

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

**SYNTHESE ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE
D'IMIDAZOLIDIN-2-ONES ET D'ANALOGUES
A POTENTIALITES IMMUNOSUPPRESSIVES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE
Discipline : Pharmacie
Spécialité : Pharmacochimie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Caroline SABOURIN

Le 12 juillet 2007, devant le jury ci-dessous :

Président : M. Jean-Daniel BRION, Professeur, UMR CNRS 8076, Université de Paris XI

Rapporteurs : M. Jean-Daniel BRION, Professeur, UMR CNRS 8076, Université de Paris XI
Mme Julie DECHANET, Directrice de recherche, UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux

Examineurs : M. Marc BONNEVILLE, Directeur de recherche, INSERM U601, Nantes
M. Olivier DUVAL, Professeur, Université d'Angers

Directeur de thèse : M. Jean-Michel ROBERT, Professeur, Université de Nantes
Co-directeur de thèse : M. Emmanuel SCOTET, Chargé de recherche, INSERM U601, Nantes

AVANT-PROPOS

Ce travail a été financé par la Région des Pays de la Loire. Il s'est déroulé au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Chimie Thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Nantes, en collaboration avec le Département de Recherche en Cancérologie de l'Unité INSERM U601.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION GENERALE	
A- INTRODUCTION	13
B- L'ALLOGREFFE	15
I- DEFINITION	15
II- BASES IMMUNOLOGIQUES DU REJET D'ALLOGREFFE	15
C- LES DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOSUPPRESSEURS UTILISES EN TRANSPLANTATION	31
I- GENERALITES	31
II- LES CORTICOÏDES	31
III- LES ANTICALCINEURINES : INHIBITEURS DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES	35
IV- INHIBITEURS DES REPONSES LEUCOCYTAIRES AUX CYTOKINES	38
V- LES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE D'ADN	42
D- INCONVENIENTS DES TRAITEMENTS ACTUELS	49
E- LES NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE	50
I- GENERALITES	50
II- LES AGENTS ENTRAÎNANT UNE DEPLETION DES LYMPHOCYTES T	51

III- LES AGENTS BLOQUANT LES SIGNAUX DE CO-STIMULATION DES CELLULES T	51
IV- LES AGENTS BLOQUANT LES MOLECULES D'ADHESION OU ACCESSOIRES DES CELLULES T	53
V- LE FTY720 (FINGOLIMOD) : INHIBITEUR DU TRAFIC LYMPHOCYTAIRE	53
VI- I- LES AGENTS ENTRAÎNANT UNE DEPLETION DES LYMPHOCYTES B	55
VII- LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE DES CYTOKINES	55
PREMIERE PARTIE	
INTRODUCTION	57
A- INTRODUCTION	58
B- PHARMACOMODULATIONS ENVISAGEES	59
ETUDE CHIMIQUE	62
A- AMINES INTERMEDIAIRES : DERIVES DE LA 3-FLUOROANILINE	63
I- TRAVAUX REALISES	63
II- PARTIE EXPERIMENTALE	66
B- AMINES INTERMEDIAIRES : 4- ET 5-AMINO-1H-ISOINDOLE-1,3(2H)-DIONES	75
I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : METHODE DE SYNTHESE DES PHTALIMIDES N-SUBSTITUES	75
II- TRAVAUX REALISES	81
III- PARTIE EXPERIMENTALE	83
C- AMINES INTERMEDIAIRES : 1,1'-BIPHENYLAMINES	87
I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : ARYLATION DE SUZUKI	88
II- TRAVAUX REALISES	92
III- PARTIE EXPERIMENTALE	96
D- SERIE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES	102

I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : VOIES D'ACCES AUX UREES CYCLIQUES	102
II- TRAVAUX REALISES	109
III- PARTIE EXPERIMENTALE	119
E- SERIE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1<i>H</i>)-ONES	141
I- TRAVAUX REALISES	141
III- PARTIE EXPERIMENTALE	144
ETUDE STRUCTURALE	148
A- SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE	149
B- RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON	168
C- RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU CARBONE	198
ETUDE PHARMACOCHEMIE	213
A- INTRODUCTION	214
B- MATERIELS ET METHODES	215
I- MOLECULES TESTEES	215
II- TEST DE PROLIFERATION DE SPLENOCYTES MURINS A LA CONCANAVALINE A	215
III- TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE A LA PHYTOHEMAGGLUTININE A	217
IV- MODELE D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE	218
V- TEST DE CYTOTOXICITE SUR MRC5	219
VI- STATISTIQUES	220
C- RESULTATS - DISCUSSION	221
I- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T : TESTS A LA CONA ET A LA PHA	221
II- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA REACTION DE DTH	234

III- MESURE DE LA CYTOTOXICITE SUR DES FIBROBLASTES HUMAINS (MRC5)	235
D- CONCLUSION - PERSPECTIVES	236

DEUXIEME PARTIE

A- INTRODUCTION	240
B- DESCRIPTION DU MODELE D'ETUDE UTILISE	241
C- MATERIELS ET METHODES	246
I- MOLECULES TESTEES ET REACTIFS	246
II- ANTICORPS ET CYTOMETRIE	246
III- OBTENTION DES CELLULES ET CULTURE	247
IV- ETUDE D'UN MARQUEUR APOPTOTIQUE PRECOCE : L'APO2.7	248
V- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T	249
VI- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE T	252
VII- ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR LE TCR PAR WESTERN BLOT	255
D- RESULTATS	261
I- ETUDE D'UN MARQUEUR APOPTOTIQUE PRECOCE : L'APO2.7	261
II- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T	263
III- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE T	268
IV- ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR LE TCR PAR WESTERN BLOT	272

D- DISCUSSION	278
E- CONCLUSION - PERSPECTIVES	283
BIBLIOGRAPHIE	284
ANNEXES : Publications	323

ABBREVIATIONS

ADCC	: Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADP	: Adénosine diphosphate
AMM	: Autorisation de mise sur le marché
AMP	: Adénosine monophosphate
Ar	: Aromatique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
BCA	: Acide bicinchonique
BLCL	: B lymphoblastoid cell lines
BrHPP	: Bromohydrine pyrophosphate
BSA	: Bovine serum albumin
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CD	: Cluster de différenciation
CDCl ₃	: Deutériochloroforme
CDI	: <i>N,N'</i> -carbonyldiimidazole
CDK	: Cyclin dependent kinase
CFSE	: 5-(et 6-)-carboxyfluoresceindiacetate, succinimidyl ester
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	: Concanavaline A
COX	: Cyclooxygénase
CPA	: Cellules présentatrices d'antigène
CRAC	: Ca ²⁺ -release-activated- Ca ²⁺
CsA	: Cyclosporine A
CSFs	: Facteurs stimulant la formation des colonies
CTL	: Cytotoxic T lymphocyte
δ	: Déplacement chimique exprimé en parties par million (ppm)
d	: Doublet
dd	: Doublet dédoublé
ddd	: Doublet de doublets dédoublé
DAG	: Diacylglycérol
DAPCy	: <i>trans</i> -diacétatebis(dicyclohexylamine)palladium
dGTP	: Désoxyguanosine triphosphate

DMF	: Diméthylformamide
DMSO-d ₆	: Diméthylsulfoxyde hexadeutérié
DOXP	: 1-désoxy-D-xylose-5-phosphate
DTH	: Delayed type hypersensitivity
EBV	: Epstein Barr virus
ERK	: Extracellular signal-regulated protein kinase
F°C	: Points de fusion exprimés en degrés Celsius
Fc	: Fragment constant (des immunoglobulines)
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FKBP	: FK-binding protein
GAP	: GTPase-activating protein
GDP	: Guanosine diphosphate
GEF	: Guanylnucleotide exchange factors
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GMP	: Guanosine monophosphate
Grb2	: Growth factor receptor-bound protein 2
GRE	: Glucocorticoid response element
GTP	: Guanosine triphosphate
GVH	: Graft versus host
GVHD	: Graft versus host disease
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HDMAPP	: 4-Hydroxydiméthylallylpyrophosphate
HGPRTase	: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HLA	: Human leucocyte antigen
hsp90	: Heat shock protein 90
HSR	: Hypersensibilité retardée
ICAM	: Intercellular adhesion molecule
IFN- γ	: Interféron- γ
Ig	: Immunoglobuline
I- κ B	: Inhibitor of NF- κ B
IL	: Interleukine
IMP	: Inosine monophosphate
IMPD	: Inosine monophosphate déshydrogénase
IP3	: Inositol 1,4,5-triphosphate

IPP	: Isopenténylpyrophosphate
IR	: Infra-rouge
ITAM	: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IUPAC	: International union of pure and applied chemistry
I.V.	: Intraveineux (se)
J	: Constante de couplage (exprimée en Hertz)
Jak	: Janus kinase
JNK	: c-Jun NH ₂ -terminal kinase
LAK	: Lymphokine-activated killer cell
LAT	: Linker for activation of T cells
LFA-1	: Lymphocyte function-associated antigen-1
m	: Multiplet
MAP kinase	: Mitogen-activated protein kinase
mfi	: Mean fluorescence intensity
MLR	: Mixed leucocytes reaction
MMF	: Mycophénolate mofétil
MPA	: Acide mycophénolique
M_r	: Masse molaire
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
MTT	: Méthyltétrazolium
NF-AT	: Nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	: Nuclear factor κ B
NK	: Natural killer
PAF	: Platelet activating factor
PBL	: Peripheral blood lymphocytes
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cells
PBS	: Phosphate buffer solution
Pd/C	: Palladium sur charbon
PHA	: Phytohémagglutinine A
PI3K	: Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PKC	: Protéine kinase C
PLA-2	: Phospholipase A2
PLC γ 1	: Phospholipase C γ 1

PRPP	: Phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PTK	: Protéines tyrosine kinases
RAPA	: Rapamycine
RasGRP	: Ras guanylnucleotide-releasing protein
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
s	: Singulet
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SLP-76	: SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
Sol. Rec.	: Solvant de recristallisation
Sos	: Son on sevenless
S1P	: Sphingosine-1-phosphate
SVF	: Sérum de veau fœtal
t	: Triplet
TA	: Température ambiante
TCR	: T cell antigen receptor
Th	: Lymphocyte T helper
THF	: Tétrahydrofurane
TNF	: Tumor necrosis factor
UV	: Ultra-violet
ν_s	: Fréquence de vibration en cm^{-1}
ν_{as}	: Fréquence de vibration asymétrique en cm^{-1}
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
VLA	: Very late antigen
ZAP-70	: Protéine associée à zêta

INTRODUCTION GENERALE

A- INTRODUCTION

Les immunosuppresseurs sont des médicaments utilisés pour lutter contre des réactions immunitaires indésirables ou pathologiques. Ils sont principalement indiqués dans le domaine des transplantations pour traiter et/ou prévenir le rejet aigu d'allogreffe. Ils peuvent également être utilisés en seconde intention dans le traitement de certaines maladies auto-immunes telles que le diabète de type I (YANG, 2003), le lupus érythémateux (SOLSKY, 2002), la polyarthrite rhumatoïde (HERRMANN, 2000 - ALARCON, 2000) ou le psoriasis (EPINETTE, 1987). Néanmoins, leur très forte toxicité limite leur utilisation dans ces indications à des formes particulièrement invalidantes ou résistantes aux traitements classiques. Pour cette raison, nous nous intéresserons donc essentiellement dans cet ouvrage à leur application en transplantation.

La transplantation est actuellement la thérapie de choix dans les derniers stades d'insuffisance rénale, cardiaque, hépatique et pulmonaire. La greffe de pancréas apporte des bénéfices similaires aux patients diabétiques. Les immunosuppresseurs sont indispensables à la réussite d'une allogreffe. En leur absence, le receveur de la greffe rejette inéluctablement le greffon. La découverte de la cyclosporine A, dans un premier temps, et d'autres nouveaux agents immunosuppresseurs (ex : tacrolimus, rapamycine, évérolimus et mycophénolate mofétil) ainsi que les progrès réalisés dans le domaine chirurgical ont transformé les transplantations en technique de routine avec d'excellents taux de survie du greffon et du patient à court terme (1 à 3 ans) (<http://test.efg.ddo.net>). Néanmoins, ce succès est nuancé par différents problèmes. Premièrement, les taux de survie du greffon à long terme (c'est à dire au-delà de 5 ans) restent médiocres (MEIER-KRIESCHE, 2004 - <http://test.efg.ddo.net>) ce qui est expliqué en partie par le fait que les immunosuppresseurs utilisés en cliniques sont très actifs dans la prévention et le traitement des rejets aigus mais peu efficaces sur la survenue des rejets chroniques responsables à terme de la perte du greffon. De plus, les thérapeutiques actuelles n'induisent pas un état de tolérance de l'hôte à l'égard de l'organe greffé ce qui nécessite l'emploi, de façon continue, de molécules immunosuppressives, responsables de la survenue de nombreux effets indésirables (ex : maladies cardiovasculaires, néphrotoxicité, infections opportunistes, lymphomes et cancers) qui peuvent parfois mettre en péril la survie du greffon et/ou du patient.

La recherche de nouvelles voies thérapeutiques s'avère donc nécessaire afin de développer des composés moins toxiques ayant des mécanismes d'action différents de ceux des molécules actuellement commercialisées, leur permettant d'élargir leur spectre d'activité au traitement des rejets chroniques ou de favoriser l'induction d'un état de tolérance.

La première partie de ce travail décrit la synthèse chimique d'une série de molécules de structure imidazolidin-2-one ou tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one et l'évaluation pharmacologique de leurs potentialités immunosuppressives.

La seconde partie de cet ouvrage est consacrée à l'étude pharmacologique plus approfondie d'une molécule chef de file, l'imidazolidinone **68**.

B- L'ALLOGREFFE

I- DEFINITION

Une allogreffe est un don d'organe (s), de tissu ou de cellules entre deux individus génétiquement différents de même espèce (ou "allogéniques"). C'est la situation la plus fréquente en clinique. Elle nécessite obligatoirement la mise en place d'un traitement immunosuppresseur chez le receveur de la greffe pour éviter un rejet du greffon provenant d'un donneur génétiquement différent.

Il existe deux types de transplantation : la transplantation cadavérique et la transplantation de donneur vivant. La transplantation cadavérique est la plus pratiquée actuellement. Le don doit être volontaire, anonyme et gratuit. Le donneur doit être âgé de moins de soixante-dix ans, dans un coma de stade IV et doit présenter deux encéphalogrammes plats à quatre heures d'intervalle sur un enregistrement d'au moins trente minutes, en l'absence de drogues sédatives. La transplantation de donneur vivant concerne principalement la transplantation rénale, mais est également envisageable en transplantation hépatique ou pulmonaire. Dans ce cas, le donneur doit être un parent proche (parents, enfants, frères et sœurs). Le (ou la) conjoint (e) peut également être donneur en cas d'urgence.

II- BASES IMMUNOLOGIQUES DU REJET D'ALLOGREFFE

Les lymphocytes T du receveur jouent un rôle majeur dans la survenue des rejets aigu et chronique, à la différence du rejet suraigu qui intervient dans les minutes qui suivent l'implantation du greffon et qui est dû à l'existence, chez le receveur, d'anticorps préexistants dirigés contre le greffon (KISSMEYER-NIELSEN, 1966 - VENETZ, 2007).

Les événements immunologiques responsables des rejets aigu et chronique d'une allogreffe peuvent se diviser en deux phases : la phase de sensibilisation et la phase effectrice.

1- La phase de sensibilisation

1.1- Les mécanismes de la reconnaissance allogénique

La reconnaissance par les cellules T d'un alloantigène par leur récepteur pour l'antigène (ou TCR, "T cell antigen receptor") est la première étape dans le processus amenant au rejet de l'allogreffe. Il existe ainsi deux types d'alloantigènes.

Les plus importants sont ceux codés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur. Le rôle physiologique des molécules du CMH est de présenter des peptides aux lymphocytes T. Une cellule T reconnaît ainsi un seul type de peptide, modifié ou d'origine microbienne, associé à une molécule de CMH ce qui induit une réponse immunitaire adaptée. Néanmoins, une très grande proportion de lymphocytes T (entre 0,1 et 10%) sont capables de se lier directement et de répondre à des molécules du CMH allogéniques (SUCHIN, 2001). Ces molécules jouent donc un rôle majeur dans l'induction du rejet d'allogreffe, d'autant plus que les gènes codant pour ces molécules sont parmi les plus polymorphiques connus et possèdent des centaines d'allèles différents. Les chances de trouver un donneur, sans lien de parenté, ayant les mêmes allèles que le receveur sont donc minimes.

D'autres alloantigènes, nommés antigènes mineurs d'histocompatibilité (mH) peuvent également jouer un rôle dans l'apparition d'un rejet. Il résultent du polymorphisme de protéines dérivées du greffon non codées par le CMH (SNELL, 1948 - COUNCE, 1956).

La reconnaissance de ces antigènes peut se faire de manière directe ou indirecte (ZHUORU, 1993).

- La reconnaissance directe

Les cellules dendritiques du donneur résidant dans le greffon, nommées leucocytes passagers (figure 1), migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur 24 à 48 heures après la greffe. Au cours de cette migration, ces cellules deviennent matures et se mettent ainsi à exprimer à leur surface de nombreuses molécules de classe II du CMH allogéniques qui vont être reconnues par le TCR de nombreux lymphocytes T CD4⁺ du receveur présents au niveau des tissus lymphoïdes (figure 2) (MARRACK, 1988 – MATIS,

1987). Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent également intervenir dans ce type de reconnaissance.

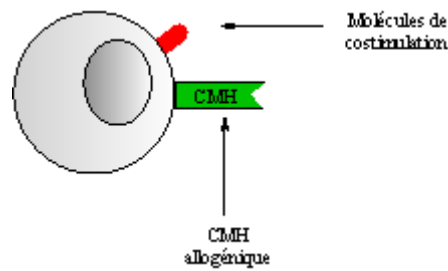


Figure 1 : Leucocyte passager du donneur (d'après MALE, 1999).

Cette forme de reconnaissance est spécifique de la réaction allogénique et représente la principale voie de présentation de l'antigène lors des premières semaines de la greffe. Ce mécanisme semble intervenir de manière dominante dans l'initiation des rejets aigus (LIU, 1993). La réaction allogénique qui en découle est violente car elle met en jeu un très grand nombre de lymphocytes T (0,1 à 10%) par rapport à la réaction obtenue en réponse à un antigène environnemental (SUCHIN, 2001).

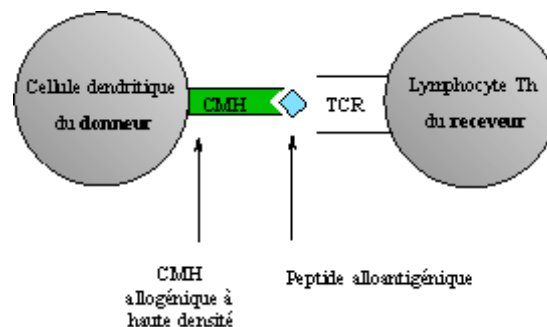


Figure 2 : Mécanisme de reconnaissance directe (d'après COLLEGE UNIVERSITAIRE DES ENSEIGNANTS EN NEPHROLOGIE, 2003).

- La reconnaissance indirecte

Avec le temps, les cellules dendritiques du donneur vont progressivement disparaître. Les cellules dendritiques du receveur vont alors intervenir. Ces dernières migrent au niveau du greffon où elles captent des molécules du CMH du donneur ou des peptides dérivés du greffon qu'elles appréhendent et présentent ensuite sous forme de peptide par l'intermédiaire de leurs molécules de classe II du CMH aux lymphocytes T helper (Th) CD4⁺ (figure 3) (SAYEGH, 1994).

Ce mode classique de présentation de l'antigène implique, contrairement à la réaction allogénique, un grand nombre de peptides allogéniques et une fréquence beaucoup plus faible de cellules T dirigées contre ces peptides. Ce mécanisme peut être responsable de rejets aigus, mais joue surtout vraisemblablement un rôle majeur au cours du processus de rejet chronique (VELLA, 1997).

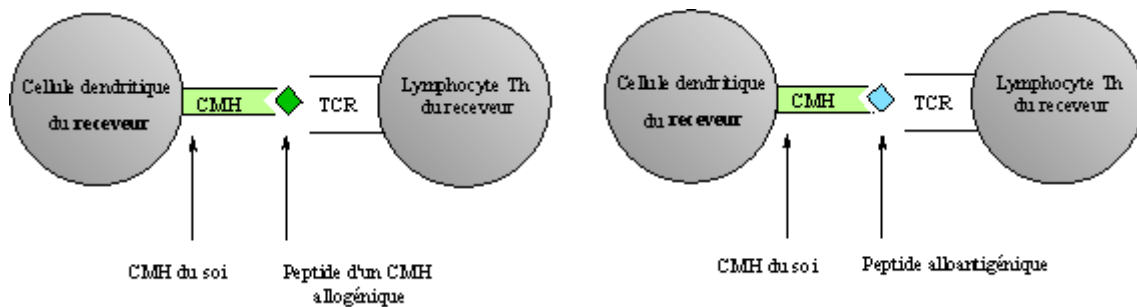


Figure 3 : Mécanismes de reconnaissance indirecte (d'après COLLEGE UNIVERSITAIRE DES ENSEIGNANTS EN NEPHROLOGIE, 2003).

1.2- L'activation lymphocytaire T

Lorsque le lymphocyte T reconnaît un alloantigène, il est activé par deux types de signaux. Cette phase d'activation est une étape nécessaire à la réaction de rejet.

- Le premier signal est déclenché suite à l'interaction entre le récepteur du lymphocyte T et le complexe CMH-peptide de la cellule présentatrice d'antigène (CPA)

Cette voie de signalisation a fait l'objet d'études très approfondies. Les informations exposées dans ce paragraphe sont issues des revues sur le sujet de Lin *et al.* (LIN, 2001) et de Acuto *et al.* (ACUTO, 2003).

Le récepteur membranaire pour l'antigène des lymphocytes T est un complexe multimoléculaire composé de deux éléments principaux: le TCR et le complexe CD3 (figure 4). Le TCR est constitué de deux chaînes α et β , liées l'une à l'autre de façon covalente par des ponts disulfures, essentiellement extracellulaires et impliquées dans la reconnaissance des complexes CMH-peptide à la surface des CPA. Il existe un autre type de TCR, moins fréquent, composé des chaînes γ et δ qui sera décrit dans la seconde partie de ce mémoire. Le TCR possède des domaines intracytoplasmiques trop courts pour permettre la transduction de

signaux intrinsèques. D'autres molécules associées de façon non covalente au TCR assurent donc les fonctions de transduction du signal : le complexe CD3 (composé de deux chaînes ϵ , d'une chaîne γ et d'une chaîne δ) et un homodimère de chaîne ζ .

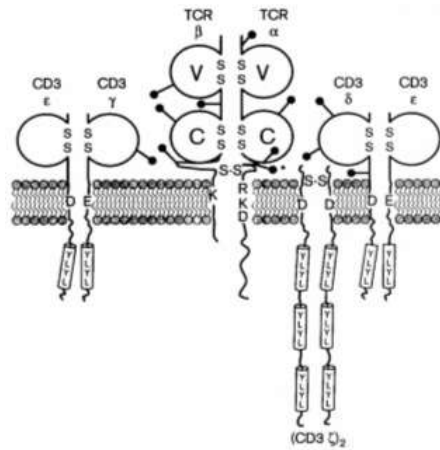


Figure 4 : Structure du complexe TCR-CD3 (image extraite de la référence : MALISSEN, 1996).

Les molécules associées au TCR (CD3 et chaînes ζ) contiennent dans leur région intracytoplasmique un motif nommé ITAM ("immunoreceptor tyrosine-based activation motif", motif permettant l'activation des immunorécepteurs *via* une tyrosine) qui est nécessaire à l'initiation des signaux précoces et tardifs au sein des lymphocytes T. Ce motif est composé d'une séquence consensus d'acides aminés, $XXYXXL(X)_{6-8}YXXL$ (où Y est un résidu tyrosine, L est un résidu leucine et X un acide aminé de n'importe quel type) (RETH, 1989 - CAMBIER, 1995). Il y a un exemplaire de ce motif dans chacune des chaînes du CD3 et 3 au sein des chaînes ζ . Suite à l'engagement du TCR, des protéines tyrosine kinases (PTK) Src nommées Lck et Fyn sont activées et phosphorylent les résidus tyrosines des motifs ITAMs (STRAUS, 1992 - GAUEN, 1994). La phosphorylation des ITAMs sur les chaînes ζ apporte des sites d'arrimage pour les domaines SH2 (Src homology 2) d'une autre PTK nommée ZAP-70 ("protéine associée à zêta") qui est présente sous forme inactive dans le cytoplasme (WANGE, 1993 - HATADA, 1995). Les domaines SH2 sont des séquences composées d'une centaine d'acides aminés, qui permettent l'association de la protéine à des tyrosines kinases phosphorylées de manière spécifique. Le recrutement de ZAP-70 au niveau des chaînes ζ , par fixation à deux tyrosines phosphorylées, est suivi de son activation par phosphorylation par Fyn et Lck (WANGE, 1995 - CHAN, 1995). ZAP-70 a pour substrat les protéines adaptatrices LAT ("linker for activation of T cells") et SLP-76 ("SH2-domain-containing leukocyte protein

of 76 kDa"). La phosphorylation sur les résidus tyrosine de LAT et SLP-76 entraîne le recrutement, au sein de complexes comportant de nombreux adaptateurs, de plusieurs protéines impliquées dans l'activation de la voie Ras, dans la mobilisation de calcium et dans la réorganisation du cytosquelette.

La phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) est une des protéines recrutées par LAT et joue un rôle critique dans la signalisation du TCR. Son activation est responsable de la libération de deux seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) par hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP_2), un phospholipide membranaire contenant de l'inositol. Le DAG active plusieurs protéines telles que les diverses isoformes de la protéine kinase C (PKC) et RasGRP ("Ras guanylnucleotide-releasing protein"). L' IP_3 se fixe sur ses récepteurs spécifiques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique entraînant le relargage des stocks de calcium du réticulum dans le cytoplasme. Cet événement provoque l'ouverture des canaux calciques CRAC (" Ca^{2+} -release-activated- Ca^{2+} ") au niveau de la membrane plasmique, permettant un influx de calcium extracellulaire. La fixation du calcium sur la calmoduline, une protéine cytoplasmique inactive, entraîne un changement de conformation de celle-ci à l'origine de son activation. Une fois activée, la calmoduline se fixe sur une protéine phosphatase cytoplasmique, nommée calcineurine, pour l'activer. La calcineurine activée va alors déphosphoryler un facteur de transcription, le NF-AT ("nuclear factor of activated T cells"), ce qui va induire sa migration du cytoplasme vers le noyau. La PKC activée phosphoryle, quant à elle, la protéine I- κB ("inhibitor of NF- κB ") qui sera par la suite ubiquitinylée et dégradée. Cette protéine forme, dans des conditions normales, un complexe avec un autre facteur de transcription, le NF- κB , ce qui le retient dans le cytoplasme. Après phosphorylation, le I- κB libère le NF- κB qui est alors transporté dans le noyau. Une fois dans le noyau, les facteurs de transcription NF-AT et NF- κB se fixent sur les régions promotrices de gènes et coopèrent pour induire la transcription de différents gènes d'activation précoce. Parmi ceux-ci, figurent des gènes de cytokines dont celui de l'interleukine 2 (IL-2), facteur de croissance majeur des lymphocytes T, et le gène de la chaîne inductible α du récepteur à l'IL-2.

Un autre groupe de protéines interagissant avec LAT sont les protéines de la famille Grb2 (Grb2, Grap et Gads). Ces protéines se lient à LAT lorsqu'il est phosphorylé sur ses résidus tyrosine par leurs domaines SH2. Elles possèdent également un domaine SH3 qui est une séquence, d'environ 50 acides aminés, capable de se lier à une séquence riche en prolines et en acides aminés hydrophobes présente sur une autre protéine. Grb2 ("Growth factor

receptor-bound protein 2"), lié à LAT par un domaine SH2, s'associe au facteur d'échange Sos ("son on sevenless"), par ses deux domaines SH3, pour entraîner l'activation d'une protéine G monomérique de la famille Ras qui intervient dans l'activation de la voie des MAP kinases ("Mitogen-activated protein kinases").

Les protéines G monomériques de la famille Ras sont régulées par des facteurs d'échange qui permettent à la protéine de passer d'une forme inactive fixant du GDP (Ras-GDP) à une forme activée se liant à du GTP (Ras-GTP) ou l'inverse. Les GAPs ("GTPase-activating protein") augmentent l'activité GTPasique de Ras et favorise le passage à la forme inactive tandis que les GEFs ("guanylnucleotide exchange factors") accélèrent le décrochage du GDP de Ras permettant au GTP de se lier et d'entraîner l'activation de Ras (BOGUSKI, 1993). Roose *et al.* ont ainsi démontré, qu'au sein du lymphocyte T, l'activation de Ras suite à une activation TCR pouvait se faire de deux façons par le biais de deux RasGEF différents : Sos et RasGRP1 (ROOSE, 2005) (figure 5). L'activation par Sos implique la formation d'un complexe phospho-LAT-Grb2-Sos qui amène Sos à proximité de Ras-GDP ancrée à la membrane plasmique. Le deuxième mode d'activation de Ras fait intervenir la génération de DAG par la PLC γ suite à une stimulation TCR. Le DAG recrute la PKC- θ et la RasGRP1 à la membrane par leur domaine C1. Certaines isoformes de PKC phosphorylent alors RasGRP1 ce qui augmente son activité GEF et lui permet de convertir le Ras-GDP en Ras-GTP actif.

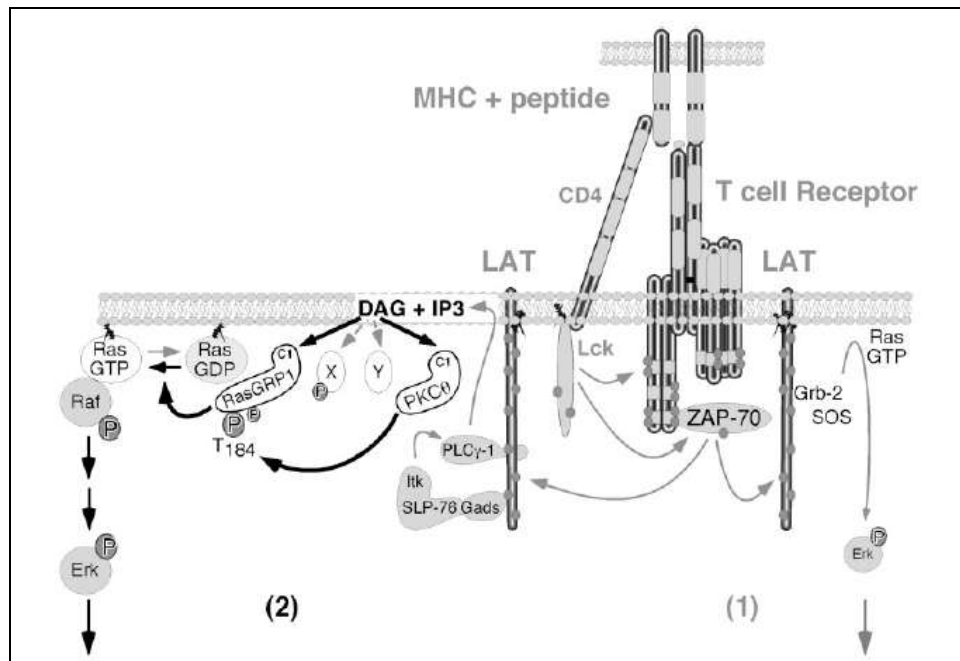


Figure 5 : Les deux voies d'activation de Ras-Raf-ERK induites par l'activation TCR au sein du lymphocyte T (image extraite de la référence : ROOSE, 2005)

Ras, sous sa forme active, se fixe à une sérine-thréonine kinase, Raf, et la recrute à la membrane plasmique où elle est ensuite phosphorylée (MORRISON, 1997). Raf active alors des tyrosine-thréonine kinases nommées MEK 1 et MEK 2 (ENGLISCH, 1999 - ROBINSON, 1997 - COBB, 1995) qui vont activer par phosphorylation les kinases ERK-1 et ERK-2 ("extracellular signal-regulated protein kinases 1 et 2"). Ces deux kinases vont alors activer le facteur de transcription Elk-1. Ras peut également activer une MAP kinase kinase kinase nommée MEKK1 qui phosphoryle alors les MAP kinases kinases MKK3 et MKK6, responsable de l'activation de la p38 MAP kinase, (ONO, 2000 - LIN, 2001) ainsi que les MAP kinases kinases MKK4 et MKK7 qui activent les JNK (c-Jun NH₂-terminal kinases). La p38 MAP kinase active le facteur de transcription ATF-2 et les JNK le facteur Jun.

Les ERK kinases agissent en régulant l'expression de c-fos, par le facteur de transcription Elk-1. La p38 MAP kinase et les JNK régulent l'expression des protéines c-jun, respectivement par les facteurs ATF-2 et Jun. C-fos et c-jun sont les deux composants du facteur de transcription AP-1 qui collabore avec d'autres facteurs de transcription tels que le NFAT et le NFκB pour induire la transcription de nombreux gènes d'activation précoce au sein de la cellule T activée.

Le deuxième substrat d'intérêt de ZAP-70 est SLP-76. SLP-76 fonctionne comme une protéine adaptatrice pouvant lier plusieurs molécules effectrices qui peuvent être recrutées près de LAT. Suite à l'engagement du TCR ZAP-70 activé phosphoryle plusieurs résidus tyrosine dans la partie amino-terminale de SLP-76. Ces résidus phosphorylés servent de sites de liaison pour une série de protéines contenant un domaine SH2. Il se forme un complexe multi-protéique impliqué dans la régulation d'un bon nombre de voies de signalisation critiques à l'activation de la cellule T et intervenant par exemple dans la polymérisation de l'actine (BUBECK, 1998) ou dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (PETERSON, 2001).

Ce premier signal permet également le passage de la cellule de la phase G₀ à la phase G₁ du cycle cellulaire.

- Le second signal est apporté par les molécules de co-stimulation

Le premier signal ne suffit généralement pas à entraîner l'activation du lymphocyte T. En effet, pour cela, un signal de co-stimulation est nécessaire (figure 6). En l'absence de ce signal de co-stimulation, la cellule, qui ne reçoit pas l'ensemble complet des signaux, ne se

divise pas et ne produit pas de cytokines. Elle tend même à devenir anergique, c'est à dire qu'elle devient incapable de répondre à une stimulation antigénique et pourrait entamer un processus d'apoptose (GIMMI, 1993). Les molécules de co-stimulation représentent donc actuellement des cibles intéressantes pour de nouveaux traitements immunosuppresseurs capables d'induire un état de tolérance (SAYEGH, 1998).

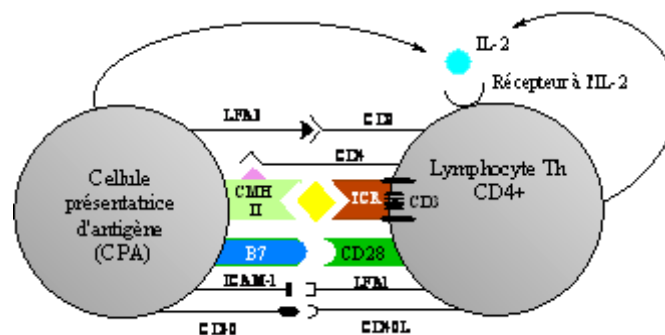


Figure 6 : L'activation lymphocytaire (d'après COLLEGE UNIVERSITAIRE DES ENSEIGNANTS EN NEPHROLOGIE, 2003).

Ce signal est déclenché après la liaison entre des molécules de co-stimulation présentes sur le lymphocyte T et leur ligand sur la CPA. Les couples de molécules les mieux caractérisés, à l'heure actuelle, sont l'association CD28/B7 (SAYEGH, 1998) et le couple CD40/CD40-Ligand (ou CD154) (DURIE, 1994 - DENTON, 1998). Le CD28 est régulé de façon négative par l'activation. A l'opposé, le CTLA-4, un autre ligand du B7, qui n'est pas exprimé sur les cellules au repos, est induit par l'activation de la cellule T. Sa liaison au B7 régule de manière négative l'activation de la cellule T ce qui entraîne l'inhibition des réponses du lymphocyte T (RILEY, 2002 - LINSLEY, 1991).

Les signaux de co-stimulation entrent en synergie avec les signaux couplés au TCR pour augmenter la production de cytokines et la prolifération des lymphocytes T activés. Le CD28 semble agir comme un amplificateur du signal médié par le TCR (ACUTO, 2003).

Enfin, il faut noter que l'activation des molécules de co-stimulation est optimisée par d'autres interactions entre des molécules accessoires d'adhésion (ou de co-stimulation) à la surface des CPA et leur ligand sur le lymphocyte T (BIERER, 1988). Parmi ces couples de molécules, ICAM-1/LFA-1 et LFA-3/CD2 interviennent dans l'adhésion entre les cellules et dans l'activation lymphocytaire. Le couple VCAM-1/VLA-4 participe, quant à lui, principalement, à l'adhésion cellulaire (BURKLY, 1991 - DAMLE, 1991).

Les deux premiers signaux coopèrent au sein du lymphocyte T pour induire la production de cytokines dont l'IL-2, l'interféron- γ (IFN- γ), le tumor necrosis factor- α (TNF- α) et l'IL-4 mais également l'expression de la chaîne inductible α du récepteur à l'IL-2, le CD25.

La fixation de l'IL-2 sur son récepteur spécifique de façon autocrine ou paracrine induit la phosphorylation de Janus kinases (Jak-1 et Jak-3) associées aux régions intracytoplasmiques des chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2. Ceci est à l'origine de la phosphorylation d'une phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et de l'activation d'une kinase dénommée mTOR ("mammalian target of rapamycin"). La mTOR induit la synthèse de protéines de progression du cycle cellulaire nommées CDK ("cyclin dependent kinases") entraînant la progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et donc leur prolifération. Cette étape nécessite la synthèse d'acides nucléiques à partir de bases puriques et pyrimidiques.

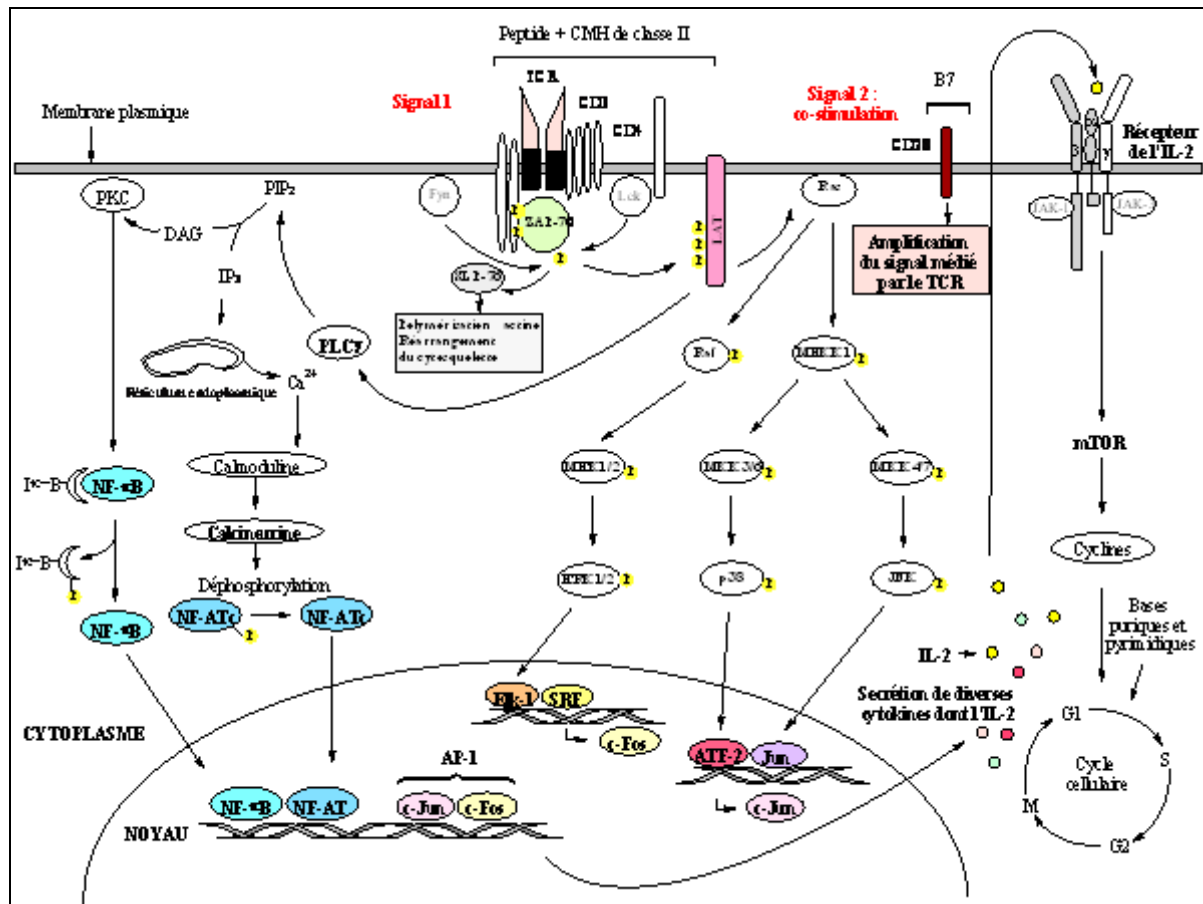


Figure 7 : Mécanismes de transduction du signal lors de l'activation antigénique du lymphocyte T (d'après BACH, 2002 et LIN, 2001).

2- La phase effectrice

- Migration de lymphocytes sensibilisés

Lors du processus de rejet aigu, les lymphocytes T alloréactifs activés, présents au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques, prolifèrent et sécrètent des cytokines qui vont être impliquées dans l'activation et la différenciation de diverses cellules effectrices (cellules T_{DTH} , lymphocytes T cytotoxiques (CTL), et lymphocytes B). Toutes ces cellules sont ensuite recrutées par des chemokines exprimées par le greffon. Elles regagnent alors le site de la greffe par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et l'infiltrant.

- Phase d'agression du greffon

Les mécanismes effecteurs à l'origine de la destruction du greffon lors d'un rejet chronique sont encore mal connus. En revanche, l'agression du greffon au cours du rejet aigu est assurée par de multiples types cellulaires spécifiques ou non et agissant par des voies différentes (figure 11).

L'infiltrat cellulaire d'un greffon en rejet aigu est composé d'environ 60 % de cellules T, en majorité des $CD8^+$ cytotoxiques, de 30 % de monocytes-macrophages, et de 10 % de cellules B, NK ("natural killer") ou LAK ("lymphokine-activated killer cell"). Les mécanismes effecteurs les plus impliqués dans le rejet aigu du greffon sont les réactions à médiation cellulaire comprenant l'hypersensibilité retardée (HSR) assurée par les cellules T_{DTH} , cellules Th intervenant dans l'HSR ou "delayed type hypersensitivity" (DTH), et la cytotoxicité médiée par les CTL (LOWRY, 1983 - LOWRY, 1985, NANISHI, 1980 – MASON, 1988).

L'hypersensibilité retardée ou de type IV comporte deux phases : une phase de sensibilisation et une phase effectrice (Figure 8). Lors de la phase de sensibilisation, l'antigène (dans le cas de la transplantation, l'alloantigène) est présenté aux cellules $CD4^+$ Th (Th1) par les CPA *via* les molécules de classe II du CMH, comme décrit précédemment. Les cellules Th $CD4^+$ ainsi activées vont alors proliférer et se différencier en cellules T effectrices de l'HSR mémoire (T_{DTH} mémoire). La phase effectrice est déclenchée lorsque la cellule T_{DTH} réalise un second contact avec l'antigène. Elle sécrète alors de nombreuses cytokines qui attirent et activent les macrophages et les neutrophiles inflammatoires non spécifiques. Ces

cellules présentent une activité phagocytaire augmentée et libèrent une grande quantité d'enzymes lytiques provoquant une réponse inflammatoire locale ainsi que des dommages tissulaires importants au niveau du greffon (CHER, 1987).

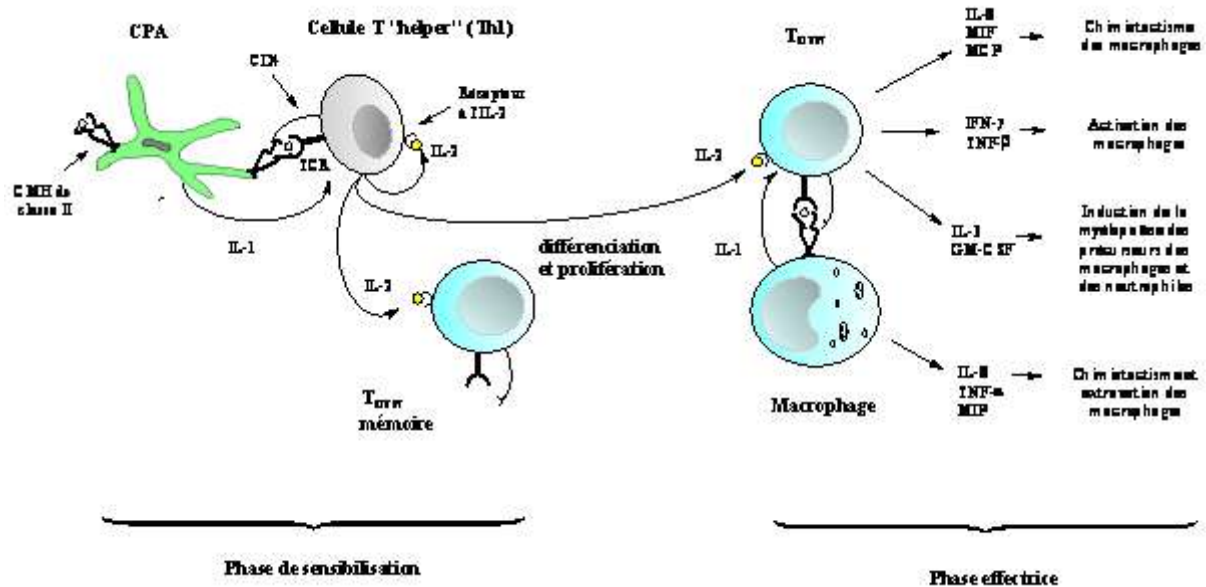


Figure 8 : Mécanismes de l'hypersensibilité de type IV (d'après l'ouvrage KATZUNG, 2000).

De plus, parmi les cytokines sécrétées pendant la phase effectrice, on retrouve le TNF- β et l'IFN- γ . Le TNF- β a un effet cytotoxique direct sur les cellules d'une greffe (SARIN, 1995). De plus, ces deux cytokines favorisent le rejet de la greffe en induisant une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et/ou de classe II à la surface des cellules du greffon favorisant ainsi l'attaque de celles-ci par les lymphocytes cytotoxiques (CTL) (GOBIN, 1999 - ELJAAFARI, 2006).

La reconnaissance des alloantigènes à la surface du greffon par les CTL peut conduire à une mort médiée par les CTL. Cette cytotoxicité est réalisée par plusieurs mécanismes.

Le premier est représenté par le système perforine/granzyme (SMYTH, 1995). Le CTL libère le contenu de ses granules comprenant la perforine et le granzyme B en direction de la cellule cible. La perforine est une molécule capable de se polymériser dans la membrane de la cellule cible pour former un canal permettant à une protéase, nommée granzyme B, de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Le granzyme va alors activer des enzymes nommées caspases impliquées dans l'apoptose. La lymphotoxine α (ou TNF- β) sécrétée par les cellules T peut également être à l'origine de l'induction de la mort cellulaire.

Le second système est celui du Fas (ou CD95) /Fas ligand (ou CD95L). Le Fas est exprimé à la surface de nombreuses cellules. Sa liaison avec son récepteur spécifique, le CD95L, situé au niveau de la membrane des lymphocytes T induit la mort de la cellule cible par apoptose (figure 9) (HANABUCHI, 1994 - ROUVIER, 1993).

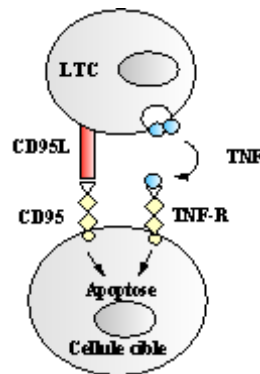


Figure 9 : Apoptose induite par le système Fas/ Fas-L (d'après l'ouvrage MALE, 1999).

D'autres réactions interviennent également de manière minoritaire : la lyse par un anticorps associé au complément et la destruction par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (LIGHTBODY, 1974).

Certaines cellules, comme les cellules NK ou les macrophages, possèdent des récepteurs capables de fixer le fragment constant (Fc) des immunoglobulines. Lorsqu'un anticorps reconnaît un antigène à la surface d'une cellule, il peut être fixé, par son fragment Fc, par une cellule NK ou un macrophage ce qui provoque l'activation de ces cellules. Elles se mettent alors à libérer le contenu de leurs granules contenant des enzymes lytiques et de la perforine qui vont entraîner la lyse de la cellule (figure 10).

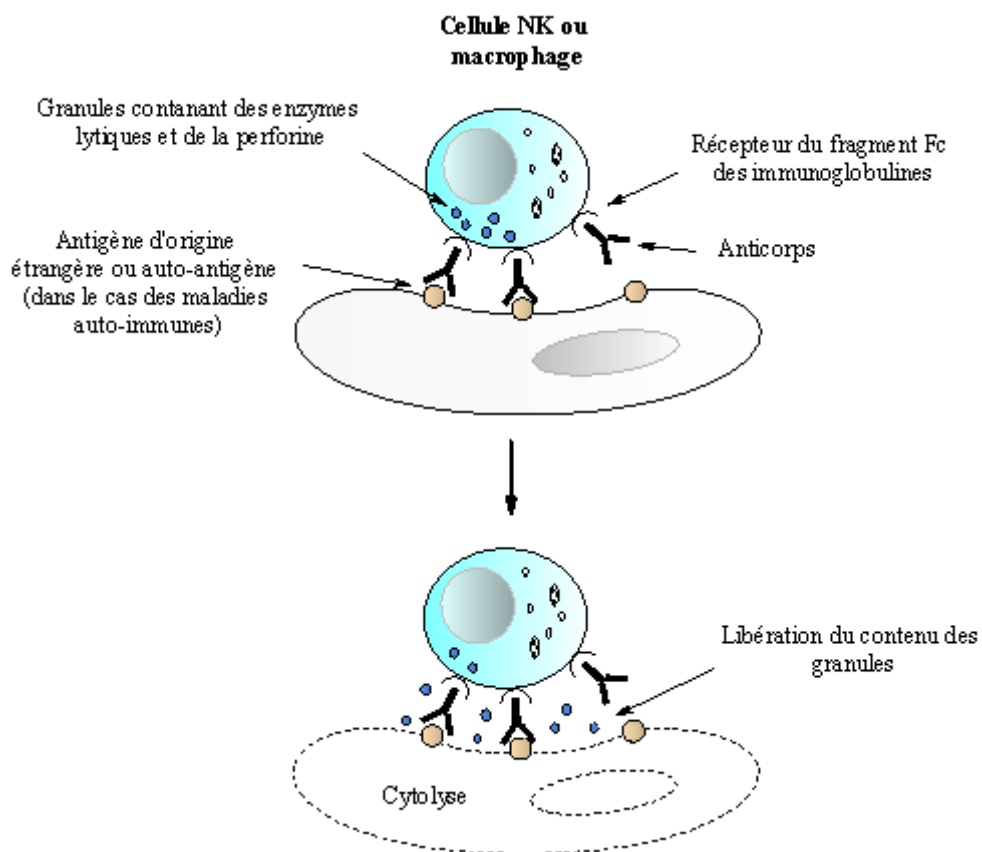


Figure 10 : Mécanisme du phénomène d'ADCC ("cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps") (d'après l'ouvrage BACH, 2002).

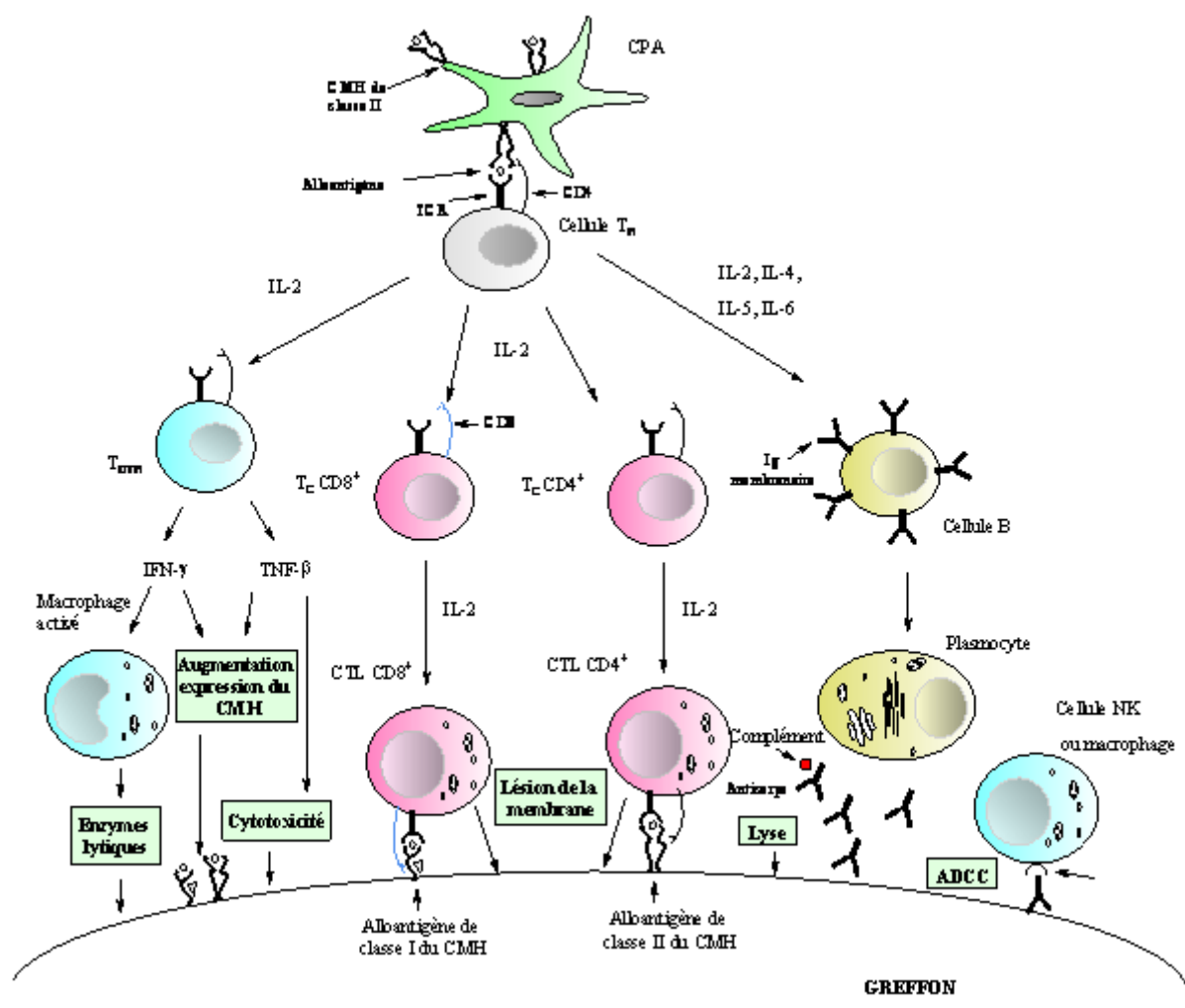


Figure 11 : Mécanismes effecteurs impliqués dans le rejet aigu d'allogreffe
(d'après l'ouvrage GOLDSBY, 2000).
ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ; CPA : cellule présentatrice d'antigène.

C- LES DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOSUPPRESSEURS UTILISES EN TRANSPLANTATION

I- GENERALITES

Il est difficile d'établir une classification des immunosuppresseurs car ces molécules se caractérisent par une grande diversité structurale. De plus, ces composés ont des cibles très variées et exercent souvent leur activité par le biais de plusieurs mécanismes.

Il existe diverses classifications envisageables : suivant leur processus de fabrication (ex : fermentation microbienne, synthèse organique, héli-synthèse à partir de produits naturels) ou selon leur mécanisme d'action.

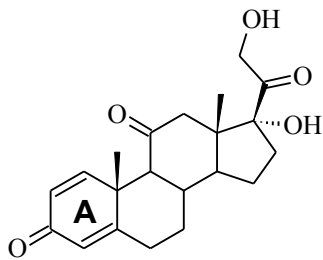
La classification choisie ici repose sur le type de mécanisme d'action principal et permet de définir quatre grands groupes de molécules : les corticoïdes, les inhibiteurs de la production de cytokine (anticalcineurines), les inhibiteurs des réponses leucocytaires aux cytokines et les inhibiteurs de la synthèse d'ADN (principalement les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des purines).

II- LES CORTICOÏDES

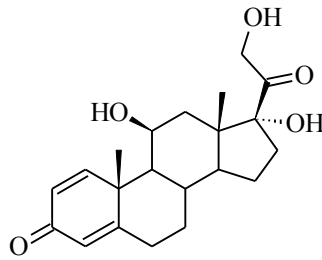
Cette classe regroupe principalement les glucocorticoïdes. Au sein de cette famille, les molécules les plus utilisées en transplantation sont la prednisone, la prednisolone et la méthylprednisolone. Ce sont des dérivés de synthèse possédant une double liaison en position 1-2 du cycle A (cf. structure de la prednisone) ce qui augmente leur activité anti-inflammatoire.

Le bénéfice thérapeutique qu'ils apportent n'est pas nécessairement la conséquence d'une immunosuppression et s'expliquerait, dans certains cas, uniquement par leur activité anti-inflammatoire puissante.

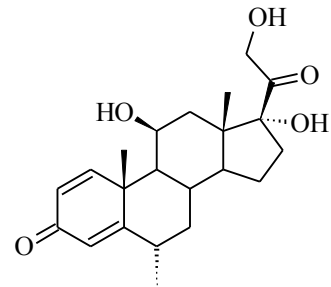
1- Structure et métabolisme des principaux corticoïdes utilisés en transplantation



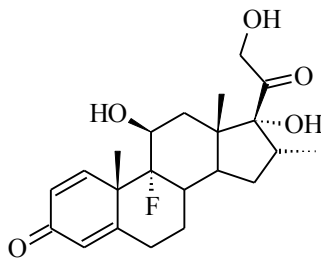
Prednisone
Cortancyl®



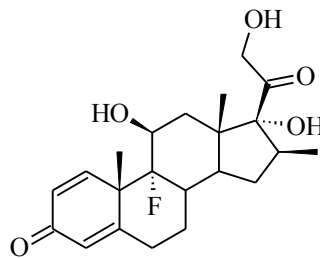
Prednisolone
Hydrocortancyl®
Solupred®



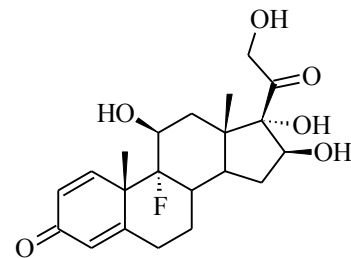
Méthylprednisolone
Méthylprednisolone®
Médrol®, Solumédrol®
Depo-médrol®



Dexaméthasone
Decadron®
Soludecadron®
Dectancyl®
Dexaméthasone®



Betaméthasone
Celestene®, Betnesol®
Diprostene®



Triamcinolone
Kenacort-retard®

Leur métabolisme est principalement hépatique. Ils sont éliminés par voie rénale sous la forme de 17-cétostéroïdes conjugués stables.

2- Mécanisme d'action

Ces molécules agissent en se fixant sur leur récepteur spécifique intracytoplasmique qui existe sous deux formes : activée et non activée. La forme non activée ou de repos est un complexe moléculaire composé par le récepteur des corticoïdes associé à des protéines intracellulaires dont la protéine hsp90 ("heat shock protein 90") et une immunophiline, qui bloquent le site de fixation des corticoïdes. Lorsque le corticoïde pénètre dans la cellule, il se

fixe au récepteur sur son domaine de fixation entraînant ainsi la libération du complexe moléculaire constitué par hsp90 et l'immunophiline. Puis, le récepteur se dimérise et est phosphorylé ce qui entraîne sa translocation vers le noyau où il va exercer son action sur l'ADN. En effet, les récepteurs des corticoïdes possèdent dans leur structure un domaine "zinc finger" (figure 1) qui leur permet de reconnaître certaines séquences localisées au niveau des promoteurs de certains gènes appelées "glucocorticoid response element" (GRE) et de s'y intercaler ce qui entraîne une modification de configuration de la molécule d'ADN à l'origine d'une modulation positive ou négative de la transcription de ces gènes. Ces récepteurs agissent donc comme des facteurs cytoplasmiques de régulation de la transcription (SLATER, 1986).

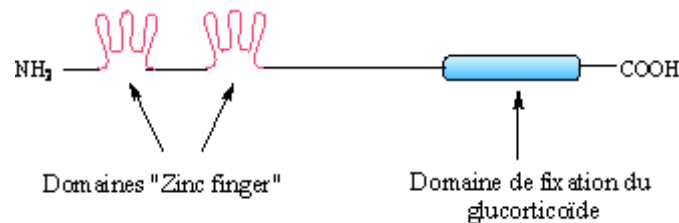


Figure 1 : Structure du récepteur intracytoplasmique des corticoïdes

Parmi les gènes dont la transcription est induite par les corticoïdes, on retrouve celui codant pour la protéine I- κ B qui fixe le facteur de transcription NF κ B et le maintient dans le cytoplasme l'empêchant ainsi d'exercer son activité au niveau du noyau. Cette inactivation du NF κ B est à l'origine de nombreux effets des corticoïdes puisqu'il favorise la transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des molécules comme la cyclooxygénase-2 (COX-2), la Phospholipase A2 (PLA-2) et de nombreuses cytokines (SCHEINMAN, 1995). Les corticoïdes inhibent ainsi la transcription et/ou la synthèse de nombreuses interleukines qui participent directement à la réaction inflammatoire (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α) et de l'IL-2 nécessaire à la prolifération lymphocytaire qui intervient lors du rejet de greffe. Ils diminuent également la production d'interféron- γ (IFN- γ).

Les corticoïdes induisent également la synthèse d'une autre protéine régulatrice, la lipocortine 1, qui va bloquer l'action de la PLA-2 au niveau de la membrane plasmique en protégeant les phospholipides membranaires de son action (ROTHHUT, 1983). Ce dernier effet est à l'origine du blocage de la production de médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les leucotriènes et le PAF-acether ("platelet activating factor") à partir de l'acide arachidonique provoquant un effet anti-inflammatoire marqué.

Les cibles des corticoïdes sont les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.

Parmi les lymphocytes activés engagés dans la réponse immunitaire, les lymphocytes cytotoxiques et les lymphocytes producteurs d'IL-2 sont particulièrement sensibles aux corticoïdes, expliquant en partie l'efficacité importante de ces molécules dans le rejet de greffe. De plus, les stéroïdes entraînent une lymphocytopenie portant surtout sur les cellules T qui résulte de deux mécanismes. D'une part, ils génèrent l'apoptose de ces cellules et de l'autre, ils entraînent une redistribution des lymphocytes circulants vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette diminution des lymphocytes circulants, importants dans l'initiation de la réaction immunitaire, explique également l'effet immunosuppresseur de ces molécules.

Ils agissent sur les macrophages et les monocytes en entraînant une monocytopenie très importante et en inhibant de nombreuses fonctions des macrophages (notamment la production de cytokines telles que IL-1, IL-6 et le TNF), des monocytes et des neutrophiles (diminution de leur réponse chimiotactique et de leurs activités bactéricide et fongicide sans altérer leur activité phagocytaire). Enfin, ils entraînent une très forte inhibition de la maturation des cellules dendritiques ce qui altère leur différenciation et leur capacité à présenter efficacement les antigènes aux cellules T (ROZKOVA, 2006). Cette dernière propriété joue certainement un rôle important dans leur activité immunosuppressive.

3- Indications en transplantation

Les corticoïdes ont l'avantage de posséder de nombreux sites d'action. Ils sont utilisés dans le traitement d'entretien post-greffe, à faible dose, dans la prévention du rejet aigu. Ils sont également indiqués dans le traitement du rejet aigu, en première intention, en perfusion, à forte dose, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires qui se surajoutent à leur action immunosuppressive.

Leur efficacité est néanmoins relative et leur tolérance, à court et long terme, moyenne. La tendance actuelle est donc de diminuer les doses cumulatives de corticoïdes. Des protocoles permettant d'éviter l'utilisation de corticoïdes sont actuellement en cours d'évaluation.

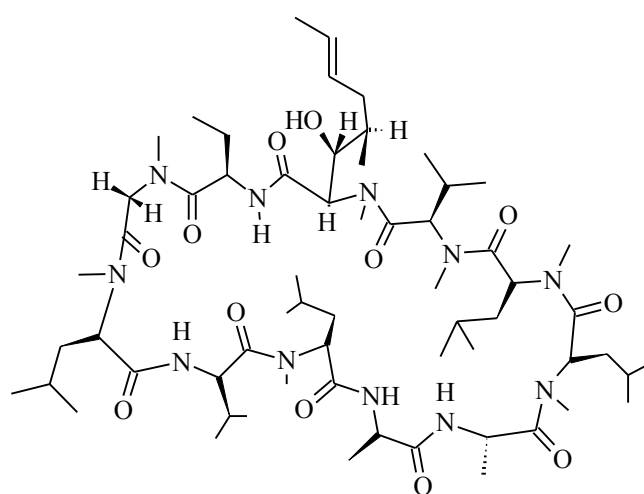
III- LES ANTICALCINEURINES : INHIBITEURS DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES

Cette famille de composés comporte deux molécules actuellement utilisées en clinique pour leurs propriétés immunodépressives : la cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506). Ces deux molécules sont des ligands des immunophilines. Bien que chimiquement non apparentées, elles ont des mécanismes d'action très proches et sont souvent regroupées sous le terme d'anticalcineurine.

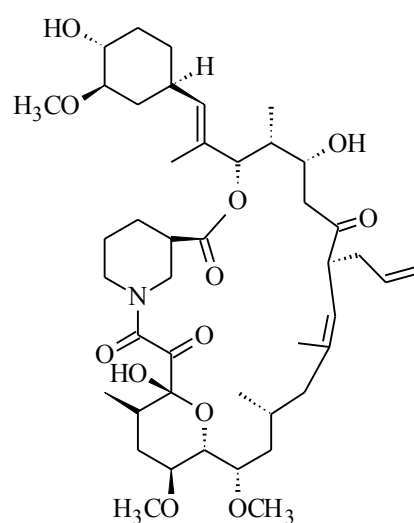
1- Structure et métabolisme

La CsA est un polypeptide antibiotique de 11 acides aminés, liposoluble et extrait du champignon *Tolypocladium inflatum*, découvert en 1976 par Borel *et al* (BOREL, 1976). Elle est fortement métabolisée par le foie, donnant naissance à plus de 30 métabolites essentiellement par la voie du CYP3A. Il existe d'importantes variabilités interindividuelles.

Le FK506 ou tacrolimus est également un métabolite d'origine fongique, de structure macrolide, isolé à partir de *Streptomyces tsukubaensis*, dont les propriétés immunosuppressives ont été mises en évidence par Kino *et al*. (KINO, 1987). Il subit également un métabolisme hépatique important (moins de 1 % est retrouvé inchangé dans les urines).



Cyclosporine A
Sandimmun[®], Néoral[®]



Tacrolimus (FK506)
Prograf[®]

2- Mécanisme d'action

Les deux molécules exercent leur activité immunosuppressive par des mécanismes d'action similaires. Elles agissent au niveau des lymphocytes Th. Du fait de leur lipophilie, elles se lient à la membrane de ces cellules par des liaisons hydrophobes non spécifiques puis se fixent toutes les deux à des immunophilines cytoplasmiques qui sont des peptidyl-prolyl-cis-transisomérases (ou rotamase) ubiquitaires et abondantes impliquées dans la stabilisation de la configuration tertiaire des protéines. La CsA se lie de manière spécifique à la cyclophiline et le FK506 à une protéine nommée FKBP ("FK-binding protein"). La fixation de la CsA et du FK506 à ces immunophilines, inhibe l'activité rotamase de ces protéines (ROSEN, 1990).

L'inhibition de l'activité rotamase n'explique pas à elle seule l'activité immunodépressive de ces molécules. En effet, les complexes CsA/cyclophiline et FK506/FKBP formés vont se fixer de manière spécifique à trois polypeptides intracellulaires : la calmoduline et les deux sous-unités d'une sérine-thréonine phosphatase calcium-dépendante cytoplasmique nommée calcineurine. Au sein de ces complexes, la cyclophiline va agir en bloquant l'activité phosphatasique de la calcineurine (LIU, 1991).

Suite à l'activation d'une cellule T, l'augmentation du calcium cytosolique générée active la calcineurine qui va se fixer à la calmoduline. Le complexe ainsi formé va alors déphosphoryler un facteur de transcription nommé NF-AT ce qui est à l'origine de la translocation de celui-ci vers le noyau où il se fixe sur certaines régions promotrices de gènes entraînant ainsi la transcription de nombreux gènes d'activation précoce du lymphocyte T.

En bloquant l'activité phosphatasique de la calcineurine, qui est spécifique des lymphocytes T, la CsA et le FK506 inhibent donc la transcription de gènes codant pour de nombreuses cytokines intervenant dans l'activation lymphocytaire T, comme l'IL-2, qui est nécessaire à la prolifération et à la différenciation des cellules T, mais également l'IL-4, le CD40L, IL-3, le GM-CSF, l'IFN- α , et l'IFN- γ . Ces produits agissent donc en interférant avec l'étape précoce d'activation du lymphocyte T (MATSUDA, 2000). Ils ont donc peu d'effet une fois que la production d'IL-2 est commencée c'est à dire lorsque la réaction immunitaire est initiée.

Des travaux ont montré que la CsA et le FK506 exercent également leur action en inhibant les voies de signalisation des Jun kinase (JNK) et de la p38 MAP kinase (MATSUDA, 2003).

La conséquence de leur action est l'inhibition de la prolifération des cellules Th CD4⁺ et de l'activation des cellules effectrices impliquées dans le rejet aigu de greffe.

Enfin, l'action moléculaire de ces produits est spécifique et réversible.

3- Indications en transplantation

La CsA est la molécule la plus ancienne de sa catégorie et présente donc de ce fait de plus nombreuses indications par rapport au tacrolimus qui est toujours l'objet d'études variées et d'essais cliniques.

La CsA est tout d'abord la molécule de choix pour la prévention et le traitement du rejet d'allogreffe d'organes et de tissus. Elle est également indiquée dans la prévention du rejet après une greffe de moelle osseuse ainsi que pour le traitement préventif ou curatif de la GVHD ("graft versus host disease").

Le tacrolimus est utilisé en transplantation sous la spécialité Prograf[®]. Il est indiqué dans la prévention du rejet de greffe lors de transplantations rénales, hépatiques ou cardiaques et le traitement du rejet rebelle aux autres thérapeutiques immunosuppressives après une transplantation d'organe.

IV- INHIBITEURS DES REPONSES LEUCOCYTAIRES AUX CYTOKINES

1- Les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2

1.1- Composition et production

Des cellules B, issues de souris préalablement immunisées avec des lymphocytes T humains et sécrétant toutes le même anticorps dirigé contre la chaîne α du récepteur à l'IL-2 des cellules T, sont fusionnées avec des cellules de myélome pour donner des hybridomes immortels, sécrétant tous le même anticorps, qui sont ensuite clonés. L'inconvénient majeur de ces anticorps est l'immunisation possible du receveur envers ces protéines d'origine animale. Pour éviter cela, des techniques de génie génétique ont été mises en œuvre permettant l'obtention d'anticorps recombinants chimériques (seule la région variable de l'anticorps est d'origine murine, le reste est d'origine humaine) ou humanisés (seule la région hypervariable de l'anticorps est d'origine murine) possédant une meilleure tolérance.

Actuellement, deux anticorps de ce type sont utilisés en thérapeutique pour lutter contre le rejet en transplantation : le basiliximab (Simulect[®]) (AMLOT, 1995) et le daclizumab (Zenapax[®]) (VICENTI, 1998). Le basiliximab est un anticorps chimérique (murin-humain de type IgG1 κ) c'est à dire que seule sa partie variable est d'origine murine, le reste de l'anticorps est d'origine humaine. Le daclizumab est un anticorps de type IgG1 recombinant humanisé. Cette caractéristique augmente sa tolérance.

1.2- Mécanisme d'action

Ces anticorps sont dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2 situé à la surface des lymphocytes T qui ont été stimulés par un antigène. Ils se comportent comme des antagonistes complets du récepteur à l'IL-2 en se fixant de manière spécifique sur la chaîne α de ce récepteur (ou antigène CD25) qui est induite après activation du lymphocyte T. Cette spécificité lymphocytaire est également appelée activité anti-Tac. Le blocage du récepteur par ces anticorps empêche la fixation de l'IL-2 sur son récepteur spécifique ce qui a pour conséquence d'inhiber la prolifération des lymphocytes T.

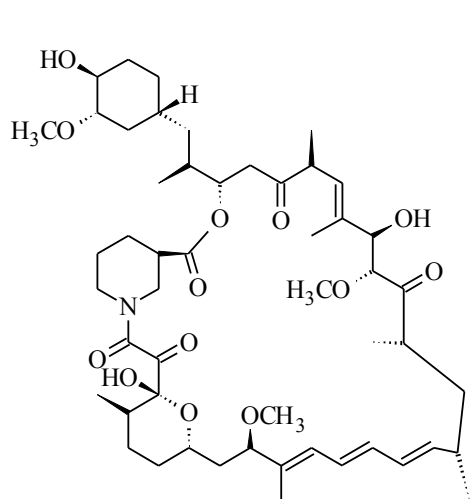
1.3- Indications

Le Zenapax[®] et le Simulect[®] sont recommandés dans la prévention du rejet aigu après transplantation rénale allogénique *de novo* en association au sein de protocoles d'immunosuppresseurs chez des patients non hyperimmunisés.

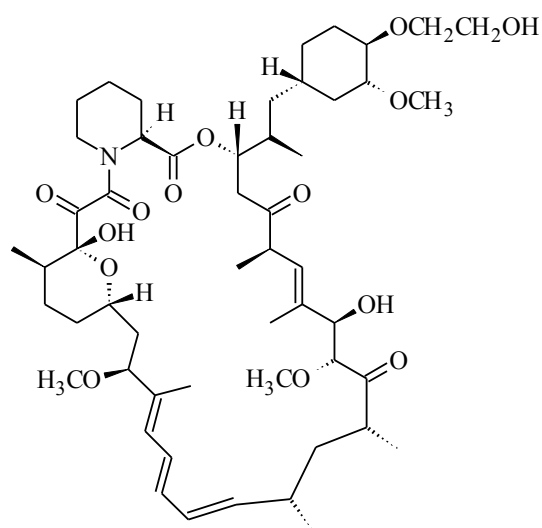
2- La rapamycine (RAPA) ou sirolimus et l'évérolimus

2.1- Structure et métabolisme

La rapamycine (ou sirolimus) est un macrolide antibiotique d'origine fongique de structure très proche de celle du FK506. Elle a été isolée en 1975 dans les bouillons de culture de *Streptomyces hygroscopicus* lors d'un screening visant à découvrir une activité antifongique (SEHGAL, 1975) et reconnue pour ses propriétés immunosuppressives en 1977 (MARTEL, 1977). L'intérêt de son utilisation pour prévenir le rejet de greffe (MORRIS, 1991) ou dans le traitement du diabète chez la souris (CARLSON, 1993) s'est manifesté dans le début des années 90. L'évérolimus a été obtenu par modification structurale de la rapamycine (SEDRANI, 1998). Ses propriétés immunosuppressives sont proches de celles du sirolimus (SCHUURMAN, 1997 - SCHULER, 1997). Ces deux molécules sont fortement métabolisées principalement par le CYP3A4.



Rapamycine (ou sirolimus), Rapamune[®]



Évérolimus, Certican[®]

2.2- Mécanisme d'action

Le sirolimus et l'évérolimus inhibent une voie de signalisation intracellulaire qui est déclenchée par la fixation de facteurs de croissance des cellules T à leurs récepteurs respectifs, et qui conduit normalement à la prolifération cellulaire. Le blocage de ce signal par ces molécules provoque un arrêt des cellules au stade G1 du cycle cellulaire.

Au niveau moléculaire, le sirolimus (S) et l'évérolimus (E) ayant une analogie structurale avec le FK506, se fixent sur la même immunophiline (le FKBP-12) au niveau du cytoplasme du lymphocyte T. Mais le complexe formé (S ou E/FKBP) n'interagit pas avec la calmoduline et la calcineurine expliquant la différence de mode d'action et d'activité immunosuppressive entre ces deux molécules et les inhibiteurs de la calcineurine.

Les données expérimentales suggèrent que le complexe S ou E/FKBP formé se lie et interfère avec la fonction d'une kinase intracellulaire nommée mTOR ("mammalian target of rapamycin") (SEHGAL, 1998 - NEUHAUS, 2001).

La mTOR est protéine régulatrice essentielle qui contrôle le métabolisme, la croissance et la prolifération cellulaire. Elle intervient dans les voies de transduction médiées par les récepteurs aux cytokines et notamment du récepteur à l'IL-2. Elle agit sur le cycle cellulaire en activant les CDK qui contrôlent le passage des cellules d'une phase à une autre du cycle cellulaire et est ainsi impliquée dans la progression des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Elle contrôle également le déclenchement de la traduction des ARNm en protéines.

La fixation, au niveau du cytoplasme des lymphocytes T, du complexe S ou E/FKBP à la mTOR entraîne son inhibition et donc le blocage de la prolifération et de la différenciation des cellules T activées dans la phase G1 du cycle cellulaire en empêchant l'entrée de ces cellules en phase S. De plus, la phosphorylation stimulée par facteur de croissance de la p70 S6 kinase est inhibée ce qui inhibe la synthèse protéique (figure 2).

Ces deux molécules agissent donc sur les lymphocytes T activés à une étape plus tardive que les molécules précédentes une fois que l'IL-2 est sécrétée. Elles exercent leur effet immunosuppresseur en inhibant la réponse proliférative à l'IL-2 et l'expansion clonale des cellules T activées par un antigène, médiées par des interleukines spécifiques de la cellule T telles que l'IL-2 et l'IL-15. Elles entraînent également une diminution de l'activation des cellules effectrices impliquées dans le rejet de greffe.

Enfin, il a été démontré que la rapamycine peut inhiber la maturation des cellules dendritiques de manière très importante, les rendant moins aptes à présenter efficacement les alloantigènes aux cellules T (QIU, 2006).

2.3- Indications

A l'heure actuelle, la rapamycine (Rapamune®) ne possède qu'une seule indication. Elle est indiquée, en association, dans la prévention du rejet de greffe d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré et recevant une transplantation rénale.

L'évérolimus (Certican®) possède la même indication mais il peut également être utilisé en transplantation cardiaque.

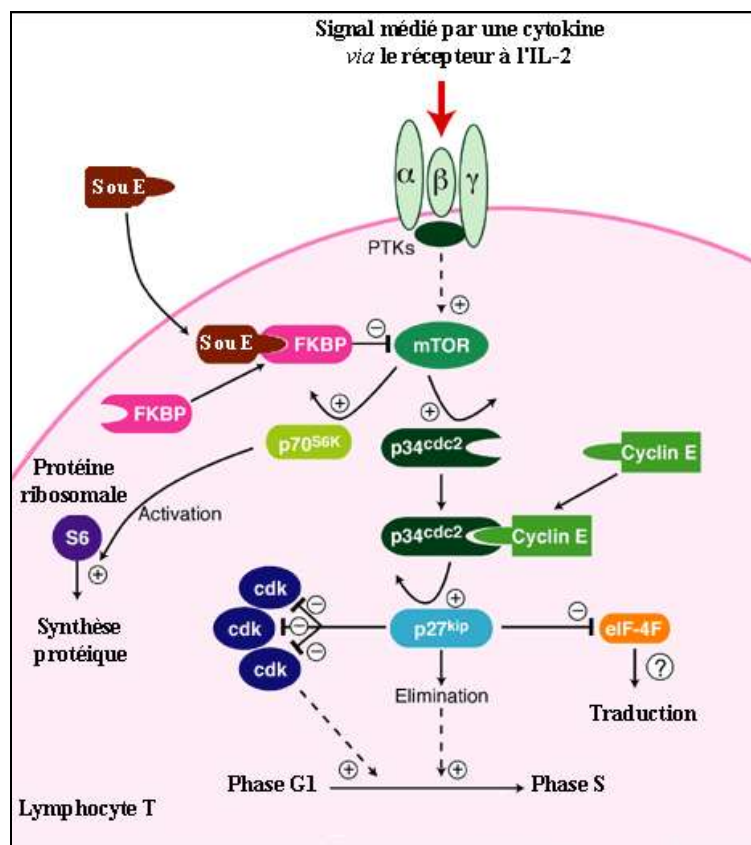


Figure 2 : Mécanisme d'action du sirolimus (S) et de l'évérolimus (E) (image extraite de la référence : STEPKOWSKI, 2000).

V- LES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE D'ADN

1- Généralités

Suite à une stimulation antigénique efficace, le lymphocyte T prolifère. La cellule doit donc se diviser et entre dans la phase S du cycle cellulaire qui correspond à la phase de synthèse de l'ADN. Pour synthétiser de l'ADN, la cellule a besoin de bases puriques et pyrimidiques.

Les inhibiteurs de la synthèse d'ADN utilisés en transplantation sont essentiellement des inhibiteurs de la synthèse *de novo* des purines. Les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des pyrimidine (léflunomide, bréquinar sodique et méthotrexate) ainsi que le cyclophosphamide (agent alkylant) sont principalement utilisés, pour leurs propriétés immunosuppressives, dans le traitement de certaines maladies auto-immunes et ne seront pas développés dans ce chapitre.

Il y a deux voies majeures de synthèse des bases puriques (figure 3) : la voie dite "de sauvetage" (voie de récupération) et la synthèse *de novo* (voie de synthèse totale). Les lymphocytes T et B utilisent principalement la synthèse *de novo* et sont donc très sensibles à l'inhibition de cette voie contrairement aux autres types cellulaires.

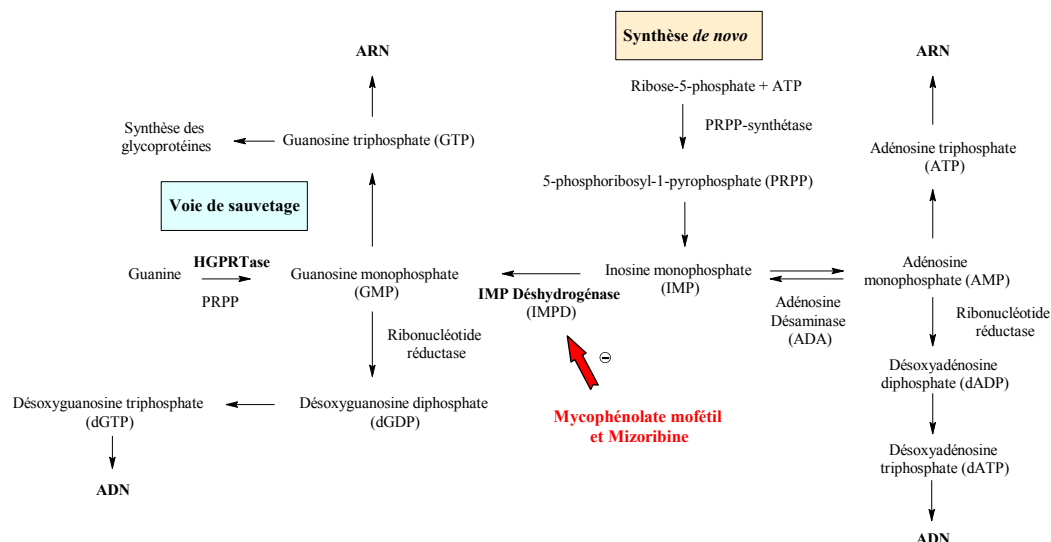


Figure 3 : Les différentes voies biosynthétiques des bases puriques (image extraite de la référence : ALLISON, 2000).

HGPRTase : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase.

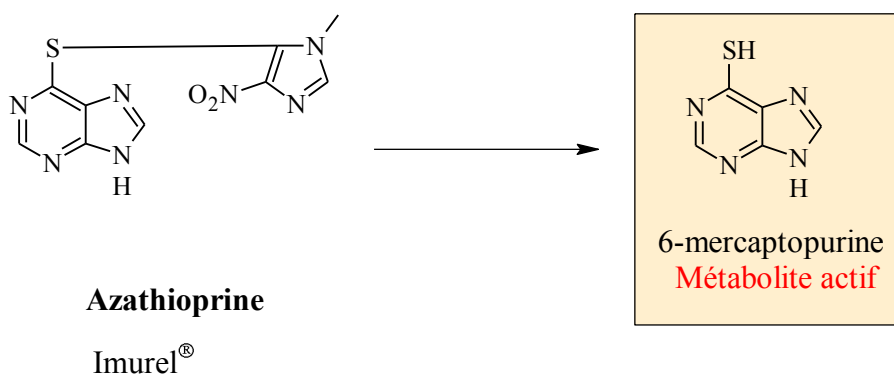
Les molécules capables d'inhiber cette voie présentent donc un intérêt certain dans le domaine de l'immunosuppression étant donné qu'elles ciblent les lymphocytes de manière plus spécifique, et, particulièrement, les lymphocytes activés, les autres cellules étant beaucoup moins sensibles à l'inhibition de la synthèse *de novo*. Dans cette catégorie de produits, il faut distinguer les molécules de première et de seconde génération.

2- Les molécules de première génération : la 6-mercaptopurine et l'azathioprine

2.1- Structure et métabolisme

Ces molécules sont des analogues structuraux des bases puriques (adénine, guanine et hypoxanthine). L'azathioprine est un dérivé nitroimidazolé de la 6-mercaptopurine, qui se comporte comme une prodrogue (CHAN, 1990). L'adjonction de ce radical nitroimidazole protège la molécule d'une métabolisation trop rapide par méthylation ou oxydation.

Après administration, l'azathioprine est rapidement transformée en 6-mercaptopurine. Cette dernière subit alors un très important métabolisme intracellulaire conduisant à des métabolites thiopuriques nucléotidiques actifs. Le principal métabolite retrouvé au niveau urinaire est l'acide 6-thiourique inactif et produit par une réaction d'oxydation catalysée par la xanthine oxydase. Les patients recevant, pour le traitement de la goutte, de l'allopurinol (Zyloric®), inhibiteur de la xanthine oxydase, doivent donc avoir une posologie d'azathioprine diminuée pour prévenir une toxicité excessive.



2.2- Mécanisme d'action

La molécule utilisée pour ses propriétés immunosuppressives en clinique est l'azathioprine. Son activité est due à ses métabolites thiopuriques nucléotidiques dont la 6-thioinosine monophosphate (CHAN, 1990). Ce sont des analogues structuraux des nucléotides puriques endogènes qui peuvent être incorporés dans les acides nucléiques et produire des cassures chromosomiques. Les cellules qui prolifèrent ont besoin de dupliquer leur ADN et sont, par conséquent, particulièrement sensibles à leur action. L'azathioprine inhibe donc la prolifération des cellules lymphoïdes activées suite à une stimulation antigénique.

L'immunité cellulaire et les réponses humorales à anticorps primaires et secondaires sont inhibées (SCHWARTZ, 1959 - SCHWARTZ, 1960). Néanmoins, la prolifération des lymphocytes T activés est plus diminuée que celle des lymphocytes B activés.

Enfin, l'azathioprine aurait un effet inhibiteur de la voie *de novo* et de la voie de sauvetage de la synthèse des purines en interférant avec l'action d'enzymes de ces deux voies telles que, par exemple, la phosphoribosylphosphatase, l'inosine monophosphate déshydrogénase ou l'adénosylsuccinate synthase. Cet effet complémentaire renforcerait donc son activité.

2.3- Indications en transplantation

L'azathioprine (Imurel[®]) est utilisée dans la prévention du rejet de certains organes transplantés en association avec les corticoïdes et d'autres agents immunosuppresseurs.

3- Les molécules de seconde génération : le mycophénolate mofétil et la mizoribine

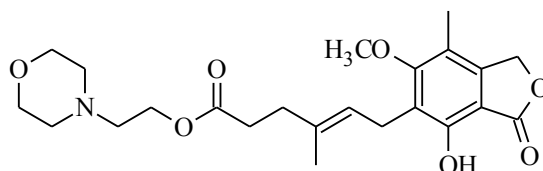
3.1- Le mycophénolate mofétil

3.1.1- Structure et métabolisme

Le mycophénolate mofétil (MMF) est un dérivé semi-synthétique de l'acide mycophénolique (MPA), un produit de fermentation de différentes espèces de *Penicillium*

isolé en 1896 (GOSIO, 1896). Ses propriétés immunosuppressives ont été découvertes en 1969 par Franklin et Cook (FRANKLIN, 1969).

Le mycophénolate mofétil est le dérivé morpholinylester de l'acide mycophénolique. L'introduction du groupement morpholinoéthyle lui confère une meilleure biodisponibilité par voie orale.



Mycophénolate mofétil

Après introduction dans l'organisme, le MMF est rapidement hydrolysé par les estérases pour donner le MPA qui peut ensuite être glucuronoconjugué. C'est notamment sous cette forme qu'il est excrété dans les urines ou dans la bile où il subit un fort recyclage entérohépatique. Les activités du MMF et du MPA sont identiques. Le MMF se comporte donc comme une prodrogue.

3.1.2- Mécanisme d'action

Le MMF inhibe de manière puissante, non compétitive et réversible l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPD). Cette enzyme est une enzyme clé de la synthèse *de novo* des purines qui permet la formation de guanosine monophosphate (GMP) à partir d'inosine monophosphate (IMP) (EUGUI, 1991 - a- ALLISON, 1993 - ALLISON, 2000).

Le GMP est le précurseur de la guanosine triphosphate (GTP), qui intervient dans la composition de l'ARN, et de la désoxyguanosine triphosphate (dGTP) qui est une des bases puriques de l'ADN. L'inhibition de l'IMPD entraîne donc une déplétion en GTP et dGTP au niveau des lymphocytes bloquant ainsi la synthèse d'ARN et d'ADN pouvant expliquer les propriétés anti-prolifératives du MMF. Le GTP et le dGTP ont également une action régulatrice importante sur la 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthase (PRPP synthase) en la stimulant. Cette enzyme de la synthèse *de novo* est nécessaire à la production d'IMP. Ils stimulent également la ribonucléotide réductase qui intervient dans les deux voies de synthèse

des purines (figure 3). Il y a donc une amplification de l'action anti-proliférative du MMF par ces mécanismes.

Etant donné que la synthèse *de novo* des purines est surtout utilisée par les lymphocytes, les effets cytotoxiques engendrés par l'inhibition de cette voie sont beaucoup plus puissants sur ces cellules que sur les autres types cellulaires.

De plus, un autre facteur augmente la sélectivité d'action du MMF. En effet, l'IMPD existe dans l'organisme sous deux isoformes : type I et type II (CARR, 1993). Des études ont montré que les lymphocytes au repos exprimaient de manière prédominante le gène de l'isoforme de type I alors que dans les lymphocytes activés, le gène de l'isoforme de type II était fortement exprimé (KONNO, 1991 - NAGAI, 1992). Or, l'isoforme de type II est presque cinq fois plus sensible à l'inhibition par le MMF que l'isoforme de type I. Le produit présente donc une sélectivité envers les lymphocytes activés ce qui est recherché en thérapeutique (ALLISON, 2000).

Le MMF inhibe donc la prolifération lymphocytaire de manière relativement spécifique en agissant à un stade tardif de la réponse. Il entraîne le passage des cellules en phase G1 et les bloque en phase S.

De plus, cette molécule ne semble pas interférer avec la production d'IL-2 ce qui est, selon les dernières études, plutôt favorable à l'induction de la tolérance à long terme (EUGUI, 1991).

Bien que son action soit centrée sur le lymphocyte, le MMF entraîne également une déplétion des stocks de GTP et de dGTP au niveau des monocytes et macrophages de manière significative. De plus, le MPA inhibe la maturation des cellules dendritiques et donc leur capacité à présenter efficacement les alloantigènes aux lymphocytes T (MEHLING, 2000 - COLIC, 2003).

Le MMF inhibe également les processus de glycosylation et l'expression des molécules d'adhésion au niveau des lymphocytes et des macrophages. En effet, la glycosylation des protéines et des lipides se fait *via* des intermédiaires de type nucléotidique et la déplétion en GTP médiée par le MMF inhibe le transfert de fucose et de mannose sur les glycoprotéines (b- ALLISON, 1993). Parmi les glycoprotéines concernées par ce phénomène, il y a des molécules d'adhésion facilitant l'attachement des leucocytes à la cellule endothéliale et leur passage à travers les vaisseaux. En antagonisant l'expression des molécules d'adhésion, le MMF diminue le recrutement des lymphocytes et des monocytes au niveau des sites inflammatoires ce qui pourrait avoir un intérêt dans les rejets de greffe vasculaires et dans les rejets chroniques.

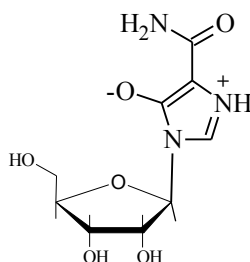
3.1.3- Indications

Le MMF (Cellcept[®]) est indiqué en association à la ciclosporine et aux corticoïdes dans la prévention des rejets aigus d'allogreffe rénale, cardiaque ou hépatique.

3.2- La mizoribine

3.2.1- Structure

La mizoribine est un analogue nucléotidique des purines isolé en 1974 à partir du bouillon de culture d'*Eupenicillium brefeldianum* et possédant une faible activité antibiotique (MIZUNO, 1974). Ses propriétés immunosuppressives ont été mises à jour en 1975 par Sakaguchi *et al.* (SAKAGUCHI, 1975) et son intérêt dans le domaine des transplantations en 1980 (OKUBO, 1980).



Mizoribine

3.2.2- Mécanisme d'action

Dans l'organisme, la mizoribine est phosphorylée par l'adénosine kinase (KOYAMA, 1983). Elle exerce son activité immunosuppressive en inhibant la IMPD, de manière compétitive, (KOYAMA, 1983 - GAN, 2003) et la GMP synthase (KUSUMI, 1989). Le blocage de ces enzymes est à l'origine d'une déplétion intracellulaire de GTP et de dGTP entraînant l'inhibition de la synthèse *de novo* et un arrêt des lymphocytes en phase S.

3.2.3- Indications

Cette molécule a obtenu en janvier 2007 une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative dans le domaine des transplantations (<http://agemed.sante.gouv.fr>).

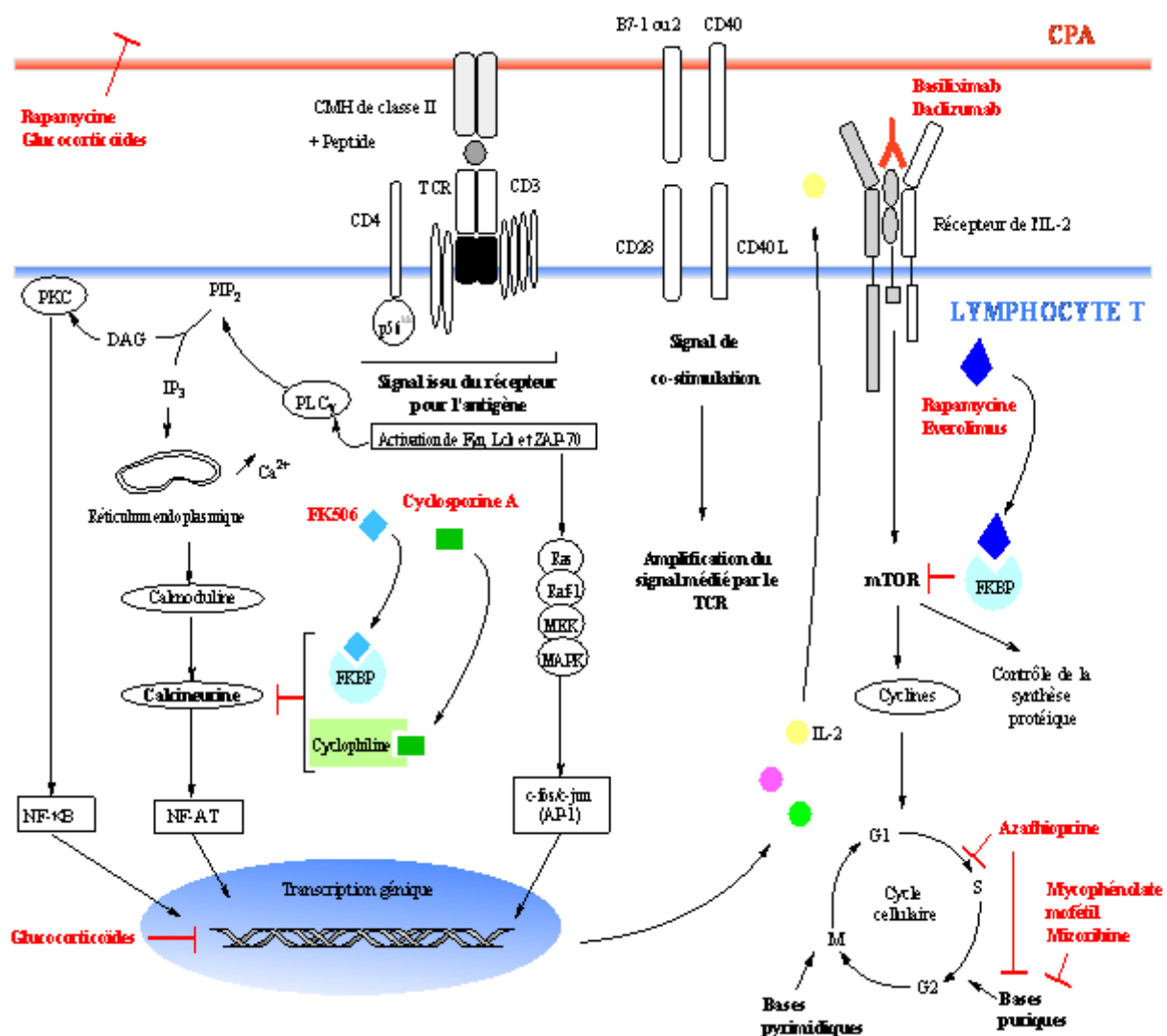


Figure 4 : Mécanismes d'action des différents immunosuppresseurs (d'après BACH, 2002).

D- INCONVENIENTS DES TRAITEMENTS ACTUELS

Les immunosuppresseurs précédemment décrits ont permis d'améliorer de manière décisive la survie des patients greffés sur les 30 dernières années.

Néanmoins, les cliniciens se heurtent actuellement à deux problèmes majeurs.

Le premier résulte de la très forte toxicité de ces molécules. D'une part, elles entraînent toutes une immunodépression généralisée plus ou moins importante, due à leur manque de sélectivité, favorisant l'émergence d'infections opportunistes bactériennes (par des bactéries à développement intracellulaire telles que le Bacille de Koch ou *Listeria*), à protozoaires (ex : pneumocystose, toxoplasmose), fongiques (ex : candidose, aspergillose) ou virales (ex : infections à Cytomégalovirus, Herpes simplex virus, Varicelle-zona virus ou Epstein Barr virus). La sur-immunosuppression engendrée par ces traitements est également responsable de la survenue de lymphomes et de cancers viro-induits (ROSS, 2007).

D'autre part, les molécules utilisées en clinique présentent toutes une toxicité intrinsèque importante à l'origine d'effets indésirables sérieux (ex : néphrotoxicité des anticalcineurines, myélotoxicité de la rapamycine, hématotoxicité de l'azathioprine et du mycophénolate mofétil).

L'incidence de ces complications peut être diminuée par une surveillance étroite du traitement. Les protocoles actuels visent à limiter leur survenue en diminuant la posologie des molécules les plus immunodépressives en les associant, par exemple, à d'autres produits entraînant moins de sur-immunosuppression ou en modifiant les durées d'administration de certaines. De plus, la mise en place d'une prophylaxie adéquate permet souvent de prévenir les infections. Néanmoins, malgré toutes ces précautions, ces effets indésirables ne peuvent pas toujours être évités et peuvent hypothéquer la vie du patient ou mettre en danger la survie du greffon.

Le second problème réside dans le fait que bien que ces traitements soient très efficaces dans le traitement et la prévention du rejet aigu, ils le sont beaucoup moins dans la prévention du rejet chronique responsable à terme de la perte du greffon (LIBBY, 2001).

E- LES NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE

I- GENERALITES

Afin de résoudre les différents problèmes évoqués précédemment, de nombreux nouveaux agents sont actuellement en cours d'évaluation.

La première voie de recherche repose sur le développement de thérapeutiques immunosuppressives adjuvantes. Un des objectifs est de développer des molécules peu toxiques capables d'augmenter la survie des greffons à long terme. Les efforts sont également concentrés pour déterminer de nouveaux protocoles permettant d'éviter l'utilisation des corticostéroïdes et des anticalcineurines, molécules possédant le plus d'effets indésirables. Enfin, il est nécessaire d'identifier de nouvelles alternatives thérapeutiques pour traiter les épisodes de rejet chez les patients qui ne répondent pas aux traitements existants.

La seconde voie de recherche consiste à déterminer des protocoles capables d'induire un état de tolérance du receveur de la greffe à l'égard des cellules du donneur. La tolérance, en transplantation décrit un état dans lequel l'organe du donneur est accepté par le receveur de la greffe sans qu'il y ait besoin d'avoir recours à une thérapeutique immunosuppressive permanente et sans altération du reste du système immunitaire. Il y a donc une absence de réponse envers les alloantigènes de manière spécifique et le receveur reste capable de lutter efficacement contre les infections et processus de cancérisation. Cet état est obtenu par des mécanismes immunorégulateurs complexes qui coopèrent les uns avec les autres. L'induction d'une tolérance en transplantation permettrait de s'affranchir de l'utilisation permanente des immunosuppresseurs chez les patients greffés. Ces 25 dernières années diverses stratégies ont été mises au point pour tenter d'induire un tel état : méthode du chimérisme hématopoïétique mixte, blocage des signaux de co-stimulation, déplétion des cellules T périphériques ou encore induction *in vivo* ou expansion *ex vivo* des cellules T régulatrices (LECHLER, 2005). Néanmoins, les applications cliniques sont encore très limitées.

Le chapitre qui suit décrit brièvement les molécules qui sont actuellement les plus prometteuses au regard des résultats des essais cliniques réalisés.

II- LES AGENTS ENTRAÎNANT UNE DEPLETION DES LYMPHOCYTES T

De nombreuses stratégies développées dans le but d'induire un état de tolérance se sont focalisées sur la déplétion des cellules T dans le but d'éliminer les lymphocytes T alloréactifs. Actuellement, trois agents sont capables d'entraîner une déplétion des cellules T en clinique. L'OKT3, un anticorps monoclonal spécifique du CD3, les sérums polyclonaux anti-lymphocytaires et un anticorps monoclonal anti-CD52, l'alentuzumab ou Campath-1H. Bien que le CD52 soit largement exprimé par les cellules d'origine hématopoïétique, il semble que le Campath-1H soit assez sélectif et entraîne la déplétion des cellules T pendant plus d'une année après une courte période de traitement (KNECHTLE, 2004). Des études sont en cours pour tenter de démontrer son intérêt dans le domaine des transplantations (KNECHTLE, 2003 - RAO, 2003).

III- LES AGENTS BLOQUANT LES SIGNAUX DE CO-STIMULATION DES CELLULES T

Rappelons, tout d'abord, que l'activation des lymphocytes Th naïfs nécessite, en plus du signal médié par le TCR, un signal de co-stimulation. Si ce signal est bloqué, cela entraîne l'inhibition de la production de cytokine, de la prolifération et de la différenciation du lymphocyte T qui devient anergique ce qui favorise l'établissement d'un état de tolérance.

Ces signaux de co-stimulation sont induits lors de l'interaction de deux couples de molécules, B7/CD28 et CD40/CD40L (ou CD154), présents respectivement sur la CPA et le lymphocyte T.

Les lymphocytes T activés régulent de manière positive le CTLA-4, molécule structurellement similaire au CD28 mais qui se lie au B7-1 ou 2 avec une affinité pour 20 fois supérieure à celle du CD28. De plus, la liaison du CTLA-4 au B7 entraîne une inhibition de l'activation lymphocytaire. Ce mécanisme permet au lymphocyte T de réguler son état d'activation. Le blocage de l'interaction CD28/B7 peut donc être réalisé en utilisant des anticorps monoclonaux ou une protéine de fusion soluble, nommée CTLA4-Ig, qui est constituée du domaine extracellulaire du CTLA-4 et de la région constante de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine (LINSLEY, 1991). Cette molécule agit comme un inhibiteur compétitif puissant de l'interaction B7/CD28. L'administration de CTLA-4 Ig prolonge la survie des greffons dans un très grand nombre de modèles animaux (greffe de coeur, de rein, de

poumons et d'îlots de Langherans) (SAYEGH, 1998) et peut parfois induire un état de tolérance (LIN, 1993). Le signal de co-stimulation médié par le couple CD28/B7 peut également être inhibé par une protéine de fusion de seconde génération, nommée LEA29Y (ou belatacept), qui est une forme mutante de la CTLA4-Ig, qui se lie également au B7-1 ou 2 et dont l'affinité envers le B7-2 est augmentée. Dans les essais de phase II réalisés, le belatacept a été aussi efficace que la cyclosporine A dans la prévention du rejet aigu au sein d'un protocole comprenant une association de mycophénolate mofétil, de basiliximab et de corticostéroïdes. De plus, il a entraîné moins de toxicité rénale et de dyslipidémies (VINCENTI, 2005). Cette molécule semble donc particulièrement prometteuse. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD40-L (ou CD154) ont également été développés et ont donné des résultats intéressants, en association avec d'autres molécules immunosuppressives, sur quelques modèles animaux (GUILLONEAU, 2005 - BROWN, 2006).

Enfin, nous pouvons classer dans la catégorie des molécules bloquant les signaux de co-stimulation des lymphocytes T, les inhibiteurs de Janus kinase 3 (JAK3). JAK3 est une kinase impliquée dans la signalisation médiée par les récepteurs de cytokines utilisant la chaîne gamma (récepteurs à l'IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21) qui sont indispensables au développement et à l'homéostasie des cellules lymphoïdes. De plus, JAK3 est aussi engagée dans la voie de signalisation du CD40 des monocytes du sang périphérique qui est responsable de la maturation de ces cellules. Une inhibition de JAK3 entraîne donc une inhibition de la voie de signalisation médiée par le récepteur à l'IL-2 au sein des lymphocytes T. Mais elle est également responsable de l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques qui deviennent incapables de présenter efficacement les alloantigènes aux cellules T (SAEMANN, 2003). Les inhibiteurs de JAK3 ont montré une sélectivité d'action pour la lignée lymphoïde et se sont montrés efficaces dans différents modèles de transplantation lors des essais pré-cliniques (CETKOVIC-CVRLJE, 2003 - KUDLACZ, 2004 - BORIE, 2005). Une molécule chef de file, le CP-690550 (CHANGELIAN, 2003) est actuellement évaluée en essai clinique de phase II.

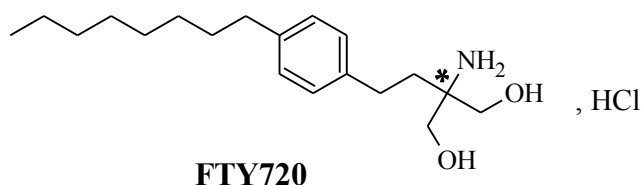
IV- LES AGENTS BLOQUANT LES MOLECULES D'ADHESION OU ACCESSOIRES DES CELLULES T

Les molécules d'adhésion, comme nous l'avons vu précédemment, jouent un rôle très important dans l'activation des lymphocytes ainsi que dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau de la greffe. Elles constituent donc une cible thérapeutique intéressante.

Le couple de molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 (respectivement sur la CPA et sur la cellule T) intervient dans l'activation lymphocytaire et dans l'adhésion entre les cellules. Plusieurs anticorps monoclonaux ont été créés dans ce but : un anti-ICAM-1 (enlimomab) et des anti-LFA-1 (efalizumab et odulimomab). L'enlimomab ne s'est pas avéré efficace dans la prévention du rejet en transplantation rénale (COSIMI, 1990 - SALMELA, 1999). L'efalizumab et l'odulimomab sont en cours d'évaluation dans la prévention du rejet aigu. De plus, ces molécules pourraient avoir un intérêt dans les cas de reprise retardée de la fonction du greffon. En effet, elles ont la capacité de bloquer l'adhérence des cellules inflammatoires circulantes au niveau de l'endothélium ischémique altéré, observé lors du phénomène d'ischémie-reperfusion responsable de la reprise retardée de la fonction (RRF) du greffon (BROCKMEYER, 1993). L'effet synergique de l'association de l'anti-ICAM-1 et de l'anti-LFA-1 dans la protection contre la RRF a déjà été démontré chez l'animal (ISOBE, 1992) et doit être confirmé chez l'homme.

V- LE FTY720 (FINGOLIMOD) : INHIBITEUR DU TRAFIC LYMPHOCYTAIRE

Ce composé est un analogue de la sphingosine-1-phosphate (S1P) dérivé de la myriocine (ISP-1), produit isolé à partir du bouillon de culture d'un champignon : *Isaria sinclairii* (FUJITA, 1994).



Cette molécule présente l'intérêt d'agir par un mécanisme complètement nouveau. C'est un modulateur du récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P-R), récepteur à 7

passages membranaires couplé à une protéine G. Il agit en entraînant une accumulation des lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques et périphériques. Cette séquestration est à l'origine d'une lymphocytopénie par diminution du nombre de lymphocytes circulants (figure 1). Son mécanisme d'action se fait en trois temps (YOPP, 2006). Le FTY720 entraîne tout d'abord la migration des lymphocytes T vers les tissus lymphatiques périphériques par un mécanisme dépendant des chemokines puis il est responsable d'une down-régulation des S1PRs à la surface des cellules T ce qui rend ces lymphocytes incapables de migrer au travers d'un gradient de S1P, qui est indispensable à la sortie des lymphocytes T hors du thymus et des ganglions lymphatiques. Enfin, il réduit l'aptitude des cellules T à migrer vers les sites périphériques et donc vers le greffon mais sans altérer leurs fonctions. Il semble que son développement dans le domaine des transplantations rénales soit arrêté du fait de l'apparition d'une toxicité au niveau de la fonction rénale (deux essais de phase III) et de complications rétinienues. Les nouvelles études se focalisent surtout sur son action dans certaines maladies auto-immunes telle que la sclérose multiple ou dans des maladies démyélinisantes (BUDDE, 2006).

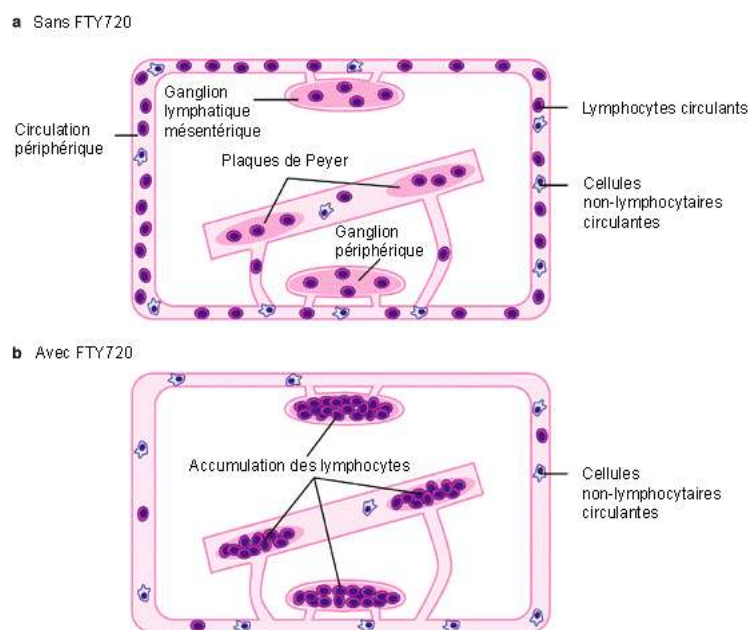


Figure 1 : Mécanisme d'action du FTY720. (a) Distribution des lymphocytes en l'absence de traitement par le FTY720. (b) Séquestration des lymphocytes au niveau des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques. (image extraite de la référence : STEPKOWSKI, 2000).

VI- I- LES AGENTS ENTRAÎNANT UNE DEPLETION DES LYMPHOCYTES B

Certains rejets sont médiés par une réaction humorale. Ainsi, une très forte densité de lymphocytes CD20⁺ (marqueur des lymphocytes B) a été retrouvée chez des patients développant un rejet résistant aux corticoïdes (BECKER, 2004). Un anticorps monoclonal anti-CD20 de haute affinité, nommé rituximab, a donc été développé et semble prometteur pour le traitement de ce type de rejet.

VII- LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE DES CYTOKINES

Certaines cytokines jouent un rôle primordial dans le rejet de greffe comme l'IL-2 et l'IFN- γ précédemment cités mais également le TNF- α qui intervient dans le chimiotactisme et l'extravasation des macrophages et favorise la cytotoxicité des neutrophiles et des macrophages jouant un rôle central dans les processus inflammatoires du rejet.

L'infliximab, un anticorps monoclonal chimérique anti-TNF alpha a été développé. il bloque l'interaction de cette cytokine avec son récepteur spécifique et induit la lyse des cellules productrices de TNF- α . L'expérience clinique de cet anticorps est limitée. Il a néanmoins été utilisé avec succès dans des rejets cellulaires aigu après transplantation intestinale lorsqu'une résistance aux corticostéroïdes et à l'OKT3 était observée (PASCHER, 2003).

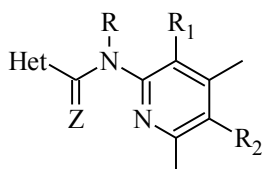
PREMIERE PARTIE

SYNTHESE ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE D'IMIDAZOLIDIN-2-ONES ET D'ANALOGUES A POTENTIALITES IMMUNOSUPPRESSIVES

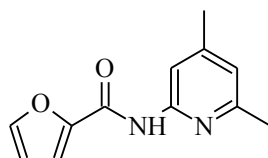
INTRODUCTION

A- INTRODUCTION

Les travaux réalisés au sein du laboratoire de Chimie Thérapeutique sur une famille de molécules de structure benzamidique (ROBERT-PIESSARD, 1990 - ROBERT, 1994) (dont la formule générale est indiquée ci-après) présentant une activité anti-inflammatoire ont permis d'identifier une molécule chef de file, le trancamide (ou JM34).



Des études pharmacologiques complémentaires ont montré que ce composé exerçait également une puissante activité immunosuppressive (LANG, 2001). Son mécanisme d'action original, consistant à inhiber de manière sélective la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CARBONNELLE, 2005) a fait l'objet d'un dépôt de brevet d'activité par l'Université de Nantes (LANG, 2001).

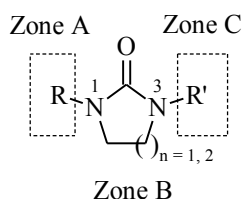


Trancamide ou JM34

Ces résultats très encourageants nous ont incité à synthétiser des dérivés du JM34. Etant donné que la cible biologique du trancamide n'a pas encore été déterminée, il nous a été impossible d'avoir recours à une approche rationnelle en utilisant la modélisation moléculaire. Les différentes modulations structurales présentées dans ce chapitre ont donc été réalisées selon un schéma classique et systématique de pharmacomodulation.

Nous avons tout d'abord réalisé une élongation de la chaîne amidique par la préparation d'analogues uréiques. Ces molécules n'ont pas présenté d'activité immunosuppressive (données non publiées). Nous avons donc décidé dans un second temps de synthétiser des analogues cycliques d'urées de type imidazolidin-2-one ou tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one diversement substitués au niveau des deux azotes hétérocycliques.

B- PHARMACOMODULATIONS ENVISAGEES



I- AU NIVEAU DU CYCLE UREIQUE (ZONE B)

Au niveau du cycle uréique cyclique, nous avons fait varier le nombre de maillons CH_2 :

- $n = 1$: série imidazolidin-2-one
- $n = 2$: série tétrahydropyrimidin-2(1H)-one

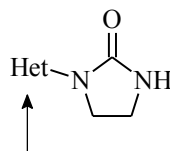
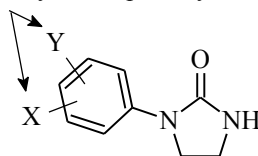
II- AU NIVEAU DE L'AZOTE N^1 (ZONE A)

- En série N-arylimidazolidin-2-one

Dans un premier temps, nous avons envisagé de remplacer l'hétérocycle azoté présent dans le furanecarboxamide JM34 par un groupe phényle diversement substitué par des groupements de petite taille (halogènes, méthoxyle, cyano, trifluorométhyle ou méthylthio) ou plus volumineux (phénoxy ou morpholinyle).

Enfin, nous avons remplacé le cycle pyridinique du furanecarboxamide JM34, qui n'entraîne pas d'activité en série imidazolidin-2-one (donnée non publiée), par différents types d'hétérocycles azotés (1,3-diméthyl(1H)pyrazol-5-yle, quinoléin-8-yle et 1H-indol-5-yle).

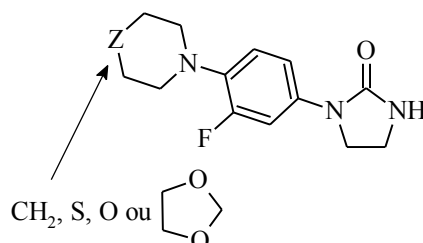
Halogène, méthoxyle, cyano,
trifluorométhyle, méthylthio,
phénoxy, morpholinyle



1,3-diméthyl(1*H*)pyrazol-5-yle,
quinoléin-8-yle et 1*H*-indol-5-yle

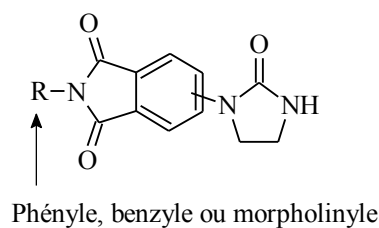
- En série *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-one

Dans cette série, nous avons greffé sur le noyau phényle un atome de fluor en position 3 et un hétérocycle azoté en position 4 de type pipéridinyle, thiomorpholinyle, morpholinyle ou 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dec-8-yle.



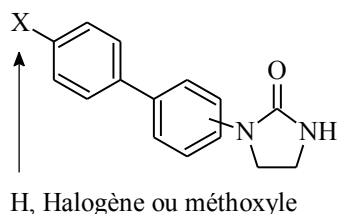
- En série 4- et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione

Certains dérivés du thalidomide, possédant un motif phtalimidique, exercent une activité inhibitrice sur la production de TNF- α (MIYACHI, 1997 - MACHADO, 2005 - NAKAMURA, 2006). Cette activité anti-inflammatoire pourrait s'avérer intéressante en vue de développer de nouveaux composés immunosuppresseurs. Nous avons donc voulu regarder si le motif phtalimidique pouvait avoir une influence sur l'activité de nos composés. Pour cela, nous avons introduit ce motif sur l'azote N¹ de l'imidazolidin-2-one. Nous avons réalisé diverses substitutions au niveau de l'azote phtalimidique par des groupements phényle, benzyle ou morpholinyle.



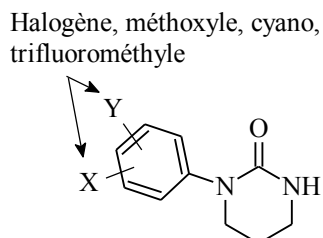
- En série *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-one et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-one

Enfin, en série imidazolidin-2-one, nous avons envisagé de fixer sur l'azote N¹ un groupement 1,1'-biphényl-3-yle ou 1,1'-biphényl-4-yle diversement substitué ou non en position 4' par un halogène ou un groupe méthoxyle.



- En série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one

En série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one, nous avons substitué l'azote N¹ par un groupe phényle diversement substitué par des groupements de petite taille (halogènes, méthoxyle, cyano ou trifluorométhyle).



III- AU NIVEAU DE L'AZOTE N³ (ZONE C)

Cet azote peut être libre ou substitué par un enchaînement de type 4-bromobenzyle ou 2-bromobenzyle.

ETUDE CHIMIQUE

A- AMINES INTERMEDIAIRES : DERIVES DE LA 3-FLUOROANILINE

I- TRAVAUX REALISES

L'accès aux dérivés de la 3-fluoroaniline substitués en position 4 par un hétérocycle azoté a été réalisé selon la méthode décrite par Brickner *et al.* pour la synthèse du linézolide (Zyvoxid*) (BRICKNER, 1996). Cette synthèse comporte deux étapes : la préparation des dérivés du 3-fluoronitrobenzène *para*-substitués et leur réduction par voie catalytique.

1- Synthèse des dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène *para*-substitués : méthodes A1, A2 et A3

L'accès aux dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène *para*-substitués se fait par une substitution nucléophile aromatique entre le 3,4-difluoronitrobenzène et un dérivé de la pipéridine.

Cette réaction peut se faire sans solvant, à température ambiante, en mettant simplement les deux réactifs en contact sous agitation (**méthode A1**), ce qui permet d'obtenir instantanément les produits désirés de manière quantitative ou avec un bon rendement (86%).

Avec la morpholine et la thiomorpholine, il est nécessaire de chauffer, en ajoutant éventuellement une base pour initier la réaction. Cela s'explique par la moindre nucléophilie de l'azote hétérocyclique dans ces composés.

La **méthode A2** consistant à mettre, sous agitation, les réactifs de départ au reflux de l'acétonitrile, en présence de triéthylamine, permet d'accéder rapidement (en environ 2 heures) aux composés souhaités avec un rendement convenable (58 et 65%).

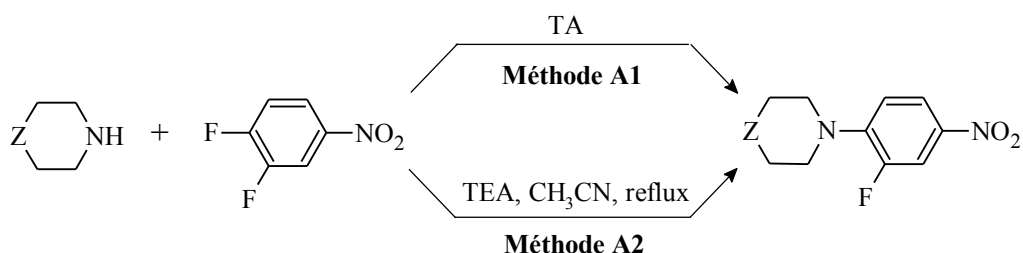


Schéma 1

Il faut noter que pour la synthèse de la molécule **3**, le rendement a pu être amélioré en utilisant la morpholine à la fois comme réactif et comme solvant et en chauffant à 50°C en l'absence de base (**méthode A3**). Dans ces conditions, nous avons obtenu le composé **3** de manière quasi-quantitative en 1 heure.

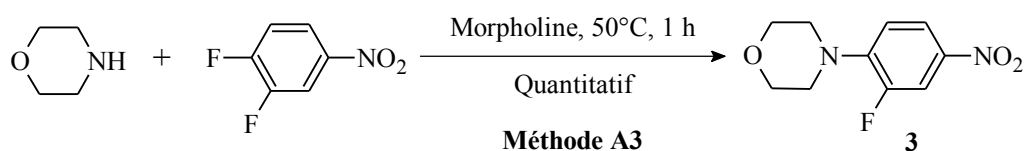
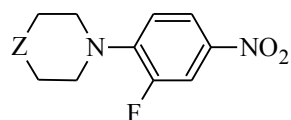


Schéma 2



N°	Z	Méthode	Temps de réaction	Rdt (%)
1	CH ₂	A1	instantané	100
2	S	A2	2 h 30	58
3	O	A2	2 h	65
		A3	1 h	99
4		A1	instantané	86

2- Réduction des dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène *para*-substitués : méthode B1

La réduction des dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène *para*-substitués a été réalisée de manière classique par voie catalytique en utilisant le palladium sur charbon à 5% dans le méthanol sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante. Les amines ont ainsi été obtenues avec des rendements corrects (75-81%) excepté pour le composé **6** (43%). Les temps de réaction sont très variables en fonction de la nature de l'hétérocycle azoté (4 à 48 heures).

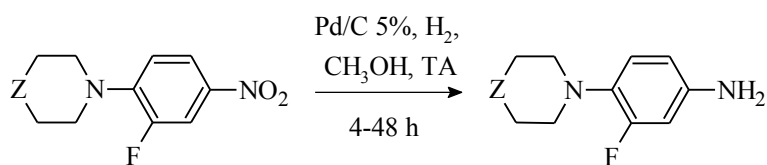


Schéma 3

N°	Ar	Temps de réaction	Rdt (%)
5	CH ₂	24 h	81
6	S	48 h	43
7	O	4 h	81
8		4 h	75

II- PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES

Solvants

- L'éther diéthylique, le toluène et le tétrahydrofurane sont distillés sur sodium / benzophénone et conservés sur tamis moléculaire 4 Å.
- Le 1,2-dichlorométhane et l'acétonitrile sont distillés sur chlorure de calcium et conservés sur tamis moléculaire 4 Å.
- La pyridine est distillée sur de la potasse et conservée sur tamis moléculaire 4 Å.
- Le *N,N*-diméthylformamide est distillé puis conservé sur tamis moléculaire 4 Å.
- L'acétone est distillée sur chlorure de calcium et conservée sur tamis moléculaire 3 Å.

Chromatographies

- *Chromatographies préparatives*

Pour les chromatographies en phase liquide sur colonne ouverte, la phase stationnaire utilisée est le gel de silice 60 (70-230 mesh ASTM) Merck

- *Chromatographies analytiques*

Les réactions sont suivies par chromatographie sur couches minces (CCM) sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel).

Méthodes spectroscopiques

- *RMN ¹H et RMN ¹³C*

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un spectromètre Bruker AC 250 (250 MHz) et sur un spectromètre Bruker AVANCE 400 (400 MHz).

Les valeurs de déplacement chimique (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) avec pour référence interne le pic du tétraméthylsilane. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les abréviations suivantes sont utilisées pour préciser la multiplicité des signaux :

s = singulet	ddd = doublet de doublet de doublet	q = quadruplet
d = doublet	t = triplet	qt = quintuplet
dd = doublet de doublet	td = triplet de doublet	m = multiplet
e = élargi	* = valeur interchangeable entre deux protons ou carbones.	

Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été réalisés dans le CDCl_3 ou le DMSO-d_6 .

- *Spectrométrie infrarouge (IR)*

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Paragon 1000 PC Perkin Elmer par pastillage au bromure de potassium (KBr) pour les solides ou par film entre cristaux de chlorure de sodium (NaCl) pour les huiles.

- *Spectrométrie de masse*

Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker (ESQUIRE-LC Ion Trap System) qui permet une ionisation par électrospray (SM-ESI) avec trappe d'ions, en polarité négative ou positive (Mode standard Scan Range avec une température de source de 250 °C).

Les composés analysés sont préalablement dissous dans du méthanol auquel est ajouté de l'acide formique.

L'abondance relative des ions est figurée entre parenthèses en %.

Méthodes spectroscopiques

- *Température de fusion*

Les points de fusion sont déterminés en tube capillaire sur appareil Electrothermal IA 9000.

TABLEAU RECAPITULATIF DES MODES OPERATOIRES

Les méthodes utilisées lors des travaux de synthèse sont représentées par les lettres **A** à **J**.

Méthode	Type de réaction	Réactifs Conditions opératoires	Pages
A1	Substitution nucléophile aromatique	TA	71
A2	Substitution nucléophile aromatique	Et ₃ N, CH ₃ CN, reflux	71
A3	Substitution nucléophile aromatique	Morpholine, 50°C	72
B1	Réduction d'un groupement nitro	H ₂ , Pd/C 5 %, MeOH, TA	73
B2	Réduction d'un groupement nitro	H ₂ , Pd/C 5 %, THF, 50°C	85
C	Phtaloylation d'amines	AcOH, reflux	84
D	Acétylation	Ac ₂ O, TA	97
E1	Couplage de Suzuki	K ₂ CO ₃ , [(C ₆ H ₅) ₃ P] ₄ Pd, acide boronique, DME, 80°C	97
E2	Couplage de Suzuki	K ₃ PO ₄ , DAPcy, acide boronique, EtOH, TA	100
F	Hydrolyse d'un amide	NaOH 5M, reflux	98
G	Synthèse du DAPcy	Dicyclohexylamine, Pd(OAc) ₂ , dioxane, TA	99
H1	Condensation amine + isocyanate → urée	Isocyanate de 2-chloroéthyle (1éq), CHCl ₃ , reflux	120
H2	Condensation amine + isocyanate → urée	Isocyanate de 2-chloroéthyle (1éq), pyridine, reflux	121
H3	Condensation amine + isocyanate → urée	Isocyanate de 2-chloroéthyle (1éq), CHCl ₃ , TA	121
H4	Condensation amine + isocyanate → urée	Isocyanate de 2-chloroéthyle (8éq), micro-ondes, 82 °C, 20 W	122

Méthode	Type de réaction	Réactifs Conditions opératoires	Pages
H5	Condensation amine + isocyanate → urée	Isocyanate de 3-chloropropyle, CHCl ₃ , reflux	145
I1	Cyclisation des urées en imidazolidin-2-ones	Cs ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, reflux	123
I2	Cyclisation des urées en imidazolidin-2-ones	Na ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, reflux	124
I3	Cyclisation des urées en imidazolidin-2-ones	Et ₃ N, CH ₃ CN, reflux	125
I4	Cyclisation des urées en imidazolidin-2-ones	1) Isocyanate de 2-chloroéthyle, CH ₃ CN, reflux 2) Cs ₂ CO ₃ , reflux	126
J	Benzylation	1) NaH (3 éq), DMF, TA 2) Bromure de bromobenzyle, TA	128

I- METHODES DE SYNTHESE

1- Synthèse des dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène

Méthode A1

1-(2-fluoro-4-nitrophényl)pipéridine 1

Mettre en contact 1,24 mL (12,57 mmoles) de pipéridine et 2 g (12,57 mmoles) de 3,4-difluoronitrobenzène dans un ballon, sous agitation, à température ambiante. Après 5 minutes, récupérer le produit avec 2 à 5 mL d'eau et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 2,82 g du dérivé nitré **1**.

Rendement : quantitatif

Poudre orange

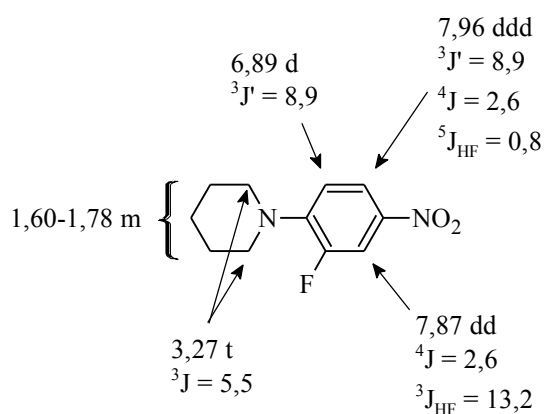
$C_{11}H_{13}FN_2O_2$

$M_r = 224,24$

$F^\circ C = 30$

IR (KBr, cm^{-1}) : 1511 ($\nu_{as} NO_2$) ; 1330 ($\nu_s NO_2$) ; 1024 ($\nu C-F$).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode A2

4-(2-fluoro-4-nitrophényl)thiomorpholine 2

Dissoudre 2,73 mL (27,14 mmoles) de thiomorpholine et 3 mL (27,14 mmoles) de 3,4-difluoronitrobenzène dans 100 mL d'acétonitrile. Ajouter 4,22 mL (30,03 mmoles, 1,1 éq) de

triéthylamine et laisser au reflux pendant 2 heures et demie. Evaporer ensuite l'acétonitrile sous pression réduite et reprendre le résidu par de l'eau. Extraire le dérivé nitré à trois reprises avec du dichlorométhane et sécher la phase organique sur sulfate de sodium anhydre puis évaporer sous pression réduite. Reprendre le résidu huileux par de l'éther diéthylique. Recueillir 3,83 g du dérivé nitré **2**.

Rendement : 58%

Poudre jaune

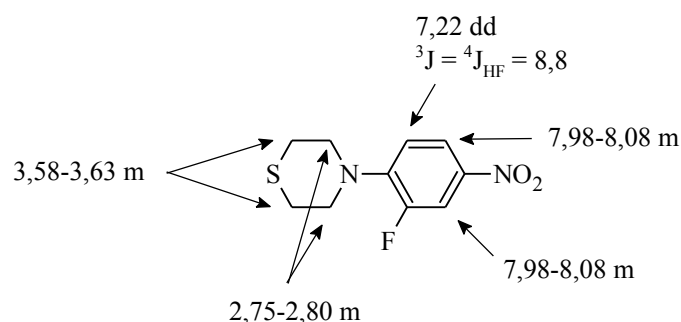
$C_{10}H_{11}FN_2O_2S$

$M_r = 242,27$

F°C = 56

IR (KBr, cm^{-1}) : 1510 ($\nu_{as} NO_2$) ; 1343 ($\nu_s NO_2$)

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode A3

4-(2-fluoro-4-nitrophényl)morpholine **3**

Dans un ballon contenant 20 mL de morpholine, servant à la fois de réactif et de solvant, ajouter goutte à goutte 2 g (12,57 mmol) de 3,4-difluoronitrobenzène. Chauffer sous agitation à 50°C pendant 1 heure. Reprendre par 250 mL d'eau froide. Le produit précipite. Filtrer et sécher sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Recueillir 2,82 g d'une poudre jaune.

Rendement : 99%

Poudre jaune

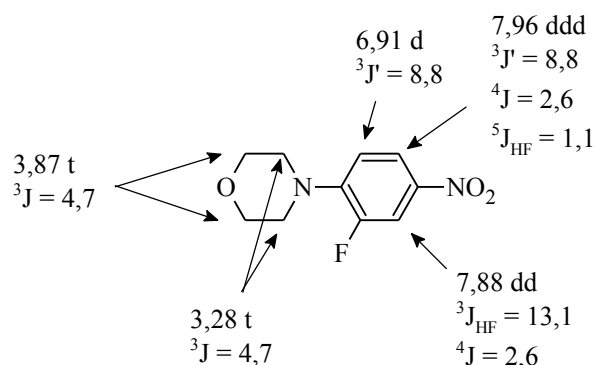
$C_{10}H_{11}FN_2O_3$

M_r : 226,21

T_m = 110

IR (KBr, cm^{-1}) : 1495 (ν_{as} NO₂) ; 1328 (ν_s NO₂) ; 1048 (ν C-F).

RMN (250 MHz) du 1H (CDCl₃), δ (ppm), J (Hz) :



2- Synthèse des 3-fluoroanilines

Méthode B1

3-fluoro-4-pipéridin-1-ylaniline **5**

Dissoudre 4,23 g (18,86 mmoles) de 1-(2-fluoro-4-nitrophényl)pipéridine **1** dans le méthanol (50 mL) et ajouter le palladium sur charbon à 5% en quantité catalytique. Agiter le mélange sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 24 heures. Filtrer à chaud le catalyseur au moyen d'un filtre de papier. Evaporer ensuite le filtrat obtenu sous pression réduite. Purifier le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par de l'éther diéthylique. Isoler 3 g de l'amine **5**.

Rendement : 81%

Poudre marron

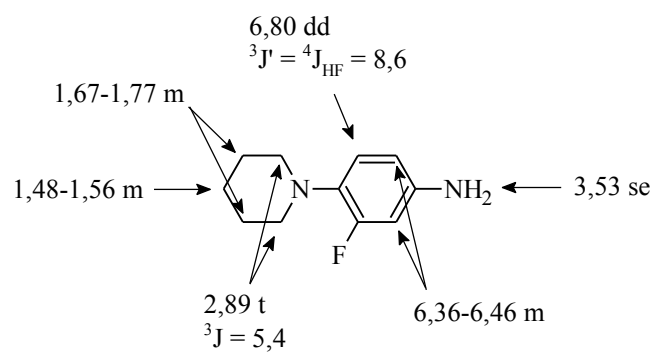
$C_{11}H_{13}FN_2$

M_r = 194,25

T_m = 38

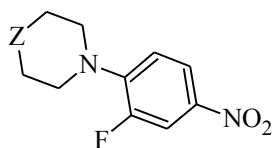
IR (KBr, cm^{-1}) : 3445 (ν_{as} NH₂) ; 3320 (ν_s NH₂) ; 1029 (ν C-F).

RMN (250 MHz) du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz) :



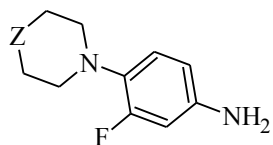
II- CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

Tableau 1 : dérivés nitrés **1-4**



N°	Z	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
1	CH ₂	C ₁₁ H ₁₃ FN ₂ O ₂ 224,24	A1 : 100	30 eau
2	S	C ₁₀ H ₁₁ FN ₂ O ₂ S 242,27	A2 : 58	56 éther diéthylique
3	O	C ₁₀ H ₁₁ FN ₂ O ₃ 226,21	A2 : 65 A3 : 99	110 eau
4		C ₁₃ H ₁₅ FN ₂ O ₄ 282,27	A1 : 86	124 eau

Tableau 2 : 3-fluoroanilines **5-8**



N°	Z	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Sol. rec.
5	CH ₂	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ 194,25	B1 : 81	38 éther diéthylique
6	S	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ S 212,29	B1 : 43	58 éthanol
7	O	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O 196,23	B1 : 81	120 éther diéthylique
8		C ₁₃ H ₁₇ FN ₂ O ₂ 252,29	B1 : 75	110 éther diéthylique

B- AMINES INTERMEDIAIRES : 4- ET 5-AMINO-1H-ISOINDOLE-1,3(2H)-DIONES

Pour plus de clarté, nous avons utilisé, dans cette partie, la nomenclature usuelle dans laquelle les 1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones (nomenclature IUPAC) sont désignées par le terme de phthalimides.

I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : METHODE DE SYNTHÈSE DES PHTALIMIDES N-SUBSTITUÉS

Les voies d'accès aux phthalimides *N*-substitués ont été très largement décrites dans la littérature. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories :

- les méthodes par cyclisation et
- les méthodes par substitution

Le schéma rétrosynthétique ci-dessous illustre les différentes voies envisageables.

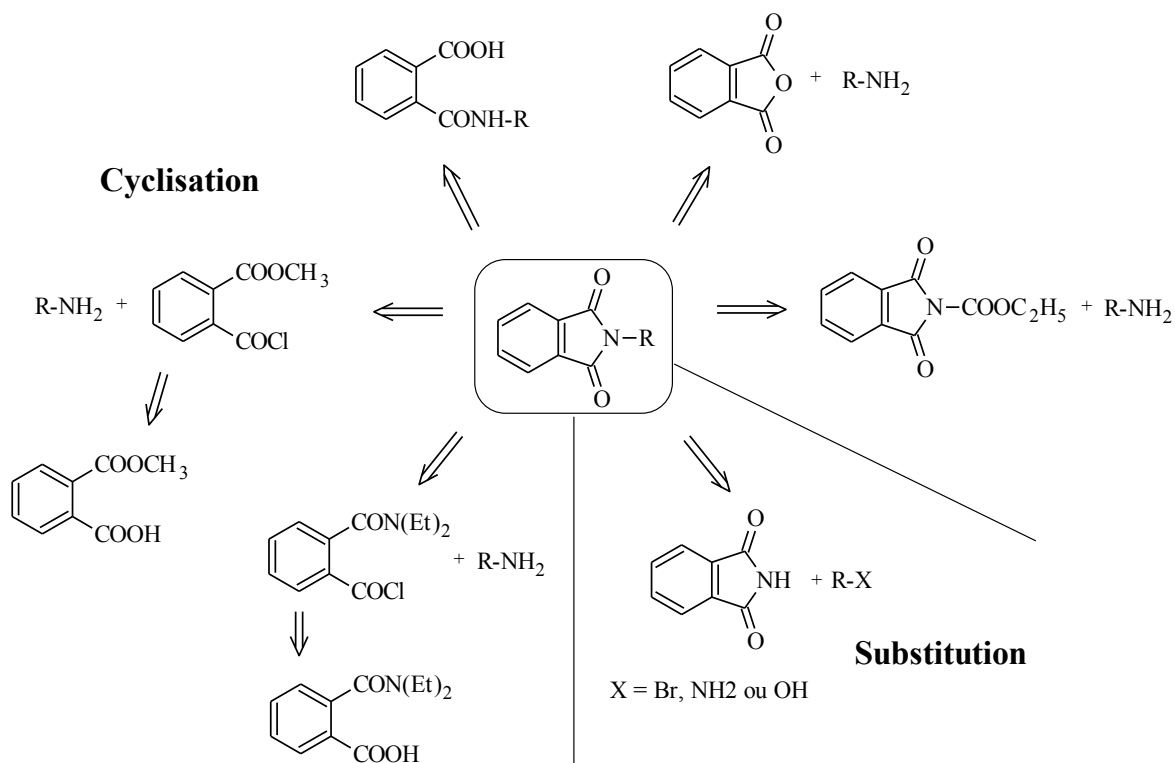


Schéma 1

1- Méthodes par cyclisation

1.1- Action d'une amine primaire sur l'anhydride phtalique et cyclisation des acides phtalamiques obtenus

La réaction entre une amine primaire aromatique ou aliphatique et l'anhydride phtalique conduit à un acide phtalamique *N*-substitué intermédiaire, qui, par déshydratation, se cyclise, pour conduire au phalimide désiré (BROWN, 1966).

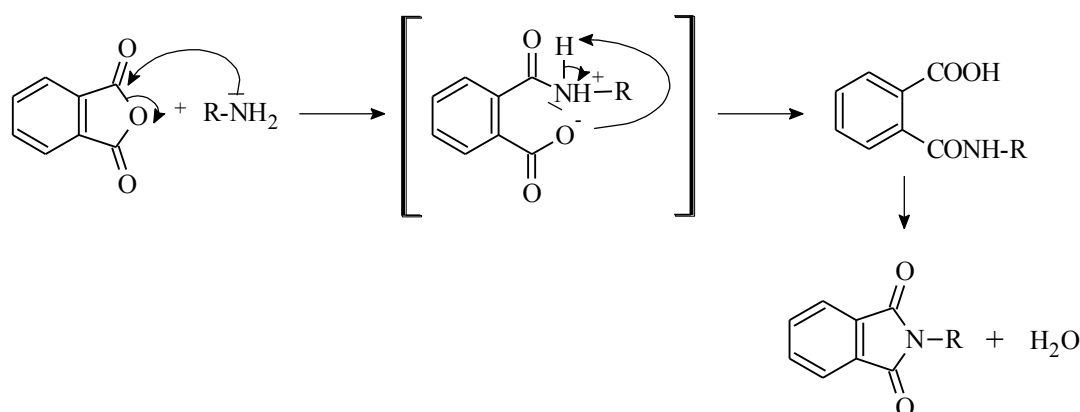


Schéma 2

La réaction peut s'effectuer par fusion directe de l'anhydride et de l'amine, en l'absence de solvant (VOGEL, 1989). Cette technique, utilisée dans la littérature pour l'obtention de *N*-phénylphtalimides et *N*-benzylphtalimides, s'est caractérisée par des temps de réaction très courts (1 à 2 h) et d'excellents rendements (SASAKI, 1995 - SHIBATA, 1994 - SHIBATA, 1996 - MIYACHI, 1997).

Cependant, notamment lorsque l'amine est instable à température élevée, il peut être recommandé d'utiliser des conditions moins drastiques. Ainsi, le reflux dans le benzène ou le toluène peut être envisagé (STERK, 1968) ou le reflux dans l'acide acétique glacial (PAGANI, 1968 - PAGANI, 1970). L'utilisation d'un déshydratant (anhydride acétique, anhydride phosphorique, association anhydride acétique et acétate de sodium) présente l'avantage d'accélérer la réaction (SEARLE, 1948 - FLOCH, 1979) mais le risque d'engendrer la formation d'isophtalimides par réarrangement (RODERICK, 1963).

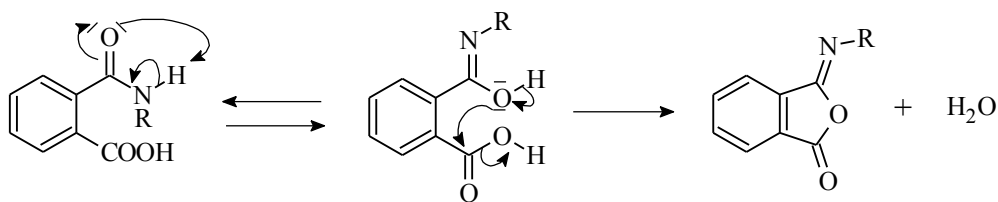


Schéma 3

Les méthodes de synthèse précédemment décrites présentent toutes l'avantage de permettre une purification facile des produits bruts par élimination des composés secondaires acides (dérivés d'acides phtalamiques) à l'aide d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (PAGANI, 1968).

1.2- Cyclisation de chlorures d'acides phtalamiques

L'action du chlorure de thionyle sur un acide phtalamique *N*-substitué entraîne la formation d'un chlorure d'acide phtalamique *N*-substitué instable qui se cyclise en phthalimide avec élimination d'acide chlorhydrique (HORAK, 1953).

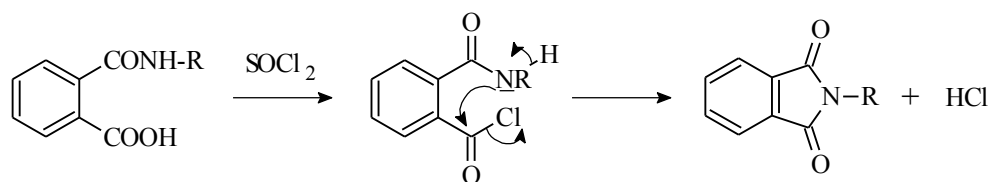


Schéma 4

1.3- Cyclisation de phtalamides

Les phthalimides *N*-substitués peuvent également être obtenus par cyclisation de phtalamides préalablement synthétisés.

L'accès à ces phtalamides peut se faire *via* un couplage amidique entre un chlorure d'acide phtalamique *N,N'*-disubstitué et une amine primaire (STERK, 1968).

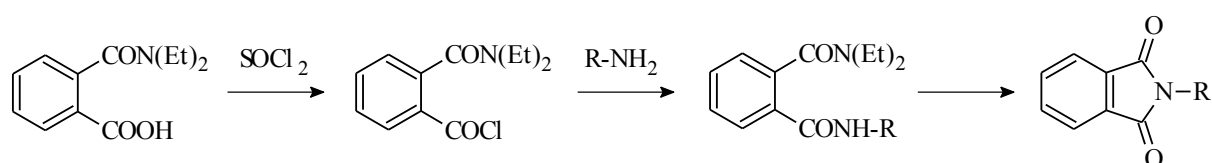


Schéma 5

Les phthalamides peuvent aussi être obtenus par aminolyse du phthalimide (HOOGWATER, 1973).

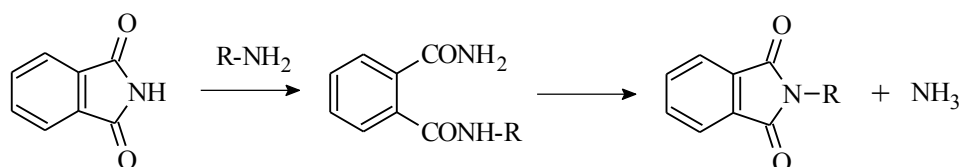


Schéma 6

1.4- Préparation à partir des chlorures d'acides d'hydrogénophthalate d'alkyle

Une autre possibilité pour obtenir des phthalamides *N*-substitués consiste à faire agir une amine primaire aliphatique sur le chlorure d'acide de l'hydrogénophthalate de méthyle. La réaction donne directement le phthalimide attendu (vraisemblablement *via* un ester d'acide phthalamique) (HOOGWATER, 1973 - FLOC'H, 1979). Cette voie d'accès peut s'avérer utile en synthèse peptidique car elle n'entraîne pas de racémisation des acides aminés (HOOGWATER, 1973).

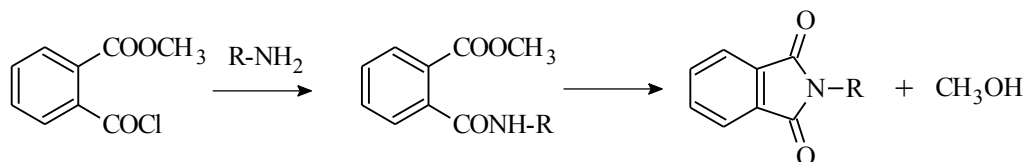


Schéma 7

1.5- Préparation à partir du *N*-carbéthoxyphthalimide

Enfin, parmi les méthodes par cyclisation, il existe une dernière voie d'accès qui consiste à faire réagir une amine avec le *N*-carbéthoxyphthalimide en milieu légèrement alcalin (Na_2CO_3). Cette méthode, comme la précédente, est non racémisante, donc intéressante pour la préparation de peptides et peut être réalisée dans l'eau comme solvant de réaction.

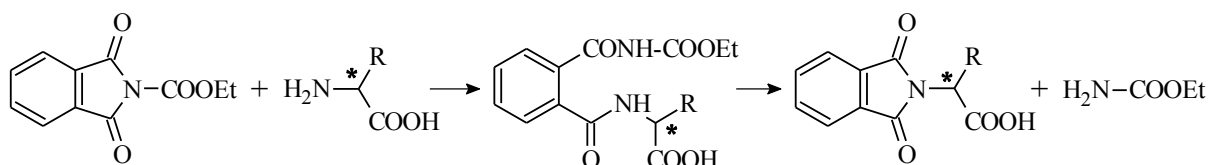


Schéma 8

2- Méthodes par substitution

L'accès aux phtalimides *N*-substitués peut également se faire par des méthodes de substitution. La plus classique consiste à faire réagir le phtalimide avec un halogénure d'alkyle en présence de carbonate de potassium. Cette synthèse, nommée **méthode de Gabriel**, est notamment utilisée pour obtenir des amines primaires en permettant le blocage transitoire de deux valences de l'azote (NIGH, 1975 - GIBSON, 1968).

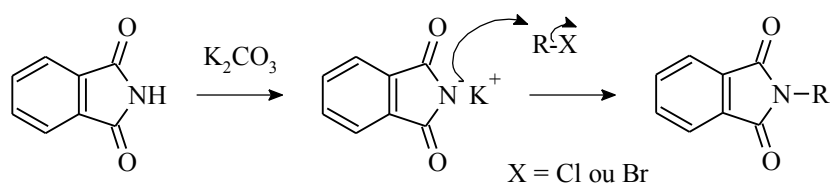


Schéma 9

Une autre méthode pouvant être utilisée est la **réaction de Mitsunobu**. Dans cette synthèse, le phtalimide réagit sur un alcool en présence de triphénylphosphine et d'azodicarboxylate d'éthyle pour donner le phtalimide substitué équivalent (MITSUNOBU, 1972)

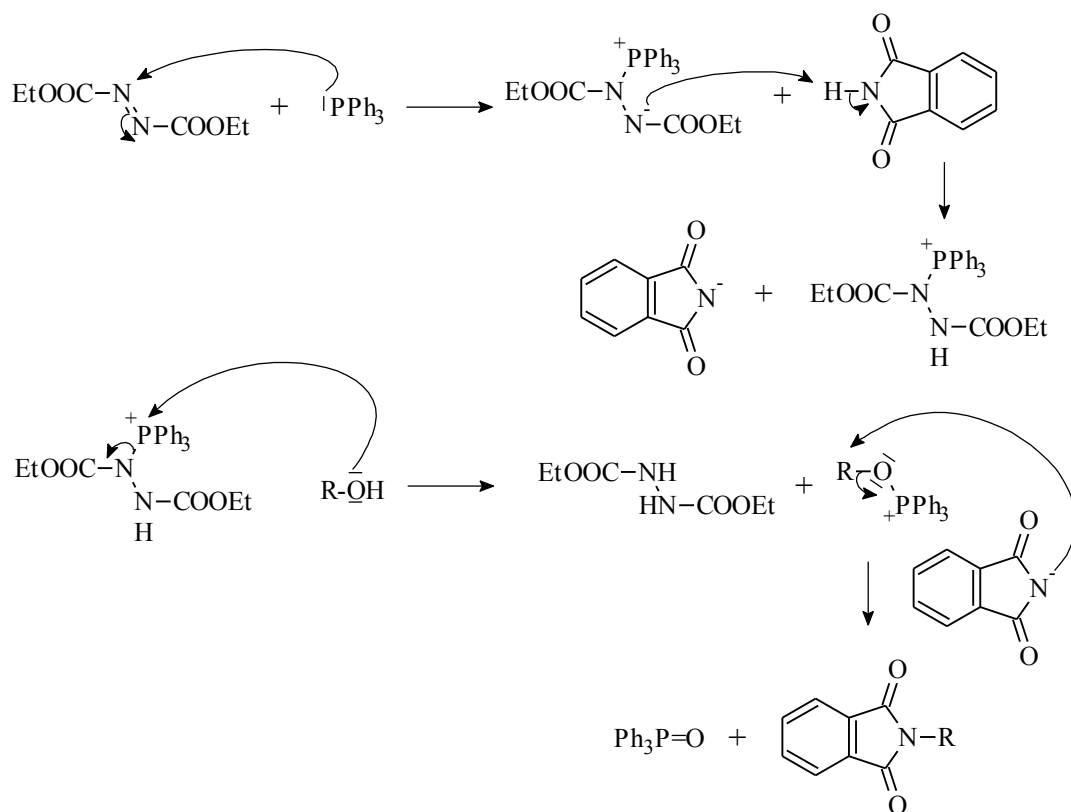


Schéma 10

3- Autres méthodes

Les méthodes par cyclisation et par substitution sont celles qui connaissent le plus d'applications en synthèse.

Rappelons, tout de même, qu'il existe d'autres voies d'accès présentant des applications beaucoup plus restreintes telle que, par exemple, la réaction de Tscherniac-Einhorn qui consiste à faire réagir l'hydroxyméthylphtalimide (préalablement obtenu par réaction de Mannich entre le phtalimide et le formol) avec un dérivé aromatique en présence d'acide sulfurique, selon un mécanisme de substitution électrophile (ZAUGG, 1969).

II- TRAVAUX REALISES

1- Cyclisation directe dans l'acide acétique glacial : méthode C

Nous avons choisi cette voie d'accès pour obtenir les 4-nitro et 5-nitrophthalimides *N*-substitués. Pour réaliser ces synthèses nous avons suivi le protocole décrit par Pagani *et al.* (PAGANI, 1968 - PAGANI, 1970) en tenant compte des modifications apportées par Floc'h (FLOC'H, 1979). L'amine est introduite en quantité stoechiométrique dans une solution d'anhydride 4-nitro ou 5-nitrophthalique à 10 à 15% (*p/v*) dans l'acide acétique glacial. Nous avons opté pour une durée de reflux de 15 heures éventuellement prolongée jusqu'à 22 heures en fonction des résultats du suivi sur CCM de la réaction, effectué à partir de $t = 15$ h.

Cette méthode n'a engendré aucun échec dans nos séries et a permis l'obtention des produits désirés avec des rendements tout à fait satisfaisants compris entre 72 et 95%.

De plus, ce protocole comprend une méthode d'isolement et de purification rapide et facilement exploitable qui consiste à évaporer le solvant de réaction et à traiter ensuite le résidu obtenu par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 4% qui permet l'élimination des impuretés acides (acides phthalamiques et phthaliques).

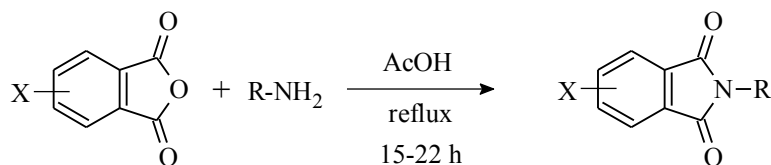


Schéma 11

N°	R	X	Rdt (%)
9		4-NO ₂	79
12		5-NO ₂	72
10		4-NO ₂	91
13		5-NO ₂	94
11		4-NO ₂	87
14		5-NO ₂	95

2- Réduction des 4-nitro et 5-nitrophthalimides : méthode B2

La réduction des 4-nitro et 5-nitrophthalimides a été réalisée de manière classique par voie catalytique (RESPLANDY, 1968) en utilisant le palladium sur charbon à 5% dans le THF sous atmosphère d'hydrogène et en chauffant à 50°C. Les 4-amino et 5-aminophthalimides ont été obtenus avec des rendements corrects (70-89%).

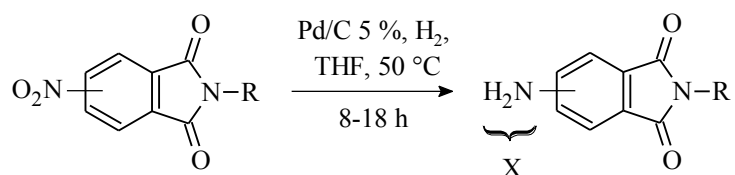


Schéma 12

N°	R	X	Rdt (%)
15		4-NH ₂	89
18		5-NH ₂	80
16		4-NH ₂	80
19		5-NH ₂	68
17		4-NH ₂	78
20		5-NH ₂	70

Il faut noter que l'utilisation du méthanol ou de l'éthanol en tant que solvant entraîne des rendements bien inférieurs à ceux obtenus en utilisant le THF. Cela s'explique par la faible solubilité des nitrophthalimides dans ces solvants.

III- PARTIE EXPERIMENTALE

I- METHODES DE SYNTHESE DES 4- ET 5-AMINO-1H-ISOINDOLE-1,3(2H)-DIONES

1- 4- et 5-nitro-1H-isoindole-1,3(2H)-diones

Méthode C

2-morpholin-4-yl-4-nitro-1H-isoindole-1,3(2H)-dione **9**

Dissoudre 2 g (10,36 mmoles) d'anhydride 3-nitrophthalique puis 1 mL (10,36 mmoles) de *N*-aminomorpholine dans 15 mL d'acide acétique glacial. Chauffer au reflux pendant 19 h. Evaporer ensuite l'acide acétique sous pression réduite. Reprendre le résidu solide par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 4%. Filtrer, laver à l'eau et sécher sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Recristalliser dans l'éthanol et recueillir 2,26 g du composé **9**.

Rendement : 79%

Poudre jaune

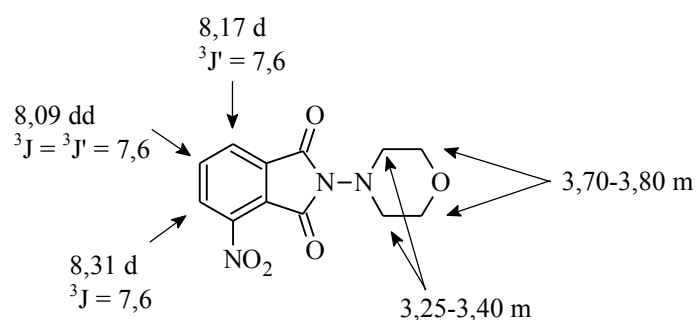
$C_{12}H_{11}N_3O_5$

$M_r = 277,24$

$F^\circ C = 189$

IR (KBr, cm^{-1}) : 1795 (ν_s C=O imide) ; 1729 (ν_{as} C=O imide) ; 1530 (ν_{as} NO₂) ; 1360 (ν_s NO₂).

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



2- 4- et 5-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Méthode B2

4-amino-2-morpholin-4-yl-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione **15**

Dissoudre 1,29 g (4,65 mmoles) du dérivé nitré **9**, précédemment synthétisé, dans 100 mL de tétrahydrofurane à chaud. Ajouter le palladium sur charbon à 5% en quantité catalytique. Agiter le mélange sous atmosphère d'hydrogène en chauffant à 50°C pendant 8 heures. Filtrer à chaud le catalyseur au moyen d'un filtre de papier. Evaporer ensuite le filtrat obtenu. Purifier le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par du dichlorométhane. Isoler 1,02 g de l'amine **15**.

Rendement : 89%

Poudre jaune

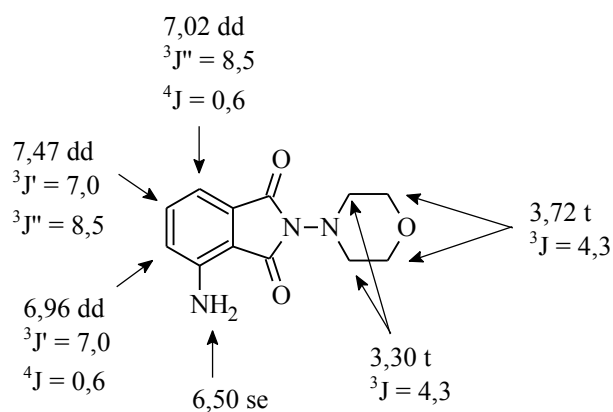
$C_{12}H_{13}N_3O_3$

$M_r = 247,26$

F°C = 264

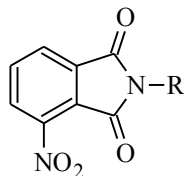
IR (KBr, cm^{-1}) : 3399 (ν NH_2) ; 1773 (ν_s C=O imide) ; 1705 (ν_{as} C=O imide) ; 1623 (δ NH_2) ;

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



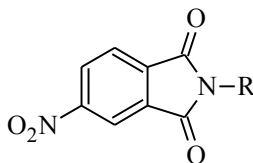
II- CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

Tableau 1 : 4-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **9-11**



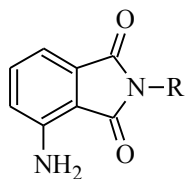
N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
9		C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₅ 277,24	C : 79	189 éthanol
10		C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄ 268,23	C : 91	121 éthanol
11		C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₄ 282,26	C : 87	141 éthanol

Tableau 2 : 5-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **12-14**



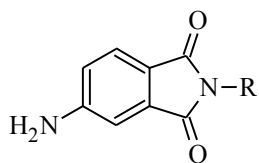
N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
12		C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₅ 277,24	C : 72	221 éthanol
13		C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄ 268,23	C : 94	189 éthanol
14		C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₄ 282,26	C : 95	161 éthanol

Tableau 3 : 4-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **15-17**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
15		$C_{12}H_{13}N_3O_3$ 247,26	B2 : 89	264 éther diéthylique
16		$C_{14}H_{10}N_2O_2$ 238,25	B2 : 80	180 éther diéthylique
17		$C_{15}H_{12}N_2O_2$ 252,28	B2 : 78	147 éther diéthylique

Tableau 4 : 5-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **18-20**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
18		$C_{12}H_{13}N_3O_3$ 247,26	B2 : 80	249 éther diéthylique
19		$C_{14}H_{10}N_2O_2$ 238,25	B2 : 68	207 éther diéthylique
20		$C_{15}H_{12}N_2O_2$ 252,28	B2 : 70	129 éther diéthylique

C- AMINES INTERMEDIAIRES : 1,1'-BIPHENYLAMINES

L'accès aux 1,1'-biphénylaminés a été envisagé de deux façons :

- La **voie I** comporte, dans un premier temps, une étape de blocage de la fonction amine de la bromoaniline par acétylation puis, dans un second temps, une arylation par un couplage de Suzuki dans des conditions classiques. Une dernière étape de déprotection de la fonction amine est enfin nécessaire pour conduire aux 1,1'-biphénylaminés.

- La **voie II** consiste à réaliser l'arylation de Suzuki directement sur la bromoaniline sans protection de la fonction amine en utilisant un nouveau système catalytique décrit par Tao *et al.* (TAO, 2004).

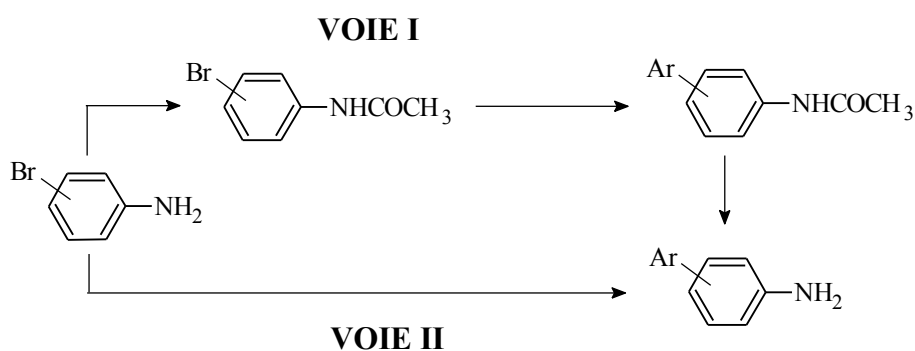


Schéma 1

I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : ARYLATION DE SUZUKI

L'accès à des composés biarylés a fait l'objet de nombreux travaux depuis la réaction de **Ullmann** en 1901 (ULLMANN, 1901). La méthode la plus couramment utilisée fait intervenir une réaction de "cross-coupling" entre un halogénure d'aryle ou un aryltriflate et un composé organométallique, catalysée par un métal de transition (STANFORTH, 1998).

Le métal de transition, utilisé comme catalyseur, est soit le nickel (0) soit le palladium (0).

Les composés organométalliques les plus importants sont dérivés du magnésium (réaction de **Kharasch**), du zinc (réaction de **Negishi**), de l'étain (réaction de **Stille**) et du Bore (réaction de **Suzuki**) (STILLE, 1986).

Dans la réaction de Kharasch, un réactif de Grignard arylé (Ar^1MgX où X est un halogène) réagit avec un halogénure d'aryle (Ar^2X) en présence d'un catalyseur approprié pour donner le composé biarylé ($\text{Ar}^1\text{-Ar}^2$). L'un des inconvénients de cette méthode est que la nature polaire du réactif de Grignard exclut l'utilisation de certains groupes fonctionnels comme les fonctions aldéhydes, cétones, esters et les groupements nitro.



La méthode de Negishi, consiste à faire réagir un dérivé organozincique (Ar^1ZnX) et un halogénure ou un triflate d'aryle (Ar^2X où X est un halogène ou un groupement triflate).

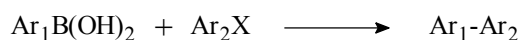


La réaction de Stille met en jeu un halogénure ou un triflate (FARINA, 1993) d'aryle et un dérivé organostannique (Ar^1SnR_3). Les composés stanniques sont très stables et cette réaction est compatible avec de nombreux groupements fonctionnels. L'inconvénient majeur de cette méthode repose sur la toxicité des organostanniques et des produits dérivés.



M. Miyaura et A. Suzuki (MIYAURA, 1981 - MIYAURA, 1995) ont développé une autre méthode utilisant des composés borés qui présentent l'avantage d'être très stables et peu toxiques contrairement aux organostanniques.

Cette réaction, dite de Suzuki, consiste à faire réagir un acide arylboronique ($\text{Ar}^1\text{B}(\text{OH})_2$) avec un halogénure ou un triflate d'aryle en présence d'une base et d'un catalyseur.



Cette méthode est très utilisée car elle peut être réalisée en présence de nombreux groupements fonctionnels. De plus, une grande variété d'acides boroniques est disponible dans le commerce. La réaction peut avoir lieu en milieu aqueux, ce qui favorise l'homogénéisation du mélange lors de l'utilisation de bases inorganiques (ANDERSON, 1995).

Les catalyseurs utilisés pour réaliser cette réaction sont le plus souvent à base de palladium, même si, parfois, des catalyseurs à bases de nickel peuvent s'avérer utiles.

Il existe de très nombreux catalyseurs palladiés. Les ligands du palladium jouent un rôle essentiel dans la réussite de la réaction de couplage. Ils se lient au centre palladé et agissent en stabilisant et/ou activant le complexe catalyseur. De nombreux travaux ont donc été menés pour développer de nouveaux ligands et actuellement, il existe un très grand nombre de catalyseurs palladiés.

A partir des ligands originaux de type triphénylphosphine (MIYAURA, 1981), d'autres ligands ont été développés contenant des phosphines de fort encombrement stérique et riches en électrons (LITTKKE, 1998 - LITTKKE, 2000 - ZAPF, 2000 - a-WOLFE, 1999 - b-WOLFE, 1999 - YIN, 2002 - SHAW, 1998 - a-FEUERSTEIN, 2001 - b-FEUERSTEIN, 2001 - SHAUGHNESSY, 2001 - NISHIMURA, 2002). Le catalyseur le plus utilisé est, d'ailleurs, le tétrakis(triphényl)phosphinepalladium (0). Des complexes palladiés cycliques et des oxydes de phosphines (LI, 2001 - LI, 2002 - BEDFORD, 2003) peuvent également être utilisés. D'autres catalyseurs tels que le diacétate de palladium (II) associé à la triphénylphosphine ou le dichlorobis(triphénylphosphine)palladium (II) sont également souvent utilisés. Ils sont facilement réduits *in situ* en complexes de palladium (0) actifs et présentent l'avantage d'être stables à l'air.

Des catalyseurs dépourvus de ligands de type phosphine sont actuellement développés (TAO, 2002 - MINO, 2005). Ils présentent l'intérêt d'être moins polluants et sont beaucoup plus stables.

La plupart de ces nouveaux catalyseurs ne sont pas commerciaux et leur synthèse s'avère parfois fastidieuse. De plus, les catalyseurs disponibles directement dans le commerce sont souvent très onéreux.

Dans un effort de développement de catalyseurs stables et facilement accessibles à un moindre coût, Tao *et al.* (TAO, 2004) ont développé un nouveau complexe palladié : le *trans*-diacétatebis(dicyclohexylamine)palladium (DAPCy). Ce catalyseur est très facilement synthétisable à partir de dicyclohexylamine et de diacétate de palladium et est stable à l'air. Ils ont ainsi mis au point un nouveau système catalytique, faisant intervenir le DAPCy en présence de K_3PO_4 dans l'éthanol, qui permet de réaliser des couplages de Suzuki en s'affranchissant d'une atmosphère inerte, dans des conditions très douces : température ambiante et bases moins fortes que celles utilisées dans beaucoup de couplages de Suzuki. Cette méthode permet ainsi de réaliser des couplages de Suzuki en présence de groupements particulièrement sensibles (comme des aldéhydes, des acides carboxyliques, des hydroxyles et des amines) sans qu'il soit nécessaire de les protéger auparavant.

Des études ont montré que le DAPCy est converti *in situ* en une espèce active dont la formation est facilitée par une élévation de température et la présence de solvants tels que l'éthanol. Le mécanisme exact de la réaction n'est pas encore totalement élucidé.

Le cycle catalytique suivant a été proposé pour expliquer la formation de la liaison carbone-carbone au cours du "cross-coupling" (MIYAURA, 1985) :

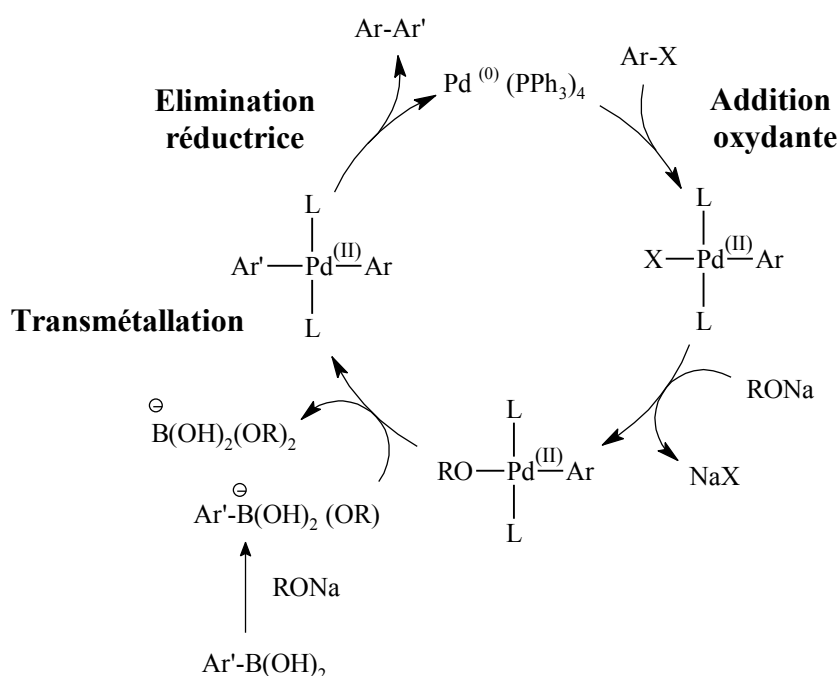


Schéma 2

Le cycle catalytique de la réaction de Suzuki est initié par **l'addition oxydante** du dérivé halogéné ou du triflate sur le complexe palladium (0) pour conduire à un complexe palladium (II) (Ar-Pd-X). Le Pd (0) s'insère dans la liaison C_{sp2}-X de l'halogénure ou du triflate, ce qui fait passer le degré d'oxydation du Pd (0) à Pd (+2). Il s'agit de l'étape déterminante pour la vitesse de la réaction.

La réactivité relative des dérivés arylés est, par ordre décroissant : I > OTf ≈ Br >> Cl (inversement proportionnelle à l'énergie de la liaison C_{sp2}-X). Différentes équipes ont néanmoins réalisé des réactions de "cross-coupling" entre des chlorures d'aryle et des acides boroniques en utilisant des catalyseurs (ex : le Pd(dba)₃, à base de dibenzylidène acétone), des ligands phosphines (ex : P(*t*Bu)₃) et des bases (ex : Cs₂CO₃) spécifiques (LITTKKE, 2002).

L'encombrement stérique de l'halogénure d'aryle n'est pas un facteur déterminant.

Par contre, les dérivés halogénés possédant un groupement électroattracteur sont plus réactifs à l'égard de l'addition oxydante que ceux substitués par un groupement électrodonneur. Cela s'explique par le fait que les groupements attracteurs renforcent la polarisabilité de la liaison C_{sp2}-X.

A ce stade du cycle, la base joue un rôle fondamental en déplaçant, par **substitution**, l'ion halogénure ou triflate du complexe palladié (Ar-Pd-X) pour donner un complexe alcoxypalladium (II) (Ar-Pd-OH) beaucoup plus réactif, qui va faciliter l'étape suivante.

Il se produit ensuite, une **transmétallation**. Le composé arylboré devient un composé arylpalladé. D'un point de vue mécanistique, cette étape correspond à un échange de ligands sur le palladium : le groupe OR du complexe palladé est remplacé par le groupe aryle (Ar') du composé arylboré.

Une étude a montré que la base entraînerait la formation de l'espèce réactive [Ar'-B(OH)₂(OR)]⁻, qui serait l'intermédiaire réactif plutôt que l'acide boronique correspondant.

Enfin, dans la dernière étape, les deux groupes aryles Ar et Ar' liés indépendamment l'un de l'autre par une liaison σ sur le palladium se couplent. Le degré d'oxydation du palladium redescend alors de +2 à 0. C'est donc une étape d'**élimination réductrice** qui fournit le composé biarylé Ar-Ar' et régénère le catalyseur palladié.

Cette réaction de couplage est encore la source de nombreux travaux. De nouvelles approches concernent l'utilisation des micro-ondes (BAI, 2003 - ZHANG, 2004), de supports solides (LUTZ, 2002) ou de liquides ioniques (MIAO, 2003).

II- TRAVAUX REALISES

1- Voie I : Arylation de Suzuki après blocage de la fonction amine

La fonction amine est un groupement électrodonneur. Sa présence sur le bromure de phényle, ne favorise pas la rupture de la liaison $C_{sp^2}-Br$ lors de la première étape d'addition oxydante de la réaction de couplage de Suzuki avec un acide arylboronique.

Nous avons donc envisagé, dans un premier temps, de bloquer cette fonction amine par acétylation.

1.1- N-acétylation de la 4-bromoaniline : méthode D

Le *N*-(4-bromophényl)acétamide **21** est obtenu de manière quantitative en mettant la 4-bromoaniline sous agitation dans l'anhydride acétique à température ambiante pendant 15 minutes.

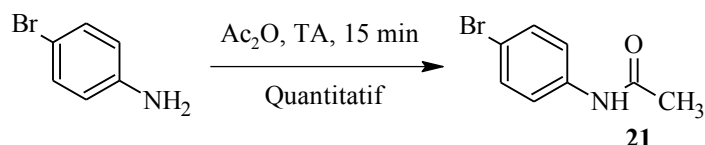


Schéma 3

1.2- Couplage de Suzuki avec le tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0) : méthode E1

L'arylation du *N*-(4-bromophényl)acétamide **21** est réalisée, dans des conditions classiques, sous atmosphère inerte dans l'éther diméthylique sous catalyse tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0), en utilisant l'acide phénylboronique et le carbonate de potassium comme base. Le *N*-1,1'-biphényl-4-ylacétamide **22** est ainsi obtenu avec un rendement de 61%.

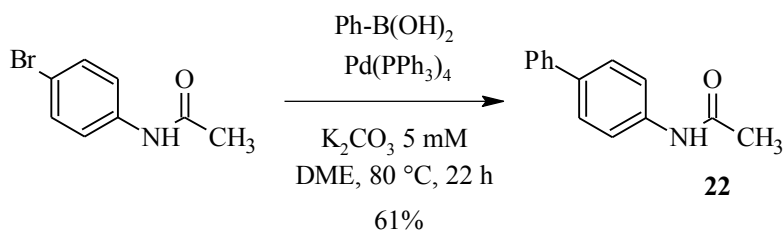


Schéma 4

1.3- Hydrolyse de la fonction amide : méthode F

L'hydrolyse alcaline du *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)acétamide **22** est réalisée, après solubilisation du produit dans l'éthanol, en ajoutant une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5 M et en laissant au reflux pendant 24 h. La 1,1'-biphényl-4-amine **23** est obtenue avec un rendement de 75%.

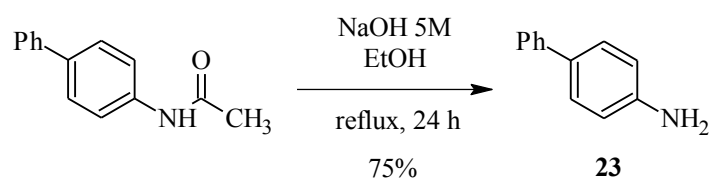


Schéma 5

Le rendement global des méthodes D, E1 et F est de 46%.

2- Voie II : Arylation de Suzuki directe sur la bromoaniline

Dans le but d'augmenter le rendement et de diminuer le nombre d'étapes, nous avons envisagé de réaliser des arylations de Suzuki en une étape, directement sur les 3-bromo et 4-bromoanilines. Pour cela nous avons mis en oeuvre la méthode décrite par Tao *et al.* (TAO, 2004) utilisant le DAPCy comme catalyseur.

En effet, nous avons vu dans l'étude bibliographique que cette méthode présentait l'avantage d'être compatible avec la présence de groupements très sensibles comme les fonctions amines.

2.1- Synthèse du *trans*-diacétatebis(dicyclohexylamine)palladium (DAPCy) : méthode G

La synthèse du DAPCy se fait très facilement en mettant en contact, sous atmosphère inerte, du diacétate de palladium avec 2 équivalents de dicyclohexylamine sous agitation dans le dioxane à température ambiante pendant 3 heures. Le DAPCy est alors obtenu avec un rendement de 86%.

Ce catalyseur présente donc l'avantage d'être simple à synthétiser à partir de réactifs peu coûteux.

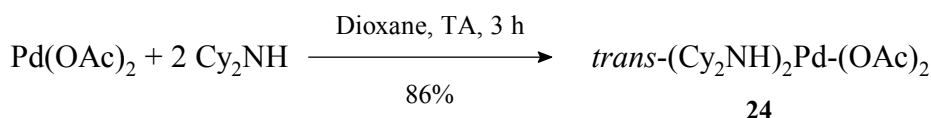


Schéma 6

2.2- Arylations de Suzuki directes sur la bromoaniline : méthode E2

L'arylation de la 4-bromoaniline, selon la méthode classique E1 décrite précédemment s'est soldée par un échec.

La méthode de Tao *et al.* a donc été appliquée. La 4-bromoaniline a ainsi été phénylée en utilisant l'acide phénylboronique, sous catalyse du DAPCy, en présence de K_3PO_4 à 2 mM, dans l'éthanol, à température ambiante et sous atmosphère aérobie, pendant 6 heures. Le produit **23** est obtenu avec un rendement très médiocre de 24% qui s'explique, en partie par la perte de produit lors de la purification.

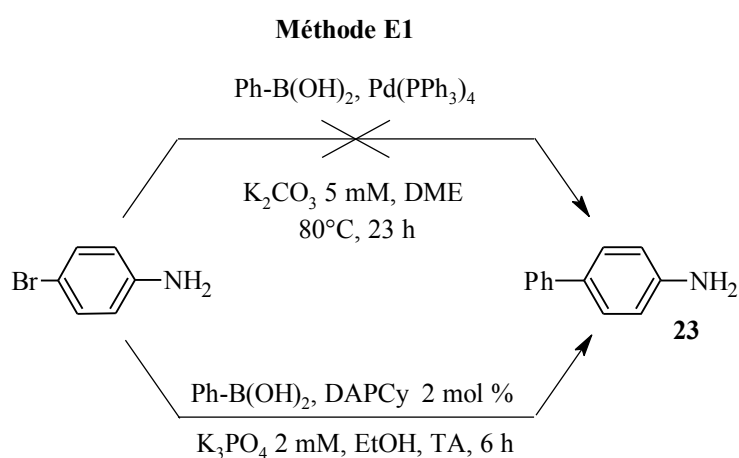


Schéma 7

Cette méthode a donc été adoptée pour la synthèse de tous nos composés 1,1'-biphénylaminés en utilisant divers acides boroniques et a permis d'obtenir les produits désirés avec des rendements satisfaisants dans la majorité des cas (70-95%). Les rendements médiocres observés avec les composés **28** et **30** s'expliquent par la perte de produit lors de la purification.

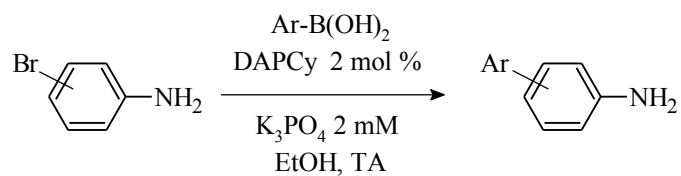


Schéma 8

N°	Ar	Temps de réaction	Rdt (%)
23	4-phényle	6 h	24
28	3-phényle	3 h	53
25	4-(4-chlorophényle)	72 h	78
29	3-(4-chlorophényle)	7 h	70
26	4-(4-fluorophényle)	72 h	89
30	3-(4-fluorophényle)	6 h 30	30
27	4-(4-méthoxyphényle)	46 h	72
31	3-(4-méthoxyphényle)	5 h 30	95

Il faut noter que les temps de réaction sont beaucoup plus longs avec les 4-bromoanilines. Cela s'explique par le fait que lorsque le brome et la fonction amine sont en *para* sur le cycle aromatique, il y a enrichissement en électrons de la liaison $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-Br}$ par rapport à la position *meta*, ce qui ne favorise pas sa rupture.

III- PARTIE EXPERIMENTALE

I- METHODES DE SYNTHÈSE DES 1,1'-BIPHENYL-4-AMINES ET 1,1'-BIPHENYL-3-AMINES

1- Voie I : Arylation de Suzuki après blocage de la fonction amine

Méthode D

N-(4-bromophényl)acétamide **21**

Dissoudre 1 g (5,81 mmoles) de 4-bromoaniline dans 4 mL d'anhydride acétique et laisser sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes. Il se forme instantanément une poudre blanche très fine. Evaporer sous pression réduite et reprendre par de l'éther diéthylique. Recueillir 1,24 g du produit **21**.

Rendement : quantitatif

Poudre blanche

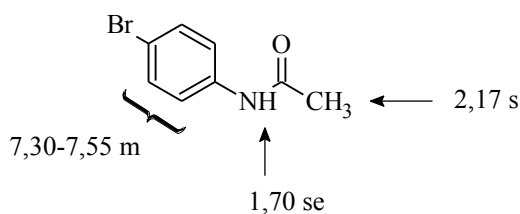
C_8H_8BrNO

$M_r = 214,07$

F°C = 163

IR (KBr, cm^{-1}) : 3295 (ν NH) ; 1670 (ν C=O amide) ; 1531 (δ NH) ; 1308 (comb. NH/CN) ; 1006 (ν C-Br).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode E1

N-1,1'-biphényl-4-ylacétamide **22**

Dissoudre 0,5 g (2,33 mmoles) de *N*-(4-bromophényl)acétamide **21** dans 15 mL d'éther diméthylque. Placer le milieu réactionnel sous courant d'azote pendant 30 minutes. Ajouter, à chaud et sous atmosphère d'azote, 70 mg (0,06 mmoles, 0,03 éq) de tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) et laisser sous agitation pendant 15 minutes. Ajouter ensuite 2,5 mL d'une solution aqueuse de carbonate de potassium 2M puis 0,31 g (2,56 mmoles, 1,1 éq) d'acide phénylboronique dissous à chaud dans quelques millilitres d'éther diméthylque. Chauffer le mélange à 80°C et le laisser sous agitation vigoureuse et sous atmosphère d'azote pendant 22 heures. Extraire la phase aqueuse par du dichlorométhane, réunir les phases organiques et les laver à l'eau. Sécher sur sulfate de sodium anhydre, filtrer et évaporer le solvant. Reprendre le résidu par de l'éther diéthylique. Recueillir 0,30 g du produit **22** sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement : 61%

Poudre blanche

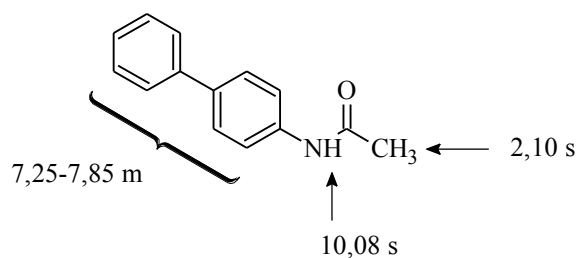
$C_{14}H_{13}NO$

$M_r = 211,27$

F°C = 162

IR (KBr, cm^{-1}) : 3289 (ν NH) ; 1662 (ν C=O amide) ; 1530 (δ NH) ; 1318 (comb. NH/CN)

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode F

1,1'-biphényl-4-amine **23**

Dissoudre 0,20 g (0,95 mmoles) de *N*-1,1'-biphényl-4-ylacétamide **22** dans 5 mL d'éthanol et ajouter, goutte à goutte et sous agitation, 20 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5M. Laisser sous agitation au reflux pendant 24 heures. Extraire par l'éther diéthylique. Sécher sur sulfate de sodium anhydre, filtrer et évaporer le solvant. Purifier le

résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par l'éther diéthylique. Recueillir 0,12 g de l'amine **23**.

Rendement : 75%

Poudre jaune

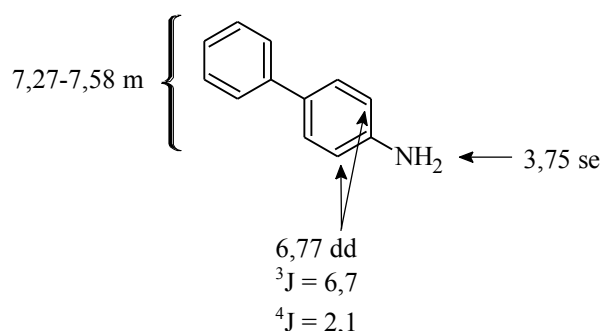
$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

F°C = 50

IR (KBr, cm^{-1}) : 3424 (ν_{as} NH_2) ; 3391 (ν_s NH_2) ; 1627 (δ NH_2).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



2- Voie II : Arylation de Suzuki directe sur la bromoaniline

2.1- Synthèse du *trans*-diacétatebis(dicyclohexylamine)palladium (DAPCy) **24**

Méthode G

trans-diacétatebis(dicyclohexylamine)palladium **24**

Dans un ballon rodé de 50 mL, placer 20 mL de dioxane sous courant d'azote pendant 30 minutes. Ajouter ensuite 449 mg (2,00 mmoles) de diacétate de palladium en solution dans du dioxane et additionner goutte à goutte 0,8 mL (4,00 mmoles) de dicyclohexylamine. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Un précipité jaune se forme. Evaporer le solvant sous pression réduite et recristalliser la poudre obtenue dans du dichlorométhane. Recueillir 1 g d'une poudre jaune.

Rendement : 86%

Poudre jaune

$C_{28}H_{52}N_2O_4Pd$

$M_r = 587,14$

F°C = 140

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) : 6,94-6,92 (m; 2H) ; 2,84-2,79 (m, 4H) ; 2,55-2,35 (m, 4H) ; 2,01-1,66 (m, 30 H) ; 1,40-1,10 (m, 12 H).

2.2- Arylations de Suzuki directes sur la bromoaniline

Méthode E2

4'-chloro-1,1'-biphényl-4-amine 25

Dissoudre 35,2 mg (0.06 mmoles, 0,02 éq) de DAPcy dans 9 mL d'éthanol. Ajouter 0,51 g (2,96 mmoles) de 4-bromoaniline, 0,56 g (3,55 mmoles, 1,2 éq) d'acide 4-chlorophénylboronique et 1,27 g (6,00 mmoles, 2 éq) de phosphate tripotassique. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 72 h. Filtrer sur célite et extraire la phase aqueuse par de l'éther diéthylique. Réunir les phases organiques et les laver à l'eau. Sécher sur sulfate de sodium anhydre, filtrer et évaporer le solvant. Reprendre le résidu par du cyclohexane.

Rendement : 78%

Poudre jaune

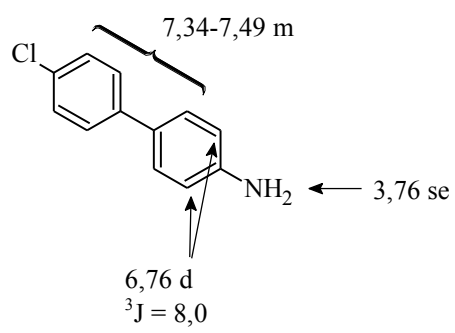
$C_{12}H_{10}ClN$

$M_r = 203,67$

F°C = 119

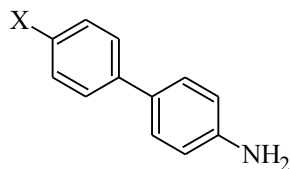
IR (KBr, cm^{-1}) : 3415 (νNH_2) ; 1607 (δNH_2).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



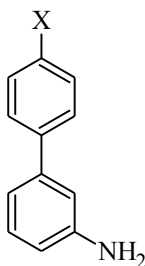
II- CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

Tableau 1 : 1,1'-biphényl-4-amines **23** et **25-27**



N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
23	H	$C_{12}H_{11}N$ 169,23	E1 : 0 D+E1+F : 46 E2 : 24	50 cyclohexane
25	Cl	$C_{12}H_{10}ClN$ 203,67	E2 : 78	119 cyclohexane
26	F	$C_{12}H_{10}FN$ 187,22	E2 : 89	112 cyclohexane
27	OMe	$C_{13}H_{13}NO$ 199,26	E2 : 72	137 cyclohexane

Tableau 2 : 1,1'-biphényl-3-amines **28-31**



N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
28	H	$C_{12}H_{11}N$ 169,23	E2 : 53	- (huile)
29	Cl	$C_{12}H_{10}ClN$ 203,67	E2 : 70	- (huile)
30	F	$C_{12}H_{10}FN$ 187,22	E2 : 30	58 cyclohexane
31	OMe	$C_{13}H_{13}NO$ 199,26	E2 : 95	82 cyclohexane

D- SERIE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES

I- APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE : VOIES D'ACCES AUX UREES CYCLIQUES

Les urées cycliques à 5 carbones, sont très souvent utilisées en synthèse asymétrique comme auxiliaires chiraux pour la réalisation de réactions hautement diastéréosélectives d'alkylation (DAVIES, 1994), d'aldolisation (DAVIES, 1991) ou de Diels-Alder (JENSEN, 1992).

Les imidazolidin-2-ones utilisées dans ces situations sont des molécules substituées par un groupement alkyle ou aryle en position 4 ou 5 du cycle qui confère au composé un centre de chiralité. De nombreuses voies d'accès à ces composés ont été décrites dans la littérature.

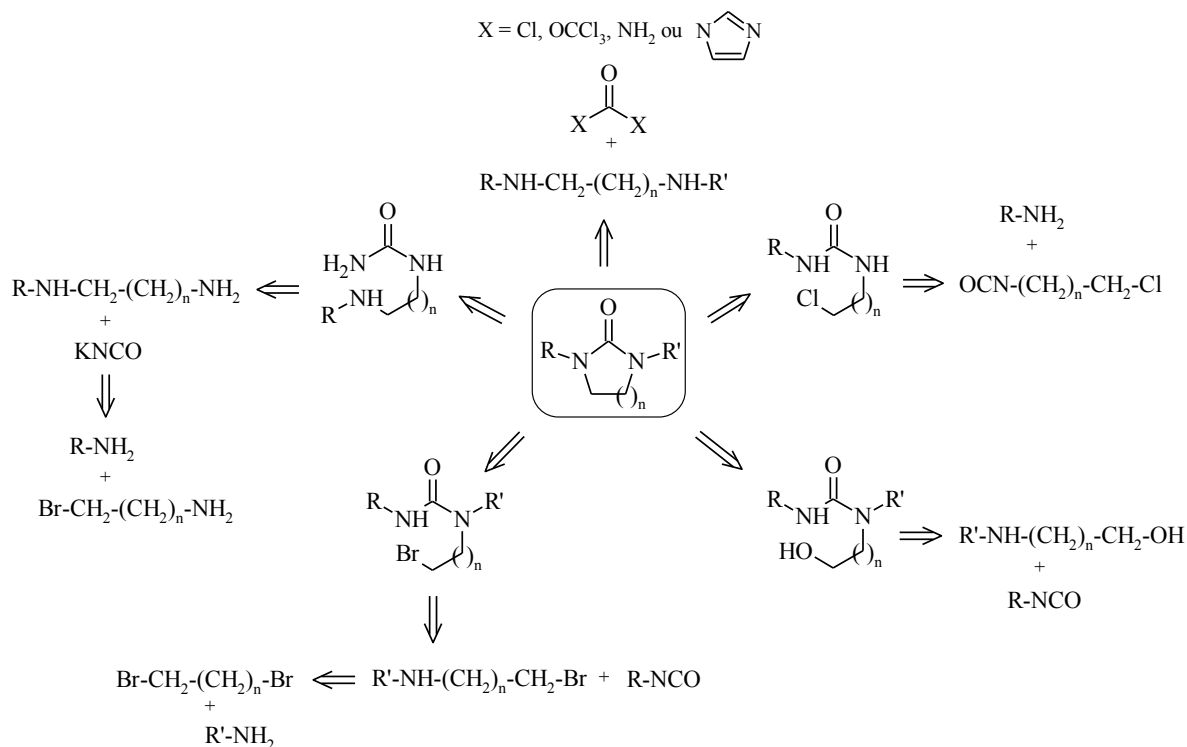
Néanmoins, nos travaux se portant sur l'étude d'imidazolidin-2-ones non substituées en position 4 et 5, nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur les voies d'accès à ces composés, excluant volontairement certains procédés très spécifiques permettant d'introduire divers groupements en position 4 et 5.

Les méthodes les plus utilisées font appel à deux grandes stratégies.

La première permet d'obtenir l'urée cyclique en une seule étape par une réaction de cyclisation entre une diamine et un dérivé d'acide carbonique.

La seconde stratégie consiste à synthétiser une urée, à partir d'une amine ou d'un acide aminé, puis à réaliser une réaction de cyclisation intramoléculaire pour accéder au produit désiré.

Les voies de synthèse les plus fréquemment utilisées sont représentées dans le schéma rétrosynthétique ci-dessous.



1- Réaction de cyclisation entre une diamine et un dérivé d'acide carbonique

La méthode la plus classique pour l'obtention d'urées cycliques consiste à faire réagir une diamine, diversement substituée au niveau de ses deux atomes d'azote, sur un dérivé d'acide carbonique. Il se produit alors une double réaction de substitution nucléophile sur le carbone du carbonyle permettant la formation du dérivé cyclisé désiré.

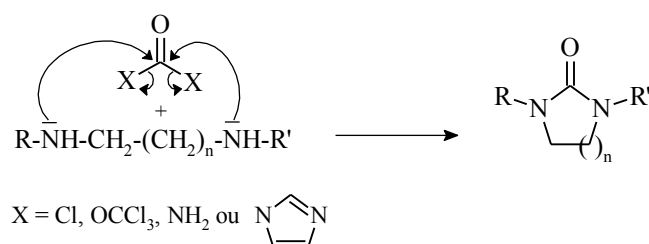


Schéma 2

Ce procédé présente l'avantage d'être très facilement réalisable et de permettre l'accès à des urées cycliques *N, N'*-disubstituées en une seule étape.

Divers dérivés d'acide carbonique ont été utilisés dans la littérature.

Le phosgène (ClCOCl) a tout d'abord été employé (MOLL, 1974). La très forte toxicité de ce gaz, le rendant très difficile à manipuler en toute sécurité, il a été remplacé par un dérivé solide : le triphosgène (Cl3CO-CO-OCCl3) (KIM, 1996).

L'urée peut également servir de réactif et permettre l'accès à de nombreux composés (WILSON, 1950 - MOREL, 1961 - MATOSIUK, 1996).

Enfin, le *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) est très souvent utilisé. Il permet d'accéder à un très grand nombre d'imidazolidin-2-ones et de tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones (WRIGHT, 1966 - KAZMIERSKI, 2004) substituées par des groupements complexes (HEIDEMPERGHER, 1997 - KALTENBACH, 2003).

Cette voie d'accès peut donc s'avérer particulièrement intéressante. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ce type de méthode réside dans le risque de réactions secondaires de polymérisation (DAVIES, 1993).

2- Passage par une urée puis réaction de cyclisation intramoléculaire

Dans la plupart des méthodes décrites dans la littérature, l'urée est obtenue en faisant réagir une fonction amine avec un isocyanate. Il s'agit d'une réaction d'addition d'un hétéronucléophile sur la double liaison $C=N$ de l'isocyanate. Ce type de réaction fait partie des plus anciennes synthèses connues en chimie organique et elle se déroule selon le mécanisme d'addition non catalysée décrit dans le schéma 3.

L'hétéronucléophile (ici l'azote de la fonction amine) attaque l'atome de carbone, hybridé sp , au centre du groupe fonctionnel isocyanate. Cette étape est cinétiquement déterminante et conduit à la formation d'un intermédiaire dans lequel l'atome de carbone attaqué est hybridé sp^2 et ainsi coordonné dans une conformation planaire trigonale. Il s'ensuit une migration de proton permettant d'aboutir à l'urée.

Cette réaction peut être acido-catalysée. Dans ce cas, il se forme un intermédiaire protoné à partir de l'isocyanate au niveau de l'azote qui favorise l'attaque de l'hétéronucléophile sur le carbone central de la fonction isocyanate (schéma 3).

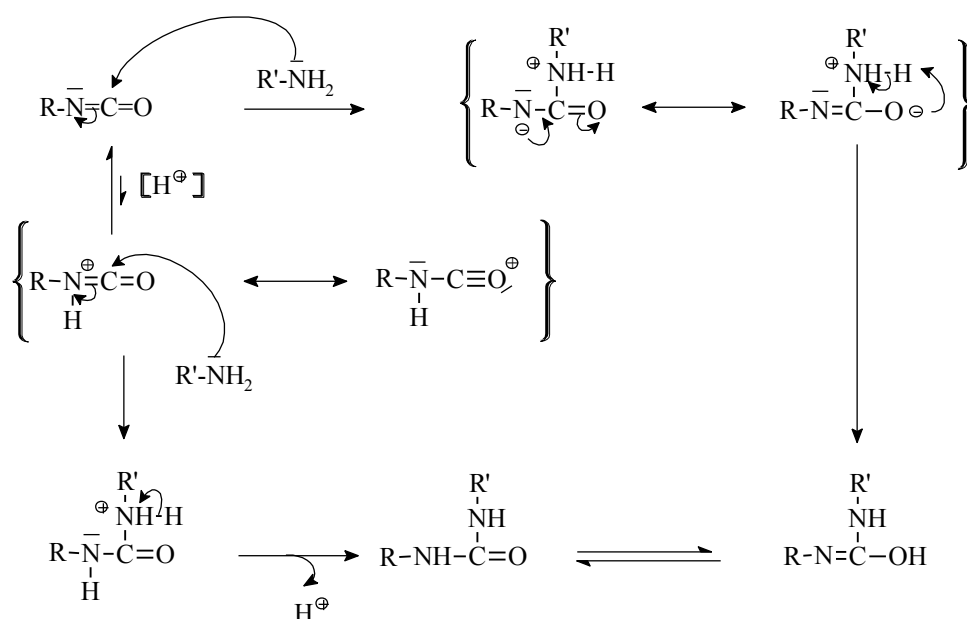


Schéma 3

2.1- Action de l'isocyanate de potassium sur une diamine

Une méthode d'accès aux imidazolidin-2-ones et aux tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones consiste à faire réagir une éthane-1,2-diamine ou une propane-1,3-diamine avec l'isocyanate de potassium en milieu acide. Il se forme alors une *N*-aminoalkylurée qui se cyclise ensuite par chauffage à 220°C (WRIGHT, 1966).

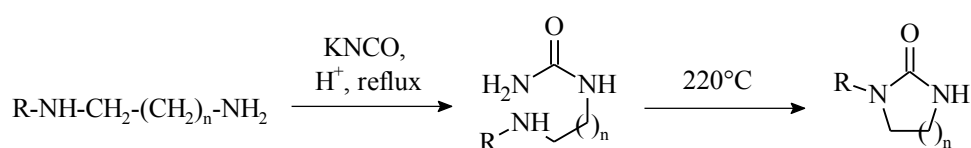


Schéma 4

2.2- Action d'un isocyanate d'alkyle ou d'aryle sur une bromoalkylamine

Cette voie de synthèse, décrite par Kurihara *et al.* (KURIHARA, 2004) est une variante de la précédente. La première étape consiste à réaliser une *N*-alkylation sur une amine primaire avec le 1,2-dibromoéthane ou le 1,3-dibromopropane. La bromoalkylamine ainsi formée s'additionne ensuite sur un isocyanate d'alkyle ou d'aryle pour former la *N*-

bromoalkylurée correspondante. La cyclisation intramoléculaire du dérivé uréique est enfin effectuée en utilisant l'hydrure de sodium comme base (schéma 5).

Cette méthode permet d'accéder directement à des urées cycliques *N,N'*-disubstituées.

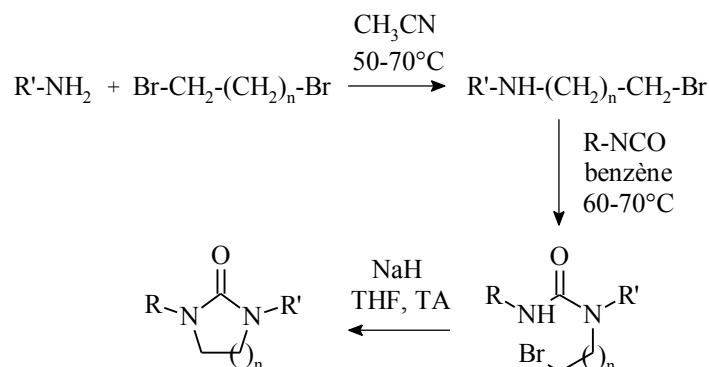


Schéma 5

2.3- Action d'un isocyanate d'alkyle ou d'aryle sur un dérivé du 2-aminoéthan-1-ol

Une voie d'accès utilisant des aminoalcools comme réactifs de départ a également été décrite par Kim *et al.* (KIM, 1999). Ces dérivés du 2-aminoéthan-1-ol peuvent être obtenus simplement par réduction des acides aminés correspondants (KIM, 1990).

L'urée est ensuite obtenue par addition de l'aminoalcool sur un isocyanate d'aryle ou d'alkyle.

La cyclisation en imidazolidin-2-one est ensuite effectuée en "*one-pot*" par action simultanée du chlorure de tosyle et du tert-butyrate de potassium.

Il est à noter que ces conditions permettent d'obtenir uniquement le produit *N*-cyclisé sans aucune trace de produit *O*-cyclisé contrairement à ce que l'on peut observer lorsque l'on réalise la réaction en deux temps ou lorsque l'on effectue une réaction du Mitsunobu en utilisant l'azodicarboxylate de diéthyle et la triphénylphosphine (KIM, 1990). Dans ces derniers cas, un problème de régiosélectivité de la réaction de cyclisation se pose.

Cette technique présente surtout un intérêt pour la synthèse d'auxiliaires chiraux possédant un groupement en position 4 ou 5 du cycle imidazolidin-2-one apportant à la molécule un centre de chiralité. Dans ce cas, il faut partir d'acides aminés chiraux.

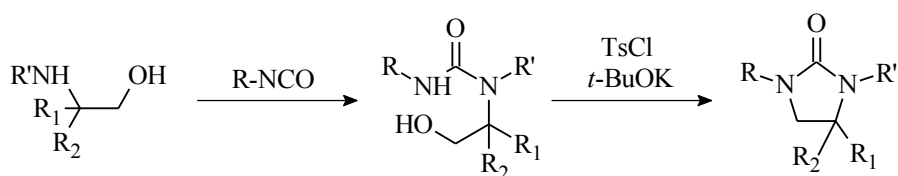


Schéma 6

2.4- Action d'un isocyanate de chloroalkyle sur une amine primaire

Enfin, parmi les méthodes faisant intervenir la cyclisation d'une urée, il existe une voie d'accès fréquemment rencontrée consistant à réaliser l'addition d'une amine primaire sur un isocyanate de 2-chloroéthyle ou de 3-chloropropyle (GABRIEL, 1895 - HENTZER, 1977 - MAYER, 2000). La chloroalkylurée ainsi formée est ensuite cyclisée par une réaction de substitution nucléophile en milieu alcalin.

Cette cyclisation peut se faire au reflux de l'acétonitrile en présence de carbonate de sodium (ROBERT, 2003) ou de carbonate de césium (SABOURIN, 2004). Elle peut également s'effectuer à température ambiante en utilisant l'hydrure de sodium comme base dans le THF (OTTO, 1998 - MAYER, 2000) ou un mélange DMF/THF (1:1) (SHIA, 2002).

Ce procédé permet l'obtention d'urées cycliques *N*-substituées par une très grande variété de groupements. Peu d'échecs ont été observés avec cette technique.

L'accès à des dérivés *N,N'*-disubstitués peut être réalisé facilement par des réactions d'alkylation, de sulfonylation ou d'acylation au niveau de l'azote uréique non substitué (ROBERT, 2003).

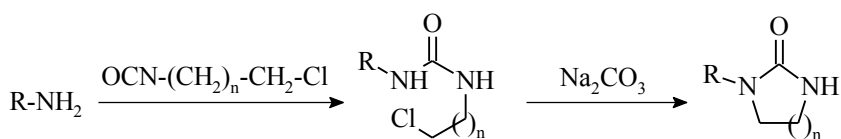


Schéma 7

3- Autres méthodes

Outre les méthodes précédemment décrites, il existe d'autres moyens d'accéder aux urées cycliques même si leurs applications ont été jusqu'à présent beaucoup plus limitées.

Quelques exemples de ces synthèses sont exposés dans le paragraphe suivant.

3.1- A partir d'hydrazines

Michels *et al.* ont employé un procédé utilisant la 2-hydrazinoéthanamine comme réactif de départ (MICHELS, 1956). Dans la première étape, l'hydrazone, formée à partir de la 2-hydrazinoéthanamine et de 2 équivalents de benzaldéhyde, réagit avec le chlorocarbonate d'éthyle pour donner l'ester correspondant qui est ensuite hydrolysé en milieu acide. Le 1-(2-aminoethyl)hydrazinecarboxylate d'éthyle obtenu est ensuite cyclisé par l'action de l'éthylate de sodium permettant d'accéder à la *N*-aminoimidazolidin-2-one.

Cette molécule peut alors servir de synthon pour l'obtention de *N*-iminoimidazolidin-2-ones, par l'action de différents aldéhydes.

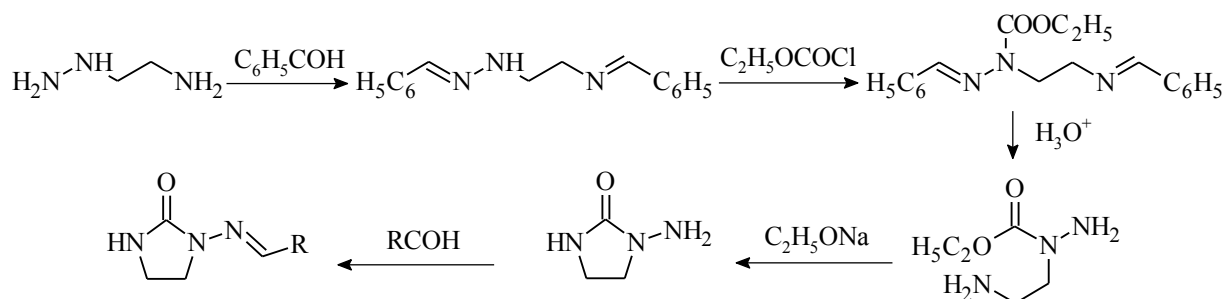


Schéma 8

3.2- A partir de diamines activées par un carbamate

Il n'est pas toujours possible de réaliser la cyclisation entre une diamine et un dérivé de l'acide carbonique, tel que par exemple, le 1,1'-carbonyldiimidazole. C'est notamment le cas lorsque les substituants présents sur la diamine génèrent une gêne stérique trop importante. Dans cette situation, une alternative consistant à passer par un intermédiaire carbamate (HEIDEMPERGHER, 1997) peut s'avérer utile (schéma 9).

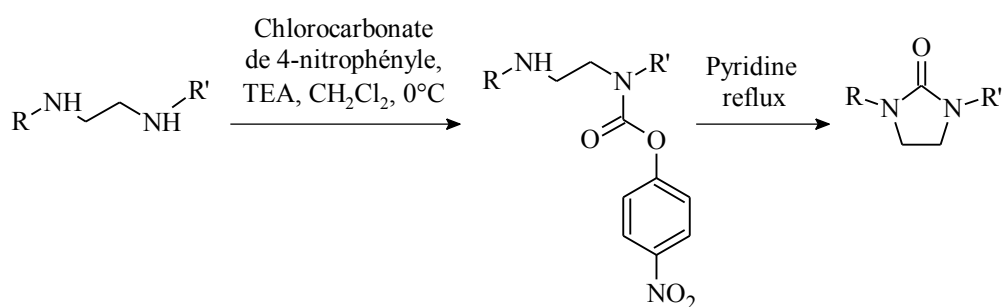


Schéma 9

II- TRAVAUX REALISES

Pour la synthèse des imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées, nous avons employé la méthode décrite par Gabriel *et al.* (GABRIEL, 1895) consistant à additionner une amine primaire sur un isocyanate de 2-chloroéthyle et réaliser la cyclisation intramoléculaire de l'urée obtenue en milieu alcalin.

Le choix de cette voie d'accès a été motivé par le fait que ce procédé a généré très peu d'échecs dans les séries antérieurement synthétisées au laboratoire (ABDALA, 2000 - ROBERT, 2003). De plus, il permet l'utilisation d'une très grande variété d'amines de départ.

Les imidazolidin-2-ones *N*-substituées ainsi obtenues ont parfois été alkylées pour donner des dérivés *N,N'*-disubstitués.

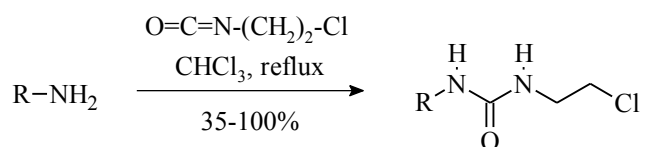
1- Synthèse des *N*-(2-chloroéthyl)urées

La plupart des urées ont été synthétisées selon la **méthode H1**. Dans ce procédé, l'amine est dissoute dans du chloroforme à chaud et l'isocyanate de 2-chloroéthyle est ensuite ajouté, goutte à goutte, au milieu réactionnel. L'ensemble est enfin porté au reflux pendant une durée très variable en fonction des amines utilisées.

D'une manière générale, les temps de réaction sont compris entre 5 minutes et 5 heures. Néanmoins, pour les molécules **40** et **52** la réalisation de la réaction a exigé un temps beaucoup plus important (29 et 39 heures respectivement).

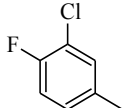
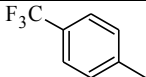
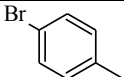
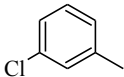
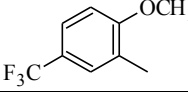
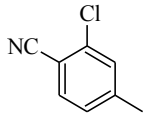
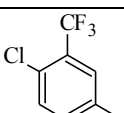
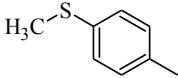
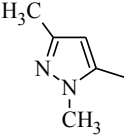
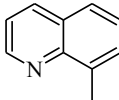
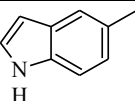
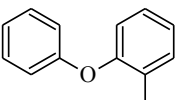
Il a parfois été nécessaire d'ajouter un ou plusieurs équivalents d'isocyanate de 2-chloroéthyle afin de déplacer l'équilibre de la réaction pour en augmenter le rendement.

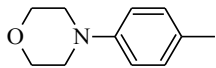
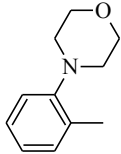
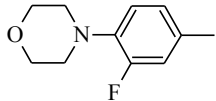
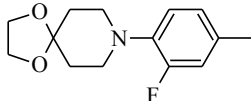
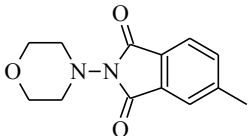
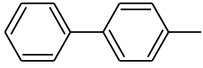
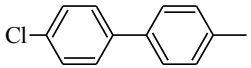
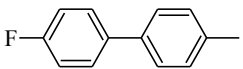
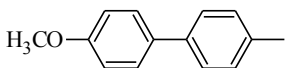
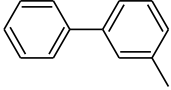
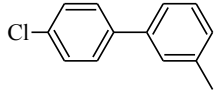
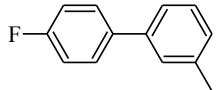
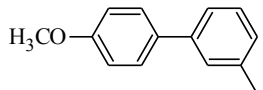
Les urées ont été obtenues avec des rendements corrects à très bons, excepté pour les molécules **37** et **40** pour lesquelles les rendements ont été très médiocres (39 et 35% respectivement) malgré une augmentation du nombre d'équivalents d'isocyanate utilisés (jusqu'à 5 équivalents pour la synthèse de la molécule **37**) et du temps de réaction (au-delà de 20 heures pour les deux molécules).



Méthode H1

Schéma 10

N°	R	Nombre d'équivalents (éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle	Temps de réaction	Rdt (%)
32		1 éq	3 h	91
33		1 éq	3 h	75
34		1 éq	40 min	96
35		1 éq	1 h 40	65
36		1 éq	5 min	80
37		1 éq	3 h	39
		1 éq	12 h	38
		5 éq	22 h	31
38		2 éq	2 h	50
39		1,2 éq	3 h	48
40		2 éq	29 h	35
41		1 éq	20 min	84
42		1 éq	5 min	90
43		1 éq	2 h	74

44		1 éq	3 h	98
45		1 éq	3 h	89
47		1 éq	1 h	88
48		1 éq	1 h	65
52		4 éq	39 h	70
55		1 éq	2 h	69
56		2,5 éq	30 min	66
57		1 éq	4 h 30	71
58		1 éq	3 h	95
59		1 éq	1 h 30	48
60		2 éq	3 h	80
61		1 éq	3 h 30	100
62		1 éq	3 h	68

Le composé **37** est l'intermédiaire de synthèse de la molécule chef de file **68**. Une optimisation de sa synthèse a donc été envisagée.

Une première tentative a été effectuée dans le diméthylformamide en utilisant 3 équivalents d'hydruure de sodium et en laissant sous agitation, à température ambiante, pendant 3 heures. Dans ces conditions, il se forme de très nombreuses impuretés difficiles à séparer. Cette méthode a donc été abandonnée.

Un autre procédé consistant à réaliser la réaction au reflux de la pyridine (**méthode H2**) a été entrepris. Il a permis l'obtention de l'urée désirée avec un rendement inférieur à celui obtenu avec la méthode H1.

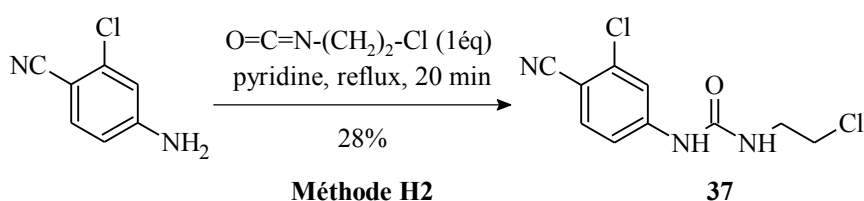


Schéma 11

La synthèse de l'urée **46** par la méthode H1, au reflux du chloroforme pendant une heure, s'est soldée par un échec. En effet, il se forme rapidement de très nombreux produits. La réaction a donc été réalisée à température ambiante (**méthode H3**) et a permis l'obtention du composé **46** avec un bon rendement (82%).

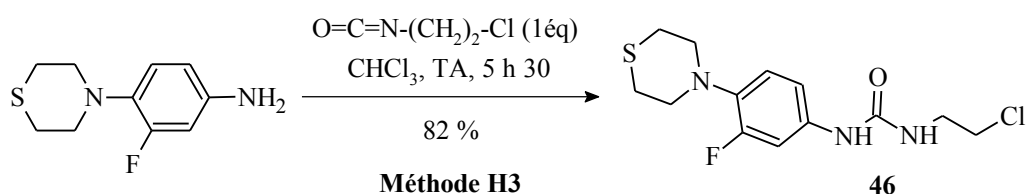


Schéma 12

En série phthalimidique, une seule molécule, le composé **52**, a été synthétisée selon la méthode H1 avec un rendement correct de 70%, mais une durée de réaction très importante de 39 heures.

Pour les autres molécules de la série, ce procédé a engendré des temps de réaction excessivement longs pour des résultats peu satisfaisants (faibles rendements ou échecs).

La **méthode H4** a donc été développée. Elle consiste à utiliser le chauffage par micro-ondes pour accélérer la réaction. L'accès aux urées **49**, **50**, **51**, **53** et **54** a ainsi été effectué en faisant réagir les aminophthalimides de départ avec 8 équivalents d'isocyanate de 2-chloroéthyle en l'absence de solvant. Le mélange a ensuite été chauffé à 82°C par micro-ondes, à la puissance de 20 W, sous agitation, pendant 40 minutes. Ce protocole a permis d'accéder très rapidement aux urées attendues avec des rendements assez satisfaisants excepté pour la molécule **54**.

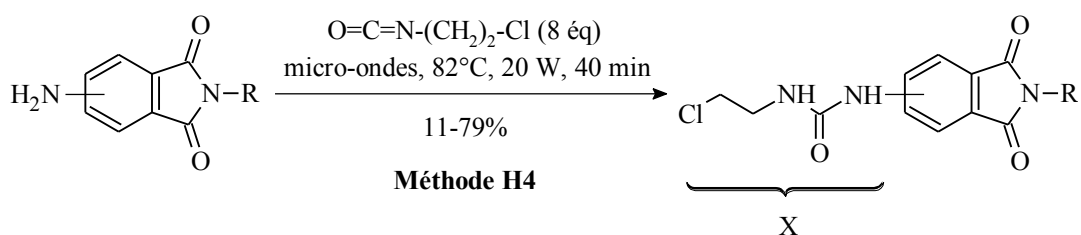


Schéma 13

N°	R	X	Rdt (%)
49		4-X	79
50		4-X	66
53		5-X	75
51		4-X	41
54		5-X	11

2- Synthèse des imidazolidin-2-ones *N*-substituées

L'accès aux imidazolidin-2-ones *N*-substituées a été réalisé principalement à partir des *N*-(2-chloroéthyl)urées précédemment synthétisées, par cyclisation intramoléculaire en milieu alcalin au reflux de l'acétonitrile. Différentes bases ont été utilisées : le carbonate de césium (**méthode I1**), le carbonate de sodium (**méthode I2**) et la triéthylamine (**méthode I3**).

La base peut parfois jouer un rôle très important. Par exemple, pour la synthèse de la molécule **73**, l'utilisation du carbonate de sodium permet d'éviter l'apparition d'une réaction secondaire observée avec le carbonate de césium.

Les temps de réaction sont généralement inférieurs à 6 heures excepté pour les molécules **63**, **65**, **76** et **87** qui ont nécessité des durées de réaction supérieures ou égales à 18 heures.

Les rendements sont globalement satisfaisants bien que relativement hétérogènes (41-87%). Quelques composés sont néanmoins obtenus avec des rendements très médiocres (**70**, **83**, **88** et **89**).

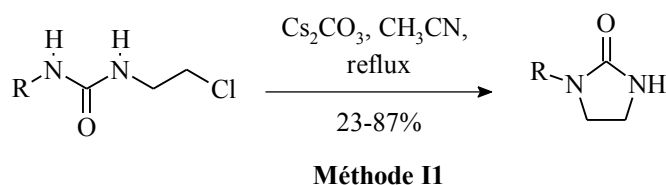
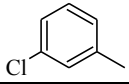
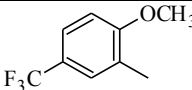
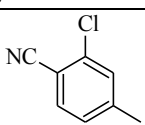
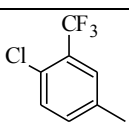
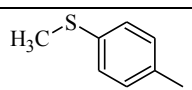
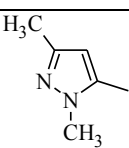
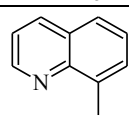
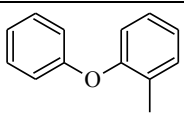
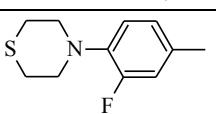
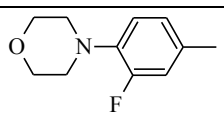
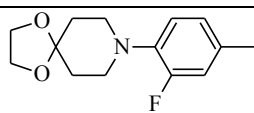
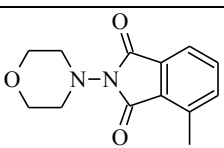
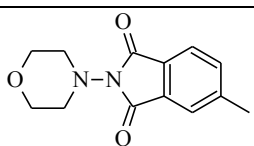
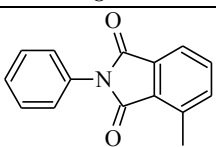
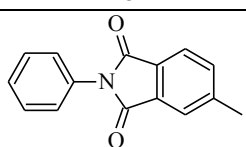
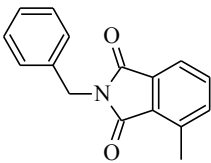
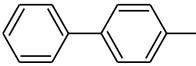
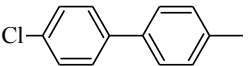
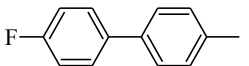
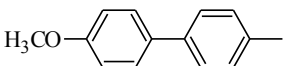
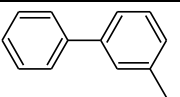
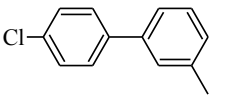
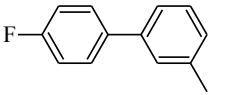
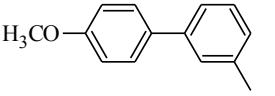
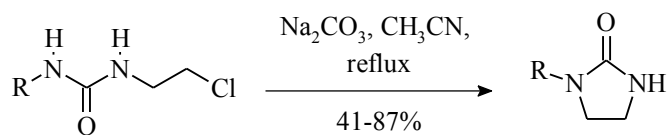


Schéma 14

N°	R	Temps de réaction	Rdt (%)
63		22 h	71
64		3 h	69
65		19 h	75

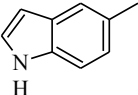
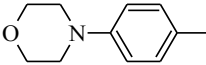
66		3 h	47
67		4 h	55
68		3 h	86
69		4 h	76
70		4 h	32
71		3 h	49
72		30 min	52
74		2 h	48
78		3 h 30	74
79		3 h	65
80		2 h	66
81		4 h	59
84		2 h 30	61
82		2 h	87
85		1 h	78

83		3 h	39
86		3 h	70
87		21 h	71
88		2 h	23
89		3 h	28
90		2 h 30	53
91		4 h	73
92		3 h	42
93		4 h 30	46



Méthode I2

Schéma 15

N°	R	Temps de réaction	Rdt (%)
73		6 h	41
75		3 h	87

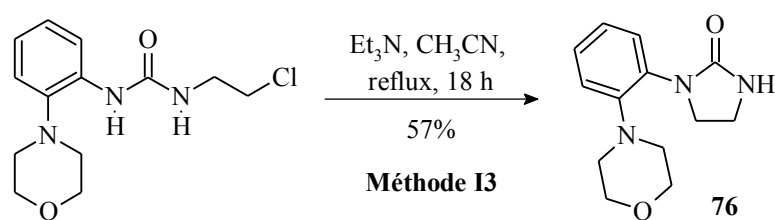


Schéma 16

Les méthodes précédemment décrites n'ont pas permis l'obtention de la molécule **77**. L'urée n'a pas pu être isolée et une réaction "one-pot" a donc été envisagée (**méthode I4**). Pour cela nous avons fait réagir la 3-fluoro-4-(piperidin-1-yl)aniline avec 4 équivalents d'isocyanate de 2-chloroéthyle au reflux de l'acétonitrile pendant 7 heures. A la fin de cette période, la réaction n'est pas totale et n'évolue plus même lorsque l'on ajoute un équivalent supplémentaire d'isocyanate. Le carbonate de césium est alors ajouté au milieu réactionnel et permet la cyclisation de l'urée précédemment formée de manière instantanée. Cette réaction a permis d'isoler le composé **77** attendu avec un rendement très médiocre (2%). L'accès à ce composé doit être optimisé.

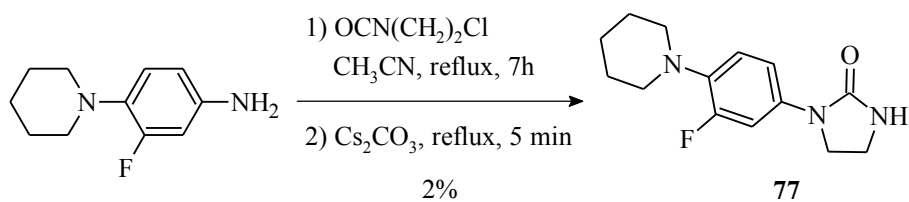


Schéma 17

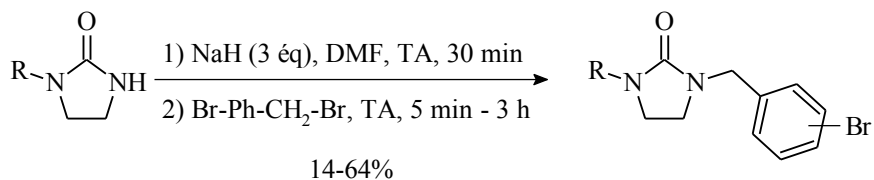
Enfin, aucune des techniques précédentes n'a permis la cyclisation de l'urée **54**. Une autre stratégie de synthèse doit donc être envisagée.

3- Accès aux imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

L'introduction d'un groupement 2-bromo ou 4-bromobenzyle sur l'azote non substitué des imidazolidin-2-ones précédemment synthétisées a parfois été envisagé. En effet, les études de criblage ont montré, dans certains cas, l'intérêt de ce groupement dans l'induction d'une activité immunosuppressive.

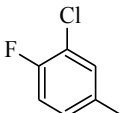
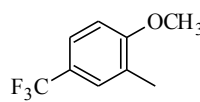
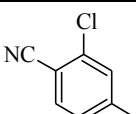
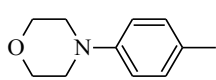
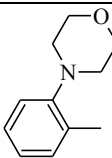
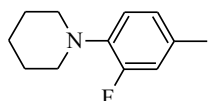
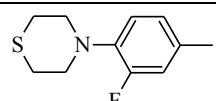
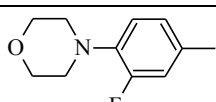
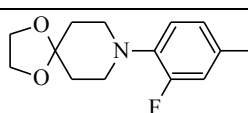
Cette réaction de *N*-alkylation est réalisée par action de l'hydruide de sodium dans le diméthylformamide pendant 30 minutes à température ambiante, suivie d'une alkylation de

l'anion intermédiaire formé, en présence de bromure de 2- ou 4-bromobenzyle. La durée de cette dernière étape est de 5 minutes à 3 heures. Le produit *N,N'*-disubstitué est obtenu avec un rendement compris entre 14 et 64%.



Méthode J

Schéma 18

N°	R	Br	Temps de réaction	Rdt (%)
94		4-Br	10 min	36
95		2-Br	10 min	45
96		4-Br	3 h	24
97		2-Br	3 h	40
98		4-Br	3 h	46
99		2-Br	3 h	37
100		4-Br	2 h	28
101		2-Br	2 h	57
102		4-Br	2 h	40
103		4-Br	3 h	14
104		4-Br	30 min	61
105		4-Br	1 h 30	16
106		4-Br	3 h	64

III- PARTIE EXPERIMENTALE

I- METHODES DE SYNTHESE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES

1- N-(2-chloroéthyl)urées

Méthode H1

N-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-chloro-4-fluorophényl)urée **32**

Mettre en solution 3 g (20,61 mmoles) de 3-chloro-4-fluoroaniline dans 25 mL de chloroforme puis ajouter 1,78 mL (20,61 mmoles, 1 éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, évaporer le solvant et le reste d'isocyanate sous pression réduite, puis réaliser un rinçage du précipité par l'éther diéthylique pour éliminer l'excès éventuel d'amine de départ et filtrer sur entonnoir fritté pour récupérer 4,72 g de l'urée **32** sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement : 91%

Poudre blanche

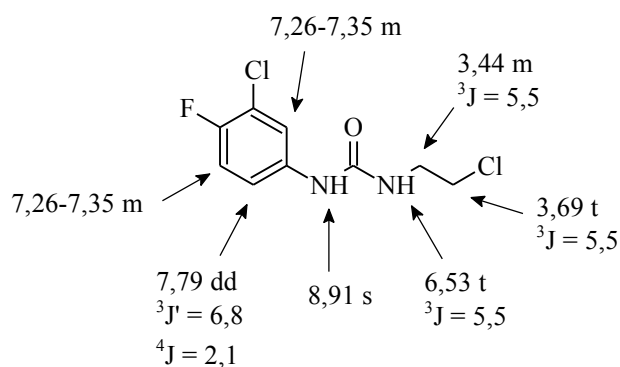
$C_9H_9Cl_2FN_2O$

$M_r = 251,09$

F°C = 116

IR (KBr, cm^{-1}) : 1646 (ν NCON) ; 1057 (ν C-F) ; 823 (ν C-Cl).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode H2

N-(3-chloro-4-cyanophényl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urée **37**

Dissoudre 2 g (13,11 mmol) de 3-chloro-4-cyanoaniline dans 8 mL de pyridine et ajouter 1,13 mL (13,11 mmol, 1 éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle. Porter le milieu réactionnel au reflux, sous agitation, pendant 20 minutes. Evaporer sous pression réduite la pyridine et les restes éventuels d'isocyanate. Reprendre le résidu avec de l'eau. Filtrer le précipité formé et le rincer abondamment à l'eau. Recristalliser le solide obtenu dans du dichlorométhane. Recueillir 0,95 g d'une poudre rose pâle.

Rendement : 28%

Poudre rose pâle

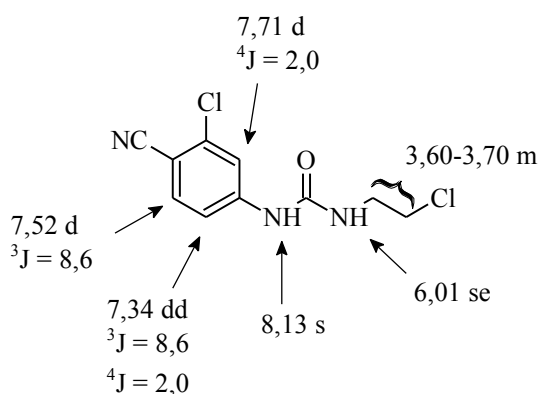
$C_{10}H_9Cl_2N_3O$

$M_r = 258,11$

$F^\circ C = 131$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3327 (ν NH) ; 2228 (ν CN) ; 1656 (ν NCON).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode H3

N-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluoro-4-thiomorpholin-4-ylphényl)urée **46**

Dissoudre 0,33 g (1,55 mmol) de 3-fluoro-4-thiomorpholin-4-ylaniline dans 50 mL de chloroforme et ajouter goutte à goutte 0,14 mL (1,55 mmol, 1 éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle. Laisser pendant 5 heures et demie sous agitation à température ambiante.

Evaporer le milieu réactionnel sous pression réduite et reprendre le résidu par de l'éther diéthylique. Recueillir 0,40 g de l'urée **46**.

Rendement : 82%

Poudre marron

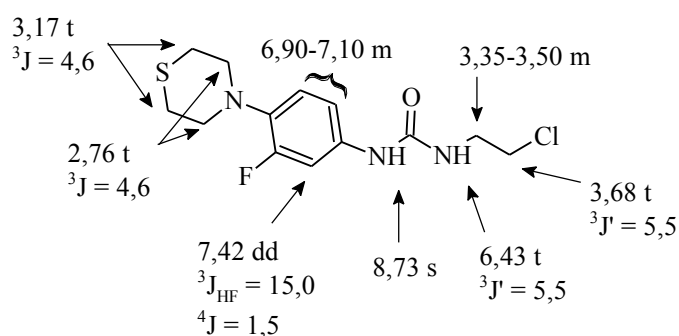
$C_{13}H_{17}ClFN_3OS$

$M_r = 317,81$

$F^\circ C = 130$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3392 (ν NH) ; 1653 (ν NCON).

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode H4

N-(2-chloroéthyl)-*N'*-(2-morpholin-4-yl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urée **49**

Mettre en contact dans un tube scellé 0,51 g (2,06 mmoles) du 3-aminophtalimide **15** et 1,43 mL (16,48 mmoles, 8 éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle. Chauffer le mélange à 82°C par micro-ondes, à la puissance de 20 W, sous agitation, pendant 40 minutes. Reprendre le milieu réactionnel par de l'acétone. Evaporer sous pression réduite pour éliminer l'acétone et les restes d'isocyanate. Purifier le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par du dichlorométhane. Récupérer le résidu avec de l'éther diéthylique. Isoler 0,58 g de l'urée **49**.

Rendement : 79%

Poudre blanche

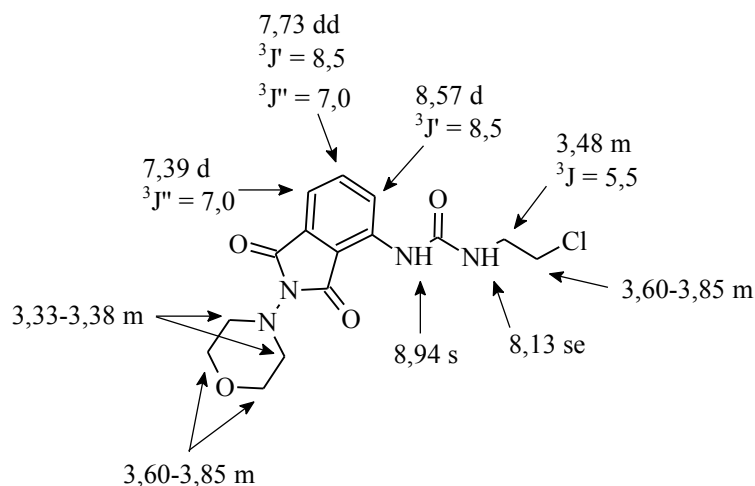
$C_{15}H_{17}ClN_4O_4$

$M_r = 352,78$

F°C = 226

IR (KBr, cm^{-1}) : 3328 (ν NH) ; 1772 (ν_s C=O imide) ; 1712 (ν_{as} C=O imide) ; 1700 (ν NCON).

RMN (250 MHz) du ^1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



2- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

Méthode I1

N-(3-chloro-4-fluorophényl)imidazolidin-2-one **63**

Mettre en solution 1,1 g (4,38 mmoles) de *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-chloro-4-fluorophényl)urée **32** dans 50 mL d'acétonitrile puis ajouter 1,43 g (4,38 mmoles, 1éq) de carbonate de césium et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 22 heures. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le carbonate de césium et évaporer sous pression réduite le filtrat obtenu. Récupérer ensuite le résidu avec de l'éther diéthylique. Laisser cristalliser dans un bain de glace et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 0,94 g de l'imidazolidin-2-one **63** sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement : 71%

Poudre blanche

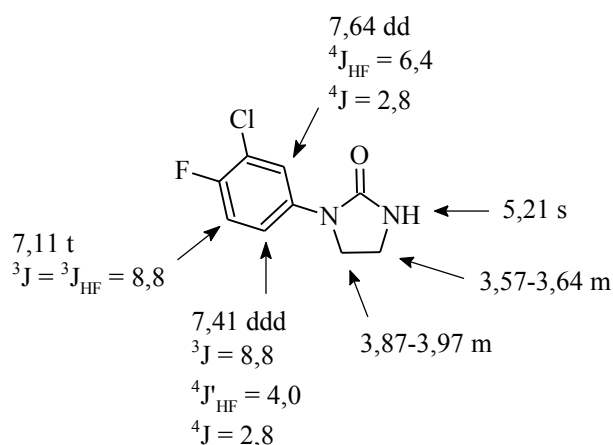
$\text{C}_9\text{H}_8\text{ClFN}_2\text{O}$

$M_r = 214,63$

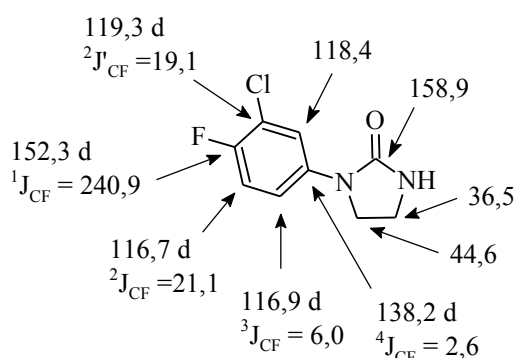
F°C = 161

IR (KBr, cm^{-1}) : 1687 (ν NCON) ; 1025 (ν C-F) ; 760 (ν C-Cl)

RMN (250 MHz) du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz) :



RMN (400 MHz) du ^{13}C (DMSO-d_6), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode I2

N-(1H-indol-5-yl)imidazolidin-2-one **73**

Mettre en solution 0,5 g (2,10 mmoles) de l'urée **42** dans 50 mL d'acétonitrile puis ajouter 0,22 g (2,10 mmoles, 1 éq) de carbonate de sodium et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 6 heures. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le carbonate de sodium et évaporer sous pression réduite le filtrat. Reprendre l'huile obtenue avec un mélange d'éther éthylique et de dichlorométhane (50 : 50). Laisser cristalliser dans un bain de glace et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 0,17 g de l'imidazolidin-2-one **73** sous la forme d'une poudre fine blanche.

Rendement : 41%

Poudre blanche

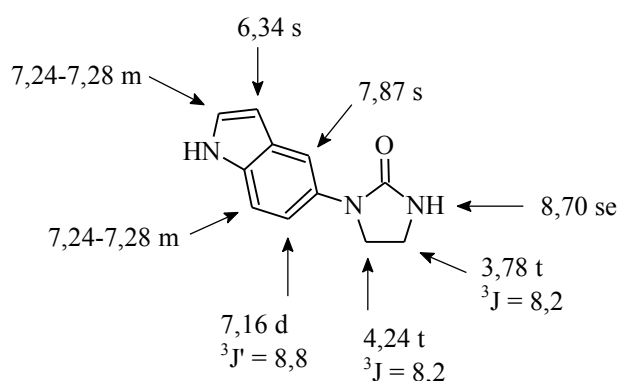
$C_{11}H_{11}N_3O$

$M_r = 201,23$

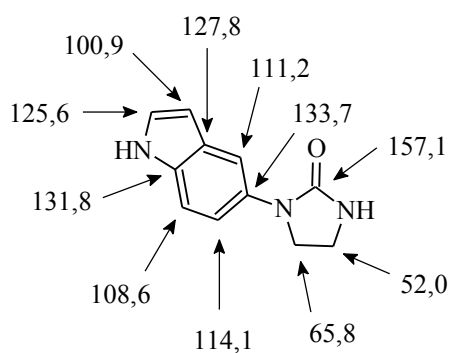
$F^\circ C = 257$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3384 (v NH indolique) ; 1674 (v NCON).

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



RMN (400 MHz) du ^{13}C (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode I3

N-(2-morpholin-4-ylphényl)imidazolidin-2-one **76**

Mettre en solution 3 g (10,57 mmoles) de l'urée **45** dans 250 mL d'acétonitrile puis ajouter 8 mL (57,55 mmoles, 5,5 éq) de triéthylamine et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 18 heures. Evaporer sous pression réduite et recristalliser le produit dans l'acétonitrile. Purifier le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par l'éther diéthylique. Recueillir 1,49 g du composé **76** sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement : 57%

Poudre blanche

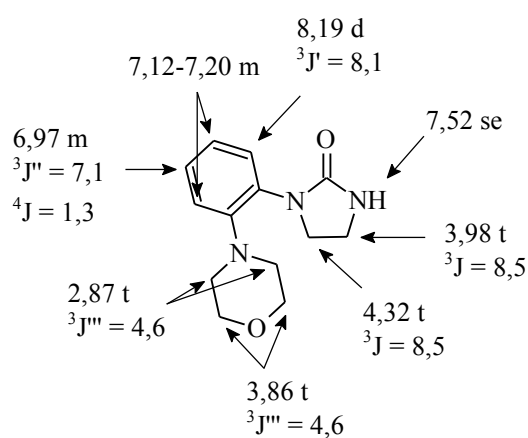
$C_{13}H_{17}N_3O_2$

$M_r = 247,30$

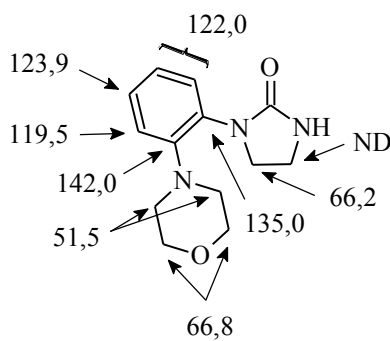
$F^\circ C = 77$

IR (KBr, cm^{-1}) : 1684 (ν NCON).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



RMN (400 MHz) du ^{13}C ($DMSO-d_6$), δ (ppm), J (Hz) :



Méthode I4

N-(3-fluoro-4-pipéridin-1-ylphényl)imidazolidin-2-one 77

Mettre en solution 2 g (10,29 mmoles) de 3-fluoro-4-*N*-pipéridinylaniline **5** dans 50 mL d'acétonitrile puis ajouter 0.89 mL (10,29 mmoles, 1 éq) d'isocyanate de 2-chloroéthyle et

porter le milieu réactionnel au reflux pendant 10 heures. Introduire ensuite 3,35 g (10,29 mmoles, 1 éq) de carbonate de césium et laisser au reflux pendant 3 heures et demie. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le carbonate de césium et évaporer sous pression réduite le filtrat obtenu. Puis, récupérer le produit avec de l'éther diéthylique. Recueillir 0,04 g de l'imidazolidin-2-one **77** sous forme d'une poudre blanche.

Rendement : 2%

Poudre blanche

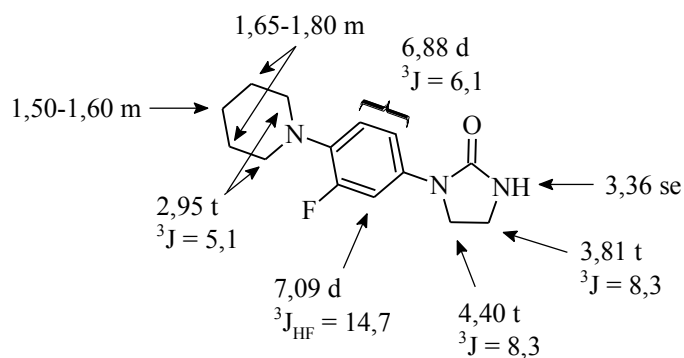
$C_{14}H_{18}FN_3O$

$M_r = 263,32$

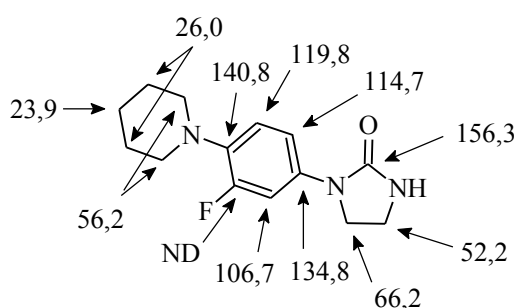
F°C = 150

IR (KBr, cm^{-1}) : 1685 (ν NCON) ; 1045 (ν C-F).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



RMN (400 MHz) du ^{13}C ($DMSO-d_6$), δ (ppm), J (Hz) :



3- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Méthode J

N-(4-bromobenzyl)-*N'*-(3-chloro-4-fluorophényl)imidazolidin-2-one **94**

Dissoudre 0,8 g (3,73 mmol) de *N*-(3-chloro-4-fluorophényl)imidazolidin-2-one **63** dans 2 mL de DMF à 0°C. Ajouter ensuite par petites quantités 0,45 g (11,19 mmol, 3 éq) de NaH*, et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Additionner ensuite 0,93 g (3,73 mmol, 1 éq) de bromure de 4-bromobenzyle. Au bout de 10 minutes, arrêter la réaction par adjonction de 50 mL d'eau et épuiser le mélange par extraction à l'éther diéthylique. Réunir ensuite les fractions organiques, sécher sur sulfate de sodium anhydre, filtrer et évaporer sous pression réduite. Purifier le résidu par chromatographie sur gel de silice en éluant par l'éther diéthylique. Enfin, reprendre le produit isolé par l'éther diéthylique et provoquer la cristallisation par trituration. Recueillir 0,51 g du produit recherché **94** sous la forme d'une poudre blanche.

* Le NaH utilisé est sous une forme commerciale dans laquelle il est dispersé à 60% dans une huile minérale. Le poids indiqué est le poids effectivement pesé en tenant compte de cette dispersion. Avant d'être introduit dans le mélange réactionnel, le NaH doit être lavé par le toluène ou l'éther diisopropylique.

Rendement : 36%.

Poudre blanche

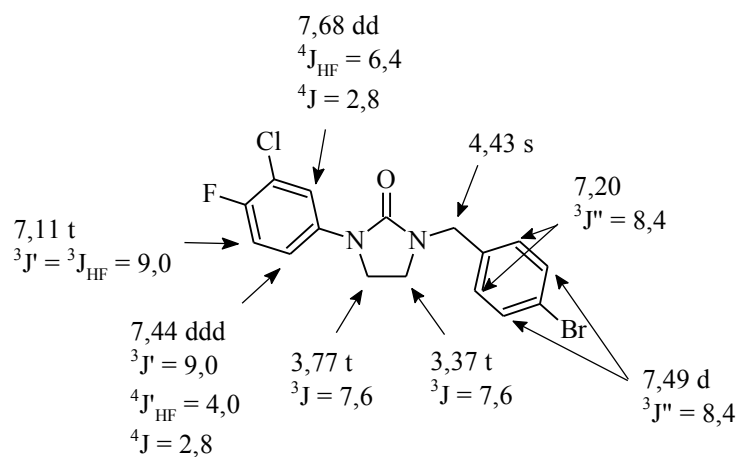
$C_{16}H_{13}BrClFN_2O$

$M_r = 383,65$

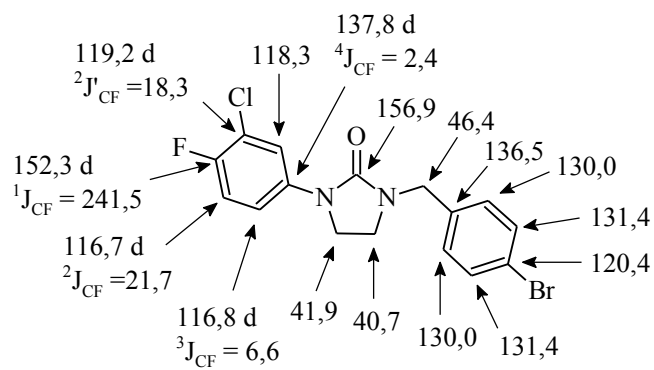
F°C = 102

IR (KBr, cm^{-1}) : 1703 (ν NCON).

RMN (250 MHz) du 1H ($CDCl_3$), δ (ppm), J (Hz) :



RMN (400 MHz) du ^{13}C (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :

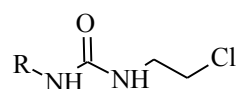


II- CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

1- N-(2-chloroéthyl)urées

1.1- N-aryl-N'-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 1 : N-aryl-N'-(2-chloroéthyl)urées **32–38**



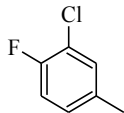
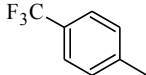
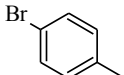
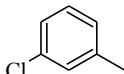
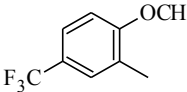
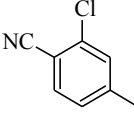
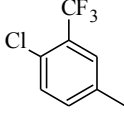
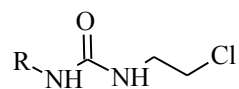
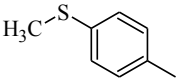
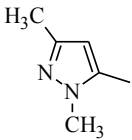
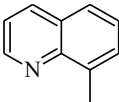
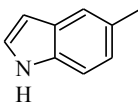
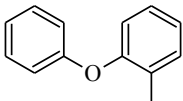
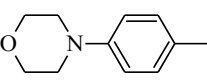
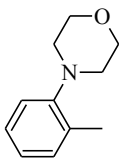
N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
32		C ₉ H ₉ Cl ₂ FN ₂ O 251,09	H1 : 91	116 éther diéthylique
33		C ₁₀ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O 266,65	H1 : 75	132 éther diéthylique
34		C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O 277,55	H1 : 96	177 éther diéthylique
35		C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O 233,10	H1 : 65	99 éther diéthylique
36		C ₁₁ H ₁₂ ClF ₃ N ₂ O ₂ 296,68	H1 : 80	140 éther diéthylique
37		C ₁₀ H ₉ Cl ₂ N ₃ O 258,11	H1 : 39 H2 : 28	131 éther diéthylique
38		C ₁₀ H ₉ Cl ₂ F ₃ N ₂ O 301,10	H1 : 50	123 éther diisopropylique

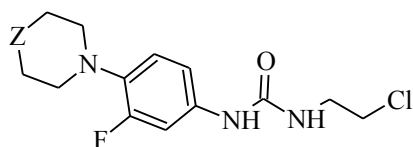
Tableau 2 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **39–45**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
39		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$ 244,74	H1 : 48	123 chloroforme
40		$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$ 216,67	H1 : 35	128 dichlorométhane/ éther diéthylique
41		$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$ 249,70	H1 : 84	157 éther diéthylique
42		$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$ 237,69	H1 : 90	153 éther diéthylique
43		$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ 290,75	H1 : 74	130 éther diéthylique
44		$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$ 283,76	H1 : 98	146 éther diéthylique
45		$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$ 283,76	H1 : 89	149 éther diéthylique

1.2- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées

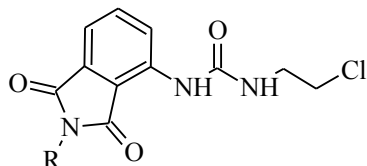
Tableau 3 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées **46–48**



N°	Z	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
46	S	$C_{13}H_{17}ClFN_3OS$ 317,81	H3 : 82	130 éther diéthylique
47	O	$C_{13}H_{17}ClFN_3O_2$ 301,75	H1 : 88	129 éther diéthylique
48		$C_{16}H_{21}ClFN_3O_3$ 357,81	H1 : 65	91 éther diéthylique

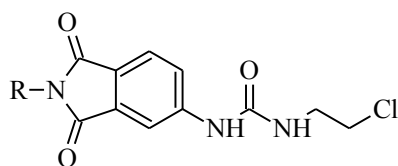
1.3- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées et *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées

Tableau 4 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées **49-51**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
49		$C_{15}H_{17}ClN_4O_4$ 352,78	H4 : 79	226 éther diéthylique
50		$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$ 343,77	H4 : 66	193 éther diéthylique
51		$C_{18}H_{16}ClN_3O_3$ 357,80	H4 : 41	186 dichlorométane

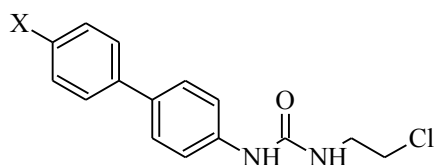
Tableau 5 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées **52-54**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
52		$C_{15}H_{17}ClN_4O_4$ 352,78	H1 : 70	207 éther diéthylique
53		$C_{17}H_{14}ClN_3O_3$ 343,77	H4 : 75	230 éther diéthylique
54		$C_{18}H_{16}ClN_3O_3$ 357,80	H4 : 11	215 éther diéthylique

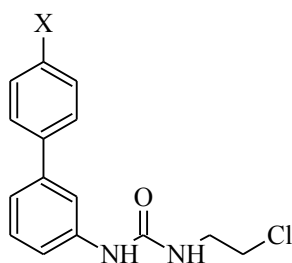
1.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 6 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **55-58**



N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
55	H	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O 274,75	H1 : 69	178 dichlorométhane
56	Cl	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O 309,20	H1 : 66	179 éther diéthylique
57	F	C ₁₅ H ₁₄ ClFN ₂ O 292,74	H1 : 71	177 éther diéthylique
58	OMe	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂ O ₂ 304,78	H1 : 95	201 éther diéthylique

Tableau 7 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **59-62**

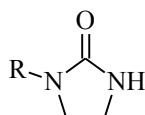


N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
59	H	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O 274,75	H1 : 48	132 éther diéthylique
60	Cl	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O 309,20	H1 : 80	162 éther diéthylique
61	F	C ₁₅ H ₁₄ ClFN ₂ O 292,74	H1 : 100	161 éther diéthylique
62	OMe	C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂ O ₂ 304,78	H1 : 68	165 éther diéthylique

2- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

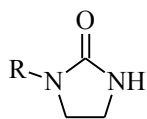
2.1- *N*-arylimidazolidin-2-ones

Tableau 8 : *N*-arylimidazolidin-2-ones **63-69**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
63		$C_9H_8ClFN_2O$ 214,63	II : 71	161 éther diéthylique
64		$C_{10}H_9F_3N_2O$ 230,19	II : 69	170 éther diéthylique
65		$C_9H_9BrN_2O$ 241,09	II : 75	185 éther diéthylique
66		$C_9H_9ClN_2O$ 196,63	II : 47	121 éther diéthylique
67		$C_{11}H_{11}F_3N_2O_2$ 260,22	II : 55	120 éther diéthylique
68		$C_{10}H_8ClN_3O$ 221,65	II : 86	140 éther diéthylique
69		$C_{10}H_8ClF_3N_2O$ 264,63	II : 76	148 éther diisopropylique

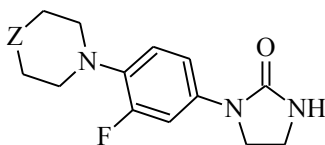
Tableau 9 : *N*-arylimidazolidin-2-ones **70-76**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
70		$C_{10}H_{12}N_2OS$ 208,28	I1 : 32	187 éther diisopropylique
71		$C_8H_{12}N_4O$ 180,21	I1 : 49	130 éther diéthylique
72		$C_{12}H_{11}N_3O$ 213,24	I1 : 52	151 éther diéthylique
73		$C_{11}H_{11}N_3O$ 201,23	I2 : 41	256 éther diéthylique/ dichlorométhane
74		$C_{15}H_{14}N_2O_2$ 254,29	I1 : 48	124 éther diéthylique
75		$C_{13}H_{17}N_3O_2$ 247,30	I2 : 87	185 éther diéthylique
76		$C_{13}H_{17}N_3O_2$ 247,30	I3 : 57	77 acétonitrile

2.2- *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones

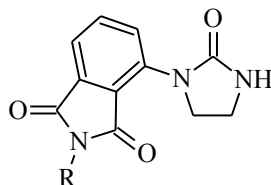
Tableau 10 : *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **77-80**



N°	Z	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Sol. rec.
77	CH ₂	C ₁₄ H ₁₈ FN ₃ O 263,32	I4 : 2	150 éther diéthylique
78	S	C ₁₃ H ₁₆ FN ₃ OS 281,35	I1 : 74	229 éther diéthylique
79	O	C ₁₃ H ₁₆ FN ₃ O ₂ 265,29	I1 : 65	237 éther diéthylique
80		C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₃ 321,35	I1 : 66	224 éther diéthylique

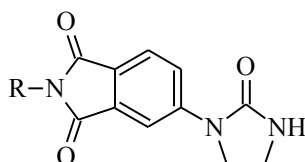
2.3- 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Tableau 11 : 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **81-83**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
81		$C_{15}H_{16}N_4O_4$ 316,32	II : 59	193 éther diéthylique
82		$C_{17}H_{13}N_3O_3$ 307,31	II : 87	201 éther diéthylique
83		$C_{18}H_{15}N_3O_3$ 321,34	II : 39	175 éthanol

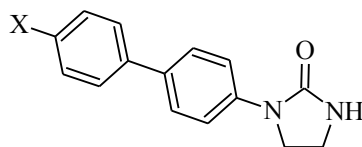
Tableau 12 : 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **84 et 85**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
84		$C_{15}H_{16}N_4O_4$ 316,32	II : 61	288 éther diéthylique
85		$C_{17}H_{13}N_3O_3$ 307,31	II : 78	312 éther diéthylique

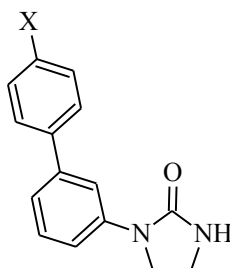
2.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones

Tableau 13 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones **86-89**



N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
86	H	$C_{15}H_{14}N_2O$ 238,29	II : 70	273 éther diéthylique
87	Cl	$C_{15}H_{13}ClN_2O$ 272,74	II : 71	282 éther diéthylique
88	F	$C_{15}H_{13}FN_2O$ 256,28	II : 23	266 éther diéthylique
89	OMe	$C_{16}H_{16}N_2O_2$ 268,32	II : 28	163 éther diéthylique

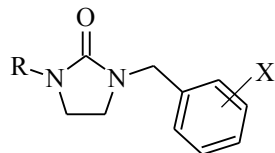
Tableau 14 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones **90-93**



N°	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
90	H	$C_{15}H_{14}N_2O$ 238,29	II : 53	167 éther diéthylique
91	Cl	$C_{15}H_{13}ClN_2O$ 272,74	II : 73	187 éther diéthylique
92	F	$C_{15}H_{13}FN_2O$ 256,28	II : 42	171 éther diéthylique
93	OMe	$C_{16}H_{16}N_2O_2$ 268,32	II : 46	218 éther diéthylique

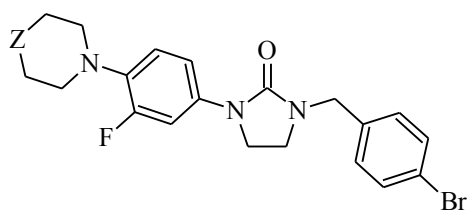
3- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Tableau 15 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones **94-102**



N°	R	X	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
94		4-Br	$C_{16}H_{13}BrClFN_2O$ 383,65	J : 36	102 éther diéthylique
95		2-Br	$C_{16}H_{13}BrClFN_2O$ 383,65	J : 45	144 éther diéthylique
96		4-Br	$C_{18}H_{16}BrF_3N_2O_2$ 429,25	J : 24	96 éther diéthylique
97		2-Br	$C_{18}H_{16}BrF_3N_2O_2$ 429,25	J : 40	98 éther diéthylique
98		4-Br	$C_{17}H_{13}BrClN_3O$ 390,68	J : 46	194 éther diéthylique
99		2-Br	$C_{17}H_{13}BrClN_3O$ 390,68	J : 37	180 éther diéthylique
100		4-Br	$C_{20}H_{22}BrN_3O_2$ 416,33	J : 28	172 éther diéthylique
101		2-Br	$C_{20}H_{22}BrN_3O_2$ 416,33	J : 57	156 éther diéthylique
102		4-Br	$C_{20}H_{22}BrN_3O_2$ 416,33	J : 40	144 éther diéthylique

Tableau 16 : *N*-bromobenzyl-*N'*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **103-106**



N°	Z	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Sol. rec.
103	CH ₂	C ₂₁ H ₂₃ BrFN ₃ O 432,34	J : 14	139 éther diéthylique
104	S	C ₂₀ H ₂₁ BrFN ₃ OS 450,38	J : 61	168 éther diéthylique
105	O	C ₂₀ H ₂₁ BrFN ₃ O ₂ 434,32	J : 16	159 éther diéthylique
106		C ₂₃ H ₂₅ BrFN ₃ O ₃ 490,38	J : 64	149 éther diéthylique

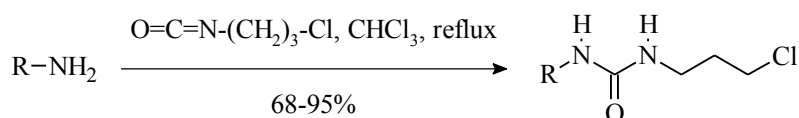
E- SERIE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES

I- TRAVAUX REALISES

Pour accéder aux tétrahydropyrimidin-2(1H)-ones, nous avons employé la même stratégie de synthèse qu'en série imidazolidin-2-one (GABRIEL, 1895).

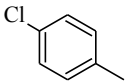
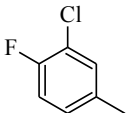
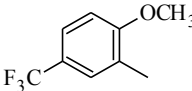
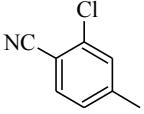
1- Synthèse des *N*-(3-chloropropyl)urées

Toutes les urées de cette série ont été synthétisées selon la **méthode H5**. Dans ce procédé, l'amine est dissoute dans du chloroforme à chaud et l'isocyanate de 3-chloropropyle est ensuite ajouté, goutte à goutte, au milieu réactionnel. L'ensemble est enfin porté au reflux pendant 1 à 24 heures. Les urées sont obtenues avec des rendements très satisfaisants à excellents. Comme en série imidazolidin-2-one, il a parfois été nécessaire d'ajouter un ou plusieurs équivalents d'isocyanate de 3-chloropropyle afin de déplacer l'équilibre de la réaction.



Méthode H5

Schéma 1

N°	Ar	Nombre d'équivalents (éq) d'isocyanate de 3-chloropropyle	Temps de réaction	Rdt (%)
107		1 éq	1 h	95
108		1 éq	1 h	84
109		1,5 éq	3 h	68
110		2 éq	24 h	89

2- Synthèse des tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones *N*-substituées

L'accès aux tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones *N*-substituées a été réalisé selon la **méthode I1** précédemment décrite. Les *N*-(3-chloropropyl)urées préalablement synthétisées, sont cyclisées en présence de carbonate de césium, au reflux de l'acétonitrile pendant 30 minutes à 4 heures. Les rendements sont très satisfaisants excepté pour la molécule **113**.

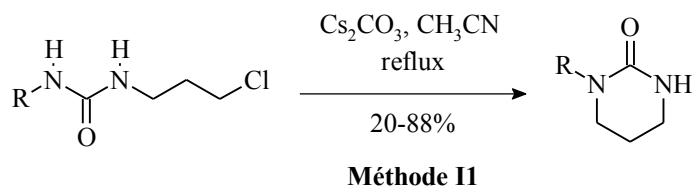


Schéma 2

N°	Ar	Temps de réaction	Rdt (%)
111		4 h	86
112		1 h	70
113		3 h	20
114		30 min	88

3- Synthèse de la tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones *N,N'*-disubstituées **115**

La molécule **115** a été obtenue avec un rendement de 53% par alkylation de la tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **112** selon la **méthode J** précédemment décrite.

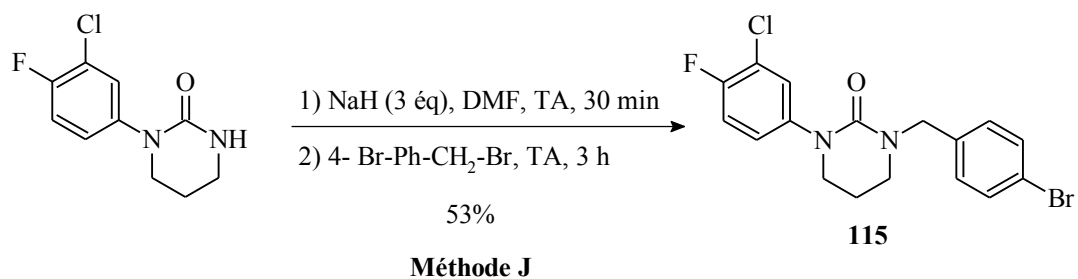


Schéma 3

III- PARTIE EXPERIMENTALE

I- METHODES DE SYNTHESE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES

1- N-(3-chloropropyl)-N'-phénylurées

Méthode H5

N-(4-chlorophényl)-*N'*-(3-chloropropyl)urée **107**

Mettre en solution 1 g (7,84 mmoles) de 4-chloroaniline dans 30 mL de chloroforme puis ajouter, goutte à goutte et sous agitation, 0,81 mL (7,84 mmoles, 1 éq) d'isocyanate de 3-chloropropyle et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 1 heure. Après refroidissement, évaporer sous pression réduite, puis réaliser un rinçage du précipité par l'éther diéthylique pour éliminer les éventuels restes d'amine de départ et filtrer sur entonnoir fritté pour récupérer 1,84 g de l'urée sous forme de paillettes blanches.

Rendement : 95%.

Poudre blanche

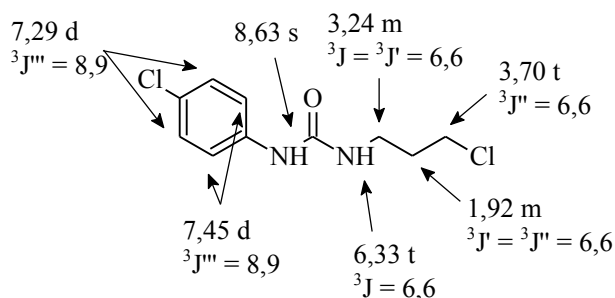
$C_{10}H_{12}Cl_2N_2O$

$M_r = 247,12$

$F^\circ C = 143$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3331 (νNH) ; 1635 ($\nu N\overline{C}ON$) ; 828 ($\nu C-Cl$).

RMN (250 MHz) du 1H (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz) :



2- *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones

Méthode I1

N-(4-chlorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **111**

Dissoudre à chaud 1,5 g (6,07 mmoles) de *N*-(4-chlorophényl)-*N'*-(3-chloropropyl)urée dans 30 mL d'acétonitrile puis ajouter 1,98 g (6,07 mmoles, 1 éq) de carbonate de césium et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 4 heures. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le Cs₂CO₃ et évaporer sous pression réduite le filtrat obtenu. Puis, récupérer le produit avec de l'éther diéthylique. Laisser cristalliser dans un bain de glace et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 1,10 g d'une poudre blanche.

Rendement : 86%.

Poudre blanche

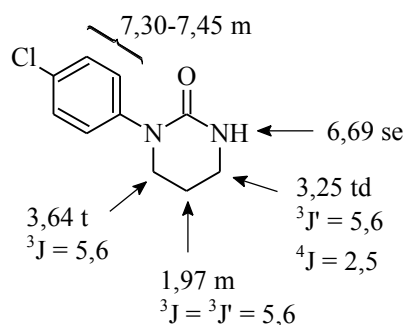
C₁₀H₁₁ClN₂O

*M*_r = 210,66

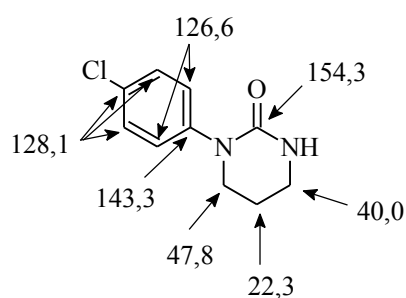
F°C = 164

IR (KBr, cm⁻¹) : 1657 (νNCON).

RMN (250 MHz) du ¹H (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz) :

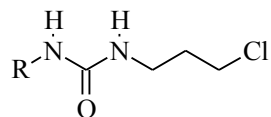


RMN (400 MHz) du ¹³C (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz) :



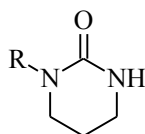
II- CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES PRODUITS SYNTHETISES

Tableau 1 : *N*-(3-chloropropyl)-*N'*-phénylurées **107–110**



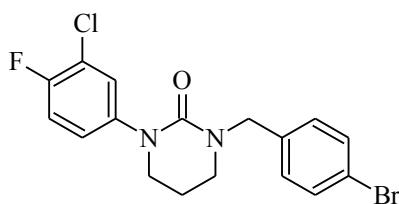
N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
107		$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ 247,12	H5 : 95	143 éther diéthylique
108		$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}$ 265,12	H5 : 84	107 éther diéthylique
109		$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$ 310,71	H5 : 68	158 éther diéthylique
110		$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ 272,14	H5 : 89	111 éther diéthylique

Tableau 2 : *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **111–114**



N°	R	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
111		$C_{10}H_{11}ClN_2O$ 210,66	I1 : 86	164 éther diéthylique
112		$C_{10}H_{10}ClFN_2O$ 228,65	I1 : 70	153 éther diéthylique
113		$C_{12}H_{13}F_3N_2O_2$ 274,25	I1 : 20	153 éther diéthylique
114		$C_{11}H_{10}ClN_3O$ 235,68	I1 : 88	169 éther diisopropylique

Tableau 3 : *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **115**



N°	Formule brute M_r	Méthode : Rdt (%)	F°C Solvant
115	$C_{17}H_{15}BrClFN_2O$ 397,68	J : 53	78 éther diisopropylique

ETUDE STRUCTURALE

A- SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE

I- SERIE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES

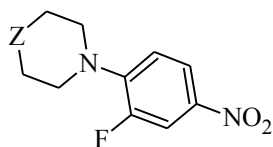
1- Dérivés nitrés

Le groupement nitro se distingue par deux bandes caractéristiques :

- une bande de vibration d'élongation asymétrique : $\nu_{as}NO_2$, de très forte intensité, située, pour les dérivés nitrés aromatiques, entre 1560 et 1490 cm^{-1} et
- une bande de vibration d'élongation symétrique : ν_sNO_2 , de forte intensité, située, pour les dérivés nitrés aromatiques, entre 1360 et 1310 cm^{-1} .

1.1- Dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène

Tableau 1 : dérivés nitré 1-4



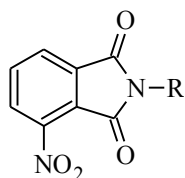
N°	Z	$\nu_{as}NO_2$	ν_sNO_2	ν_{C-F}
1	CH ₂	1511	1330	1242
2	S	1510	1343	1229
3	O	1495	1328	1242
4		1512	1336	1234

1.2- 4- et 5-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Les composés phthalimidiques sont définis par deux bandes caractéristiques :

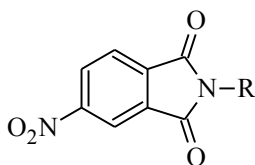
- une bande $\nu_s\text{C=O}$ située entre 1760 et 1785 cm^{-1} , unique, symétrique et de faible intensité, et
- une bande double ou dissymétrique entre 1710 et 1740 cm^{-1} , de forte intensité, qui pourrait correspondre à une résonance de Fermi entre la bande $\nu_{as}\text{C=O}$ et une bande de combinaison de deux vibrations fondamentales de valence C-C du squelette imidique, vers 1730 cm^{-1} (FLOCH, 1979).

Tableau 2 : 4-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **9-11**



N°	R	$\nu_s\text{C=O}$ imide	$\nu_{as}\text{C=O}$ imide	$\nu_{as}\text{NO}_2$	$\nu_s\text{NO}_2$
9		1795	1729	1530	1360
10		1776	1734	1545	1352
11		1778	1720	1538	1331

Tableau 3 : 5-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **12-14**



N°	R	$\nu_s\text{C=O}$ imide	$\nu_{as}\text{C=O}$ imide	$\nu_{as}\text{NO}_2$	$\nu_s\text{NO}_2$
12		1724	1721	1540	1346
13		1780	1719	1542	1342
14		1768	1708	1536	1346

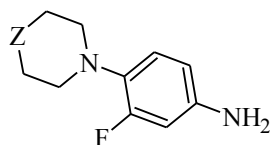
2- Amines

2.1- Dérivés de la 3-fluoroaniline

La fonction amine se distingue par trois bandes caractéristiques :

- deux bandes de vibration d'élongation situées entre 3300 et 3500 cm^{-1} , d'intensité variable : $\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$, et $\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$,
- une bande de vibration de déformation dans le plan δNH_2 , comprise entre 1590 et 1650 cm^{-1} , d'intensité moyenne ou faible.

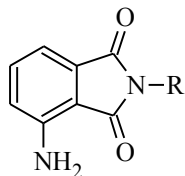
Tableau 4 : 3-fluoroanilines **5-8**



N°	Z	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$	δNH_2	$\nu\text{C-F}$
5	CH ₂	3445	3320	1637	1226
6	S	3379	3318	1637	1195
7	O	3420	3333	1639	1221
8		3457	3362	1640	1228

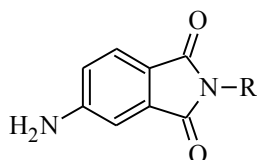
2.2- 4- et 5-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Tableau 5 : 4- amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **15-17**



N°	R	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$	$\nu_{\text{C=O}}$ imide	$\nu_{\text{as}}\text{C=O}$ imide	δNH_2
15		3399 (bande large)		1773	1705	1623
16		3472	3351	1753	1704	1630
17		3477	3355	1744	1690	1634

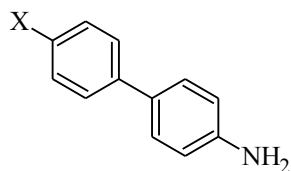
Tableau 6 : 5-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **18-20**



N°	R	$\nu_{\text{as}}\text{NH}_2$	$\nu_{\text{s}}\text{NH}_2$	$\nu_{\text{C=O}}$ imide	$\nu_{\text{as}}\text{C=O}$ imide	δNH_2
18		3454	3353	1763	1703	1617
19		3492	3373	1769	1690	1629
20		3474	3372	1761	1695	1619

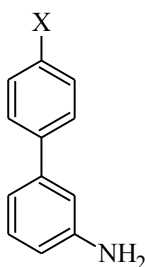
2.3- 1,1'-biphényl-4-amines et 1,1'-biphényl-3-amines

Tableau 7 : 1,1'-biphényl-4-amines **23-24** et **26-27**



N°	X	$\nu_{as}NH_2$	ν_sNH_2	δNH_2	Autres fréquences
23	H	3424	3391	1627	-
25	Cl	3415 (bande large)		1607	$\nu C-Cl$: 1096
26	F	3421 (bande large)		1624	$\nu C-F$: 1229
27	OMe	3427	3356	1607	-

Tableau 8 : 1,1'-biphényl-3-amines **28-31**



N°	X	$\nu_{as}NH_2$	ν_sNH_2	δNH_2	Autres fréquences
28	H	3421	3365	1608	-
29	Cl	3410	3312	1613	$\nu C-Cl$: 1091
30	F	3407	3307	1603	$\nu C-F$: 1223
31	OMe	3451	3371	1605, 832 et 777	-

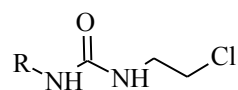
3- *N*-(2-chloroéthyl)urées

Le spectre des urées synthétisées comprend deux bandes caractéristiques :

- la bande de valence νNH , située entre 3200 et 3500 cm^{-1} et
- la bande de valence du carbonyle $\nu\text{C=O}$, comprise entre 1620 et 1690 cm^{-1} , de forte intensité.

3.1- *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 9 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **32–38**



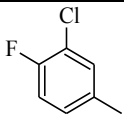
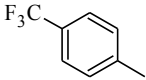
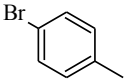
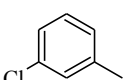
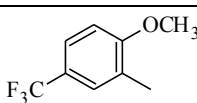
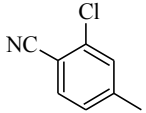
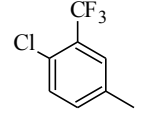
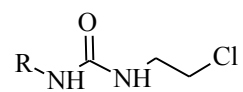
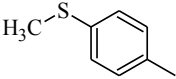
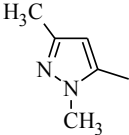
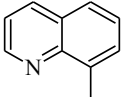
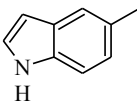
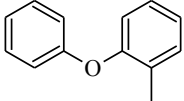
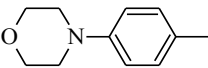
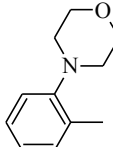
N°	R	νNH	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C-Cl}$ aliph.	Autres fréquences
32		-	1646	823	$\nu\text{C-F}$: 1057
33		3356	1641	834	-
34		3317	1631	825	$\nu\text{C-Br}$: 1071
35		3357	1638	-	$\nu\text{C-Cl}$ arom. : 1076
36		3381	1660	805	-
37		3327	1656	-	νCN : 2228 $\nu\text{C-Cl}$ arom. : 1048
38		3366	1654	829	$\nu\text{C-Cl}$ arom. : 1029

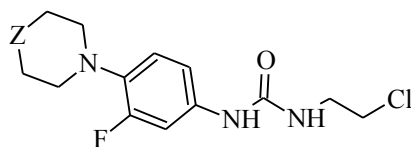
Tableau 10 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées (suite) **39–45**



N°	R	νNH	$\nu\text{C}=\text{O}$	$\nu\text{C}-\text{Cl}$ aliph.	Autres fréquences
39		3334	1636	818	-
40		3327	1687	782	-
41		3309	1648	823	-
42		3315	1626	734	$\nu\text{NH}_{\text{indolique}}$: 3421
43		3341	1641	750	-
44		3329	1640	763	-
45		3330	1641	763	-

3.2- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées

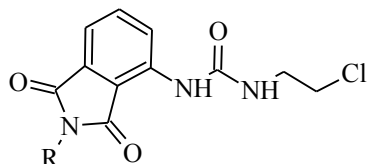
Tableau 11 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées **46–48**



N°	Z	ν NH	ν C=O	ν C-Cl	Autres fréquences
46	S	3392	1653	815	ν C-F : 1224, 1193
47	O	3388	1653	815	ν C-F : 1117
48		3392	1686	815	ν C-F : 1237, 1120

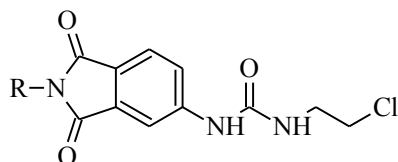
3.3- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées et *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées

Tableau 12 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées **49-51**



N°	R	ν_{NH}	$\nu_{\text{s}}\text{C=O imide}$	$\nu_{\text{as}}\text{C=O imide}$	ν_{NCON}	$\nu_{\text{C-Cl}}$
49		3328	1772	1712	1700	745
50		3391	1753	1700	1682	767
51		3317	1760	1708	1659	740

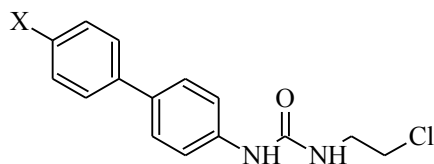
Tableau 13 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées **52-54**



N°	R	ν_{NH}	$\nu_{\text{s}}\text{C=O imide}$	$\nu_{\text{as}}\text{C=O imide}$	ν_{NCON}	$\nu_{\text{C-Cl}}$
52		3354	1773	1716	1653	738
53		3359	1774	1717	1703	748
54		3348	1769	1699	1673	747

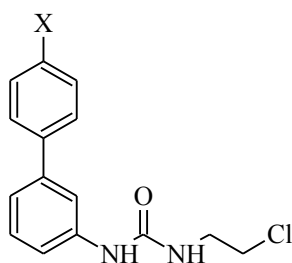
3.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 14 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **55-58**



N°	X	ν NH	ν C=O	ν C-Cl aliph.	Autres fréquences
55	H	3329	1640	835	-
56	Cl	3345	1638	818	ν C-Cl : 1102
57	F	3335	1640	821	ν C-F : 1244
58	OMe	3339	1639	819	-

Tableau 15 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **59-62**



N°	X	ν NH	ν C=O	ν C-Cl aliph.	Autres fréquences
59	H	3320	1636	758	-
60	Cl	3334	1644	786	ν C-Cl : 1091
61	F	3308	1631	836	ν C-F : 1241
62	OMe	3321	1636	836	-

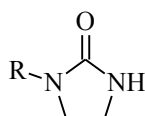
4- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

Les imidazolidin-2-ones synthétisées présentent une bande caractéristique :

- la bande de valence du carbonyle $\nu\text{C=O}$, comprise entre 1640 et 1720 cm^{-1} , de forte intensité.

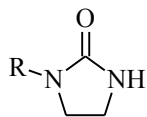
4.1- *N*-arylimidazolidin-2-ones

Tableau 16 : *N*-arylimidazolidin-2-ones **63-69**



N°	R	$\nu\text{C=O}$	Autres fréquences
63		1687	$\nu\text{C-Cl}$: 760 $\nu\text{C-F}$: 1025
64		1703	-
65		1681	$\nu\text{C-Br}$: 1071
66		1703	$\nu\text{C-Cl}$: 1080
67		1690	-
68		1718	νCN : 2224 $\nu\text{C-Cl}$: 1045
69		1719	$\nu\text{C-Cl}$: 1025

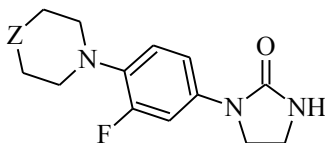
Tableau 17 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **70-76**



N°	R	$\nu_{\text{C=O}}$	Autres fréquences
70		1707	-
71		1704	-
72		1702	-
73		1674	$\nu_{\text{NH}}_{\text{indolique}}$: 3384
74		1682	-
75		1692	-
76		1684	-

4.2- *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones

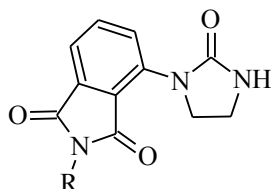
Tableau 18 : *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **77-80**



N°	Z	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C-F}$
77	CH ₂	1685	1232
78	S	1679	1191
79	O	1697	1118
80		1686	1102

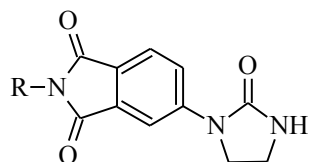
4.3- 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Tableau 19 : 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **81-83**



N°	R	$\nu_s\text{C=O imide}$	$\nu_{as}\text{C=O imide}$	νNCON
81		1771	1722	1661
82		1759	1714	1654
83		1769	1709	1656

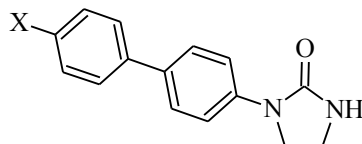
Tableau 20 : 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **84 et 85**



N°	R	$\nu_s\text{C=O imide}$	$\nu_{as}\text{C=O imide}$	νNCON
84		1774	1719	1655
85		1774	1726	1704

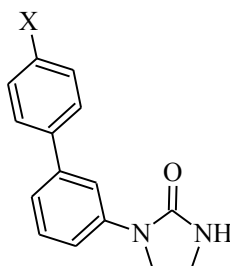
4.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones

Tableau 21 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones **86-89**



N°	X	$\nu\text{C=O}$	Autres fréquences
86	H	1681	-
87	Cl	1685	$\nu\text{C-Cl}$: 1100
88	F	1684	$\nu\text{C-F}$: 1249
89	OMe	1697	-

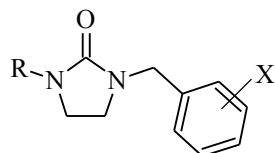
Tableau 22 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones **90-93**



N°	X	$\nu\text{C=O}$	Autres fréquences
90	H	1680	-
91	Cl	1681	$\nu\text{C-Cl}$: 1096
92	F	1681	$\nu\text{C-F}$: 1240
93	OMe	1682	-

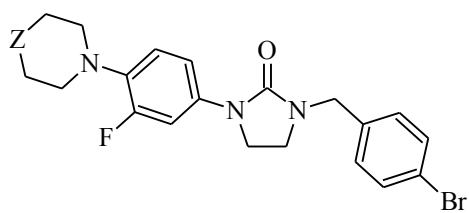
5- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Tableau 23 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones **94-102**



N°	R	X	$\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C-Br}}$	Autres fréquences
94		4-Br	1703	1008	$\nu_{\text{C-F}}$: 1220 $\nu_{\text{C-Cl}}$: 1069
95		2-Br	1702	1027	$\nu_{\text{C-F}}$: 1222, 1158 $\nu_{\text{C-Cl}}$: 1089
96		4-Br	1706	1073	-
97		2-Br	1690	1079	-
98		4-Br	1705		-
99		2-Br	1710	1026	$\nu_{\text{C-Cl}}$: 1087
100		4-Br	1659	1024	-
101		2-Br	1665	1028	-
102		4-Br	1646	1062	-

Tableau 24 : *N*-bromobenzyl-*N'*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **103-106**

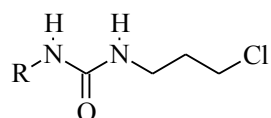


N°	Z	$\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C-Br}}$	$\nu_{\text{C-F}}$
103	CH ₂	1704	1068	1234
104	S	1705	1068	1236
105	O	1689	1070	1227
106		1686	-	-

II- SERIE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES

1- *N*-(3-chloropropyl)-*N'*-phénylurées

Tableau 25 : *N*-(3-chloropropyl)-*N'*-phénylurées **107–110**



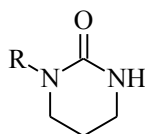
N°	R	ν NH	ν C=O	ν C-Cl aliph.	Autres fréquences
107		3331	1635	828	ν C-Cl arom. : 1087
108		3336	1651	797	ν C-Cl arom. : 1052 ν C-F : 1217
109		3370	1653	810	-
110		3321	1677	828	ν CN : 2226 ν C-Cl arom.: 1045

2- *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1H)-ones

Les tétrahydropyrimidin-2(1H)-ones synthétisées présentent une bande caractéristique :

- la bande de valence du carbonyle ν C=O, comprise entre 1640 et 1720 cm^{-1} , de forte intensité.

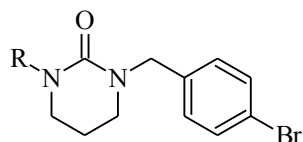
Tableau 26 : *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **111–114**



N°	R	$\nu\text{C=O}$	Autres fréquences
111		1657	$\nu\text{C-Cl}$: 1092
112		1663	$\nu\text{C-F}$: 1223 $\nu\text{C-Cl}$: 1055
113		1665	-
114		1669	νCN : 2227 $\nu\text{C-Cl}$: 1047

3- *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one

Tableau 27 : *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **115**



N°	R	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C-Br}$	Autres fréquences
115		1637	1005	$\nu\text{C-F}$: 1209 $\nu\text{C-Cl}$: 1065

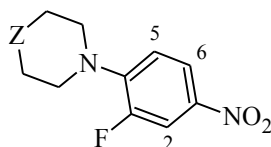
B- RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON

Les spectres de RMN du proton des produits synthétisés ont été réalisés dans le deutériochloroforme (CDCl_3) ou dans le diméthylsulfoxyde hexadeutérié (DMSO-d_6), selon la solubilité de ces composés dans ces solvants. L'interprétation des spectres obtenus a été réalisée en se basant sur les valeurs moyennes de déplacements chimiques et de constantes de couplage calculées à l'aide des tables données par Pretsch *et al.* (PRETSCH, 2000). Certaines valeurs de déplacement chimique n'ont pu être observées ou identifiées avec précision (c'est le cas lorsqu'un proton apparaît sous le pic de l'eau dans le DMSO-d_6), elles sont indiquées dans les tableaux comme valeurs non déterminées (ND).

I- SERIE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES

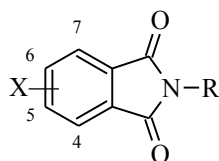
1- Dérives nitrés

Tableau 1 : Dérivés du 1-fluoro-3-nitrobenzène **1-4**



N°	Z	CH_2Z	CH_2N	H^2	H^5	H^6
1 (CDCl_3)	1,60-1,78 m $\rightarrow \text{CH}_2$	1,60-1,78 m	3,27 t $^3\text{J} = 5,5$	7,87 dd $^3\text{J}_{\text{HF}} = 13,2$ $^4\text{J} = 2,6$	6,89 d $^3\text{J}' = 8,9$	7,96 ddd $^3\text{J}' = 8,9$ $^4\text{J} = 2,6$ $^5\text{J}_{\text{HF}} = 0,8$
2 (DMSO-d_6)	S	3,58-3,63 m	2,75-2,80 m	7,98-8,08 m	7,22 dd $^3\text{J} = ^4\text{J}_{\text{HF}} = 8,8$	7,98-8,08 m
3 (CDCl_3)	O	3,87 t $^3\text{J} = 4,7$	3,28 t $^3\text{J} = 4,7$	7,88 dd $^3\text{J}_{\text{HF}} = 13,1$ $^4\text{J} = 2,6$	6,91 d $^3\text{J}' = 8,8$	7,96 ddd $^3\text{J}' = 8,8$ $^4\text{J} = 2,6$ $^5\text{J}_{\text{HF}} = 1,1$
4 (CDCl_3)	4,01 s $\rightarrow$	1,87 t $^3\text{J} = 5,8$	3,41 t $^3\text{J} = 5,8$	7,89 dd $^3\text{J}_{\text{HF}} = 13,0$ $^4\text{J} = 2,6$	6,92 d $^3\text{J}' = 8,9$	7,97 dd $^3\text{J}' = 8,9$ $^4\text{J} = 2,6$

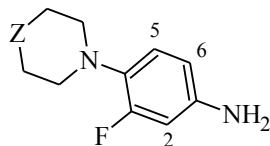
Tableau 2 : 4- et 5-nitro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **9-14**



N°	X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	R
9 (DMSO-d ₆)	NO ₂	H 8,31 d ³ J = 7,6	H 8,09 dd ³ J = 7,6 ³ J' = 7,6	H 8,17 d ³ J' = 7,6	3,25-3,40 m 3,70-3,80 m
10 (DMSO-d ₆)	NO ₂	H 8,38 dd ³ J = 7,6 ⁴ J = 0,9	H 8,16 dd ³ J = 7,6 ³ J' = 7,6	H 8,30 dd ³ J' = 7,6 ⁴ J = 0,9	7,48-7,62 m
11 (DMSO-d ₆)	NO ₂	H 8,32 d ³ J = 7,6	H 8,10 dd ³ J = 7,6 ³ J' = 7,6	H 8,22 d ³ J' = 7,6	4,81 s 7,30-7,38 m
12 (CDCl ₃)	H 8,67 d ⁴ J = 2,0	NO ₂	H 8,63 dd ³ J = 8,0 ⁴ J = 2,0	H 8,06 d ³ J = 8,0	3,42 t ³J = 4,3 3,89 t ³J = 4,3
13 (DMSO-d ₆)	H 8,63 d ⁴ J = 1,8	NO ₂	H 8,73 dd ³ J = 8,3 ⁴ J = 1,8	H 8,26 d ³ J = 8,3	7,48-7,63 m
14 (DMSO-d ₆)	H 8,55 d ⁴ J = 2,1	NO ₂	H 8,67 dd ³ J = 8,2 ⁴ J = 2,1	H 8,18 d ³ J = 8,2	4,85 s 7,28-7,39 m

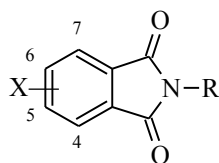
2- Amines

Tableau 3 : 3-fluoroanilines **5-8**



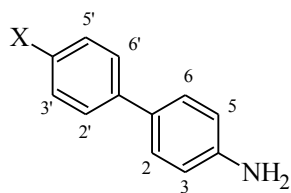
N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	NH ₂	H ²	H ⁵	H ⁶
5 (CDCl ₃)	1,48-1,56 m ↓ CH ₂	1,67-1,77 m	2,89 t ³ J = 5,4	3,53 se	6,36-6,46 m	6,80 dd ³ J = ⁴ J _{HF} = 8,6	6,36-6,46 m
6 (DMSO-d ₆)	S	3,07 t ³ J = 4,6	2,73 t ³ J = 4,6	5,06 se	6,30-6,40 m	6,82 dd ³ J = ⁴ J _{HF} = 8,5	6,30-6,40 m
7 (CDCl ₃)	O	3,85 s	2,96 s	3,51 s	6,40 m	6,79 dd ³ J = ⁴ J _{HF} = 8,7	6,40 m
8 (CDCl ₃)	4,00 s →	1,89 t ³ J = 5,4	3,05 t ³ J = 5,4	3,50 se	6,37-6,46 m	6,84 dd ³ J = ⁴ J _{HF} = 8,6	6,37-6,46 m

Tableau 4 : 4- et 5-amino-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **15-20**



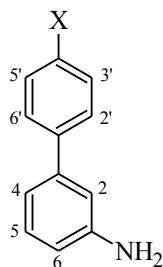
N°	X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	R
15 (DMSO-d ₆)	NH ₂ 6,50 se	H 6,96 dd ³ J = 7,0 ⁴ J = 0,6	H 7,47 dd ³ J = 7,0 ³ J' = 8,5	H 7,02 dd ³ J' = 8,5 ⁴ J = 0,6	
16 (DMSO-d ₆)	NH ₂ 6,60, se	H 7,06-7,12 m	H 7,42-7,58 m	H 7,06-7,12 m	
17 (DMSO-d ₆)	NH ₂ 6,53 se	H 7,00-7,05 m	H 7,47 dd ³ J = ³ J' = 7,9	H 7,00-7,05 m	
18 (CDCl ₃)	H 7,02 d ⁴ J = 2,1	NH ₂ 4,40 se	H 6,84 dd ³ J = 8,0 ⁴ J = 2,1	H 7,60 d ³ J = 8,0	
19 (DMSO-d ₆)	H 7,04 s	NH ₂ 6,61 se	H 6,90 d ³ J = 8,0	H 7,62 d ³ J = 8,0	
20 (DMSO-d ₆)	H 6,98 d ⁴ J = 2,0	NH ₂ 6,54 se	H 6,84 dd ³ J = 8,4 ⁴ J = 2,0	H 7,54 d ³ J = 8,4	

Tableau 5 : 1,1'-biphényl-4-amines **23-24** et **26-27** (CDCl₃)



N°	X	NH ₂	H ³ et H ⁵	H ² et H ⁶	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
23	H	3,75 se	6,77 dd ³ J = 6,7 ⁴ J = 2,1	7,27-7,58 m		
25	Cl	3,76 se	6,76 d ³ J = 8,0	7,34-7,49 m	7,34-7,49 m	7,34-7,49 m
26	F	3,74 se	6,76 d ³ J = 8,5	7,36 d ³ J = 8,5	7,48 dd ³ J' = 8,8 ⁴ J _{HF} = 5,5	7,05-7,18 m
27	H ₃ C-O ↑ 3,85 s	3,70 se	6,75 d ³ J = 8,2	7,37 d ³ J = 8,2	7,47 d ³ J' = 8,2	6,95 d ³ J' = 8,2

Tableau 6 : 1,1'-biphényl-3-amines **28-31**

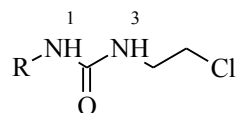


N°	X	NH ₂	H ²	H ⁴	H ⁵	H ⁶	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
28 (CDCl ₃)	H	3,72 se	6,57-7,05 m				7,21-7,60 m	
29 (CDCl ₃)	Cl	3,75 se	6,83-7,00 m		7,23 dd ³ J = ³ J' = 7,9	6,69 ddd ³ J = 7,9 ⁴ J = 2,1 ⁴ J' = 0,9	7,49 d ³ J'' = 8,5	7,38 d ³ J'' = 8,5
30 (CDCl ₃)	F	3,73 se	6,86 t ⁴ J = 1,5	6,94 d ³ J = 7,9	7,23 dd ³ J = 7,9 ³ J' = 7,9	6,69 dd ³ J' = 7,9 ⁴ J = 1,5	7,11 dd ³ J'' = ⁴ J _{HF} = 8,5	7,49-7,56 m
31 (DMSO-d ₆)	H ₃ C-O ↑ 3,81 s	5,14 se	6,83 s	6,76 d ³ J = 7,6	7,1 dd ³ J = 7,6 ³ J' = 7,6	6,55 d ³ J' = 7,6	7,52 d ³ J'' = 8,9	7,02 d ³ J'' = 8,9

3- *N*-(2-chloroéthyl)urées

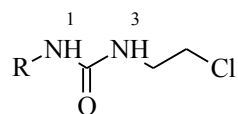
3.1- *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 7 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **32–36**



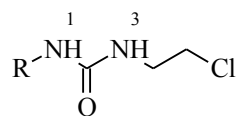
N°	R	H ¹	H ³	CH ₂ Cl	CH ₂ N
32 (CDCl ₃)		8,91 s	6,53 t ³ J = 5,5	3,69 t ³ J' = 5,5	3,44 m ³ J = ³ J' = 5,5
33 (CDCl ₃)		7,30 s	5,66 se	3,59-3,70 m	
34 (DMSO-d ₆)		8,84 s	6,48 t ³ J = 5,8	3,69 t ³ J' = 5,8	3,46 m ³ J = ³ J' = 5,8
35 (CDCl ₃)		7,52 s	5,89 se	3,55-3,64 m	
36 (CDCl ₃)		8,45 s	5,27 se	3,63-3,73 m	

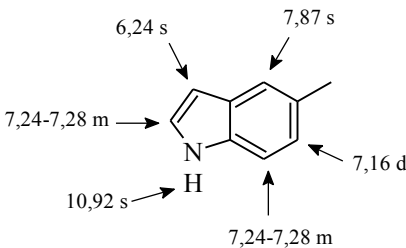
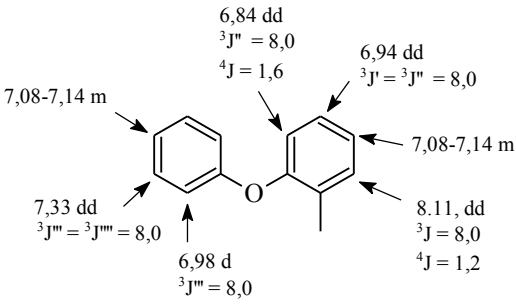
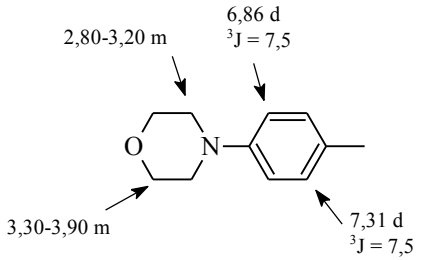
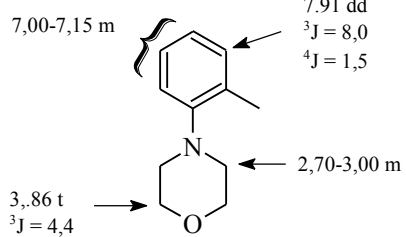
Tableau 8 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées (suite) **37–41** (CDCl₃)



N°	R	H ¹	H ³	CH ₂ Cl	CH ₂ N
37		8,13 s	6,01 se	3,60-3,70 m	
38		7,81 s	5,96 se	3,52-3,72 m	
39		6,95 s	5,53 se	3,56-3,68 m	
40		6,66 s	5,30 se	3,64 t ³ J = 5,8	3,57 m ³ J = ³ J' = 5,8
41		9,10 s	5,61 se	3,68-3,78 m	

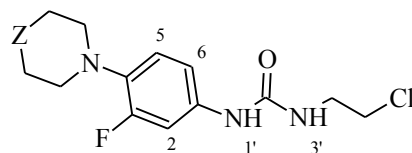
Tableau 9 : *N*-aryl-*N'*-(2-chloroéthyl)urées (suite) **42–45**



N°	R	H ¹	H ³	CH ₂ Cl	CH ₂ N
42 (DMSO-d ₆)		8,37 s	6,30 t ³ J = 5,8	3,69 t ³ J = 5,8	3,45 m ³ J = 5,8
43 (CDCl ₃)		7,03 s	5,40 se	3,55-3,65 m	
44 (DMSO-d ₆)		8,44 s	6,36 se	3,30-3,90 m	
45 (CDCl ₃)		7,52 s	5,77 se	3,58-3,70 m	

3.2- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées

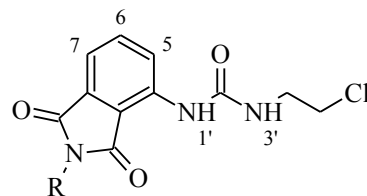
Tableau 10 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(3-fluorophényl)urées **46–48**



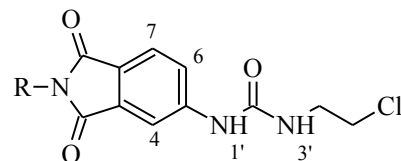
N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	H ²	H ⁵	H ⁶	H ^{1'}	H ^{3'}	CH ₂ Cl	CH ₂ NH
46 (DMSO-d ₆)	S	3,17 t ³ J = 4,6	2,76 t ³ J = 4,6	7,42 dd ³ J _{HF} = 15,0 ⁴ J = 1,5	6,90-7,10 m		8,73 s	6,43 t ³ J' = 5,5	3,68 t ³ J'' = 5,5	3,35-3,50 m
47 (CDCl ₃)	O	3,87 t ³ J = 4,5	3,02 t ³ J = 4,5	7,11 dd ³ J _{HF} = 13,9 ⁴ J = 2,1	6,86 dd ³ J' = 8,8 ⁴ J _{HF} = 8,7	6,93 dd ³ J' = 8,8 ⁴ J = 2,1	7,37 s	5,80 t ³ J'' = 5,6	3,55-3,63 m	
48 (CDCl ₃)	4,00 s →	1,70-2,10 m	3,10-3,30 m	7,19 d ³ J _{HF} = 12,2	6,94-6,99 m			5,51 se	3,57-3,64 m	

3.3- *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées et *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées

Tableau 11 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-4-yl)urées **49-51** (DMSO- d_6)



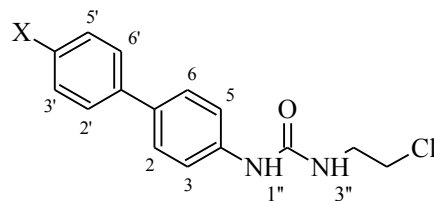
N°	CH ₂ Cl	CH ₂ N	H ^{1'}	H ^{3'}	H ⁵	H ⁶	H ⁷	R
49	3,60-3,85 m	3,48 m ³ J = 5,5	8,94 s	8,13 se	8,57 d ³ J' = 8,5	7,73 dd ³ J' = 8,5 ³ J'' = 7,0	7,39 d ³ J'' = 7,0	3,33-3,38 m 3,60-3,85 m
50	3,73 t ³ J = 5,8	3,49 m ³ J = 5,8	9,04 s	8,16 t ³ J = 5,8	8,60 d ³ J' = 8,5	7,80 dd ³ J' = 8,5 ³ J'' = 7,3	7,40-7,80 m	 7,40-7,80 m
51	3,71 t ³ J = 5,2	3,48 m ³ J = 5,2	8,97 s	8,11 t ³ J = 5,2	8,58 d ³ J' = 8,5	7,73 dd ³ J' = 8,5 ³ J'' = 6,7	7,44 d ³ J'' = 6,7	4,78 s 7,20-7,40 m

Tableau 12 : *N*-(2-chloroéthyl)-*N'*-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl)urées **52-54** (DMSO- d_6)

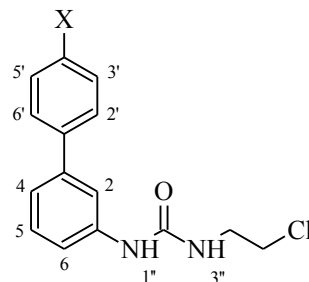
N°	CH ₂ Cl	CH ₂ N	H ^{1'}	H ^{3'}	H ⁴	H ⁶	H ⁷	R
52	3,70-3,81 m	3,44-3,61 m	9,49 s	6,74 se	8,07 s	7,68 d ³ J = 8,2	7,81 d ³ J = 8,2	3,33-3,38 m 3,72 m
53	3,74 t ³ J = 5,8	3,48-3,57 m	9,55 s	6,77 t ³ J = 5,8	8,19 d ⁴ J = 1,8	7,71 dd ³ J' = 8,2 ⁴ J = 1,8	7,86 d ³ J' = 8,2	 } 7,43-7,59 m
54	3,69-3,80 m	3,45-3,60 m	9,47 s	6,72 se	8,12 s	7,66 d ³ J = 8,2	7,79 d ³ J = 8,2	4,76 s } 7,25-7,45 m

3.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées

Tableau 13 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **55-58** (DMSO-*d*₆)



N°	X	CH ₂ Cl	CH ₂ N	H ^{1''}	H ^{3''}	H ² et H ⁶	H ³ et H ⁵	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
55	H	3,71 t ³ J = 5,8	3,47 m ³ J = 5,8	8,80 s	6,48 t ³ J = 5,8	7,33-7,67 m			
56	Cl	3,65-3,80 m	3,45-3,60 m	8,84 s	6,50 se	7,40-7,80 m			
57	F	3,71 t ³ J = 5,5	3,48 m ³ J = 5,5	8,83 s	6,50 se	7,50-7,70 m	7,28 dd ³ J' = ⁴ J _{HF} = 8,2	7,50-7,70 m	
58	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{O} \\ \uparrow \\ 3,81 \text{ s} \end{array}$	3,70 t ³ J = 5,8	3,48 m ³ J = 5,8	8,75 s	6,46 t ³ J = 5,8	7,46-7,52 m	7,58 d ³ J' = 8,8	7,02 d ³ J' = 8,8	

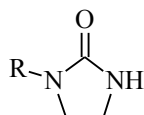
Tableau 14 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)-*N'*-(2-chloroéthyl)urées **59-62** (DMSO- d_6)

N°	X	CH ₂ Cl	CH ₂ N	H ^{1''}	H ^{3''}	H ²	H ⁴	H ⁵	H ⁶	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
59	H	3,71 t ³ J = 6,1 7,21-7,43 m	3,47 m ³ J = 6,1	8,84 s	6,52 se	7,79 s	7,21-7,43 m			7,62 d ³ J' = 7,6	7,49 t ³ J' = 7,6
60	Cl	3,71 t ³ J = 5,5	3,47 m ³ J = 5,5	8,82 s	6,50 se	7,80 s	7,15-7,45 m			7,65 d ³ J' = 7,9	7,55 d ³ J' = 7,9
61	F	3,71 t ³ J = 5,5	3,47 m ³ J = 5,5	8,80 s	6,50 se	7,76 s	7,63-7,77 m			7,66 dd ³ J' = ⁴ J _{HF} = 7,6	7,63-7,77 m
62	H ₃ C-O ↑ 3,83 s	3,70 t ³ J = 4,9	3,48 t ³ J = 4,9	8,78 s	6,49 se	7,73 s	7,10-7,40 m			7,56 d ³ J' = 7,9	7,05 d ³ J' = 7,9

4- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

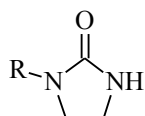
4.1- *N*-arylimidazolidin-2-ones

Tableau 15 : *N*-arylimidazolidin-2-ones **63-67** (CDCl₃)



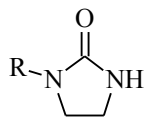
N°	R	NH	CH ₂ N	CH ₂ NH
63		5,21 se	3,87-3,97 m	3,57-3,64 m
64		5,89 se	3,93 t 3J = 7,2	3,63 t 3J = 7,2
65		5,53 se	3,90 t 3J = 8,2	3,58 t 3J = 8,2
66		5,65 se	3,91 t 3J = 8,5	3,59 t 3J = 8,5
67		5,31 se	3,88 t 3J = 7,3	3,59 t 3J = 7,3

Tableau 16 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **68-72**



N°	R	NH	CH ₂ N	CH ₂ NH
68 (DMSO-d ₆)		7,58 se	3,99 t ³ J = 7,4	3,67 t ³ J = 7,4
69 (CDCl ₃)		5,44 se	3,90-4,00 m	3,55-3,70 m
70 (CDCl ₃)		5,08 se	3,91 m	3,57 t ³ J = 7,3
71 (CDCl ₃)		5,50 se	3,79 t ³ J = 7,4	3,60 t ³ J = 7,4
72 (DMSO-d ₆)		6,81 se	4,17 t ³ J = 8,3	3,53 t ³ J = 8,3

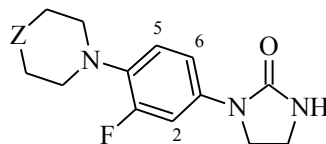
Tableau 17 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **73-76**



N°	R	NH	CH ₂ N	CH ₂ NH
73 (DMSO-d ₆)		8,70 se	4,24 t ³ J = 8,2	3,78 t ³ J = 8,2
74 (CDCl ₃)		5,18 se	3,89 t ³ J = 8,4	3,42 t ³ J = 8,4
75		ND	4,35 t ³ J = 8,3	3,80 t ³ J = 8,3
76 (CDCl ₃)		7,52 se	4,32 t ³ J = 8,5	3,98 t ³ J = 8,5

4.2- *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones

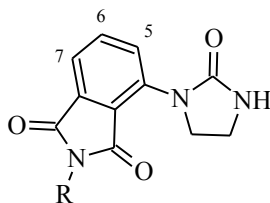
Tableau 18 : *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **77-80**



N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	H ²	H ⁵	H ⁶	NH	CH ₂ NCO	CH ₂ NH
77 (CDCl ₃)	1,65-1,80 m → CH ₂	1,65-1,80 m	2,95 t ³ J = 5,1	7,09 d ³ J _{HF} = 14,7	6,87-6,90 m		3,36 se	4,40 t ³ J' = 8,3	3,81 t ³ J' = 8,3
78 (DMSO-d ₆)	S	3,19 t ³ J = 4,6	2,77 t ³ J = 4,6	7,59 dd ³ J _{HF} = 15,5 ⁴ J = 2,1	7,05 dd ⁴ J _{HF} = ³ J' = 8,9	7,13 dd ³ J' = 8,9 ⁴ J = 2,1	7,00 se	3,83 t ³ J'' = 7,3	3,35-3,60 m
79 (DMSO-d ₆)	O	3,78 t ³ J = 9,1	2,96 t ³ J = 9,1	7,62 dd ³ J _{HF} = 15,7 ⁴ J = 2,3	7,02 dd ⁴ J _{HF} = ³ J' = 8,8	7,15 dd ³ J' = 8,8 ⁴ J = 2,3	6,98 s	3,82 t ³ J'' = 7,2	3,42 t ³ J'' = 7,2
80 (CDCl ₃)	4,00 s →	1,80-2,00 m	3,05-3,25 m	7,43 d ³ J _{HF} = 12,3	6,96 d ³ J = 9,2	7,10 d ³ J = 9,2	4,72 se	3,90 t ³ J' = 7,4	3,57 t ³ J' = 7,4

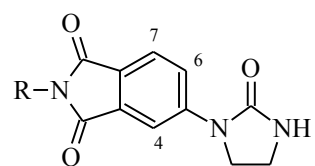
4.3- 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Tableau 19 : 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **81-83** (DMSO- d_6)



N°	CH ₂ NH	CH ₂ N	NH	H ⁵	H ⁶	H ⁷	R
81	4,06 t ³ J = 7,0	3,49 t ³ J = 7,0	7,19 se	7,78-7,88 m		7,65 d ³ J' = 6,7	3,25-3,35 m 3,65-3,80 m
82	4,09 t ³ J = 8,1	3,48 m ³ J = 8,1	7,20 se	7,94 dd ³ J' = 8,3 ⁴ J = 1,5	7,89 dd ³ J' = 8,3 ³ J'' = 6,7	7,77 dd ³ J'' = 6,7 ⁴ J = 1,5	7,45-7,60 m
83	4,08 t ³ J = 7,0	3,47 m ³ J = 7,0	7,21 se	7,79-7,90 m		7,69 d ³ J' = 6,7	4,78 s 7,30-7,40 m

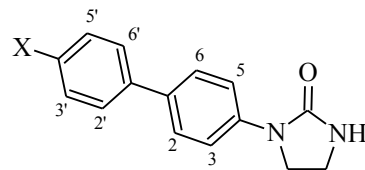
Tableau 20 : 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **84** et **85** (DMSO-*d*₆)



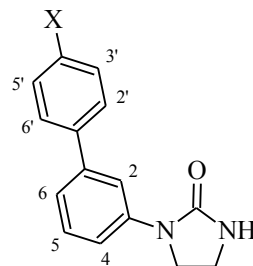
N°	CH ₂ NH	CH ₂ N	NH	H ⁴	H ⁶ et H ⁷	R
84	4,00 t ³ J = 7,3	3,49 t ³ J = 7,3	7,48 se	8,20 s	7,81-7,89 m	3,25-3,35 m 3,65-3,80 m
85	4,05 t ³ J = 7,0	3,52 t ³ J = 7,0	7,40-7,60 m	8,30 s	7,90-7,95 m	

4.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones

Tableau 21 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones **86-89** (DMSO-d₆)



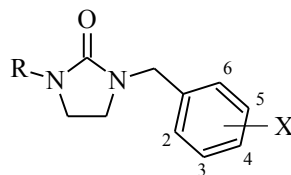
N°	X	CH ₂ NH	CH ₂ N	NH	H ² et H ⁶	H ³ et H ⁵	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
86	H 7,35 t ³ J' = 7,3	3,45 t ³ J = 7,6	3,93 t ³ J = 7,6	7,03 se	7,67-7,70 m			7,47 t ³ J' = 7,3
87	Cl	3,25-3,65 m	3,85-4,00 m	7,06 se	7,40-7,90 m			
88	F	3,46 t ³ J = 8,2	3,92 t ³ J = 8,2	7,04 se	7,60-7,90 m		7,30 dd ³ J' = ⁴ J _{HF} = 8,5	7,60-7,90 m
89	H ₃ C-O ↑ 3,70-4,00 m	3,70-4,00 m	4,20-4,40 m	-	7,40-7,80 m			7,02 d ³ J = 7,3

Tableau 22 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones **90-93** (DMSO-d₆)

N°	X	$\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$	CH_2N	NH	H^2	H^4	H^5	H^6	$\text{H}^{2'}$ et $\text{H}^{6'}$	$\text{H}^{3'}$ et $\text{H}^{5'}$
90	H	3,46 t $^3J = 7,3$	3,97 t $^3J = 7,3$	7,05 se	7,87 s	7,28-7,70 m				
91	Cl	3,46 t $^3J = 7,6$	3,96 t $^3J = 7,6$	7,04 se	7,86 s	7,53-7,62 m	7,43 dd $^3J' = ^3J'' = 7,6$	7,30 d $^3J'' = 7,6$	7,70 d $^3J''' = 8,2$	7,53-7,62 m
92	F	3,46 t $^3J = 7,6$	3,96 t $^3J = 7,6$	7,05 se	7,84 s	7,60 d $^3J' = 7,3$	7,26-7,46 m		7,71 dd $^3J'' = 8,2$ $^4J_{\text{HF}} = 5,5$	7,26-7,46 m
93	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}$ ↑ 3,83 s	3,45 t $^3J = 7,3$	3,95 t $^3J = 7,3$	7,02 se	7,82 s	7,53 d $^3J' = 8,0$	7,39 dd $^3J' = 8,0$ $^3J'' = 8,0$	7,25 d $^3J'' = 8,0$	7,61 d $^3J''' = 8,5$	7,06 d $^3J''' = 8,5$

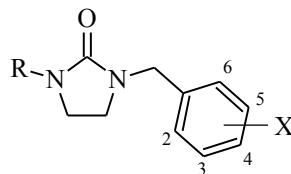
5- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Tableau 23 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones **94** et **95** (CDCl₃)



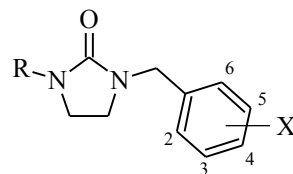
N°	R	CH ₂ NR	CH ₂ N	CH ₂	X ²	X ⁶	X ⁴	X ³	X ⁵
94		3,77 t ³ J = 7,6	3,37 t ³ J = 7,6	4,43 s	H ² et H ⁶ 7,20 d ³ J' = 8,4		Br	H ³ et H ⁵ 7,49 d ³ J' = 8,4	
95		3,79 t ³ J = 7,2	3,42 t ³ J = 7,2	4,63 s	Br	H 7,41 dd ³ J' = 7,5 ⁴ J = 1,9	H 7,19 ddd ³ J'' = ³ J''' = 7,5 ⁴ J = 1,9	H 7,59 dd ³ J''' = 7,5 ⁴ J' = 1,1	H 7,32 ddd ³ J' = ³ J'' = 7,5 ⁴ J' = 1,1

Tableau 24 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones (suite) **96** et **97** (CDCl₃)



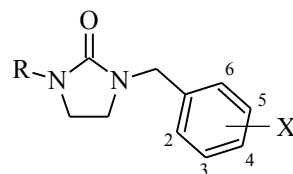
N°	R	CH ₂ NR	CH ₂ N	CH ₂	X ²	X ⁶	X ⁴	X ³	X ⁵
96		3,60-3,85 m	3,25-3,45 m	4,42 s	H ² et H ⁶ 7,23 d 3J = 8,4		Br	H ³ et H ⁵ 7,47-7,51 m	
97		3,80 t 3J = 7,2	3,47 t 3J = 7,2	4,62 s	Br	H 7,44- 7,52 m	H 7,18 dd 3J' = 3J'' = 7,4	H 7,44- 7,52 m	H 7,34 dd 3J' = 3J''' = 7,4

Tableau 25 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones (suite) **98-100**

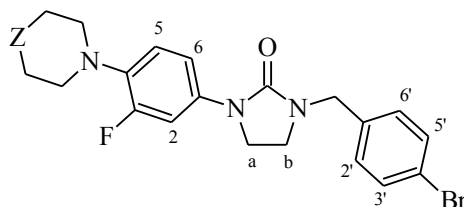


N°	R	CH ₂ NR	CH ₂ N	CH ₂	X ²	X ⁶	X ⁴	X ³	X ⁵
98 (CDCl ₃)		3,83 t ³ J = 7,6	3,43 t ³ J = 7,6	4,45 s	H ² et H ⁶ 7,19 d ³ J' = 8,3		Br	H ³ et H ⁵ 7,50 d ³ J' = 8,3	
99 (CDCl ₃)		3,84 t ³ J = 7,3	3,53 t ³ J = 7,3	4,65 s	Br	H 7,40 dd ³ J' = 7,5 ⁴ J = 1,8	H 7,20 ddd ³ J'' = ³ J''' = 7,5 ⁴ J = 1,8	H 7,60-7,62 m	H 7,33 dd ³ J' = ³ J'' = 7,5

Tableau 26 : *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-ones (suite) **100-102** (CDCl₃)



N°	R	CH ₂ NR	CH ₂ N	CH ₂	X ²	X ⁶	X ⁴	X ³	X ⁵
100		4,31 t ³ J = 7,8	3,35 t ³ J = 7,8	4,53 s	H ² et H ⁶ 7,27 d ³ J' = 8,3		Br	H ³ et H ⁵ 7,48 d ³ J' = 8,3	
101		4,35 t ³ J = 7,7	3,46 t ³ J = 7,7	4,73 s	Br	H 7,52 dd ³ J' = 7,8 ⁴ J = 1,6	H 7,17 ddd ³ J'' = ³ J''' = 7,8 ⁴ J = 1,6	H 7,58 dd ³ J''' = 7,8 ⁴ J' = 1,1	H 7,33 ddd ³ J' = ³ J'' = 7,8 ⁴ J' = 1,1
102		4,30 t ³ J = 8,5	3,82-3,90 m	4,92 s	H ² et H ⁶ 7,09 d ³ J = 8,3		Br	H ³ et H ⁵ 7,35 d ³ J = 8,3	

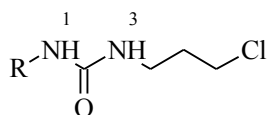
Tableau 27 : *N*-bromobenzyl-*N'*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **103-106**

N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	H ²	H ⁵	H ⁶	CH ₂ ^a	CH ₂ ^b	CH ₂	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
103 (DMSO-d ₆)	1,45-1,60 m → CH ₂	1,60-1,75 m	2,85-3,00 m	7,00-7,61 m	7,03 dd ³ J = 8,0 ⁴ J _{HF} = 9,5	7,16 d ³ J = 8,0	3,80 t ³ J' = 7,0	ND	4,39 s	7,29 d ³ J'' = 8,3	7,00-7,61 m
104 (DMSO-d ₆)	S	3,15-3,25 m	2,70-2,85 m	7,55-7,70 m	7,08 dd ⁴ J _{HF} = ³ J = 9,5	7,18 d ³ J = 9,5	3,80 t ³ J' = 8,5	ND	4,38 s	7,29 d ³ J'' = 7,9	7,55-7,70 m
105 (CDCl ₃)	O	3,85-4,00 m	3,00-3,15 m	7,40-7,60 m	6,92 dd ⁴ J _{HF} = ³ J = 9,8	7,10-7,25 m	3,76 t ³ J' = 7,0	3,35 t ³ J' = 7,0	4,42 s	7,10-7,25 m	7,40-7,60 m
106 (CDCl ₃)	4,00 s →	1,90 t ³ J = 5,5	3,13 t ³ J = 5,5	7,44-7,51 m	6,96 dd ⁴ J _{HF} = ³ J' = 9,5	7,12 dd ³ J' = 9,5 ⁴ J = 2,5	3,70-3,85 m	3,30-3,40 m	4,42 s	7,19 d ³ J'' = 8,3	7,47 d ³ J'' = 8,3

II- SERIE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES

1- *N*-(3-chloropropyl)-*N'*-phénylurées

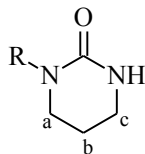
Tableau 28 : *N*-(3-chloropropyl)-*N'*-phénylurées **107–110**

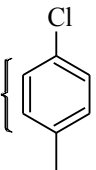
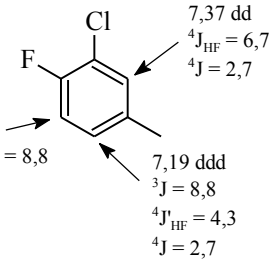
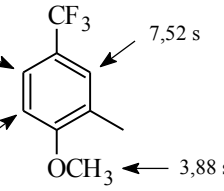
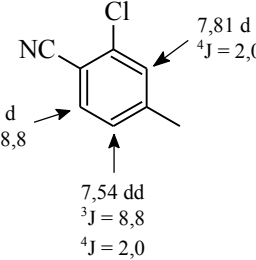


N°	R	H ¹	H ³	CH ₂ NH	CH ₂	CH ₂ Cl
107 (DMSO-d ₆)		8,63 s	6,33 t ³ J = 6,6	3,24 m ³ J = ³ J' = 6,6	1,92 m ³ J' = ³ J'' = 6,6	3,70 t ³ J'' = 6,6
108 (CDCl ₃)		7,95 s	6,02 t ³ J = 6,2	3,35 m ³ J = ³ J' = 6,2	1,93 m ³ J' = ³ J'' = 6,2	3,56 t ³ J'' = 6,2
109 (CDCl ₃)		8,47 s	5,01 se	3,45-3,65 m	1,90-2,15 m	3,45-3,65 m
110 (DMSO-d ₆)		9,28 s	6,65 se	3,20-3,30 m	1,80-2,00 m	3,65-3,75 m

2- *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones

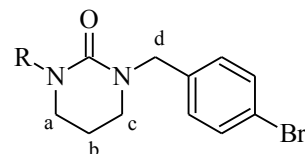
Tableau 29 : *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **111–114**



N°	R	NH	CH _{2a}	CH _{2b}	CH _{2c}
111 (DMSO- <i>d</i> ₆)	7,30-7,45 m { 	6,69 se	3,64 t ³ J = 5,6	1,97 m ³ J = 5,6 ³ J' = 5,6	3,25 td ³ J' = 5,6 ⁴ J = 2,5
112 (CDCl ₃)		5,61 se	3,64 t ³ J = 5,8	2,08 m ³ J = 5,8 ³ J' = 5,8	3,41 td ³ J' = 5,8 ⁴ J = 2,4
113 (DMSO- <i>d</i> ₆)		6,58 s	3,15-3,55 m	1,85-2,05 m	3,15-3,55 m
114 (DMSO- <i>d</i> ₆)		7,12 se	3,74 t ³ J = 5,6	1,99 m ³ J = 5,6 ³ J' = 5,6	3,25 td ³ J' = 5,6 ⁴ J = 2,4

3- *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1H)-one

Tableau 30 : *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **115**



N°	R	CH _{2a}	CH _{2b}	CH _{2c}	CH _{2d}	H ^{2'} et H ^{6'}	H ^{3'} et H ^{5'}
115	7,38 dd $^3J_{\text{HF}} = 6,4$ $^4J = 2,4$ 7,10 dd $^3J = ^3J_{\text{HF}} = 8,8$ 7,15-7,24 m	3,67 t $^3J = 5,8$	2,09 m $^3J = 5,8$ $^3J' = 5,8$	3,31 t $^3J' = 5,8$	4,55 s	7,15-7,24 m	7,46 d $^3J' = 8,2$

C- RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU CARBONE

Les spectres de RMN du ^{13}C ont été réalisés sur les produits finaux dans le CDCl_3 ou le DMSO-d_6 , selon la solubilité des composés analysés, au moyen d'un spectromètre Bruker AVANCE 400 (400 MHz).

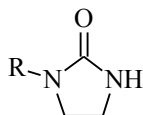
L'interprétation des spectres obtenus a été effectuée en se basant sur les valeurs moyennes de déplacements chimiques et de constantes de couplage calculées à l'aide des tables figurant dans l'ouvrage réalisé par Pretsch *et al.* (PRETSCH, 2000). L'attribution de certains carbones a été réalisée grâce à des expériences HSQC et HMBC.

I- SERIE DES IMIDAZOLIDIN-2-ONES

1- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

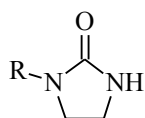
1.1- *N*-arylimidazolidin-2-ones

Tableau 1 : *N*-arylimidazolidin-2-ones **63** et **64** (DMSO-d_6)



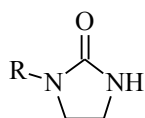
N°	R	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
63		158,9	44,6	36,5
64		158,5	44,2	36,3

Tableau 2 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **65-69**



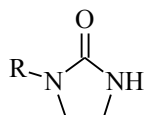
N°	R	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
65 (CDCl ₃)		159,6	45,1	37,3
66 (CDCl ₃)		159,4	45,1	37,3
67 (DMSO- <i>d</i> ₆)		160,2	46,3	37,7
68 (DMSO- <i>d</i> ₆)		158,4	44,6	36,7
69 (DMSO- <i>d</i> ₆)		158,7	44,4	36,5

Tableau 3 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **70-74**



N°	R	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
70 (DMSO-d ₆)		159,1	44,6	36,7
71 (DMSO-d ₆)		159,4	47,1	37,6
72 (DMSO-d ₆)		161,3	48,5	38,2
73 (DMSO-d ₆)		157,1	65,8	52,0
74 (CDCl ₃)		161,4	47,2	38,6

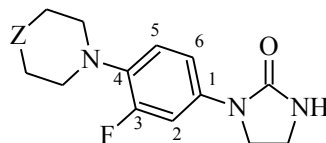
Tableau 4 : *N*-arylimidazolidin-2-ones (suite) **75** et **76** (DMSO- d_6)



N°	R	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
75		156,7	65,9	52,0
76		155,9	66,2	ND

1.2- *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones

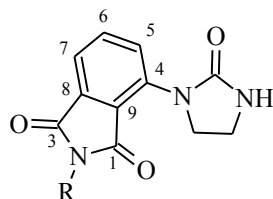
Tableau 5 : *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **77-80** (DMSO- d_6)



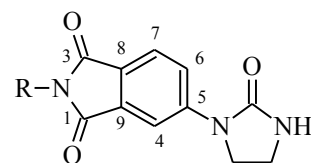
N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
77	23,9 → CH ₂	26,0	56,2	134,8	106,7	ND	140,8	119,8	114,7	156,3	66,2	52,2
78	S	53,5	27,5	134,9 d ³ J _{CF} = 9,5	105,5 d ² J _{CF} = 26,1	155,2 d ¹ J _{CF} = 242,3	136,7 d ² J _{CF} = 10,9	120,7 d ³ J _{CF} = 3,7	112,7 d ⁴ J _{CF} = 3,1	159,0	44,6	36,6
79	O	66,4	51,1	134,0 d ³ J _{CF} = 9,1	105,7 d ² J _{CF} = 26,1	155,0 d ¹ J _{CF} = 242,6	136,4 d ² J _{CF} = 11,0	119,3 d ³ J _{CF} = 4,3	112,7 d ⁴ J _{CF} = 2,7	159,0	64,3	ND
80	$\begin{array}{c} 103,5 \\ \downarrow \\ \text{O} \end{array}$ 61,2 →	32,3	34,0	131,5 d ³ J _{CF} = 9,5	103,0 d ² J _{CF} = 26,3	152,3 d ¹ J _{CF} = 242,0	133,6 d ² J _{CF} = 10,9	117,2 d ³ J _{CF} = 4,2	110,0 d ⁴ J _{CF} = 2,8	156,4	46,5	42,0

1.3- 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

Tableau 6 : 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **81-83** (DMSO- d_6)



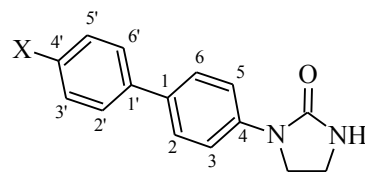
N°	CH ₂ N	CH ₂ NH	NCONH	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁ =O	C ₃ =O	R
81	46,9	37,7	159,0	137,4	131,1	134,9	119,3	131,4	121,1	164,9	165,9	
82	46,9	37,8	159,1	137,9	131,1	135,1	119,7	133,1	122,8	165,5	166,7	
83	46,8	37,7	159,0	137,7	130,7	135,0	119,4	133,1	122,7	166,2	167,4	

Tableau 7 : 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones **84** et **85** (DMSO- d_6)

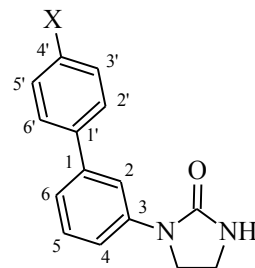
N°	CH ₂ N	CH ₂ NH	NCONH	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁ =O	C ₃ =O	R
84	44,9	36,8	158,7	111,0	146,7	121,0	124,5	121,7	131,6	166,7*	166,9*	
85	46,4	38,1	160,1	112,6	148,2	122,6	126,3	124,7	134,7	166,6*	166,8*	

1.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones

Tableau 8 : *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones **86-89** (DMSO-d₆)



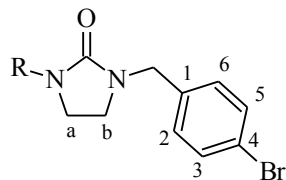
N°	X	C _{1'}	C _{2'} et C _{6'}	C _{3'} et C _{5'}	C _{4'}	C ₁	C ₂ et C ₆	C ₃ et C ₅	C ₄	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
86	H	140,0	126,3	129,0	127,0	133,2	126,9	117,4	140,4	159,1	44,6	36,7
87	Cl	139,0	127,9	128,9	131,6*	131,4*	126,9	117,4	140,7	159,1	44,6	36,7
88	F	136,3*	128,0 d ³ J _{CF} = 8,0	115,6 d ² J _{CF} = 21,2	161,4 d ¹ J _{CF} = 243,4	132,0*	126,6	117,2	140,1	158,9	44,4	36,5
89	^{55,1} H ₃ C-O	ND	127,1	114,2	ND	132,5	127,1	126,2	140,0	158,3	66,0	55,1

Tableau 9 : *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones **90-93** (DMSO- d_6)

N°	X	C _{1'}	C _{2'} et C _{6'}	C _{3'} et C _{5'}	C _{4'}	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C=O	CH ₂ N	CH ₂ NH
90	H	140,4*	126,7	128,8	127,3	140,5*	115,2	141,2	115,9	129,0	119,8	159,0	44,4	36,5
91	Cl	139,5	128,7	129,1	132,5	139,5	115,4	141,6	116,6	129,5	120,1	159,3	44,7	36,7
92	F	137,1 d ⁴ J _{CF} = 3,0	128,9 d ³ J _{CF} = 8,0	115,8 d ² J _{CF} = 21,2	162,0 d ¹ J _{CF} = 244,3	139,7	115,4	141,5	116,2	129,3	120,1	159,2	44,6	36,7
93	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}$ ^{55,3}	133,0	128,0	114,5	159,1*	140,4	115,0	151,4	115,6	129,2	119,7	159,2*	44,7	36,7

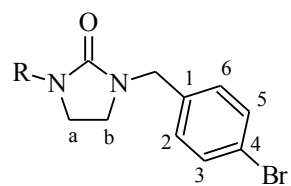
2- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Tableau 10 : *N*-aryl-*N'*-(4-bromo)benzylimidazolidin-2-ones **94**, **96** et **98** (DMSO-*d*₆)



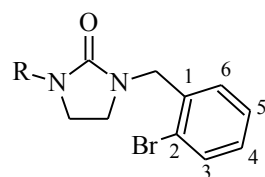
N°	R	C=O	CH _{2a}	CH _{2b}	CH ₂	C ₁	C ₂ et C ₆	C ₃ et C ₅	C ₄
94		156,9	41,9	40,7	46,4	136,5	130,0	131,4	120,4
96		158,7	44,1	42,2	46,8	137,0	130,2	131,6	120,6
98		156,1	41,7	40,5	46,3	135,9	130,0	131,5	120,5

Tableau 11 : *N*-aryl-*N'*-(4-bromo)benzylimidazolidin-2-ones (suite) **100** et **102** (DMSO-*d*₆)



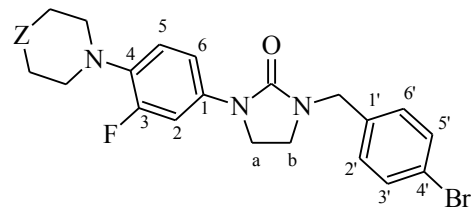
N°	R	C=O	CH _{2a}	CH _{2b}	CH ₂	C ₁	C ₂ et C ₆	C ₃ et C ₅	C ₄
100		152,6	47,6	44,9	64,5	136,7	130,1	131,3	120,3
102		160,5	68,3	52,4	51,3	137,7	130,3	130,9	120,0

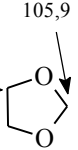
Tableau 12 : *N*-aryl-*N'*-(2-bromo)benzylimidazolidin-2-ones **95**, **97**, **99** et **101** (DMSO-*d*₆)



N°	R	C=O	CH _{2a}	CH _{2b}	CH ₂	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
95	152,3 d ¹J_{CF} = 241,1 119,2 d ²J_{CF} = 18,2 118,3 116,7 d ²J_{CF} = 21,5 116,8 d ³J_{CF} = 6,7 137,8 d ⁴J_{CF} = 2,6	156,8	42,0	41,3	47,5	135,8	122,7	132,7	129,4	128,0	129,3
97	121,0 q ²J_{CF} = 32,2 124,4 q ¹J_{CF} = 270,7 124,9 q ³J_{CF} = 4,0 124,6 q ³J_{CF} = 4,0 129,2 113,0 157,5 OCH₃ ← 56,3	158,7	44,2	42,8	47,8	136,4	122,9	132,9	129,5	128,2	129,4
99	116,5 135,9 116,6 145,6 134,9 115,1 103,3 NC	156,1	41,8	41,1	47,4	135,4	122,7	132,7	129,5	128,1	129,4
101	49,5 115,7 140,0 145,9 123,6 66,2 O	152,5	64,6	45,5	48,8	136,1	122,7	132,6	129,3	128,0	129,3

Tableau 13 : *N*-bromobenzyl-*N'*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones **103-106** (DMSO-*d*₆)

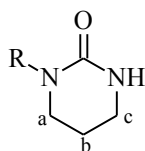


N°	Z	CH ₂ Z	CH ₂ N	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C=O	CH _{2a}	CH _{2b}	CH ₂	C _{1'}	C _{2'} et C _{6'}	C _{3'} et C _{5'}	C _{4'}
103	23,7 → CH ₂	25,7	51,8	135,3 d ³ J _{CF} = 9,0	105,4 d ² J _{CF} = 26,0	154,8 d ¹ J _{CF} = 242,0	135,5 d ² J _{CF} = 11,0	119,4 d ³ J _{CF} = 4,0	112,5 d ⁴ J _{CF} = 2,9	157,0	41,9	40,8	46,5	136,7	130,0	131,4	120,3
104	S	53,4	27,5	135,2 d ³ J _{CF} = 9,1	105,6 d ² J _{CF} = 26,6	155,2 d ¹ J _{CF} = 242,7	136,5 d ² J _{CF} = 10,9	120,8 d ³ J _{CF} = 3,7	112,8 d	157,2	42,1	41,0	46,7	136,9	130,2	131,6	120,6
105	O	66,2	50,8	134,0 d ³ J _{CF} = 8,8	105,5 d ² J _{CF} = 26,4	154,7 d ¹ J _{CF} = 243,0	136,0 d ² J _{CF} = 11,7	119,1 d ³ J _{CF} = 4,3	112,6 d ⁴ J _{CF} = 2,9	157,0	41,9	40,8	46,5	136,7	130,5	131,9	120,4
106	63,7 → 	34,7	48,9	134,3 d ³ J _{CF} = 9,5	105,4 d ² J _{CF} = 26,0	154,7 d ¹ J _{CF} = 242,0	135,8 d ² J _{CF} = 11,0	119,7 d ³ J _{CF} = 4,0	112,6	157,0	41,9	40,8	46,5	136,7	130,0	131,4	120,4

II- SERIE DES TETRAHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES

1- *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones

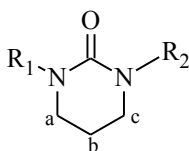
Tableau 14 : *N*-phényltétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **111–114** (DMSO-*d*₆)



N°	R	C=O	CH _{2a}	CH _{2c}	CH _{2b}
111		154,3	47,8	40,0	22,3
112		154,3	48,0	39,9	22,2
113		158,5	48,1	40,1	22,2
114		153,6	47,1	39,7	22,0

2- *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one

Tableau 15 : *N*-(4-bromobenzyl)-*N'*-(4-chloro-3-fluorophényl)tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one **115** (DMSO- d_6)



N°	R ₁	R ₂	C=O	CH _{2a}	CH _{2c}	CH _{2b}
115			154,3	48,5	45,6	22,2

ETUDE PHARMACOCHEMIQUE

A- INTRODUCTION

Nos travaux avaient pour objectif la détermination de molécules exerçant une activité immunosuppressive *in vitro* et *in vivo* tout en possédant un bon profil de toxicité avec pour perspectives thérapeutiques la prévention et/ou le traitement du rejet aigu d'allogreffe et, éventuellement, le traitement de certaines maladies auto-immunes invalidantes précédemment évoquées.

En accord avec ces objectifs, l'évaluation pharmacologique des produits synthétisés a été effectuée selon une stratégie en quatre temps.

- Des tests de criblage *in vitro* ont tout d'abord été réalisés :
 - Le premier consiste à procéder à l'étude *in vitro* de l'activité inhibitrice des molécules sur la prolifération de splénocytes de souris par la concanavaline A (SABOURIN, 2004).
 - Sur les molécules actives à l'issue de ce test, nous avons ensuite déterminé *in vitro* l'activité inhibitrice sur la prolifération de lymphocytes T humains au sein de PBMC ("peripheral blood mononuclear cells") purifiés à partir du sang périphérique de donneurs et stimulés par la phytohémagglutinine A, un mitogène non spécifique (STRONG, 1973).
- Les composés présentant une activité significative à l'issue des deux tests précédents, ont ensuite été évalués *in vivo* sur un modèle d'hypersensibilité retardée (DTH, "delayed type hypersensitivity") précédemment décrit par Dantal *et al.* (DANTAL, 1991).
- Enfin, pour les molécules les plus actives, une évaluation de la cytotoxicité *in vitro* a été réalisée sur des cellules fibroblastiques diploïdes humaines. Pour cela, nous avons eu recours au protocole décrit par Page *et al.* (PAGE, 1993) qui utilise l'Alamarblue, un fluorochrome modifié. Cette méthode présente l'avantage d'être sensible, rapide et compatible avec le screening *in vitro* de nombreuses molécules.

B- MATERIELS ET METHODES

I- MOLECULES TESTEES

Toutes les imidazolidin-2-ones testées ont été solubilisées dans le DMSO pour obtenir une solution mère à 50 mM, stockée à température ambiante, et diluées extemporanément dans du milieu RPMI (Sigma, Saint-Quentin Fallavier) pour les expériences *in vitro*. La concentration finale en DMSO n'a jamais dépassé 0,2%.

La cyclosporine A (CsA) (Tocris, Illkirch, France) a été dissoute dans de l'éthanol absolu contenant 2% de tween 80 et diluée dans du milieu RPMI pour les tests *in vitro*.

Le sel de sodium de la dexaméthasone (Soludécadron[®]) a été dilué dans de l'eau stérile.

Pour le test de DTH, les produits ont été dissous dans de l'huile d'olive.

II- TEST DE PROLIFERATION DE SPLENOCYTES MURINS A LA CONCAVALINE A

Ce modèle murin mis au point par Carbonnelle *et al.* (CARBONNELLE, 2007) est compatible avec la réalisation de tests de screening sur un grand nombre de molécules. Il permet de déterminer rapidement et à moindre coût le potentiel immunosuppresseur des composés évalués. Il est réalisé selon un protocole précédemment décrit (SABOURIN, 2004) dont les principales étapes sont détaillées ci-dessous.

- Préparation des splénocytes murins

Les tests ont été réalisés sur des souris femelles C57/BL6 (Janvier, Laval, France) âgées de 8 à 9 semaines. Les souris ont été exsanguinées et leur rate a été excisée de façon stérile et placée dans des boîtes de Pétri stériles contenant du milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma). Une suspension de rate a été réalisée dans du HBSS et traitée avec un tampon spécifique de lyse des globules rouges du sang contenant 0,02 M de Tris-HCl et 0,14 M de NH₄Cl. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du milieu RPMI et resuspendues en milieu RPMI (Sigma) complété avec 1% de L-glutamine (Gibco BRL,

Paisley), 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Sigma) et 50 μM de 2-mercaptoéthanol (Sigma).

Les cellules spléniques ont, par la suite, été semées à $1,5 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques de 96 puits à fond U (Falcon).

- Test de prolifération

Les cellules ont été incubées avec 1 $\mu\text{g/mL}$ de Concanavaline A (Con A) (Sigma), mitogène non spécifique activant les lymphocytes T, en présence des imidazolidin-2-ones (à la concentration de 30 μM ou 90 μM) ou de la CsA (5 μM). Elles ont ensuite été mises en culture à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 . Le volume final a été ajusté à 150 μL avec du milieu de culture dont la composition a été décrite précédemment.

- Evaluation de la prolifération

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée en sextuplicat après 72 heures de culture par la méthode au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Ce sel de tétrazolium, de couleur jaune, est réduit au sein des cellules vivantes par les déshydrogénases mitochondriales et forme des cristaux violacés de formazan absorbant la lumière polarisée à 570 nm.

Les cellules ont été incubées avec 12,5 $\mu\text{g/puits}$ de MTT pendant 4 heures à 37°C. Les sels de formazan formés ont ensuite été dissous par 100 μL d'un tampon de lyse (composé de SDS 30% (2 volumes) et de *N,N'*-diméthylformamide (1 volume) à pH 4,7) (ESPEVIK, 1986) laissé sur la nuit à température ambiante et dans l'obscurité.

Les absorbances ont été déterminées à 570 nm au moyen d'un lecteur de microplaques (Dynex Technologies, Guyancourt, France).

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la prolifération lymphocytaire selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (A_{\text{mol}} - A_{\text{T}}) / (A_{\text{PHA}} - A_{\text{T}})] \times 100$$

A_{mol} : absorbance des PBL traités avec la molécule testée

A_T : absorbance des PBL non stimulés (témoin)

A_{PHA} : absorbance des PBL traités par la PHA

III- TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE A LA PHYTOHEMAGGLUTININE A

Pour confirmer l'activité immunosuppressive observée sur le modèle murin précédemment décrit, un test de prolifération à la PHA des lymphocytes T de PBMC humains a été réalisé (STRONG, 1973).

La PHA est une lectine d'origine végétale classiquement utilisée pour tester la prolifération des lymphocytes T. Elle constitue un stimulus non spécifique de la prolifération des lymphocytes T faisant intervenir des molécules telles que CD2 ou CD3. La présence de CPA est indispensable à cette prolifération.

- Préparation des PBMC

Les PBMC ont été purifiés à partir du sang frais d'un donneur au moyen d'un gradient de Ficoll-Hypaque (Eurobio, Les Ulis) par centrifugation et resuspendus en milieu RPMI complété avec 1% de L-glutamine (Gibco BRL) et 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Sigma). Les PBMC ont par la suite été distribués 1.10^5 cellules/puits dans des plaques de 96 puits à fond U (Falcon).

- Test de prolifération

Les PBMC ont ensuite été mis en contact avec la PHA (Sigma) (0,3 $\mu\text{g/mL}$) et différentes doses des imidazolidinones à tester (6,25, 12,5, 25, 50 et 100 μM) ou de CsA (5 μM) puis mis en culture à 37°C sous atmosphère à 5% de CO_2 pendant 48 heures.

Les différentes conditions ont été réalisées en sextuplicat.

- Evaluation de la prolifération

Les cellules ont été chargées avec de la thymidine tritiée (1 $\mu\text{Ci/puits}$) sur les 8 dernières heures de l'expérience.

L'évaluation de la prolifération lymphocytaire a été réalisée grâce à l'analyse de l'incorporation de la thymidine tritiée mesurée au moyen d'un compteur Bêta (Wallac, PerkinElmer Life Sciences, Zaventem).

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la prolifération lymphocytaire selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (R_{\text{mol}} - R_{\text{T}}) / (R_{\text{PHA}} - R_{\text{T}})] \times 100$$

R_{mol} : émission bêta des PBL traités avec la molécule testée

R_{T} : émission bêta des PBL non stimulés (témoin)

R_{PHA} : émission bêta des PBL traités par la PHA

IV- MODELE D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE

Ce test consiste à déterminer l'effet des dérivés testés sur un modèle expérimental d'hypersensibilité retardée (ou DTH pour "delayed type hypersensitivity") précédemment décrit par Dantal *et al.* (DANTAL, 1991).

La DTH ou hypersensibilité de type IV est une réaction immunitaire pathologique exagérée, à médiation cellulaire, contre un antigène externe. Le mécanisme détaillé de ce phénomène a été décrit dans l'introduction. Elle est initiée par des lymphocytes T CD4^+ de type Th1.

Dans ce test, la DTH est induite par des hématies de mouton. L'hypersensibilité se caractérise alors par une induration et une tuméfaction au niveau du point d'injection de l'antigène. Au niveau cellulaire, on observe un infiltrat important de cellules mononucléées : macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T.

- Protocole

Le test est effectué sur des groupes de 5 souris femelles Balb/C (Janvier) âgées de 8 à 9 semaines.

L'immunisation primaire de ces souris a été réalisée à J = 0 par l'injection par voie intraveineuse (I.V.) de 5×10^6 hématies de mouton (Biomérieux, Marcy-l'Etoile) dans la veine caudale.

Les imidazolidinones ont été administrées par voie orale à différentes doses (25, 50 ou 80 mg/kg) partir de J = 0 et tous les jours jusqu'à J = 4.

La CsA (à 50mg/kg) et la dexaméthasone (à 0,5 mg/kg) ont été utilisées comme contrôles positifs.

L'immunisation secondaire a été réalisée à J = 4 par injection sous-cutanée de 3×10^8 à 4×10^8 hématies de mouton au niveau de la patte arrière droite. La patte arrière gauche a servi de contrôle négatif et a reçu une injection de PBS (Phosphate Buffer Solution) seul.

La taille des deux pattes arrières a été mesurée à J = 5, 24 heures après la stimulation à l'aide d'un calibre à vis micrométrique, modèle Oditest (Kroeplin, Germany). La réaction de DTH a été déterminée par la différence de taille entre la patte ayant reçu l'injection d'hématies de mouton et la taille de celle ayant reçu l'injection de PBS (contrôle).

- Expression des résultats

L'index d'inhibition de la DTH a été obtenue en réalisant le ratio entre la valeur moyenne obtenue chez un lot de souris traitées par rapport à celle obtenue chez un lot contrôle.

V- TEST DE CYTOTOXICITE SUR MRC5

Ce test *in vitro* de cytotoxicité sur des fibroblastes humains a été réalisé selon la méthode de Page *et al.* (PAGE, 1993) en suivant le protocole décrit ci-dessous.

- Protocole

Des cellules fibroblastiques humaines MRC5 sont mises en suspension à la concentration de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL dans du milieu RPMI 1640 contenant de la L-glutamine (Bio Whittaker) auquel a été ajouté 10 % de SVF (Sigma). Elles sont ensuite distribuées en plaque 96 puits fond U (25000 cellules/puits) et incubées à 37°C pendant 24 heures.

La molécule testée est alors ajoutée à différentes concentrations (1, 10 et 100 μ M) et la plaque est incubée à 37°C pendant 96 heures sous une atmosphère à 5% en CO₂.

A l'issue de cette période, l'UptiBlue™ (Interchim, Montluçon, France) est ajouté (10 μ L/puits) et la plaque est de nouveau incubée à 37°C pendant 4 heures.

L'UptiBlue™ contient de l'Alamar Blue, un indicateur d'oxydo-réduction, dont la forme oxydée, bleue et non fluorescente, est réduite à l'intérieur des cellules vivantes en expansion, en un produit rouge présentant une très forte fluorescence.

L'analyse de la cytotoxicité se fait en triplicat par l'analyse de la fluorescence au moyen d'un spectrofluorimètre (Dynetech, Fluorolite 1000) en utilisant un filtre d'excitation à 550 nm et un filtre d'émission à 590 nm.

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par la détermination de la CI₅₀.

VI- STATISTIQUES

Tous les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes accompagnées de l'erreur standard à la moyenne (e.s.m) excepté pour les tests de cytotoxicité sur MRC5 qui sont indiqués sous la forme de moyennes accompagnées de l'écart type ($\pm$ SD).

Pour les tests ConA, PHA et DTH, tous les résultats ont été comparés en utilisant l'analyse ANOVA suivi d'un test de Dunnett, réalisé uniquement lorsque le test ANOVA permet de déterminer une différence significative ($p < 0,05$) entre les différents groupes.

Les résultats des tests MRC5 ont été analysés avec un test t de Student. Les valeurs de CI₅₀ ont été déterminées par régression linéaire.

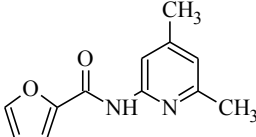
C- RESULTATS - DISCUSSION

I- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T : TESTS A LA CONA ET A LA PHA

Les résultats affichés dans les tableaux sont représentatifs de trois expériences réalisées de manière indépendante.

Les composés ont été considérés comme inactifs lorsqu'ils entraînaient un pourcentage d'inhibition de la prolifération lymphocytaire inférieur à 30%.

1- Références

	Test ConA % inhibition ($\pm$ esm)	Test PHA % inhibition ($\pm$ esm)
 Trancamide (JM34) (100 μ M) (ROBERT, 1995)	ND	80 $\pm$ 5,0
Cyclosporine A (CsA) (5 μ M)	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 1,0

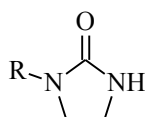
ND : non déterminé

Les résultats obtenus dans nos séries ont tous été comparés à ceux établis avec la cyclosporine A à la dose optimale de 5 μ M (100% d'inhibition de la prolifération lymphocytaire dans les deux tests). Le trancamide (ou JM34), antérieurement synthétisé au sein de notre laboratoire a servi de seconde molécule de référence. Il inhibe la prolifération lymphocytaire suite à une stimulation par la PHA à 80% à la dose de 100 μ M (dose d'inhibition maximale de la prolifération).

2- Imidazolidin-2-ones *N*-substituées

2.1- *N*-arylimidazolidin-2-ones

Dans la série des *N*-arylimidazolidin-2-ones, nous avons tout d'abord étudié l'activité immunosuppressive des *N*-phénylimidazolidin-2-ones. Nous avons ainsi examiné l'incidence sur l'activité de différents petits groupements substitués sur le noyau phényle.



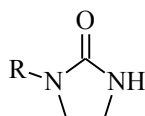
N°	R	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)	Test PHA % inhibition 100 μ M ($\pm$ esm)
63		47 $\pm$ 1,5	64 $\pm$ 1,0
64		inactif	ND
65		60 $\pm$ 1,8	ND
66		43 $\pm$ 1,9	ND
67		inactif	ND
68		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
69		91 $\pm$ 2,1	ND
70		inactif	ND

ND : non déterminé

L'analyse de ces résultats révèle que les molécules qui présentent une activité dans ces tests, possèdent toutes un halogène sur le noyau phényle (**63**, **65**, **66**, **68** et **69**). Ainsi, un atome de brome en position 4 s'avère particulièrement bénéfique sur l'activité (**65**, 60% d'inhibition dans le test à la ConA). L'introduction d'un chlore en position 3 peut s'avérer également très intéressante comme en témoignent les composés **63**, **66** et **68**. L'activité modeste de la molécule **66** dans le test à la ConA (43%) est presque inchangée lorsqu'un fluor est introduit en position 4 du cycle aromatique (**63**, 47%). Par contre, la substitution de ce fluor par un groupement cyano augmente considérablement l'activité immunosuppressive. Ainsi, la molécule **68** entraîne 100% d'inhibition de la prolifération lymphocytaire dans les tests à la ConA et à la PHA aux doses de 90 μ M et 100 μ M, respectivement. Ces pourcentages d'inhibition sont comparables à ceux obtenus avec la CsA à la dose optimale de 5 μ M. Ils sont également supérieurs de 20% à ceux du trancamide à la même dose (100 μ M) dans le test à la PHA.

En revanche, l'introduction d'un substituant méthylthio s'avère sans intérêt (**70**). Il en est de même pour le groupement trifluorométhyle qui ne semble pas favorable à l'activité comme en témoignent les imidazolidinones **64**, **67** et **70**. Néanmoins, si le groupement méthoxyle en position 2 de la molécule **67** est remplacé par un atome de chlore en position 4 (composé **69**), une activité élevée apparaît (91% d'inhibition dans le test à la ConA).

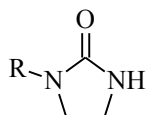
Dans un second temps, nous avons regardé l'influence sur l'activité de groupements plus volumineux sur le noyau phényle.



N°	R	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)
74		inactif
75		inactif
76		inactif

L'introduction d'un groupement morpholin-4-yle en position 2 ou 4 du noyau aromatique s'est avérée sans intérêt. Il en a été de même pour la substitution par un groupe phénoxy.

Nous avons enfin examiné si le remplacement du noyau phényle par divers hétérocycles azotés était favorable à l'activité immunosuppressive.

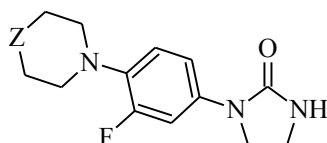


N°	R	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)
71		inactif
72		inactif
73		inactif

Les résultats exposés dans le tableau ci-dessus montrent qu'aucun des substituants hétérocycliques utilisés (1,3-diméthyl(1*H*)pyrazol-5-yle, quinoléin-8-yle et 1*H*-indol-5-yle) ne s'est avéré intéressant.

2.2- *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-ones

En série *N*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-one, seule la molécule **77**, substituée par un groupe pipéridinyle en position 4 du noyau aromatique, s'est avérée active en inhibant à 100% la prolifération lymphocytaire dans les deux tests (activité comparable à celle de la CsA). L'introduction d'un hétéroatome tel que le soufre (**78**) ou l'oxygène (**79**) ou d'une fonction acétal cyclique (**80**), sur le cycle pipéridinique, est à l'origine d'une suppression complète de l'activité.



N°	Z	Test ConA % inhibition 90 µM (± esm)	Test PHA % inhibition 100 µM (± esm)
77	CH ₂	100 ± 0,0	100 ± 0,01
78	S	inactif	ND
79	O	inactif	ND
80		inactif	ND

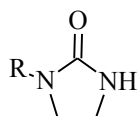
ND : non déterminé

2.3- 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones et 5-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones

En série phtalimidique, aucune des molécules testées ne s'est révélée active. La fixation d'un motif phtalimidique sur un des deux azotes de l'imidazolidinone ne semble donc jouer aucun rôle dans l'émergence d'un effet immunosuppresseur quelque soit le substituant présent sur l'azote phtalimidique et quelque soit la position de l'imidazolidinone au niveau du noyau phtalimidique. La molécule **81** est actuellement en cours d'évaluation.

A ce stade, il semble apparaître que la présence d'un noyau phényle sur l'azote de l'imidazolidinone est nécessaire à l'induction d'une activité immunosuppressive en série *N*-arylimidazolidinone. En effet, pour les composés dans lesquels ce groupement a été remplacé par

un hétérocycle azoté ou par un motif phthalimidique, aucune activité immunosuppressive n'a été observée.



N°	R	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)
81		ND
84		inactif
82		inactif
85		ND
83		inactif

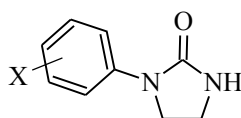
ND : non déterminé

2.4- *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-ones et *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-ones

Dans la série des *N*-(1,1'-biphényl)imidazolidin-2-ones, toutes les molécules synthétisées se sont révélées actives à l'exception du composé **86**.

Le composé **92** est actuellement en cours d'évaluation.

Les très bons résultats obtenus dans cette série viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle un groupement phényle directement lié sur l'azote de l'imidazolidinone est nécessaire à l'induction d'une activité immunosuppressive en série *N*-arylimidazolidinone. De plus, la substitution de ce groupement par un autre phényle diversement substitué par un halogène ou un groupe méthoxyle s'est révélée particulièrement intéressante.



N°	X	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)
86	4-phényle	inactif
90	3-phényle	56 $\pm$ 1,5
87	4-(4'-chlorophényle)	47 $\pm$ 1,0
91	3-(4'-chlorophényle)	59 $\pm$ 1,2
88	4-(4'-fluorophényle)	49 $\pm$ 1,8
92	3-(4'-fluorophényle)	ND
89	4-(4'-méthoxyphényle)	90 $\pm$ 1,0
93	3-(4'-méthoxyphényle)	41 $\pm$ 2,0

ND : non déterminé

En série *N*-(1,1'-biphényl-4-yl)imidazolidin-2-one, la présence d'un substituant en 4' sur le groupement biphenyle est nécessaire à l'induction d'une activité. En effet, les molécules **87**, **88** et **89** sont toutes actives alors que leur analogue non substitué, **86**, est inactif. Si la substitution par un chlore (**87**) ou un fluor (**88**) génère une activité relativement modeste (respectivement, 47 et 49% d'inhibition dans le test à la ConA), l'ajout d'un substituant méthoxyle s'avère particulièrement efficace. En témoigne la molécule **89** qui inhibe à 90% la prolifération lymphocytaire à la ConA.

En série *N*-(1,1'-biphényl-3-yl)imidazolidin-2-one, les résultats sont inversés. En effet, la molécule **90** non substituée présente une activité assez élevée avec un pourcentage d'inhibition de 56% dans le test à la ConA. La substitution par un chlore (**91**) en 4' influe peu sur l'activité (59% d'inhibition) et celle par un groupement méthoxyle (**93**) s'avère défavorable par rapport à la molécule non substituée (41% d'inhibition).

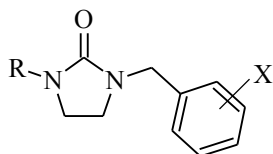
Le positionnement du groupement biphenyle en 3 ou en 4 influe également sur l'activité des composés sans qu'une règle commune à tous les produits puisse être établie. En effet, dans certains cas, la position 3 peut s'avérer préférable par rapport à la position 4. C'est le cas pour les molécules **90** (56%) et **91** (59%) dont les analogues en position 4 sont

respectivement inactif (**86**) et moins efficace (**87**, 47%). En ce qui concerne les composés **89** et **93**, l'effet inverse est observé. En effet, la molécule **89** (90%) est beaucoup plus active que son analogue en position 3 (**93**, 41%).

Les molécules les plus actives dans cette série sont en cours d'évaluation dans le test à la PHA pour confirmer leur effet immunosuppresseur.

3- Imidazolidin-2-ones *N,N'*-disubstituées

Nous avons terminé l'étude sur les imidazolidin-2-ones en examinant l'incidence sur l'activité des *N*-arylimidazolidin-2-ones de l'introduction d'un groupement bromobenzyle sur le 2^{ème} azote du cycle.



N°	R	X	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)	Test PHA % inhibition 100 μ M ($\pm$ esm)
94		4-Br	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
95		2-Br	inactif	ND
96		4-Br	100 $\pm$ 0,0	97 $\pm$ 1,0
97		2-Br	100 $\pm$ 0,0	78 $\pm$ 2,1
98		4-Br	67 $\pm$ 2,0	85 $\pm$ 1,2
99		2-Br	inactif	ND
100		4-Br	inactif	ND
101		2-Br	inactif	ND
102		4-Br	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0

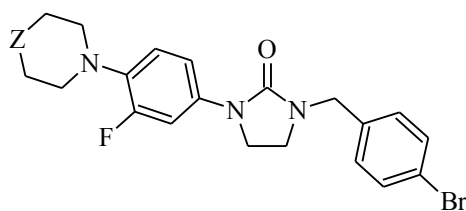
ND : non déterminé

En série *N*-aryl-*N'*-bromobenzylimidazolidin-2-one, dans presque tous les cas la substitution en *N'* a été favorable en induisant ou en améliorant l'activité. Ainsi, les diverses substitutions sur le composé **67** inactif ont généré les molécules **96** et **97** très actives entraînant un pourcentage d'inhibition de 100% dans le test à la ConA et de 97 et 78% respectivement dans le test à la PHA. Le composé **97** présente une activité similaire à celle de la CsA et supérieure à celle du trancamide dans le test à la PHA (80%). De même, le composé **76**, inactif, donne par substitution par un groupement 4-bromobenzyle le dérivé **102** qui inhibe à 100% la prolifération lymphocytaire dans les deux tests réalisés (activité semblable à celle de la CsA). Enfin, la molécule **63** qui entraîne 47% d'inhibition dans le test à la conA et 64% dans celui à la PHA voit son activité augmenter dans les deux tests avec l'introduction d'un substituant 4-bromobenzyle sur l'azote *N'*. Le composé **94** ainsi obtenu présente une activité similaire à celle de la CsA avec des pourcentages d'inhibition dans les deux tests de 100%.

Deux cas nuancent légèrement cette règle. En effet, l'imidazolidinone **68** qui entraînent 100% d'inhibition de la prolifération dans les deux tests, donne par *N'*-substitution par un groupement 4-bromobenzyle, la molécule **98**, moins active (67% d'inhibition dans le test à la conA et 85% dans celui à la PHA). De plus, les diverses substitutions sur le composé **75** inactif ont généré les produits **100** et **101** tous les deux inactifs.

Enfin, il semble que le groupement 4-bromobenzyle soit plus favorable à l'activité que le substituant 2-bromobenzyle. Ainsi, lorsqu'un groupement 4-bromobenzyle est ajouté à la molécule **63** modestement active (47% d'inhibition dans le test à la ConA), un effet positif est observé (**94**, 100% d'inhibition dans le test à la ConA) alors que la substitution par un motif 2-bromobenzyle supprime totalement l'activité (**95**, inactif). De même, la fixation d'un substituant 2-bromobenzyle sur le composé **68** (100% d'inhibition dans les deux tests) donne le dérivé **99** inactif alors que l'ajout du motif 4-bromobenzyle n'entraîne qu'une légère baisse d'activité (**98**). Enfin, les pharmacomodulations sur la molécule **67** inactive montrent que le groupement 4-bromobenzyle est plus intéressant (**96**, 97% d'inhibition dans le test à la PHA) que le substituant 2-bromobenzyle (**97**, 78% d'inhibition dans le test à la PHA).

Les pharmacomodulations suivantes ont donc été réalisées préférentiellement avec le groupement 4-bromobenzyle.



N°	Z	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)
103	CH ₂	inactif
104	S	inactif
105	O	100 $\pm$ 0,0
106		inactif

En série *N*-bromobenzyl-*N'*-(3-fluorophényl)imidazolidin-2-one, la substitution par un motif 4-bromobenzyle a été dans un cas bénéfique et a permis l'obtention de la molécule **105**, très active (100% d'inhibition dans le test à la ConA) à partir du composé **79** inactif. Par contre, elle a engendré une suppression totale de l'activité de l'imidazolidinone **77** qui présente des pourcentages d'inhibition de 100% dans les deux tests (**103**, inactif).

Le composé **102** est actuellement en cours d'évaluation dans le test à la PHA.

4- Tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones

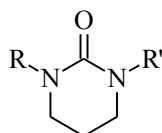
Nous avons ensuite regardé si l'ajout d'un maillon CH₂ supplémentaire au niveau du cycle imidazolidin-2-one avait une incidence sur l'activité immunosuppressive de ces composés. Pour cela, nous avons comparé les activités d'imidazolidinones précédemment synthétisées avec celles de leur analogue en série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one.

Les résultats semblent démontrer que l'ajout d'un maillon CH₂ supplémentaire au cycle imidazolidin-2-one n'est pas favorable à l'activité immunosuppressive.

En effet, toutes les molécules de la série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one se sont avérées inactives.

L'ajout d'un maillon CH₂ sur le cycle imidazolidin-2-one de la molécule **67** inactive s'est révélé inefficace (**113**, inactif).

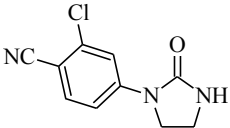
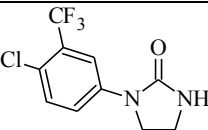
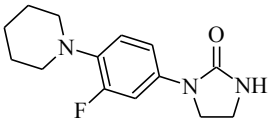
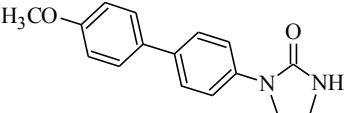
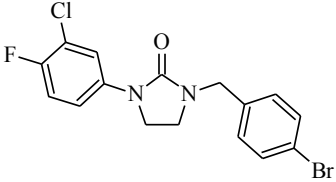
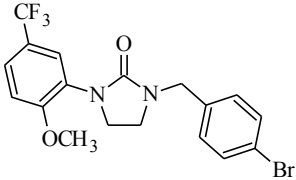
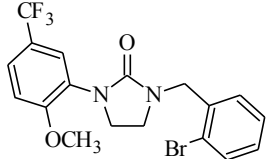
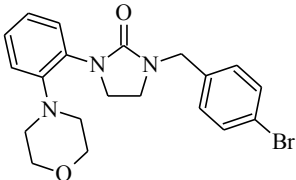
De plus, pour les molécules actives en série imidazolidin-2-one, le passage à une structure tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one s'est soldé, dans tous les cas, par une perte complète de l'activité. Ainsi, les imidazolidin-2-ones **63**, **68** et **94** présentent une activité immunosuppressive (respectivement, 47, 100 et 100% d'inhibition dans le test à la ConA) alors que leurs analogues respectifs, **112**, **114** et **115**, en série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one sont inactifs.



N°	R	R'	Test ConA % inhibition 90 μM (± esm)
111		H	inactif
112		H	inactif
113		H	inactif
114		H	inactif
115		4-bromobenzyle	inactif

5- Bilan

Parmi les 49 molécules testées, 16 ont manifesté une activité immunosuppressive significative à l'issue des tests de screening *in vitro*.

N°	R	Test ConA % inhibition 90 μ M ($\pm$ esm)	Test PHA % inhibition 100 μ M ($\pm$ esm)
68		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
69		91 $\pm$ 2,1	ND
77		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,01
89		90 $\pm$ 1,0	ND
94		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
96		100 $\pm$ 0,0	97 $\pm$ 1,0
97		100 $\pm$ 0,0	78 $\pm$ 2,1
102		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
Trancamide (JM34) à 100 μ M		ND	80 $\pm$ 5,0
Cyclosporine A (CsA) à 5 μ M		100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 1,0

ND : non déterminé

Huit composés (**68**, **69**, **77**, **89**, **94**, **96**, **97** et **102**) entraînent entre 90 et 100% d'inhibition de la prolifération lymphocytaire après stimulation par la concanavaline A. Parmi ceux-ci, 6 possèdent une activité supérieure ou égale à celle du trancamide dans le test à la PHA avec des résultats comparables à ceux obtenus avec la CsA (à la dose optimale de 5 μ M), pour 5 d'entre eux (**68**, **77**, **94**, **96** et **102**), dans les deux tests.

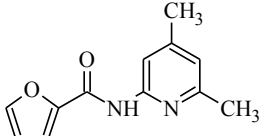
Les dérivés **69** et **89** sont actuellement en cours d'évaluation pour confirmer leur activité immunosuppressive sur la prolifération de lymphocytes T humains stimulés par de la phytohémagglutinine A.

Sur les 5 molécules les plus actives (**68**, **77**, **94**, **96** et **102**), les tests de screening précédents ont été réalisés, selon le même protocole, en utilisant de larges gammes de concentrations afin de déterminer une dose-dépendance de l'activité observée (données non présentées). Ces études ont permis de déterminer que seuls les composés **68** et **102** exerçaient une activité antiproliférative dose-dépendante à l'égard de lymphocytes T stimulés par un mitogène. Les molécules **77**, **94** et **96**, bien que très actives aux doses de 90 μ M dans le test à la ConA et de 100 μ M dans celui à la PHA, ne semblent pas présenter un effet dose-dépendant. De plus, les imidazolidinones **94** et **96** se sont caractérisées par des problèmes de solubilité dans le milieu RPMI.

Pour les raisons qui viennent d'être citées, nous avons donc choisi de focaliser notre attention sur les molécules **68** et **102** pour la réalisation d'études plus approfondies.

II- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA REACTION DE DTH

Les tests précédents ont montré que les composés **68** et **102**, présentaient une activité immunosuppressive *in vitro* très intéressante à l'égard de lymphocytes T murins et humains stimulés par un mitogène. Nous avons donc voulu déterminer leur effet *in vivo* sur un modèle murin de réaction d'hypersensibilité retardée (DTH).

	% inhibition de la DTH ($\pm$ esm)
 TRANCAMIDE (JM34) 150 mg/kg	53,5 $\pm$ 1
Dexaméthasone 0,5 mg/kg	49,5 $\pm$ 0
CsA 50 mg/kg	73,9 $\pm$ 1
68 50 mg/kg	66,8 $\pm$ 1
102 50 mg/kg	69,2 $\pm$ 0

Les résultats obtenus démontrent que les deux composés inhibent de manière significative la réaction de DTH et de manière dose-dépendante (données non présentées). De plus, à la dose de 50 mg/kg, le pourcentage d'inhibition observé avec ces deux molécules (66,8% avec le composé **68** et 69,2% avec le **102**) est comparable à celui obtenu avec la CsA à la même dose (73,9%). Leur activité est par ailleurs supérieure à celle de la dexaméthasone à la dose optimale de 0,5 mg/kg (49,5%) et du trancamide (53,5%) à une dose trois fois supérieure.

Ces données confirment donc bien l'effet immunosuppresseur des imidazolidinones **68** et **102** *in vivo*.

III- MESURE DE LA CYTOTOXICITE SUR DES FIBROBLASTES HUMAINS (MRC5)

Nous avons enfin évalué *in vitro* la toxicité des imidazolidinones **68** et **102** à l'égard de fibroblastes humains de type MRC5. Ce test nous permet de présumer de la cytotoxicité de ces molécules sur des types cellulaires différents des lymphocytes T et donc du caractère spécifique de leur action.

N°	Toxicité sur MRC5 : CI ₅₀ (μM) ± SD
68	> 500
102	21 ± 4

Les résultats obtenus montrent que le composé **102** présente une cytotoxicité importante à l'égard des cellules MRC5 avec une concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de 21 ± 4 μM. Elle est donc cytotoxique vis à vis de fibroblastes humains aux doses pour lesquelles elle exerce une activité immunosuppressive dans les tests de screening (entre 12,5 et 100 μM). Ces données semblent refléter un effet cytotoxique non spécifique de cette molécule.

Par contre l'imidazolidinone **68**, avec une CI₅₀ supérieure à 500 μM, ne paraît exercer aucune toxicité à l'égard des cellules MRC5 aux doses auxquelles elle s'avère significativement active dans les tests de screening (entre 20 et 100 μM). Ces données semblent démontrer une action spécifique du composé **68** sur les lymphocytes T avec une marge thérapeutique confortable.

D- CONCLUSION - PERSPECTIVES

Ces travaux nous ont permis d'identifier 16 molécules présentant une activité immunosuppressive significative selon les premiers tests *in vitro* de screening réalisés.

Parmi ces composés, 8 molécules (**68**, **69**, **77**, **89**, **94**, **96**, **97** et **102**) se sont avérées particulièrement intéressantes avec des pourcentages d'inhibition de la prolifération de splénocytes murins compris entre 90 et 100%. 6 de ces composés possèdent une activité supérieure ou égale à celle du trancamide (dans le test à la PHA) avec des résultats comparables à ceux de la cyclosporine A, pour 5 d'entre eux (**68**, **77**, **94**, **96** et **102**), dans les deux tests.

L'étude des relations structure-activité a démontré le rôle primordial du motif imidazolidin-2-one dans l'induction d'une activité immunosuppressive. En effet, l'élongation du cycle entraîne la suppression complète de l'activité, observée en série tétrahydropyrimidin-2(1*H*)-one.

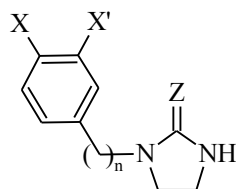
Il faut également souligner que toutes les molécules actives sont substituées par un groupement phényle sur un des deux azotes de l'imidazolidinone. Le remplacement de ce cycle par un hétérocycle azoté ou un motif phthalimidique entraîne, dans tous les cas, une perte de l'activité. De plus, les travaux de pharmacomodulation réalisés ont mis en évidence l'intérêt de la substitution en position 3 et/ou 4 du groupement phényle par un halogène, un groupement cyano ou trifluorométhyle ou un autre phényle diversement substitué.

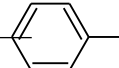
Enfin, l'introduction sur l'azote libre des *N*-arylimidazolidinones d'un enchaînement de type 4-bromobenzyle s'est révélée très souvent bénéfique.

L'analyse de ces données nous a donc permis de déterminer un nouveau modèle d'étude afin d'accéder à d'autres molécules actives. Les pharmacomodulations envisagées sont les suivantes :

- L'introduction d'un ou plusieurs maillons CH₂ entre le groupement phényle et l'azote de l'urée cyclique ;
- La réalisation de différentes modulations au niveau du groupement phényle faisant intervenir une variété de combinaisons de substituants halogénés ou phénylés ;

- Le remplacement du groupement carbonyle du cycle imidazolidin-2-one par un thiocarbonyle.



X et X' = halogène, cyano, trifluorométhyle ou 
avec Y = halogène ou méthoxyle

Z = O ou S

n = 0, 1 ou 2

Ces études nous ont également permis d'identifier une molécule chef de file, l'imidazolidinone **68**, qui inhibe, de façon dose-dépendante, la prolifération de lymphocytes T murins et humains stimulés par différents mitogènes *in vitro*, avec des résultats, à la dose de 90 μ M (test à la ConA) ou de 100 μ M (test à la PHA), comparables à ceux obtenus avec la CsA à la dose de 5 μ M. Cette molécule a également confirmé son activité *in vivo* sur un modèle murin de DTH en entraînant une inhibition de la réponse, principalement due à la prolifération des cellules Th1, similaire à celle observée avec la CsA à la même dose (50 mg/kg). De plus, durant les 5 jours d'administration du dérivé **68** aux souris, nous n'avons observé aucun effet secondaire aigu (comme la perte de poids ou la mort des souris). Enfin, ce composé ne présente pas de cytotoxicité à l'égard des fibroblastes humains MRC5 aux doses auxquelles il est actif. Ces données, associées aux précédentes, augurent d'une bonne tolérance de la molécule. D'autre part, la CI_{50} supérieure à 500 μ M observée dans le test de cytotoxicité est en faveur d'une large marge thérapeutique de cette imidazolidinone. Pour finir, cette molécule n'a engendré aucun problème de solubilité dans le DMSO ou le milieu de culture RPMI et l'activité très importante observée *in vivo* après administration par voie orale démontre son efficacité *per os*. Tous ces résultats font du composé **68**, une molécule particulièrement attractive dans le but de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques pour la prévention et le traitement du rejet d'allogreffe ou de maladies auto-immunes.

Dans cette optique, nous avons décidé, dans un second temps, de poursuivre les études pharmacologiques sur cette imidazolidinone afin de déterminer plus précisément son mécanisme d'action. L'objectif de ces travaux, qui seront détaillés dans la deuxième partie de cet ouvrage, est de déterminer une ou plusieurs cible(s) responsable(s) de l'activité immunosuppressive de ce composé. Un tel résultat nous permettrait alors d'envisager des études de modélisation moléculaire afin de mieux orienter nos pharmacomodulations dans le but d'optimiser l'activité de ces molécules.

DEUXIEME PARTIE

ETUDES PHARMACOLOGIQUES SUR L'IMIDAZOLIDIN-2-ONE 68

A- INTRODUCTION

Les études de screening nous ont permis d'identifier le composé **68** comme molécule immunomodulatrice chef de file. Cette imidazolidinone est en effet particulièrement active *in vitro* dans l'inhibition de lymphocytes T murins et humains activés par différents mitogènes. Elle exerce également une activité *in vivo* en inhibant de manière significative la réaction de DTH induite expérimentalement chez la souris, qui est une réponse principalement due à la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 (CHER, 1987). Enfin les premières données semblent démontrer une bonne tolérance de ce composé.

Le premier objectif des études pharmacologiques sur la molécule **68** a été de s'assurer que l'activité immunosuppressive observée était spécifique et non le résultat d'un effet toxique de ce composé sur les lymphocytes T.

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer l'activité inhibitrice de l'imidazolidinone **68** sur la prolifération de lymphocytes Th CD4⁺ humains et regarder si cet effet était bien spécifique de la stimulation TCR.

L'étape suivante a consisté à déterminer si l'effet observé était dû à une action tardive du composé sur la prolifération lymphocytaire ou à une action plus précoce, au moment de l'activation. En effet, dans l'objectif d'identifier de nouvelles molécules immunosuppressives, il s'avère plus intéressant d'inhiber la réaction lymphocytaire de manière très précoce au moment de son initiation.

Une fois ces travaux préliminaires réalisés nous avons essayé de définir plus précisément le mécanisme d'action de l'imidazolidinone **68** en regardant, dans un premier temps, si elle exerçait une action inhibitrice sur la production, par des lymphocytes T activés de manière TCR-dépendante, de différentes cytokines de type Th1.

Enfin, nous avons conclu ces travaux par l'étude approfondie de différentes voies de transduction médiées par le TCR afin de tenter de déterminer une ou plusieurs cible(s) moléculaires(s) responsables de l'activité immunosuppressive du composé **68**.

B- DESCRIPTION DU MODELE D'ETUDE UTILISE

Les études pharmacologiques sur l'imidazolidinone **68** ont été en grande partie effectuées en utilisant un modèle biologique particulier : les lymphocytes T Vgamma 9 Vdelta 2 activés par des phosphoantigènes de manière TCR dépendante.

I- GENERALITES SUR LES LYMPHOCYTES T V GAMMA 9 V DELTA 2 ($V\gamma 9V\delta 2$)

Pour mieux comprendre l'intérêt de l'utilisation de ce modèle pour nos travaux, il est nécessaire de faire un bref rappel sur les principales caractéristiques de ces cellules ainsi que sur leurs modalités d'activation.

Les lymphocytes T V gamma 9 V delta 2 ($V\gamma 9V\delta 2$) sont des lymphocytes T $\gamma\delta$ exprimant un TCR composé d'une chaîne γ codée par le gène $V\gamma 9$, quasiment systématiquement, associée à une chaîne δ codée par le gène $V\delta 2$. Ils constituent une sous-population de lymphocytes T bien représentés dans le sang périphérique (5 à 10% des lymphocytes T et plus de 90% des lymphocytes T $\gamma\delta$).

Ce sont des cellules effectrices (a-FISCH, 1990) impliquées dans la réponse immunitaire à de nombreux pathogènes intracellulaires (MORITA, 2000 - BARNES, 1992 - SCALISE, 1992) ainsi que dans la défense antivirale (POCCIA, 2005) et antitumorale (KOBAYASHI, 2001 - ZHAO, 1995). Ils interviennent, en effet, dans différents types de cancers comme le myélome multiple (GIRLANDA, 2005), le cancer du côlon (CORVAISIER, 2005), le carcinome rénal (VIEY, 2005) et le cancer de la vessie (ALEXANDROFF, 1997).

Ces lymphocytes reconnaissent des antigènes phosphorylés non peptidiques de faible masse moléculaire nommés phosphoantigènes (CONSTANT, 1994). Ces molécules sont des métabolites intermédiaires des voies de biosynthèse des isoprénoides (Figure 2). Les agonistes les plus puissants sont issus de la voie du 1-désoxy-D-xylose-5-phosphate (DOXP) qui est utilisée par divers microorganismes (JOMAA, 1999 - BEGLEY, 2004) et par les cellules végétales. Un de ces métabolites, le 4-hydroxydiméthylallylpyrophosphate (ou HDMAPP) active les $V\gamma 9V\delta 2$ à des concentrations de l'ordre de 0,1 nM (JOMAA, 1999). La bioactivité des métabolites issus de la voie des mévalonates, utilisée par les cellules des mammifères et de certaines bactéries, comme l'isopenténylpyrophosphate (ou IPP) est environ 10000 fois plus faible (TANAKA, 1995). La très forte bioactivité spécifique aux phosphoantigènes

microbiens permettrait aux Vγ9Vδ2 de détecter les cellules infectées même par une seule bactérie utilisant la voie du DOXP, comme les mycobactéries (DEVILDER, 2006). La discrimination des Vγ9Vδ2 entre une cellule saine et une cellule cancéreuse s'explique par une très forte surexpression d'IPP au sein des cellules tumorales (GOBER, 2003) qui est responsable de l'activation des Vγ9Vδ2.

Deux autres classes de composés sont capables d'activer les Vγ9Vδ2 : les aminobisphosphonates et les alkylamines. Ils agissent en inhibant la voie des mévalonates en aval de la synthèse d'IPP entraînant ainsi une accumulation intracellulaire de ce phosphoantigène (GOBER, 2003 - BERGSTROM, 2000 - KUNZMANN, 1999 - THOMPSON, 2006) (figure 1).

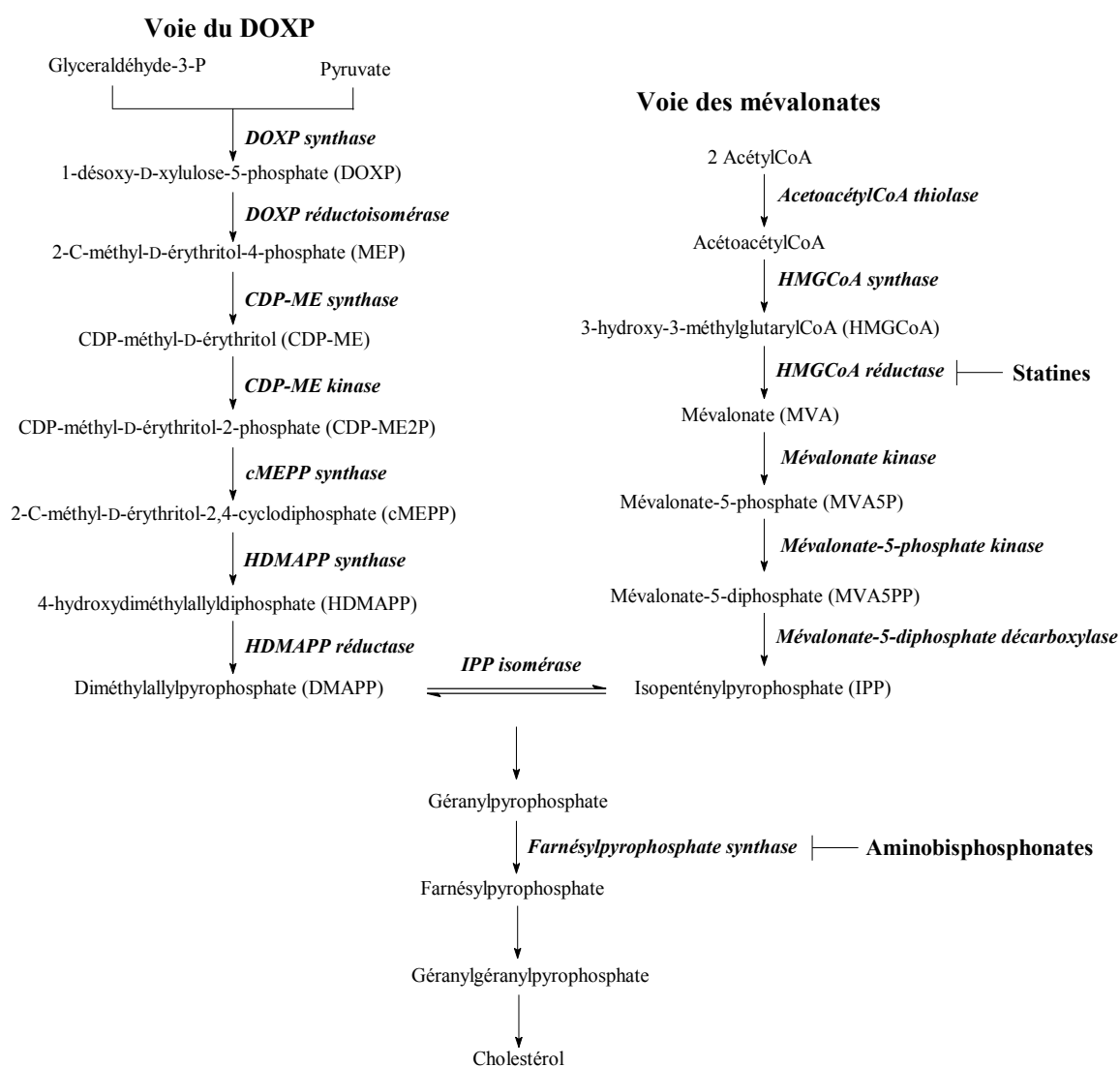


Figure 1 : Biosynthèse des isoprénoïdes par la voie des mévalonates et celle du DOXP (d'après POUPOT, 2004).

Il semble donc que, dans tous les cas, les cellules T V γ 9V δ 2 soient activées par des pyrophosphomonoesters intermédiaires de la voie de biosynthèse des isoprenoïdes.

Espinosa *et al.* ont également élaboré un phosphomonoester synthétique, le BrHPP (ou bromohydrine pyrophosphate) (ESPINOSA, 2001). C'est un agoniste puissant des V γ 9V δ 2 possédant une CE₅₀ de 10 nM.

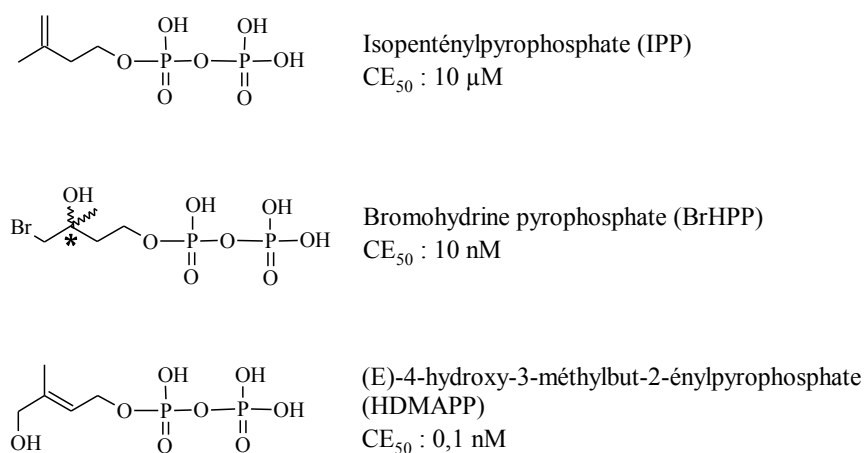


Figure 2 : Structure de phosphoantigènes naturels (IPP et HDMAPP) et synthétiques (BrHPP)

Les modalités de la reconnaissance des phosphoantigènes par les V γ 9V δ 2 ne sont pas encore bien comprises. Les études réalisées sur ce sujet ont permis de montrer que cette reconnaissance se fait *via* leur TCR (BUKOWSKI, 1995), de manière CMH-indépendante (LANG, 1995 - b-FISCH, 1990 - HOLOSHITZ, 1993), contrairement à ce qui est observé chez les lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$. Un contact cellulaire est également nécessaire à cette reconnaissance (MORITA, 1995). A l'heure actuelle, aucune molécule présentatrice ou "porteuse" n'a pu être mise en évidence.

Après activation antigénique, ces lymphocytes T sécrètent rapidement de fortes quantités de cytokines le plus souvent de type Th1 (MORITA, 1991) comme l'IFN- γ (BATTISTINI, 1997 - GOODIER, 1995) et le TNF- α (BATTISTINI, 1997 - LANG, 1995 - BOULLIER, 1999), sont capables de proliférer en présence d'IL-2 et peuvent lyser leur cible cellulaire (cellule tumorale de carcinome rénal, par exemple).

Le TCR $\gamma\delta$, comme le TCR $\alpha\beta$, ne possède pas d'activité kinasique intrinsèque et s'associe donc au complexe CD3 comportant des motifs ITAM ("immunoreceptor tyrosine-

based activatory motif) nécessaires à l'induction de la transduction du signal (WEISS, 1994 - WEISS, 1991). Peu d'études ont été réalisées sur la transduction du signal par le TCR $\gamma\delta$, mais, de par son association avec le CD3, il est fort probable que la cascade de transduction induite suite à une activation est assez similaire à celle observée dans les lymphocytes T conventionnels (KANE, 2000 - ACUTO, 2000). Lafont *et al.* ont étudié le signal induit suite à l'activation par l'IPP de lymphocytes T V γ 9V δ 2 purifiés et l'ont comparé à celui obtenu avec un anticorps anti-CD3 (LAFONT, 2001). Ils ont ainsi montré que, suite à une stimulation par l'IPP, la p56^{lck} (signal précoce) était rapidement activée par phosphorylation comme ce qui est observé chez les lymphocytes T $\alpha\beta$. Par contre, des signaux plus tardifs, comme l'activation de ZAP70 (Zeta-Associated Protein-70), de la PI3-kinase (Phosphoinositide 3-kinase) ou encore de la voie des MAP-kinases sont retardés et beaucoup plus prolongés dans le temps par rapport à la réponse observée avec un anti-CD3 ou à celle obtenue avec des lymphocytes T $\alpha\beta$ stimulés par des peptides. Les cinétiques de phosphorylation des protéines tyrosine kinases impliquées dans les voies de transduction du signal médié par le TCR $\gamma\delta$ ne sont donc pas les mêmes lorsque les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont activés par un phosphoantigène ou par un anti-CD3 (LAFONT, 2001 - THEDREZ, 2007).

Des études approfondies sont donc nécessaires pour essayer de mieux comprendre les modalités d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes.

II- AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE CE MODELE

Nous avons choisi ce modèle cellulaire car il nous a permis d'étudier de manière fine l'effet immunomodulateur du composé **68** dans un système d'activation TCR-dépendant.

En effet, comme nous l'avons décrit ci-dessus, l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par des phosphoantigènes se fait de manière TCR-dépendante. Elle ne nécessite pas la présence de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) car il suffit de mettre les V γ 9V δ 2 en contact les uns avec les autres en présence de phosphoantigènes (autoprésentation) pour déclencher une activation de ces cellules.

Ce modèle permet donc de s'affranchir de l'utilisation de CPA tout en ayant une stimulation du TCR beaucoup plus physiologique que lorsque l'on utilise un anticorps anti-CD3. Ceci s'avère particulièrement intéressant pour la réalisation d'expériences de Western Blot que l'utilisation de CPA rendrait beaucoup plus complexe.

De plus, ce sont des lymphocytes T humains disponibles, au laboratoire, sous la forme de différents clones facilement cultivables avec la possibilité de les obtenir en grande quantité ce qui est nécessaire pour les expériences de Western Blot.

Après activation, ils produisent des cytokines qui peuvent facilement être dosées et ainsi servir d'indicateurs d'activation lors des tests pharmacologiques.

Enfin, leur fréquence assez élevée en périphérie les rend aisément activables et identifiables à partir de populations *ex vivo*.

Ce modèle, bien que très pratique, présente néanmoins quelques inconvénients.

Le principal étant que les modalités d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes n'ont pas encore été déterminées avec précision.

De plus, selon les premières études réalisées, il semble que les voies de signalisation médiées par le TCR $\gamma\delta$ activé par un phosphoantigène diffèrent de celles observées avec un anti-CD3 ou avec le TCR $\alpha\beta$ au sein des lymphocytes T conventionnels, principalement en terme de cinétique (cf. B-1).

C- MATERIELS ET METHODES

I- MOLECULES TESTEES ET REACTIFS

Le composé **68** est solubilisé dans le DMSO pour obtenir une solution mère à 50 mM, stockée à température ambiante. La durée de conservation dans le DMSO ne doit pas dépasser 15 jours (début de dégradation du produit dans le DMSO au bout de 3 semaines à 1 mois). La solution mère est ensuite diluée extemporanément dans du milieu RPMI (Sigma) au moment de l'expérience. La concentration finale en DMSO est inférieure à 0,2% pour éviter de voir apparaître une toxicité liée à l'utilisation de ce solvant.

Le BrHPP est stocké entre -5°C et -25°C . Il n'est pas recongelé après utilisation.

II- ANTICORPS ET CYTOMETRIE

Pour les expériences de cytométrie en flux, différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes sont utilisés (Immunotech Beckman Coulter, Marseille) : un anti-V δ 2 marqué avec du FITC ("fluorescein isothiocyanate"), un anti-TCR $\gamma\delta$ (pan) marqué avec de la phycoérythrine-cyanine 5 (PC5), un anti-CD3-PC5 et un anti-Apo2.7 couplé à la phycoérythrine (PE).

Les marquages intracytoplasmiques de cytokines sont réalisés au moyen d'anticorps monoclonaux conjugués à la phycoérythrine spécifiques du TNF- α ou de l'IFN- γ (BD Pharmingen, Le Pont De Claix).

Les acquisitions de cytométrie en flux sont effectuées sur un FACSCalibur et analysées au moyen du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

Pour les expériences de Western Blot, les anticorps primaires suivants, obtenus chez Cell Signaling (Saint Quentin en Yvelines) sont utilisés : l'anticorps polyclonal de lapin anti-phospho-p44/p42 Map Kinase (Thr202/Tyr204), l'anticorps polyclonal de lapin anti-phospho-p38 Map Kinase (Thr180/Tyr182), l'anticorps polyclonal de lapin anti-p44/p42 Map Kinase et l'anticorps polyclonal de lapin anti-p38 Map Kinase.

L'anticorps secondaire suivant est employé : anticorps polyclonal de chèvre anti-souris et anti-lapin IgG couplé à la peroxydase (Roche, Meylan).

III- OBTENTION DES CELLULES ET CULTURE

Les PBMC utilisés dans ce travail ont été isolés à partir du sang frais d'un donneur sain au moyen d'un gradient de Ficoll-Hypaque (Eurobio) et resuspendus en milieu RPMI 1640 (Sigma) complété avec 2 mM de L-glutamine (Sigma), 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Sigma) décomplémenté, 10 µg/mL de streptomycine (Sigma) et 100 UI/mL de pénicilline (Sigma) (désigné milieu complet par la suite).

Les clones T Vγ9Vδ2 (G42, G115 et GR72), dont les caractéristiques jonctionnelles avaient été précédemment définies (a- DAVODEAU, 1993 – b- DAVODEAU, 1993), ont été générés à partir d'individus sains par dilution limitante et cultivés en milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de sérum humain et de 150 UI/mL d'IL-2 humaine recombinante (rIL-2) (Sigma) (GASCHET, 1993).

Le clone contrôle A4.5 de lymphocytes Tαβ CD8⁺ reconnaît le peptide BMLF1 (GLCTLVAML) dans le contexte HLA-A*0201. Il a été obtenu à partir du liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

Pour les besoins expérimentaux, les clones ont été stimulés selon un protocole PHA-feeders en plaque à fond rond 96 puits (Nunc). 1.10⁶ de cellules d'un clone sont activées par de la PHA (2 µg/mL) (Sigma) en présence de 10.10⁶ de PBMC allogéniques et 1.10⁶ de BLCL ("B lymphoblastoid cell lines"), préalablement irradiés à 35 Gy, en milieu RPMI 1640 complété avec 2 mM de L-glutamine, 8% de sérum humain (SH), 10 µg/mL de streptomycine, 100 UI/mL de pénicilline et de 300 UI/mL d'IL-2 humaine recombinante (rIL-2).

Les cellules WEHI-164 (clone 13) utilisées pour le dosage biologique du TNF sont issues d'un fibrosarcome murin. Elles sont tuées en présence de TNF (ESPEVIK, 1986). Une pousse à faible densité (moins de 5.10⁴ cellules/cm²) leur confèrent une bonne sensibilité à ce facteur.

Les cellules THP1 proviennent d'une lignée myélomonocytaire de leucémie myéloïde aiguë.

IV- ETUDE D'UN MARQUEUR APOPTOTIQUE PRECOCE : L'APO2.7

- Culture cellulaire

Pour effectuer l'expérience, les cellules d'un clone de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 complet auquel est ajouté 300 UI/mL de rIL-2. Elles sont ensuite distribuées en plaque 96 puits fond plat (Falcon) à 1.10⁶ cellules/puits en présence de la molécule **68** à différentes concentrations (100, 200, 400, 800 et 1000 μ M). De l'étoposide (40 μ g/mL) ainsi que des GR72 préalablement irradiées à 35 Gy sont utilisés ici comme témoins positifs. Les cellules sont alors cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 heures.

- Perméabilisation

Elles sont ensuite transférées en tube eppendorf, reprises dans 100 μ L d'une solution à 4°C de digitonine à 100 μ g/mL en PBSF (PBS contenant 2,5% de SVF et 0,01% d'azide de sodium) et incubées à 4°C pendant 20 minutes. Les différentes conditions sont enfin lavées avec 1,5 mL de PBSF à 4°C.

- Marquage

Les cellules sont resuspendues avec 5 μ L d'anticorps Apo2.7-PE et 95 μ L de PBSF et incubées pendant 15 minutes à température ambiante, dans le noir. Un dernier lavage avec du PBSF est effectué et les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

- Analyse et expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage de GR72 marquées par l'Apo2.7.

V- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T

1- Prolifération de lymphocytes T CD4⁺ humains activés de manière allogénique : MLR ("mixed leukocyte reaction")

- Test de prolifération

Les lymphocytes T CD4⁺ ont été obtenus à partir d'un anneau de kit (donneur RCL33) par gradient sur Ficoll suivi d'un isolement par tri immuno-magnétique. Ils sont resuspendus en milieu RPMI 1640 complété avec 8% de sérum humain (condition sans IL-2) ou en milieu RPMI complété avec 8% de sérum humain et 150 UI/mL de rIL-2 (condition avec IL-2). Ces cellules sont ensuite distribuées en plaque 96 puits fond plat (1.10^4 dans 50 μ L). La molécule **68** est ajoutée dans un second temps à différentes concentrations (25, 50 et 100 μ M) et les cellules sont mises en contact avec une lignée B EBV allogénique ($2,5.10^4$ dans 50 μ L) préalablement irradiée à 35 Gy et resuspendue dans l'un ou l'autre des milieux décrits ci-dessus. Un témoin positif est réalisé avec de la PHA à 1 μ g/mL. L'incubation des différentes conditions, réalisées en quintuplicat, est effectuée à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 60 heures.

- Evaluation de la prolifération

A l'issue de cette période, les cellules sont chargées avec de la thymidine tritiée (0,5 μ Ci/puits) et sont laissées en culture pendant 18 heures.

L'évaluation de la prolifération lymphocytaire est réalisée grâce à l'analyse de l'incorporation de la thymidine tritiée mesurée au moyen d'un compteur Bêta (Wallac).

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes accompagnées de l'écart type ($\pm$ SD), en pourcentage d'inhibition de la prolifération lymphocytaire selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (R_{\text{mol}} - R_T) / (R_{\text{positif}} - R_T)] \times 100$$

R_{mol} : émission bêta des cellules traitées avec la molécule testée

R_{T} : émission bêta non spécifique (somme des émissions des CD4⁺ seuls et de la lignée B seule)

R_{positif} : émission bêta des cellules non traitées par la molécule

2- Enrichissement de lymphocytes T V γ 9V δ 2 au sein de PBMC après activation antigénique

- Préparation des PBMC

Les PBMC sont préparés selon le protocole décrit précédemment (C-III) et resuspendus en milieu RPMI 1640 complet auquel a été ajouté 300 UI/mL de rIL-2. Les cellules sont ensuite distribuées en plaque 24 puits fond plat (Nunc) à 1.10^6 cellules/puits.

La fréquence de cellules V δ 2⁺ dans les CD3⁺ du donneur est déterminée sur le sang total par un simple marquage membranaire avec un anti-V δ 2-FITC. Ce pourcentage peut varier en fonction des individus et doit être au moins égal à 1% pour que l'expérience puisse être menée correctement.

- Activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les PBMC sont incubés avec du BrHPP (3 μ M) (Innate Pharma, Marseille), qui active spécifiquement les V γ 9V δ 2, en présence de différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 μ M) de l'imidazolidinone **68**. Plusieurs expériences sont menées en ajoutant le composé **68** au même moment que l'activation ($t = 0$) ou 3 jours après ($t = 3$ j).

- Evaluation de l'enrichissement des lymphocytes T V γ 9V δ 2

La fréquence des lymphocytes V γ 9V δ 2 au sein des PBMC est analysée à différents temps ($t = 3$ j, $t = 6$ j et $t = 9$ j), après activation par le BrHPP et en présence d'IL-2. Pour cela, un double marquage membranaire est réalisé par un anticorps anti-V δ 2 marqué avec un fluorochrome de type FITC et un anti-CD3 marqué avec du PC5. L'intensité de fluorescence des cellules doublement marquées est analysée par cytométrie en flux.

- Expression des résultats

La mesure de la prolifération effective par cette technique n'est effectuée qu'après calcul du nombre absolu de cellules. Les résultats sont exprimés en % de cellules V δ 2⁺ au sein des cellules CD3⁺ (lymphocytes T totaux) en fonction du temps (cinétique) et en pourcentage d'inhibition de la prolifération lymphocytaire.

3- Prolifération de lymphocytes T V γ 9V δ 2 au sein de PBMC marqués au CFSE

- Préparation des PBMC

Les PBMC sont préparés selon le protocole décrit précédemment (C-III) et incubés pendant 15 minutes, à 37°C sous 5% de CO₂, avec du CFSE (Invitrogen, Paisley) à 2 μ M dans du PBS. Les cellules sont ensuite resuspendues en milieu RPMI 1640 et laissées en culture pendant 15 minutes pour éliminer le CFSE non incorporé.

Elles sont finalement resuspendues en milieu RPMI 1640 complet auquel a été ajouté 300 UI/mL de rIL-2 et sont distribuées en plaque 24 puits fond plat à 1.10⁶ cellules/puits.

- Activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les PBMC, sont incubés avec du BrHPP (3 μ M). L'imidazolidinone **68** est ajoutée à différentes concentrations (50 et 100 μ M), 10 minutes avant la stimulation ou 24 heures après.

- Evaluation de la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2

La prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est analysée au bout de 4 jours. Pour cela, un marquage membranaire est réalisé avec un anticorps anti-pan γ δ -PC5. L'intensité de fluorescence des cellules doublement marquées, par le CFSE et l'anti-pan γ δ -PC5, est analysée par cytométrie en flux.

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés sous la forme d'histogrammes représentant l'intensité de fluorescence du CFSE. Les pourcentages de cellules T $\gamma\delta^+$ dans les différents cycles de division sont indiqués.

VI- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE T

1- Dosage biologique du TNF

- Activation lymphocytaire

Des lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains (clones G115, G42 ou GR72) sont resuspendus en milieu RPMI 1640 complet et semés à 1.10^4 cellules/puits en plaque 96 puits fond plat.

L'activation est réalisée par le BrHPP (3 μ M), en autoprésentation ou par l'OKT3 (e-Biosciences, Montrouge), anticorps monoclonal anti-CD3 (0,01, 0,1 ou 1 μ g/mL), préalablement fixé sur la plaque, en présence de diverses concentrations du composé **68** (25, 50 et 100 μ M). Des témoins positifs sont également réalisés en activant les cellules avec de la PHA (1 μ g/mL). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂, pendant 6 heures.

Nous avons également effectué une expérience sur un clone T V γ 9V δ 2 (GR72) préalablement incubé avec différentes concentrations du composé **68** pendant 24 heures, à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂, puis lavé, resuspendu en milieu complet et activé par l'OKT3. Nous avons ainsi voulu voir si l'imidazolidinone **68** avait besoin d'être apprêtée pour être active.

L'expérience est menée en parallèle sur un clone de lymphocytes T $\alpha\beta$ contrôle (S5) stimulé par l'OKT3. Les différentes conditions sont réalisées en triplicat.

- Dosage du TNF

Au terme de cette période, le dosage du TNF relargué par les cellules est effectué sur les surnageants, récoltés après 6 heures d'activation, selon un test de cytotoxicité sur des cellules du clone TNF sensible WEHI 164.13, décrit par Espevik et Nissen-Meyer (ESPEVIK, 1986) et développé brièvement ci-dessous.

Ce test ne permet pas de faire la distinction entre les différents types de TNF (α et β). Néanmoins, les cellules V γ 9V δ 2 activées produisent principalement du TNF- α . Le dosage réalisé ici concerne donc principalement celui du TNF- α .

50 μ L de surnageants sont prélevés et mis au contact, en plaque 96 puits à fond plat, pendant 16 à 20 heures, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂, avec 50 μ L de cellules WEHI 164.13 (3.10⁴ cellules /puits), préalablement traitées avec de l'actinomycine D (2 μ g/mL) (Sigma) et du chlorure de lithium (40 mM).

Une gamme standard de TNF- α humain recombinant (AbCys, Paris) comprise entre 0 et 500 pg/mL est réalisée en parallèle.

Les surnageants sont utilisés non dilués et dilués au 1:3 pour que la lecture du test soit réalisée dans des conditions non saturantes.

Ils sont ensuite dosés en TNF par une méthode de quantification colorimétrique de la viabilité des cellules WEHI. La cytotoxicité des cellules WEHI, induite par le TNF est, en effet, mise en évidence par un marqueur de viabilité : le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Ce sel de tétrazolium, de couleur jaune, est réduit au sein des cellules vivantes par les déshydrogénases mitochondriales et forme des cristaux violacés de formazan absorbant la lumière polarisée à 570 nm. Les cellules WEHI tuées par le TNF sont, quant à elles, incapable de métaboliser le MTT, qui reste, par conséquent, jaune, n'entraînant dans ce cas aucune absorption de la lumière polarisée à cette même longueur d'onde.

Les cellules sont donc incubées, pendant 4 heures, à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂, avec 50 μ L de MTT (Sigma) à 2,5 mg/mL dans du PBS. Des cristaux de formazan se forment alors dans les cellules vivantes, de manière plus ou moins importante, en fonction de la concentration en TNF- α contenu dans les surnageants testés.

Ces cristaux sont ensuite dissous par addition de 100 μ L d'un tampon de lyse (composé de SDS 30% (2 volumes) et de *N,N'*-diméthylformamide (1 volume) à pH 4,7)

(ESPEVIK, 1986), révélant par une teinte violacée plus ou moins intense la concentration en TNF- α des surnageants. Cette étape se fait dans l'obscurité à température ambiante sur la nuit.

La densité optique (D.O.) des différents puits a été déterminée à 570 nm au moyen d'un lecteur de plaque ELISA (Thermo, Courtaboeuf).

- Expression des résultats

La concentration en TNF- α des surnageants est inversement proportionnelle à la D.O. mesurée et est déterminée par rapport à une courbe étalon établie grâce à la réalisation de la gamme étalon.

2- Marquage intracytoplasmique du TNF- α et de l'IFN- γ

- Activation lymphocytaire

Dans ces expériences, un clone de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (G42) est stimulé par des CPA de type THP1 préalablement incubées avec du pamidronate (100 μ M) (Calbiochem, Fontenay-sous-Bois) pendant une nuit à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂. Cette activation présente l'avantage d'être plus physiologique par rapport à l'utilisation de phosphoantigènes en autoprésentation. De plus, ces conditions permettent d'éviter l'autotoxicité des cellules T V γ 9V δ 2 qui sont très cytotoxiques.

Les lymphocytes T sont resuspendus en milieu RPMI complet sans antibiotique et semés à 2,5.10⁵ cellules/puits en plaque fond plat. La molécule **68** est ensuite ajoutée à différentes concentrations (25, 50 et 100 μ M). Les cellules THP1 sont ajoutées, dans un second temps, selon un rapport T/CPA de 1:1 (2,5.10⁵ cellules/puits). Les différentes conditions sont incubées pendant 2 heures à 37°C sous atmosphère à 5% de CO₂.

A l'issue de cette période, le blocage de l'exocytose des cytokines est réalisé en ajoutant dans chacun des puits de la brefeldine A (10 μ g/mL) (Sigma).

- Marquage membranaire

Les cellules sont récupérées au bout de 2 heures et demie (temps total d'activation de 2 + 2 h 30) et un marquage membranaire est réalisé au moyen d'un anticorps anti-V δ 2-FITC.

Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) (Sigma) à 2% pendant 15 minutes à température ambiante.

- Marquage intracytoplasmique

La perméabilisation des cellules est effectuée ultérieurement au moyen d'un tampon de saponine (contenant 0,5% de saponine, 5% de SVF et 1% d'Hepes 1M dans du PBS) à température ambiante pendant 20 minutes.

Un marquage intracytoplasmique de cytokines accumulées dans les lymphocytes T est ensuite réalisé en incubant ces cellules, pendant 20 minutes à température ambiante, avec des anticorps monoclonaux anti-TNF- α ou anti-IFN- γ marqués avec un fluorochrome de type PE et dilués en tampon saponine.

- Expression des résultats

L'intensité de fluorescence des cellules doublement marquées est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en mfi ("mean fluorescence intensity") et en % de cellules V δ 2⁺ productrices de la cytokine étudiée.

VII- ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION MEDIÉES PAR LE TCR PAR WESTERN BLOT

L'étude par Western blot d'enzymes phosphorylées nécessite de suivre un protocole particulier assurant un blocage efficace de l'action des phosphatases dès que la stimulation des lymphocytes T est terminée, pour éviter la déphosphorylation immédiate des enzymes étudiées. L'inhibition des phosphatases est réalisée en plaçant les cellules à 4°C juste après leur stimulation. Les cellules doivent rester à cette température jusqu'à l'étape de dénaturation des protéines.

1- Préparation des culots secs

Afin d'obtenir une quantité suffisante de protéines pour réaliser ce type d'approche, 15 à 20.10⁶ de cellules doivent être utilisées par condition.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 (clone GR72), au repos, sont repris en milieu RPMI 1640 complet et distribués en tubes de 13 mL (Greiner Bio-One, Courtaboeuf) à $20 \cdot 10^6$ de cellules/tube. Ils sont ensuite stimulés à 37°C sous 5% de CO₂, par de la PMA (Sigma) (0,1 μ M) ou de l'UCHT1 (Immunotech, Marseille, France), anticorps monoclonal anti-CD3, (0,1, 1 ou 10 μ g/mL) pendant 10 minutes ou avec du BrHPP (3 μ M) pendant 30 minutes ou 1 heure, en présence de l'imidazolidinone **68** (100 μ M).

L'UCHT1 présente l'avantage d'activer les lymphocytes T en solution, contrairement à l'OKT3 qui fonctionne mieux fixé sur une plaque.

Les lymphocytes T CD8⁺ (clone A4.5), utilisés comme contrôle, sont stimulés pendant 5 ou 20 minutes, à 37°C sous 5% de CO₂, en autoprésentation, avec le peptide BMLF1 (obtenu au laboratoire) (21 μ M) qu'ils reconnaissent de manière spécifique ou avec la PMA (0,1 μ M).

Lorsque la stimulation est terminée, les cellules sont immédiatement placées à 4°C pour inhiber toute activité enzymatique et principalement, celle des phosphatases puis, elles sont lavées deux fois avec du PBS à 4°C (les centrifugations entre les lavages doivent se faire à 4°C). Après le 2^e lavage, l'excédent de PBS est éliminé à la pipette et les culots secs cellulaires sont immédiatement stockés à -80°C.

2- Préparation des lysats cellulaires

Les culots secs sont repris avec un tampon de lyse spécifique (10 μ L pour $1 \cdot 10^6$ cellules) contenant : 10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0,5 % de NP40, 5 mM d'EDTA, 1 mM de PMSF, 2 μ g/mL d'aprotinine, 2 mM de Na₃VO₄, 1 mM de NaF et 1 μ g/mL de leupeptine dans de l'eau distillée. Les échantillons sont vortexés très fortement (parfois soniqués si nécessaire) et incubés à 4°C pendant 40 minutes en vortexant toutes les 10 minutes. Ils sont ensuite centrifugés à 10000 rpm, à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants protéiques sont ensuite récupérés, conservés à 4°C ou congelés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

3- Dosage des extraits protéiques

Les extraits protéiques sont ensuite dosés grâce au kit BCA (Pierce, Paris). Une gamme de concentration en BSA ("bovine serum albumin") (0, 2,5, 5, et 10 μ g/ μ L) est

réalisée dans une plaque 96 puits à fond plat par dilution d'une solution mère de BSA à 2 mg/mL dans le tampon d'extraction décrit précédemment. Chaque lysat cellulaire est dilué au $1/8^{\text{e}}$ et dosé en duplicat selon une méthode spectrophotométrique faisant intervenir l'acide bicinchonique (BCA) et des ions cuivriques. Les protéines réduisent les ions cuivriques en ions cuivreux qui forment alors un complexe stable et intensément coloré avec le BCA. Les D. O. des différents échantillons et de la gamme sont alors mesurées au moyen d'un spectrophotomètre, à 570 nm. Les concentrations en protéines des lysats précédemment préparés sont déterminées à partir de la courbe standard établie grâce à la gamme.

4- Western Blot

- Préparation des échantillons

La préparation des échantillons se fait à 4°C jusqu'à l'étape de dénaturation des protéines.

Différents volumes d'extraits protéiques sont prélevés de manière à ce que chacun des échantillons à tester renferme la même quantité de protéines (entre 10 et 30 µg en fonction des expériences). Les volumes sont ensuite ajustés avec du tampon de lyse afin de déposer le même volume dans chaque puits lors de la migration.

Ces extraits sont ensuite dilués au $1/5^{\text{e}}$ dans du tampon Laemmli 5X contenant du Tris-HCl 1M pH 6,8, du Glycérol, du SDS 20%, du β-mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol dans de l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 minutes à 100°C pour dénaturer les protéines.

- Electrophorèse des protéines au travers d'un gel de polyacrylamide : SDS-PAGE

La séparation des protéines est réalisée par une technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes au travers d'un gel de polyacrylamide (ou SDS-PAGE pour "sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis") (LAEMMLI, 1970). Le SDS est un détergeant qui enveloppe de charges négatives les chaînes polypeptidiques des protéines. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes de la protéine qui est alors dénaturée (sous sa forme tridimensionnelle native). Les protéines chargées négativement sont ensuite séparées par technique électrophorétique au travers d'un gel de polyacrylamide. Elles migrent toutes

vers le pôle chargé positivement. Leur séparation se fait en fonction de leur poids moléculaire. plus le gel contient un pourcentage important de polyacrylamide, plus les mailles du réseau sont serrées et moins les protéines volumineuses peuvent migrer.

Le gel comporte deux parties :

- Le gel de concentration, composé de 4% d'acrylamide, de 0,126 M de Tris-HCl pH 6,8, de 0,1% de SDS, de 0,05% d'APS et de 0,1% de TEMED;
- Le gel de séparation dont le pourcentage en polyacrylamide dépend du poids moléculaire (PM) des protéines à séparer : 10 % (PM entre 50 et 100 kDa) ou 12 % (PM entre 30 et 50 kDa). Il est également composé de 0,38 M de tris-base pH 8,8, de 0,1% de SDS, de 0,05% d'APS et de 0,05% de TEMED.

Les échantillons sont déposés dans les puits du gel et la migration se fait à tension constante de 100 V à travers le gel de concentration, puis celui de séparation dans un tampon de migration composé de : 25 mM de Tris-base, de 192 mM de glycine et de 1% de SDS. La séparation des protéines est suivie grâce à un marqueur de taille (Bio-Rad, Aulnay sous Bois).

- Transfert sur membrane de PVDF

Les protéines sont ensuite électrotransférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride) (Immobilon-P, Millipore, Molsheim), préalablement équilibrée par passages successifs dans des bains de méthanol, d'eau et de tampon de transfert (composé de 25 mM de Tris-base, de 192 mM de glycine et de 20% de méthanol) pendant une minute chacun. Le transfert est ensuite réalisé dans le tampon spécifique précédemment décrit, sous agitation lente, à 4°C, pendant 2 heures à ampérage constant de 70 mA en utilisant un système Mini Trans-Blot™ Cell (Bio-Rad).

Une coloration réversible des membranes par le rouge Ponceau, colorant spécifique des protéines, permet de visualiser globalement les protéines transférées et donc de valider l'efficacité de cette étape de transfert.

- Hybridation

La membrane est alors incubée pendant 1 heure, sous agitation lente, à température ambiante, dans une solution de saturation (ou de blocage) composée de 1 mL d'une solution de blocage ("Western Blocking Reagent", Roche), de 1 mL de TBS 10X (Bio-Rad) et de 8

mL d'eau distillée. Cette étape est très importante car elle permet de bloquer les sites de fixation non spécifiques potentiels de l'anticorps utilisé par la suite.

La membrane est ensuite incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué au 1/1000^e dans 10 mL de solution de saturation.

Les anticorps suivant ont été utilisés à cette étape :

- L'anti-phospho-p44/p42 Map Kinase
- L'anti-phospho-p38 Map Kinase

Pour l'étude des protéines phosphorylées, il faut toujours incubé en premier lieu l'anticorps spécifique de l'enzyme sous sa forme phosphorylée. L'anticorps qui reconnaît l'enzyme sous toutes ses formes (phosphorylée ou non) est incubé dans un second temps sur la même membrane après déshybridation de celle-ci afin de réaliser, pour chaque condition, le rapport enzyme phosphorylée/enzyme totale.

La membrane est ensuite lavée avec une solution composée de TBS 1X et de 0,1% de Tween (TBS-Tween 0,1%) pendant 20 minutes et incubée pendant 20 minutes avec la solution de saturation puis pendant 2 heures, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire dilué au 1/1000^e dans 10 mL de solution de saturation.

L'anticorps secondaire utilisé est dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire fixé sur la membrane et couplé à de la peroxydase (POD) (anti-souris et anti-lapin IgG POD).

Deux lavages de 20 minutes sont enfin effectués avec une solution de TBS 1X contenant 0,1% de Tween.

5- Détection des protéines par chimioluminescence

Les niveaux d'expression des protéines étudiées sont révélés par chimioluminescence. Pour cela la membrane est incubée pendant 1 minute avec une solution composée de 50 µL de réactif B (luminol) et de 5 mL de réactif A (contenant du peroxyde d'hydrogène, substrat de la peroxydase, et du 4-iodophénol) provenant du kit "BM Chemiluminescence Blotting Substrate" (Roche).

La membrane est ensuite placée dans une cassette de révélation (Dupont-Cronex, Sigma).

La peroxydase oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Il en résulte l'émission d'une lumière à 428 nm détectée par un film photographique (Biomax, Kodak) placé, en chambre noire, au contact de la membrane pendant des temps variant de quelques secondes à 30 minutes en fonction de l'intensité du signal émis.

6- Réhybridation

La membrane est ensuite déshybridée selon un protocole en trois étapes : un lavage pendant 30 minutes avec du TBS-Tween 0,1%, puis une incubation pendant 30 minutes sous agitation très rapide avec 10 mL d'une solution spécifique ("Restore Western Blot Stripping Buffer", Pierce) suivie d'un second lavage de 30 minutes en TBS-Tween 0,1%.

La membrane est ensuite incubée pendant 30 minutes dans la solution de saturation puis réincubée sur la nuit, à 4°C, avec un nouvel anticorps primaire.

Les anticorps suivant ont été utilisés à cette étape :

- L'anti-p44/p42 Map Kinase
- L'anti-p38 Map Kinase

7- Analyse et expression des résultats

Les films photographiques de différents temps d'exposition sont numérisés et l'intensité du niveau de gris des bandes révélées sur les films photographiques est quantifiée à l'aide du logiciel spécifique de quantification ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), en soustrayant, pour chaque bande, l'intensité de l'arrière-plan.

Les résultats sont exprimés sous la forme du ratio de l'intensité de l'enzyme phosphorylée sur l'intensité de l'enzyme totale en unité arbitraire ce qui permet de s'affranchir, pour chaque condition, d'éventuelles variations dans la quantité totale d'enzyme (inexactitudes dans le pipetage, dans la quantité de protéines chargées dans les différentes conditions ou problèmes de transfert non homogène).

D- RESULTATS

I- ETUDE D'UN MARQUEUR APOPTOTIQUE PRECOCE : L'APO2.7

Avant de réaliser des études pharmacologiques plus approfondies sur les propriétés immunomodulatrices de l'imidazolidinone **68**, nous avons voulu nous assurer que l'activité immunosuppressive sur les lymphocytes T, observée lors des études préliminaires de screening, n'était pas le résultat d'un effet toxique de la molécule sur ces cellules.

Pour cela, nous avons analysé, *in vitro*, l'influence du composé **68** sur l'expression, par des lymphocytes T, d'un marqueur apoptotique précoce : l'Apo2.7.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un anticorps monoclonal (marqué avec de la PE) dirigé contre une protéine de 38 kDa de la membrane mitochondriale (antigène 7A6 ou Apo2.7) exprimée par les cellules entamant un processus d'apoptose (ZHANG, 1996). Il a été suggéré que l'antigène 7A6 était impliqué dans la cascade moléculaire initiant l'apoptose (ZHANG, 1996). L'intérêt de cette molécule réside dans le fait qu'elle est exprimée très rapidement (quelques heures), dès le début du processus d'apoptose (ZHANG, 1996 - ROTH, 1996). L'Apo2.7 permet ainsi de détecter très précocement les cellules en apoptose, avant même que leur profil ne soit modifié lors de l'analyse en cytométrie en flux (diminution de taille et modification de la granulosité). Cette technique est également plus spécifique que le marquage par de l'annexine V (moins de bruit de fond).

Pour effectuer cette expérience, nous avons incubé, pendant 24 heures, un clone de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) avec différentes concentrations de l'imidazolidinone **68** (100, 200, 400, 800 et 1000 μ M) ou avec de l'étoposide (40 μ g/mL), comme témoin positif. Des GR72, préalablement irradiés à 35 Gy, ont également été utilisés en tant que deuxième contrôle positif. L'analyse de l'expression cellulaire de l'antigène 7A6 (marqueur précoce de l'apoptose) a ensuite été réalisée par un marquage avec l'Apo2.7-PE.

Les résultats, exprimés en pourcentage de cellules positives à l'Apo2.7, sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

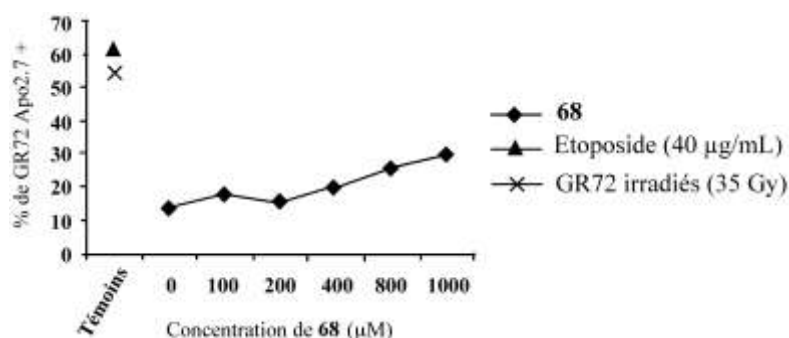


Figure 1 : Effet de l'imidazolidinone **68** sur l'expression du marqueur apoptotique Apo2.7 au sein de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72).

L'analyse de ces résultats indique que l'imidazolidinone **68**, n'entraîne pas d'augmentation significative de l'expression du marqueur apoptotique reconnu par l'Apo2.7 à la dose de 100 μM, par rapport au témoin négatif des cellules non traitées (17,2% de cellules positives pour la molécule **68** à 100 μM contre 13,2 % pour les GR72 non traités). Or, lors des études de criblage *in vitro*, le composé **68** utilisé à cette dose a entraîné 100% d'inhibition de la prolifération lymphocytaire T (cf. C-I-2). Ces résultats semblent donc appuyer l'hypothèse d'un effet immunomodulateur du composé **68** à la dose de 100 μM non lié à une toxicité cellulaire (non spécifique).

Le pourcentage de lymphocytes GR72 marqués par l'anti-Apo2.7 augmente de manière significative entre 400 μM (19,8%) et 800 μM (25,3%), puis, de façon dose-dépendante. Un effet toxique, se traduisant par l'induction de l'apoptose des cellules T apparaît donc au-delà de 400 μM. Néanmoins, même à la dose de 1 mM, soit 10 fois la dose à laquelle la molécule est active, le pourcentage de cellules positives à l'Apo2.7 reste très sensiblement inférieur à ceux observés avec les contrôles positifs (29,5% pour la molécule **68** à 1 mM contre 54,2% pour les GR72 irradiés et 61,1% pour les GR72 traités avec l'étoposide).

Ces données viennent, de plus, renforcer les résultats des études préliminaires de cytotoxicité effectuées sur des fibroblastes humains (MRC5) dans lesquelles l'imidazolidinone **68** présentait une CI₅₀ supérieure à 500 μM. Cette molécule semble donc posséder un bon profil de toxicité avec une marge thérapeutique raisonnable.

II- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T

1- Prolifération de lymphocytes T CD4⁺ humains activés de manière allogénique : MLR ("mixed leukocyte reaction")

Les tests de précriblage, précédemment réalisés sur le composé **68** ont consisté à évaluer son effet inhibiteur sur la prolifération de lymphocytes T murins et humains, activés de manière non spécifique par un mitogène (ConA ou PHA).

Nous avons donc, dans un second temps, déterminé si l'effet observé était spécifique ou non de l'activation TCR et, par la même occasion, tenté de confirmer l'activité inhibitrice de l'imidazolidinone **68** sur la prolifération de lymphocytes Th CD4⁺ humains observée lors du test de DTH.

Pour cela, nous avons examiné l'effet de ce composé sur une réaction lymphocytaire mixte (MLR) qui reproduit *in vitro* la réaction allogénique, observée lors d'un rejet aigu d'allogreffe. Cette réponse est initiée par les cellules Th CD4⁺ qui sont activées de manière allogénique (cf. introduction).

Pour effectuer cette expérience, un tri CD4⁺ (RCL33) a été activé par une lignée B EBV allogénique préalablement irradiée, pendant 60 heures, en présence de différentes concentrations de l'imidazolidinone **68** (25, 50 et 100 μ M) puis incubée pendant 18 heures avec de la thymidine tritiée. L'évaluation de la prolifération lymphocytaire est réalisée grâce à l'analyse de l'incorporation de la thymidine tritiée mesurée au moyen d'un compteur Bêta.

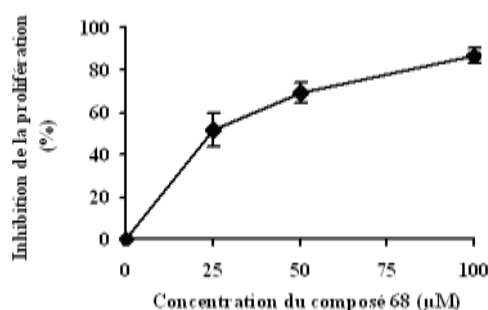


Figure 2 : Effet de l'imidazolidinone **68** sur la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ stimulés de manière allogénique par une lignée B EBV préalablement irradiée.

Comme l'indique la figure 2, le composé **68** inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des lymphocytes Th CD4⁺ activés de manière allogénique. L'inhibition maximale de 87% est observée à la dose de 100 µM. La CI₅₀ est de l'ordre de 25 µM.

L'imidazolidinone **68** inhibe donc de façon dose-dépendante la prolifération de lymphocytes Th CD4⁺ activés de manière allogénique.

2- Enrichissement de lymphocytes T Vγ9Vδ2 au sein de PBMC après activation antigénique

L'étape suivante a consisté à déterminer si l'effet immunomodulateur observé pouvait être imputable à une action tardive du composé, sur la prolifération lymphocytaire, ou à une action plus précoce, au moment de l'activation.

Nous avons utilisé le modèle d'étude décrit précédemment : des lymphocytes T Vγ9Vδ2 activés, de manière TCR-dépendante, par un phosphoantigène, le BrHPP (bromohydrine pyrophosphate). Ce phosphomonoester synthétique a été obtenu par Espinosa *et al.* (ESPINOSA, 2001). C'est un agoniste puissant des Vγ9Vδ2 possédant une CE₅₀ de 10 nM.

Pour ces expériences, nous avons travaillé avec des PBMC (donneurs sains) au sein desquels nous faisons proliférer les Vγ9Vδ2. L'avantage, par rapport à l'utilisation d'un clone établi et entretenu en culture au laboratoire, est que, dans ce modèle, les cellules sont, en l'absence de situation pathologique (ex : infection), au repos et synchrones ce qui favorise, par la suite, l'interprétation des résultats.

Pour les besoins de l'étude, les PBMC, ont été incubés avec du BrHPP (3 µM) en présence de différentes concentrations de l'imidazolidinone **68** (25, 50, 100 et 200 µM). Nous avons comparé les résultats obtenus lorsque la molécule **68** est ajoutée au même moment que l'activation par le BrHPP (t = 0) (figure 3A) ou 3 jours après (t = 3 j) (figure 3B). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Ces résultats montrent tout d'abord, que l'imidazolidinone **68** inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des lymphocytes T Vγ9Vδ2 activés *via* leur TCR quelque soit le moment d'administration de la molécule (figure 4).

Néanmoins, cette inhibition est beaucoup plus prononcée lorsque la molécule est ajoutée pendant l'initiation de la stimulation TCR (figure 4). Par exemple, lorsque l'imidazolidinone **68** est administrée à t = 0, à la dose de 50 µM, elle entraîne une inhibition

de 82% de la prolifération des V γ 9V δ 2 au bout de 6 jours contre seulement 29% lorsqu'elle est additionnée à t = 3 j.

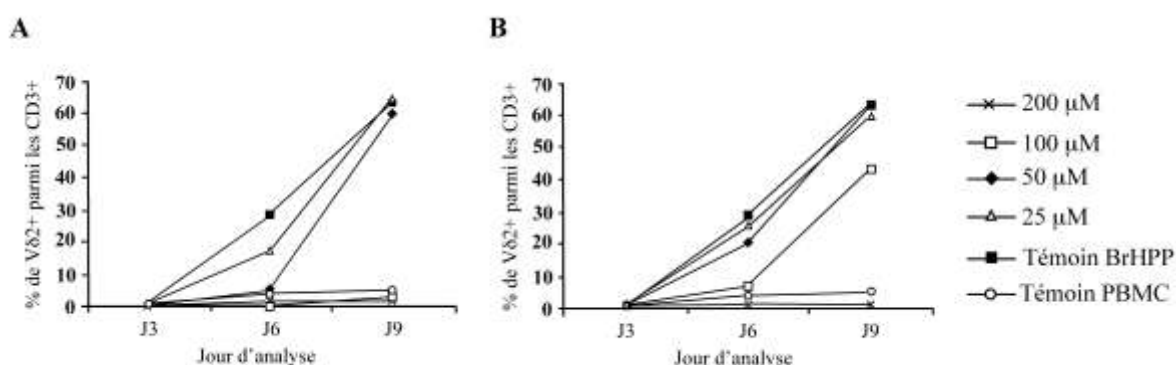


Figure 3 : Effet de l'imidazolidinone **68** sur la prolifération de lymphocytes T V γ 9V δ 2 au sein de PBMC après activation par le BrHPP (3 μ M). Le composé **68** est ajouté au moment de la stimulation (A) ou 3 jours après (B).

Lorsque le composé **68** est ajouté à t = 3 j aux doses de 25 et 50 μ M, il exerce peu d'influence sur la prolifération des V γ 9V δ 2 au sein des PBMC (figure 3B). A la dose de 100 μ M, la prolifération est ralentie mais l'inhibition quasi-totale observée au bout de 9 jours (96%) lorsque le composé est administré au moment de la stimulation, n'est plus que de 32% (figure 4).

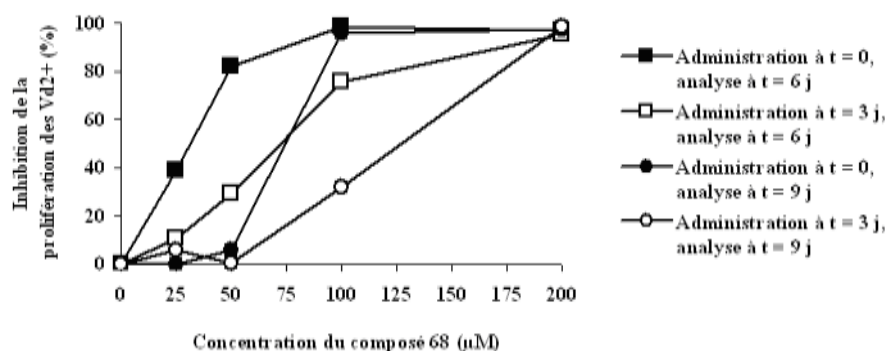


Figure 4 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T V δ 2⁺ au sein de PBMC en fonction de la concentration de l'imidazolidinone **68** et de son moment d'administration.

Après analyse de ces données, nous avons donc émis l'hypothèse que l'imidazolidinone **68** exerçait son activité immunosuppressive sur les lymphocytes T de façon précoce, pendant la phase d'activation lymphocytaire.

3- Prolifération de lymphocytes T V γ 9V δ 2 au sein de PBMC marqués au CFSE

Pour confirmer ces observations, et analyser de manière plus fine l'effet de l'imidazolidinone **68** sur l'activation et la prolifération des lymphocytes T, nous avons réalisé le même type d'expérience en marquant les cellules avec du CFSE.

Le CFSE (5-(et 6-)-carboxyfluoresceindiacetate, succinimidyl ester) est un marqueur fluorescent qui permet de suivre les cycles de division cellulaire de manière très précise par cytométrie en flux (LYONS, 1994). Il se fixe de manière covalente sur des protéines intracellulaires mais également sur des molécules membranaires. Lorsque la cellule marquée se divise, le CFSE se répartit de manière égale entre les deux cellules fille. Leur intensité de fluorescence est donc divisée par deux par rapport à celle de la cellule mère non divisée. L'analyse, par cytométrie en flux, de l'intensité de fluorescence de cellules en division marquées au CFSE permet donc de discriminer les différentes générations de cellules.

Ce fluorochrome est un dérivé de la fluorescéine et permet donc l'utilisation concomittente d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes compatibles pour l'immunophénotypage des cellules en division.

Les expériences ont été réalisées sur des PBMC marqués au CFSE puis incubés avec du BrHPP (3 μ M) qui active spécifiquement les lymphocytes T V γ 9V δ 2. L'imidazolidinone **68** a été ajoutée à différentes concentrations (50 et 100 μ M) 10 minutes avant la stimulation ou 1 jour après.

La prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 a été analysée au bout de 4 jours. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La figure 5 représente les résultats d'une première expérience dans laquelle l'imidazolidinone **68** a été ajoutée au moment de la stimulation ($t = 0$), à différentes doses. Le composé testé inhibe de façon dose-dépendante l'entrée en cycle de division cellulaire des V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP. Lorsqu'il est administré à la dose de 100 μ M, il bloque l'entrée en cycle de division de la majorité des V γ 9V δ 2 (56% de V γ 9V δ 2 non divisés avec l'imidazolidinone **68** à 100 μ M (figure 5C) contre 10% seulement lorsque les cellules ne sont pas traitées par la molécule (figure 5B)).

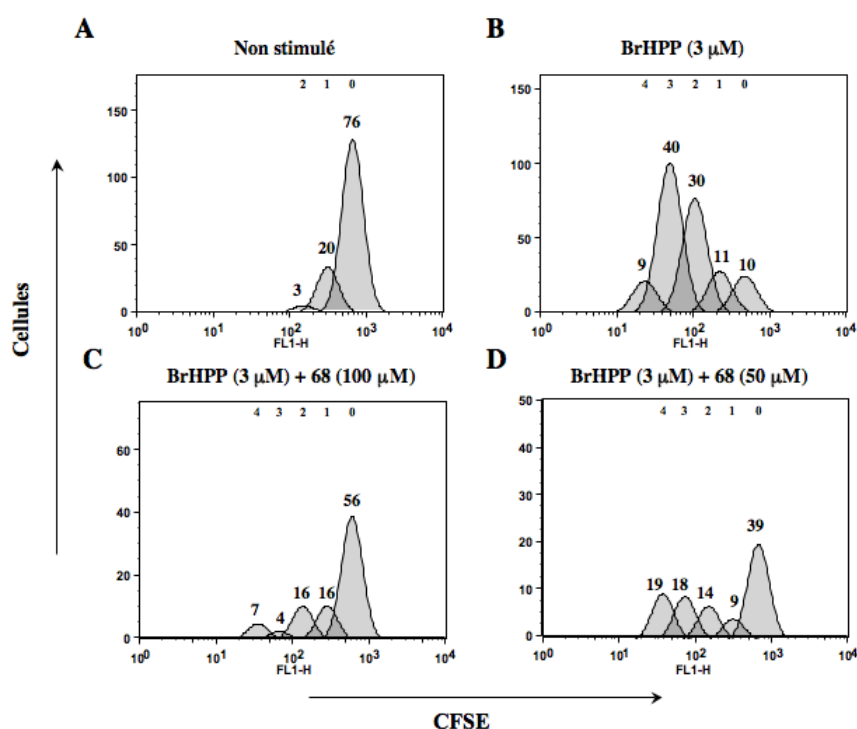


Figure 5 : Effet de l'imidazolidinone **68**,   100 et 50 μM , sur l'entrée en cycle de division de lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$, au sein de PBMC, après activation par le BrHPP (3 μM).

La figure 6 décrit les résultats d'une deuxième expérience au cours de laquelle nous avons comparé l'action du composé **68**   la dose de 100 μM lorsqu'il est administré au moment de la stimulation TCR ou 24 heures après.

L'inhibition exercée par l'imidazolidinone **68** sur l'entrée en cycle des $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ disparaît totalement lorsque la molécule est ajoutée, à la dose de 100 μM , 24 heures après l'activation (64% de $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ non divisés lorsque la molécule est ajoutée à 100 μM   $t = 0$ (figure 6C) contre 28% seulement lorsqu'elle est administrée à $t = 1$ j (figure 6D)). Dans ce cas, le profil de division cellulaire est très proche de celui qui est obtenu lorsque les cellules ne sont pas traitées par la molécule **68** (figure 6B).

Si le composé testé avait une action sur le cycle cellulaire, un blocage des cellules à la génération 1 ou 2 serait observé, ce qui n'est pas le cas. Il semble donc que la molécule a peu d'effet sur la prolifération des lymphocytes T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ une fois que ces cellules ont été activées par les phosphoantigènes.

Ces résultats confirment donc bien les observations précédentes suggérant un effet précoce de la molécule, pendant la phase d'activation antigénique.

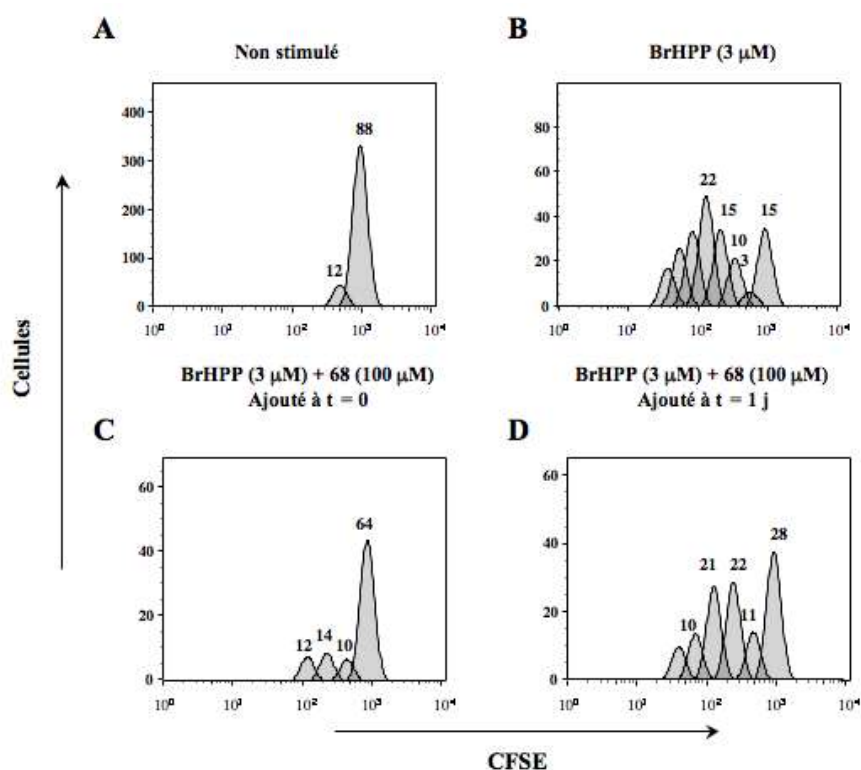


Figure 6 : Effet du moment d'administration de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) sur l'entrée en cycle de division de lymphocytes T V γ 9V δ 2, au sein de PBMC, après activation par le BrHPP (3 μ M).

III- MESURE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE T

Nous avons démontré dans les expériences précédentes que l'imidazolidinone **68** possédait une activité immunosuppressive sur les lymphocytes T humains activés de manière antigénique et que cet effet s'exerçait préférentiellement de façon précoce, durant la phase d'activation lymphocytaire par le TCR.

Nous avons donc jugé intéressant, à ce stade, d'analyser l'effet de ce composé sur la production cytokinique déclenchée suite à l'activation de lymphocytes T par un antigène (lymphocytes T V γ 9V δ 2 et lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$).

En réponse à une activation antigénique, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 se mettent rapidement à produire et sécréter de fortes quantités de cytokines, le plus souvent de type Th1 (pro-inflammatoires), (MORITA, 1991) comme le TNF- α (LANG, 1995 - BATTISTINI,

1997 - BOULLIER, 1999) et l'interféron- γ (IFN- γ) (BATTISTINI, 1997 - GOODIER, 1995). Nous avons donc choisi d'étudier plus particulièrement l'effet du composé **68** sur la production de ces deux cytokines par des clones de cellules T V γ 9V δ 2 (GR72, G115 et G42) ayant un profil de sécrétion cytokinique de type Th1.

1- Dosage biologique du TNF

Le TNF- α est un indicateur précoce (30 minutes) de l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (LANG, 1995) et présente l'avantage de requérir de faibles quantités d'antigène pour témoigner d'une bonne stimulation.

Le but de ce test est d'analyser l'effet de la molécule **68** sur la sécrétion de TNF- α par les lymphocytes V γ 9V δ 2 activés de manière TCR-dépendante.

Pour cela, des lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains (clones G115, G42 ou GR72) ont été activés par le BrHPP (3 μ M), par l'OKT3, anticorps monoclonal anti-CD3 (0,01, 0,1 ou 1 μ g/mL), ou par la PHA (1 μ g/mL) en présence de diverses concentrations du composé **68** (25, 50 et 100 μ M). L'expérience a été menée en parallèle sur un clone de lymphocytes T $\alpha\beta$ contrôle (S5), sécrétant ces deux cytokines, stimulé par l'OKT3. Le dosage du TNF a ensuite été réalisé sur les surnageants récoltés. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes et ont été reproduites avec 3 clones différents.

La figure 7 décrit les résultats obtenus avec un clone de V γ 9V δ 2 (GR72) (figure 7A) et avec un clone de lymphocytes T $\alpha\beta$ (S5) (figure 7B) stimulés par l'OKT3 ou la PHA. Dans les deux cas, l'imidazolidinone **68** inhibe la production de TNF, de manière dose-dépendante, avec une inhibition maximale à 100 μ M (comprise entre 90 et 100% avec les GR72 et de l'ordre de 80% avec les S5).

Les mêmes résultats sont observés lorsque les GR72 sont activés par le BrHPP (données non présentées).

Enfin, lorsque les GR72 sont préalablement incubés avec différentes concentrations du composé **68** pendant 24 heures puis lavés et activés par l'OKT3 ou la PHA (figure 7C), l'imidazolidinone testée n'a plus aucun effet sur la production de TNF.

Ces résultats confirment donc que la molécule **68** agit de manière précoce en inhibant la production de TNF de lymphocytes T activés de manière antigénique. De plus, les dernières

données montrent que l'imidazolidinone doit être présente au moment de l'activation pour exercer son effet.

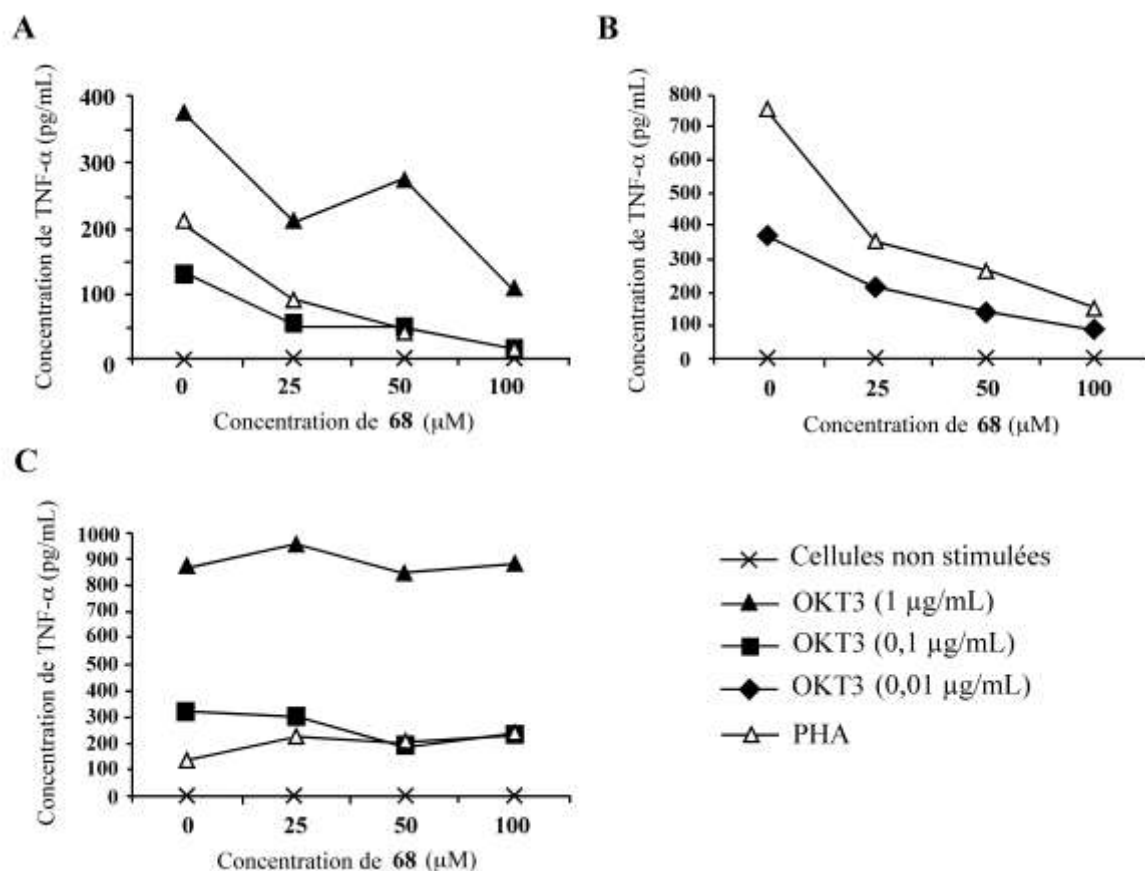


Figure 7 : Effet de l'imidazolidinone **68**, ajoutée au moment de la stimulation, sur la production de TNF de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) (A) ou des lymphocytes T $\alpha\beta$ (S5) (B) stimulés par de la PHA ou de l'OKT3. (C) Effet de l'imidazolidinone **68** sur la production de TNF de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) pré-incubés pendant 24 heures avec le composé **68** puis lavés et stimulés par la PHA ou l'OKT3.

2- Marquage intracytoplasmique du TNF- α et de l'IFN- γ

Pour déterminer plus précisément l'effet de l'imidazolidinone **68** sur la production cytokinique des cellules V γ 9V δ 2 activées de manière TCR-dépendante, des expériences de marquage intracytoplasmique du TNF- α et de l'IFN- γ ont été réalisées dans un second temps. Elles permettent de doser de façon beaucoup plus fine les cytokines produites (pourcentage de cellules sécrétrices, intensité de marquage) avant qu'elles soient excrétées dans le milieu.

Les cellules G42 ont été stimulées par des cellules THP1 préalablement incubées avec du pamidronate en présence de l'imidazolidinone **68** à différentes concentrations (25, 50 et

100 μ M). Le pamidronate est un aminobisphosphonate induisant une accumulation intracellulaire d'IPP au sein de la cellule THP1 (cf. B-1) (KUNZMANN, 1999). Ce mode d'activation des V γ 9V δ 2 est plus physiologique que la stimulation par des phosphoantigènes solubles en autoprésentation. L'utilisation de CPA entraîne une meilleure stimulation des V γ 9V δ 2 et évite le phénomène de lyse fratricide.

Les données présentées dans la figure 8 sont représentatives de 3 expériences indépendantes et ont été reproduites avec différents clones.

L'analyse des résultats montre que l'imidazolidinone **68** inhibe de manière dose-dépendante la production de TNF- α et d'IFN- γ par les V γ 9V δ 2 activés (figure 8A).

En ce qui concerne la production de TNF- α , l'inhibition maximale, observée à la dose de 100 μ M est de 77 % (figure 8B).

La production d'IFN- γ est également altérée par la molécule **68**, avec un "plateau" d'inhibition de 65% obtenu à la dose de 50 μ M.

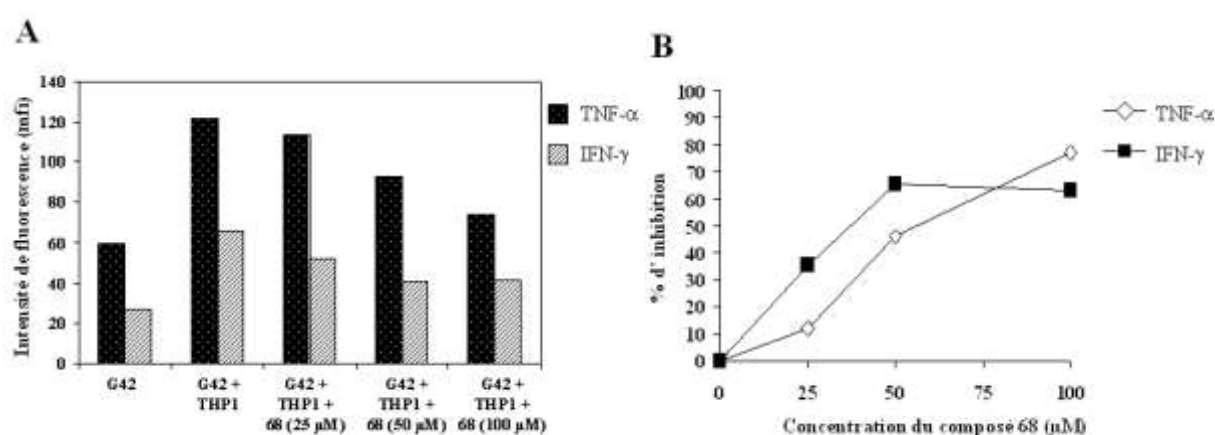


Figure 8 : Effet de l'imidazolidinone **68**, sur la production de TNF- α et d'IFN- γ par des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR42) activés par des cellules THP1 préalablement incubées avec du pamidronate. Les résultats sont exprimés en mfi (A) ou en pourcentage d'inhibition (B).

IV- ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION MEDIÉES PAR LE TCR PAR WESTERN BLOT

Les résultats précédents ont démontré que l'imidazolidinone **68** exerce une activité inhibitrice importante, dose-dépendante, sur la production de TNF- α et d'IFN- γ par des lymphocytes T humains $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, activés de manière TCR-dépendante (phosphoantigènes, anti-CD3). Nous avons donc émis l'hypothèse que le composé **68** pourrait agir en inhibant une des voies de signalisation médiées par le TCR participant à la synthèse du TNF- α et de l'IFN- γ .

Les lymphocytes T activés de manière TCR-dépendante produisent de nombreuses cytokines dont l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ . Trois voies de signalisation coopèrent pour induire la synthèse de ces cytokines : la voie de la PKC θ , celle de la calcineurine et la voie des MAP-kinases (cf. introduction) (CRABTREE, 1994). L'engagement de ces voies, suite à la stimulation du complexe TCR/CD3 induit l'activation de nombreuses enzymes en cascade ce qui aboutit à la transcription, puis la traduction de nombreux gènes d'activation précoce. Ces gènes codent pour la synthèse de nombreuses protéines intracellulaires et de surface ainsi que pour une grande variété de cytokines. En fonction des cytokines, les voies de signalisation engagées, ainsi que leur contribution respective, peuvent différer. En ce qui concerne le TNF- α et l'IFN- γ , les voies de la calcineurine et du NF κ B coopèrent avec celle des MAP kinases pour initier la transcription puis la traduction des gènes codant pour ces cytokines. Au sein des lymphocytes T $\alpha\beta$, la synthèse de TNF- α est dépendante de l'activation des voies de signalisation des ERK1/2, des JNK et de la p38 MAP kinase. Le blocage simultané de ces trois voies inhibe l'activation du promoteur du gène codant pour la synthèse du TNF- α (HOFFMEYER, 1999).

Les modalités de transduction du signal médié par le TCR $\gamma\delta$ des lymphocytes V γ 9V δ 2 ne sont pas encore totalement élucidées mais plusieurs études ont démontré que la production de TNF- α au sein de ces cellules était dépendante de l'activation de deux voies de signalisation : celle des ERK1/2 et celle de la p38 MAP kinase (LAFONT, 2000 - LAFONT, 2001). Il semble, par contre, que dans ces cellules la voie des JNK ne soit pas impliquée dans la synthèse du TNF- α (LAFONT, 2000).

Le composé **68** inhibant de manière très importante la production de TNF- α par les lymphocytes T (V γ 9V δ 2 et $\alpha\beta$) activés *via* leur TCR, nous avons, par conséquent, dans un

premier temps, porté plus particulièrement notre attention sur l'effet de l'imidazolidinone **68** sur les voies des ERK1/2 et de la p38 MAP kinase qui jouent un rôle très important dans la transcription et la synthèse de cette cytokine au sein des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et $\alpha\beta$.

1- Etude des voies ERK1/2 et p38 MAP kinase

L'activation des voies ERK1/2 et p38 a pour conséquence une augmentation de l'état de phosphorylation de ces kinases. Nous avons analysé l'effet du composé **68**, après activation *via* le TCR, sur le niveau de phosphorylation de ces enzymes par Western Blot, en utilisant des anticorps reconnaissant de manière spécifique la forme phosphorylée de ces enzymes. Tous les résultats exposés dans cette partie sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

Nous avons tout d'abord réalisé ces études sur un clone de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (clone GR72) qui a été stimulé avec un anticorps monoclonal anti-CD3, l'UCHT1, à différentes doses (0,1, 1 ou 10 μ g/mL) ou avec de la PMA (0,1 μ M) pendant 10 minutes en présence ou non de l'imidazolidinone **68** à la dose de 100 μ M.

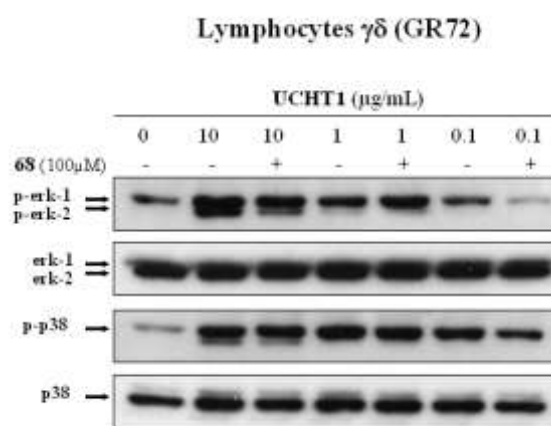


Figure 9 : Effet de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) sur la phosphorylation des ERK1/2 et de la p38 MAP kinase au sein de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) activés par un anti-CD3 (UCHT1)

Comme le montre la figure 9, la molécule **68** entraîne une inhibition modeste mais significative de la phosphorylation des deux isoformes de ERK quelque soit la dose d'UCHT1 utilisée. Cet effet est néanmoins plus visible aux doses les moins saturantes. De plus, en présence de l'inhibiteur, la phosphorylation de ERK-2 est très faible voire quasiment inexistante. L'imidazolidinone **68** ne semble, en revanche, pas exercer d'activité sur la

phosphorylation de la p38 qui reste inchangée en présence de la molécule à la dose de 100 μ M.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'activité inhibitrice observée sur les ERK1/2 était maintenue lorsque les lymphocytes T V γ 9V δ 2 étaient stimulés de manière antigénique par le BrHPP (modèle plus physiologique).

Lafont *et al.* ont observé que la cinétique de phosphorylation des ERK1/2 au sein des V γ 9V δ 2 activés par l'IPP était différente de celle induite par un anticorps anti-CD3 (LAFONT, 2001). Cette équipe a ainsi démontré que la phosphorylation de ces kinases débutait après 2 heures de stimulation par l'IPP contre seulement 5 minutes avec un anti-CD3. La cinétique observée avec ce phosphoantigène n'est donc pas la même : l'activation de ces kinases est largement retardée et dure beaucoup plus longtemps (jusqu'à 4 à 5 heures contre 30 minutes avec un anti-CD3).

Avant de tester notre inhibiteur sur le modèle V γ 9V δ 2/BrHPP, nous avons donc effectué une cinétique de phosphorylation des ERK1/2 en stimulant des GR72 avec du BrHPP (3 μ M) pendant différents temps (de 5 minutes à 5 heures). Nous avons fait parallèlement, en contrôle, une cinétique sur un clone de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ (clone A4.5) stimulé avec le peptide spécifique (BMLF1 à 21 μ M) en autoprésentation ou avec de la PMA (0,1 μ M).

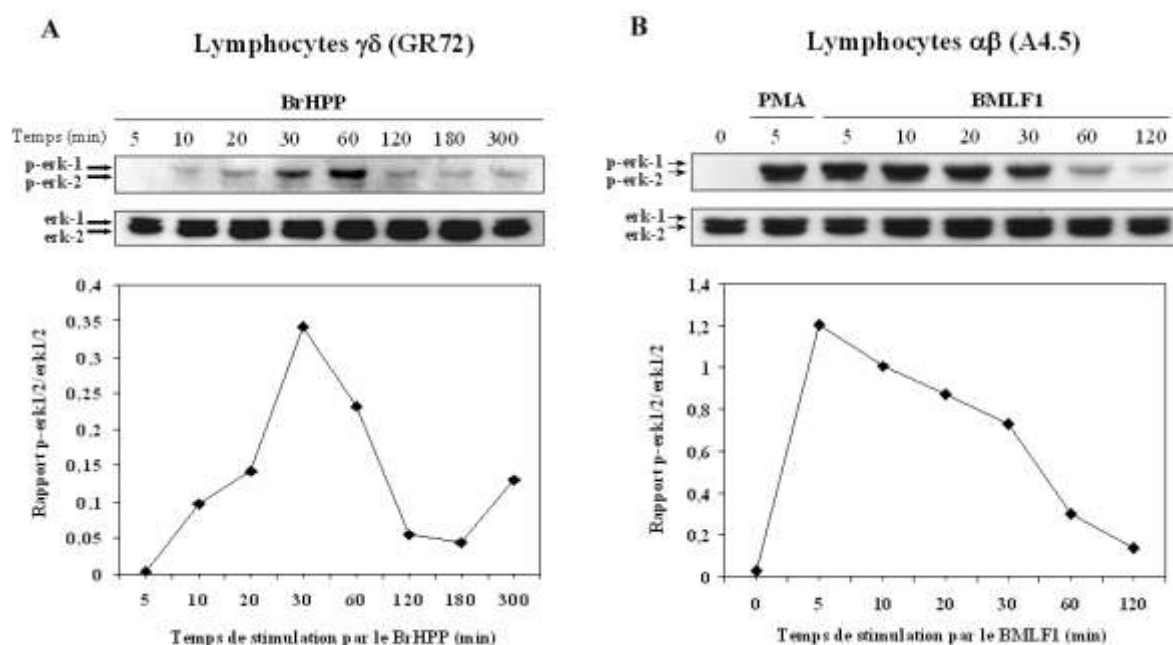


Figure 10 Cinétique de phosphorylation des ERK1/2 au sein de lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP (3 μ M) (A) ou au sein de de lymphocytes T $\alpha\beta$ (A4.5) stimulés par leur peptide spécifique (BMLF1, 21 μ M) en autoprésentation.

Comme le montre la figure 10A, la phosphorylation des ERK1/2 débute aux alentours de 20 minutes de stimulation et est maximale entre 30 et 60 minutes. Elle est donc largement retardée dans le temps par rapport à ce qui est observé avec l'anti-CD3, pour lequel un signal très intense apparaît après 10 minutes de stimulation (figure 9 et figure 11) et par rapport à la cinétique obtenue en stimulant un clone de lymphocytes T $\alpha\beta$ (A4.5) avec son peptide spécifique (figure 10B). Dans ce dernier cas, en effet, la phosphorylation des ERK1/2 est maximale au bout de 5 minutes de stimulation avec le peptide et est pratiquement terminée au bout d'une heure.

Ces données viennent donc compléter les résultats observés par Lafont *et al.* avec l'I'PP. Elles confirment un retard dans la cinétique de phosphorylation des protéines tyrosine kinases, impliquées dans les cascades de signalisation médiées par le TCR, au sein des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par un phosphoantigène, par rapport à ce qui est observé avec un anti-CD3 ou avec des lymphocytes T $\alpha\beta$ activés par un peptide.

Suite à ces observations, nous avons stimulé des GR72, en présence ou non de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) avec du BrHPP (3 μ M) pendant 30 ou 60 minutes, de l'UCHT1 (10 μ g/mL) pendant 10 minutes ou de la PMA (0,1 μ M) pendant 5 minutes.

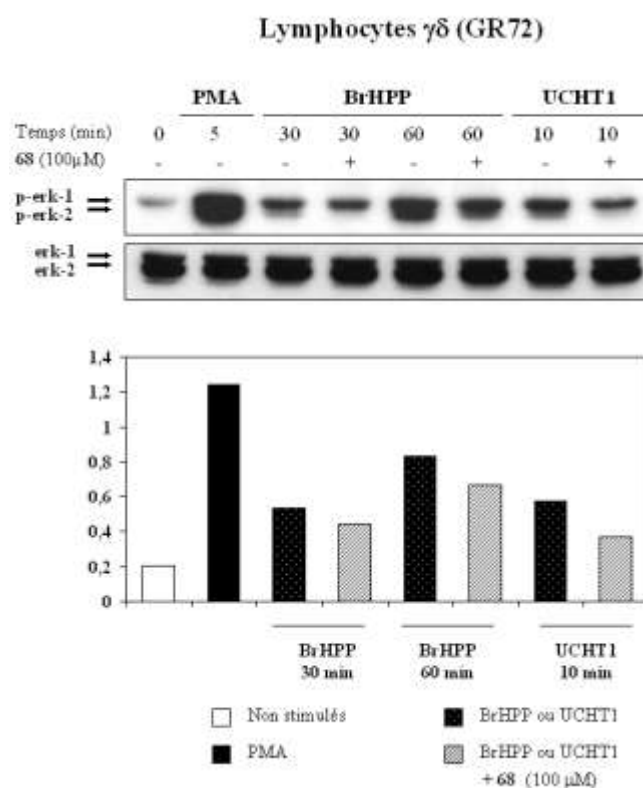


Figure 11 : Effet de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) sur la phosphorylation des ERK1/2 au sein de lymphocytes T V γ 9V δ 2 (GR72) activés par du BrHPP (3 μ M) ou un anti-CD3 (UCHT1, 10 μ g/mL).

Les résultats, exposés dans la figure 11, confirment une activité inhibitrice modeste du composé **68** sur la phosphorylation des ERK1/2 au sein des V γ 9V δ 2 quelque soit leur mode d'activation. Comme dans l'expérience précédente, la phosphorylation résiduelle des ERK-2 en présence de la molécule **68** à 100 μ M est très faible dans toutes les conditions.

Nous avons ensuite voulu confirmer ces résultats sur des lymphocytes T $\alpha\beta$. Pour cela, un clone de lymphocytes T CD8⁺ (clone A4.5) a été stimulé pendant 5 ou 20 minutes, en autoprésentation, avec le peptide qu'il reconnaît de manière spécifique (BMLF1, 21 μ M) ou avec la PMA (0,1 μ M) en présence ou non de l'imidazolidinone **68** à 100 μ M.

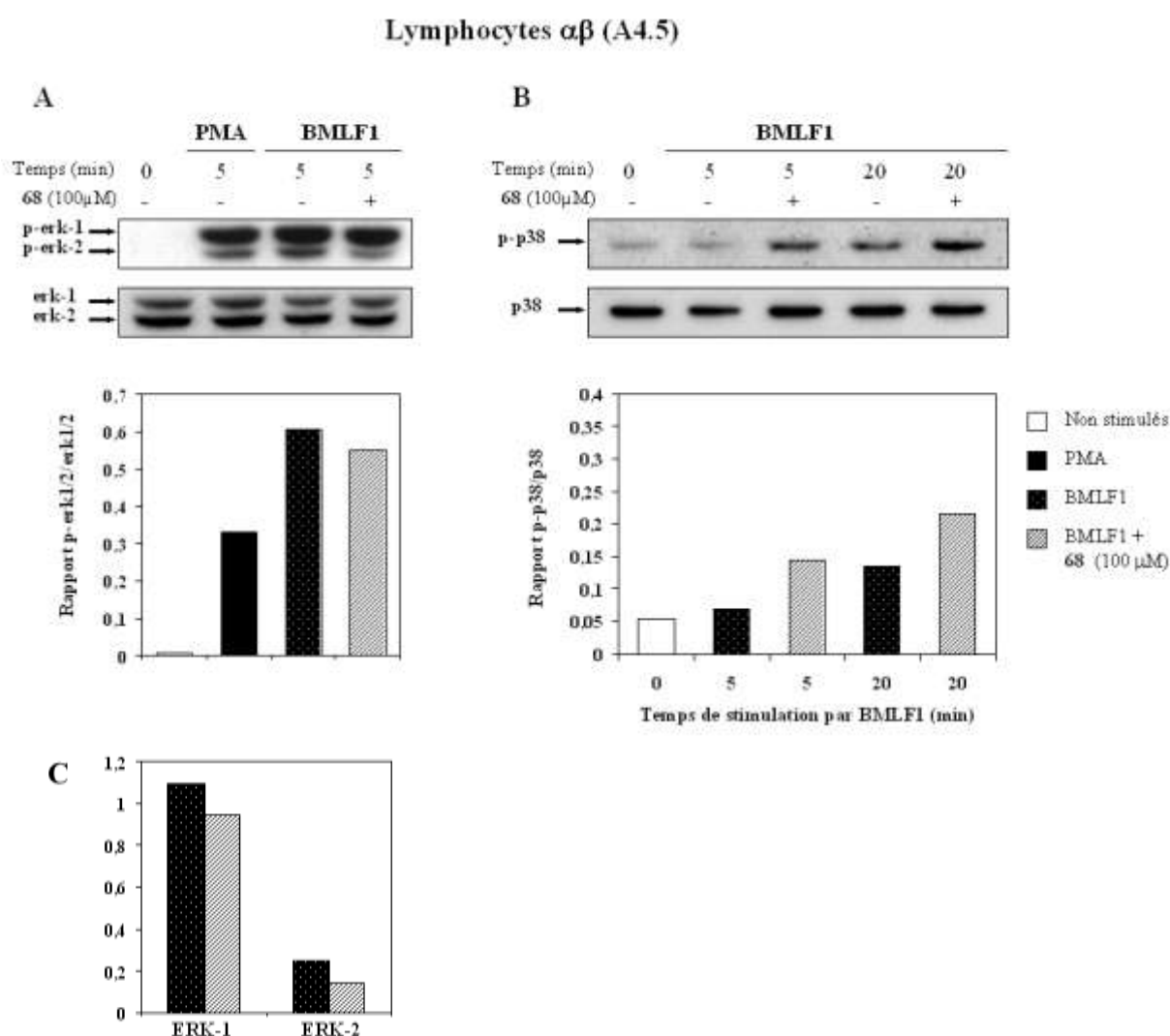


Figure 12 : Effet de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) sur la phosphorylation des ERK1/2 (A) et de la p38 MAP kinase (B) ou au sein de de lymphocytes T $\alpha\beta$ (A4.5) stimulés par leur peptide spécifique (BMLF1, 21 μ M) en autoprésentation. (C) Effet de l'imidazolidinone **68** (100 μ M) sur la phosphorylation de la ERK-1 et de la ERK-2 séparément.

Comme en témoigne la figure 12A, le composé **68** exerce une inhibition globale sur les deux isoformes de ERK qui semble moins prononcée qu'au sein des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Si l'on regarde individuellement le niveau de phosphorylation de la ERK-1 et de la ERK-2 (figure 12C) il semble que le composé **68** exerce une inhibition sur les deux isoenzymes.

Enfin, la figure 12B montre que la molécule **68** n'a pas d'effet sur l'état d'activation de la p38 MAP kinase au sein des lymphocytes T $\alpha\beta$ stimulés par un peptide. Elle semble même augmenter légèrement sa phosphorylation.

D- DISCUSSION

Nos travaux avaient pour objectif principal la détermination de nouvelles molécules immunosuppressives agissant par un mécanisme d'action original et présentant une bonne tolérance. Nous avons ainsi identifié une molécule chef de file, l'imidazolidinone **68**.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse montrent que cette molécule inhibe, de façon dose-dépendante, la prolifération de lymphocytes T humains *in vitro* stimulés *via* leur TCR que ce soient des tris CD4⁺ stimulés de manière allogénique ou des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés, au sein de PBMC, par un phosphoantigène (BrHPP). Dans tous les cas, à la dose de 100 μ M, le composé **68** entraîne entre 90 et 100 % d'inhibition de la prolifération lymphocytaire T. Cet effet est, de plus, beaucoup plus prononcé lorsque l'inhibiteur est administré au moment de l'initiation de la stimulation TCR. En témoigne le pourcentage d'inhibition (à t = 9 jours) de la prolifération, au sein de PBMC, des cellules T V γ 9V δ 2 activées par le BrHPP qui passe de 96 % à 32 % lorsque le composé **68** est administré 3 jours après la stimulation. Ces résultats sont confirmés par les expériences réalisées avec le CFSE (LYONS, 1994). En effet, lorsqu'elle est ajoutée pendant la phase d'activation, l'imidazolidinone **68** inhibe de façon dose-dépendante l'entrée en cycle de division cellulaire des V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP au sein de PBMC. Cet effet disparaît totalement quand la molécule est administrée une journée après la stimulation TCR. Ces études montrent que l'inhibiteur **68** a peu d'effet sur la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 une fois que ces cellules ont été stimulées de manière antigénique par les phosphoantigènes. Selon ces résultats, il semble que le composé **68** n'ait pas d'action sur le cycle cellulaire et qu'il agisse plutôt de façon précoce, au moment de l'activation antigénique.

Afin de contrôler que les propriétés immunomodulatrices de cette molécule n'étaient pas le résultat d'une toxicité du composé à l'égard des lymphocytes T, nous avons analysé *in vitro* l'influence de l'imidazolidinone **68** sur l'expression par les cellules T d'un marqueur précoce de l'apoptose : l'Apo2.7 (ZHANG, 1996 - ROTH, 1996). Les résultats montrent qu'à la dose de 100 μ M, le composé **68** n'entraîne pas d'augmentation significative de l'expression de ce marqueur ce qui semble appuyer l'hypothèse d'une activité immunomodulatrice de cette molécule à 100 μ M. Ces tests ont, en outre, permis de mettre en évidence un effet toxique apparaissant au-delà de 400 μ M ce qui semble présager du fait que cette molécule possède un bon profil de toxicité avec une marge thérapeutique raisonnable.

Dans un second temps, nous avons analysé l'effet de l'inhibiteur **68** sur la production cytokinique de lymphocytes T (V γ 9V δ 2 et lymphocytes T conventionnels $\alpha\beta$) consécutive à une activation antigénique. Nous avons ainsi démontré que l'imidazolidinone **68** inhibe, de manière dose-dépendante, la production de TNF- α et d'IFN- γ par des lymphocytes T humains (V γ 9V δ 2 et $\alpha\beta$) activés *via* leur TCR (par des phosphoantigènes ou un anti-CD3). En ce qui concerne la production de TNF- α , l'inhibition maximale (entre 80 et 100% d'inhibition) est observée à la dose de 100 μ M alors que pour l'IFN- γ , un plateau d'inhibition de 65% est obtenu à la dose de 50 μ M.

Ces résultats très intéressants nous ont ensuite incité à émettre l'hypothèse que l'imidazolidinone **68** pourrait inhiber une des voies de signalisation médiées par le TCR et impliquée dans la synthèse de cytokines et notamment du TNF- α et de l'IFN- γ . Trois voies coopèrent au sein des lymphocytes T pour induire la synthèse de ces cytokines (CRABTREE, 1994) : la voie de la PKC θ , avec le facteur NF κ B (JONGENEEL, 1995), celle de la calcineurine, avec le NFAT (KIANI, 2001 – TSAI, 1996) et la voie des MAP kinases, avec le facteur AP-1 (HOFFMEYER, 1999). Nous avons décidé d'étudier dans un premier temps la voie des MAP kinases. Au sein des lymphocytes T, la production de TNF- α est dépendante des voies des ERK1/2 et de la p38 MAP kinase (HOFFMEYER, 1999 - LAFONT, 2000 - LAFONT, 2001). La voie des JNK, impliquée dans la synthèse du TNF- α par les lymphocytes T $\alpha\beta$ (HOFFMEYER, 1999) ne semble pas l'être au sein des V γ 9V δ 2 (LAFONT, 2000). L'imidazolidinone **68** inhibant de manière très importante la production de TNF- α par des lymphocytes T (V γ 9V δ 2 et $\alpha\beta$) activés *via* leur TCR, nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'étude des voies ERK1/2 et p38 MAP kinases par Western Blot.

Nous avons ainsi démontré que l'imidazolidinone **68**, à la dose de 100 μ M, exerce une inhibition significative mais modeste sur la phosphorylation des deux isoformes de ERK au sein de différents types de lymphocytes T. Cette activité a été observée sur des cellules T V γ 9V δ 2 activées par un anti-CD3 (UCHT1) ou un phosphoantigène (BrHPP) et sur des lymphocytes T $\alpha\beta$ activés de manière antigénique, par leur peptide spécifique en autoprésentation. En revanche, aucune inhibition de la phosphorylation de la p38 MAP kinase n'a pu être observée que ce soit au sein de V γ 9V δ 2 activés par un anti-CD3 ou de lymphocytes T $\alpha\beta$ activés par leur peptide spécifique en autoprésentation.

Les kinases ERK-1 et ERK-2 sont activées par phosphorylation par des tyrosine-thréonine kinases MEK 1 et MEK 2, qui sont elles-mêmes activées par la sérine-thréonine kinase Raf (ENGLISCH, 1999 - ROBINSON, 1997 - COBB, 1995). La p38 MAP kinase est activée par des MAP kinases kinases (MKK3 et MKK6) elles-mêmes phosphorylées par une MAP kinase kinase kinase nommée MEKK1 (ONO, 2000 - LIN, 2001). L'activation de Raf est effectuée par une protéine G monomérique de la famille Ras qui est elle-même activée suite à la stimulation du TCR par un antigène (cf. introduction). MEKK1 peut-être activée par Ras mais également par des GTPases telles que Rac.

L'inhibiteur **68** entraîne une inhibition de la phosphorylation des ERK1/2 mais pas de la p38. Il n'agit donc probablement pas en amont de Ras car il y aurait des répercussions sur la voie de la p38. Or la phosphorylation de la p38 n'est pas altérée et est même légèrement augmentée, au sein des lymphocytes T $\alpha\beta$, en présence du composé **68**.

L'hypothèse d'une action inhibitrice directe de l'imidazolidinone **68** sur Raf ou MEK 1 ou 2 ne peut pas être complètement exclue. Néanmoins, si tel est le cas, cet effet est très modeste car il entraîne une faible inhibition de la phosphorylation des ERK1/2 qui ne peut pas expliquer les effets très importants de la molécule sur la production de TNF- α et d'IFN- γ et sur la prolifération lymphocytaire T.

Une hypothèse plus envisageable serait que la molécule agit sur une autre voie de signalisation impliquée dans la production cytokinique du lymphocyte T après activation antigénique, qui interagirait avec la voie des ERK1/2. L'activité observée sur la voie des ERK1/2 serait alors la conséquence d'un effet collatéral de l'inhibiteur et non son mécanisme d'action principal.

Les PKC sont des sérine-thréonine kinases impliquées dans la prolifération, la production cytokinique et la down-régulation du TCR des cellules T (SZAMEL, 1995 - KEENAN, 1997 - BAIER, 2003). Il existe différentes isoenzymes de PKC classées en trois grandes catégories : les PKC classiques (cPKC α , β , γ), les nouvelles PKC (nPKC δ , ϵ , η , θ) et les PKC atypiques. Les isoenzymes classiques et nouvelles répondent au diacylglycérol (DAG) mais seules les PKC classiques nécessitent la présence de calcium pour être activées de manière optimale. Ces enzymes jouent un rôle très important dans la signalisation médiée par le TCR suite à une activation antigénique. Elles activent notamment le facteur de transcription NF κ B impliqué dans la transcription de gènes de cytokines.

Plusieurs études ont également mis en avant le rôle des PKC dans la régulation de la voie des ERK des lymphocytes T. Ainsi, différents travaux indiquent que l'activation de Raf médiée par le TCR est dépendante des PKC (SIEGEL, 1990 - PUENTE, 2006). Kolch *et al.* ont également montré que la PKC- α serait capable d'activer Raf-1 directement par phosphorylation (KOLCH, 1993). Les PKC classiques (cPKC) agiraient donc sur l'activation des ERK1/2 en aval de Ras (PUENTE, 2006).

D'autres études ont démontré le rôle des nouvelles PKC dans l'activation de la voie des ERK par action en amont de Ras. Roose *et al.* ont ainsi démontré, qu'au sein du lymphocyte T, l'activation de Ras suite à une activation TCR pouvait se faire de deux façons par le biais de deux RasGEF différentes : Sos et RasGRP1 (ROOSE, 2005) (cf. introduction). Le deuxième mode d'activation de Ras fait intervenir la génération de DAG par la PLC γ (cf. introduction) suite à une stimulation TCR. Le DAG recrute la PKC- θ et la RasGRP1 à la membrane par leur domaine C1. Les nPKC phosphorylent alors RasGRP1 ce qui augmente son activité GEF et lui permet de convertir le Ras-GDP en Ras-GTP actif (Fig. 1). Cette voie d'activation serait donc dépendante des nPKC.

Pour toutes ces raisons, nous envisageons donc de poursuivre ces travaux en testant l'activité de l'inhibiteur **68**, au sein de différents types de lymphocytes T activés de manière TCR-dépendante, sur différentes isoenzymes de PKC classiques, telles que cPKC- α et cPKC- β , et de nouvelles PKC notamment la nPKC- θ . Le blocage de l'une de ces enzymes par l'imidazolidinone **68** pourrait expliquer l'effet de la molécule sur la production cytokinique et la prolifération lymphocytaire T ainsi que l'inhibition modeste de la voie ERK1/2 observée, ces kinases pouvant également être activées, de façon indépendante des PKC, par la voie faisant intervenir LAT et Sos.

Une grande partie de ces études a été réalisée sur des lymphocytes T V γ 9V δ 2. Pour les besoins de ces expériences nous avons confirmé les résultats obtenus par Lafont *et al.* avec l'IPP (LAFONT, 2001). Nous avons ainsi démontré un retard dans la cinétique de phosphorylation des protéines tyrosine kinases, impliquées dans les cascades de signalisation médiées par le TCR, au sein des lymphocytes T V γ 9V δ 2 activés par différents phosphoantigènes tels que le BrHPP et l'HDMAPP (données non présentées), par rapport à ce qui est observé avec un anti-CD3 ou avec des lymphocytes T $\alpha\beta$ activés par un peptide. En effet, la phosphorylation des ERK1/2 débute au bout d'environ 20 minutes de stimulation des

V γ 9V δ 2 avec le BrHPP, au bout d'une heure avec l'HDMAPP et de 2 heures avec l'IPP (résultats avec l'IPP identiques à ceux obtenus par Lafont *et al.* sur des lignées V γ 9V δ 2), (données non présentées) contrairement à ce qui peut être observé en stimulant les V γ 9V δ 2 avec un anti-CD3 ou avec des lymphocytes T $\alpha\beta$ stimulés avec leur peptide spécifique. En effet, dans ces situations la phosphorylation des ERK est observée au bout de 5 minutes.

Il a été démontré que suite à une stimulation phosphoantigénique, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 se mettent à produire très rapidement (dès 5 minutes de stimulation) de fortes quantités de TNF- α (LANG, 1995). Le retard de phosphorylation des protéines tyrosine kinases (20 minutes à 2 heures de stimulation) impliquées dans la production de cytokines et notamment de TNF- α semble à première vue contradictoire avec ces données. Le relargage précoce de cette cytokine serait peut-être induit par une voie de signalisation différente de celles décrites précédemment.

Le retard de signalisation observé est peut-être le reflet d'un contexte de stimulation sous-optimal lorsque les cellules T V γ 9V δ 2 sont activées par un phosphoantigène. Le TCR et l'unité de signalisation intracellulaire ne semblent pas impliqués étant donné que l'activation du TCR $\gamma\delta$ par un anti-CD3 induit une phosphorylation très rapide (5 minutes) des protéines tyrosine kinases. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons d'analyser l'effet de différents peptides d'affinité différente (peptides mutés), disponibles au laboratoire, sur la cinétique de transduction du signal de lymphocytes T $\alpha\beta$ spécifiques de ces peptides.

Pour tenter de mieux comprendre les modalités d'activation des V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes, nous envisageons également de relier ces données à l'analyse des caractéristiques du flux calcique (vidéomicroscopie avec marquages Fura-2) après activation phosphoantigénique. Nous prévoyons parallèlement d'identifier de manière précise les différents types de kinases impliquées dans la transduction du signal médié par le TCR gamma delta après activation avec différents phosphoantigènes (IPP, BrHPP et HDMAPP). Enfin, nous envisageons d'examiner l'influence de la puissance du phosphoantigène sur la cinétique de transduction du signal et la modulation du TCR en utilisant des phosphoantigènes naturels (IPP, HDMAPP) ou synthétiques (BrHPP) de bioactivité différente.

E- CONCLUSION - PERSPECTIVES

Les études pharmacologiques réalisées sur l'imidazolidinone **68** ont confirmé son activité immunosuppressive sur différents types de lymphocytes T humains. Selon les premiers résultats ce composé semble posséder une bonne tolérance et une marge thérapeutique raisonnable. La modeste inhibition de la voie des ERK1/2 exercée par la molécule **68** ne peut pas expliquer complètement ses propriétés inhibitrices très importantes sur la production cytokinique et la prolifération lymphocytaire T.

Des études complémentaires, notamment sur la voie des PKC, sont actuellement en cours pour tenter de déterminer la cible moléculaire de ce composé.

L'identification d'une telle cible permettrait alors d'envisager l'utilisation de la modélisation moléculaire pour réaliser des pharmacomodulations sur cette molécule selon une approche rationnelle afin d'optimiser l'activité de ce composé dans le but de développer un nouvel agent immunosuppresseur.

Ce travail, a également permis de confirmer et d'étendre les résultats de Lafont *et al.* concernant les cinétiques de phosphorylation des protéines tyrosine kinases engagées dans les cascades de signalisation médiées par le TCR V γ 9V δ 2 suite à une stimulation phosphoantigénique. Les résultats, obtenus avec le BrHPP et l'HDMAPP (données non présentées) indiquent que les phosphorylations de ces enzymes sont retardées lorsque le TCR V γ 9V δ 2 est stimulé avec un phosphoantigène par rapport à ce qui est observé avec une activation par un anti-CD3 ou au sein de lymphocytes T $\alpha\beta$ stimulés par un peptide.

La poursuite des travaux sur ces cellules devrait, dans un second temps, fournir des informations sur les modalités d'activation de cette sous-population de lymphocytes T qui présentent une forte réactivité antitumorale et sont impliqués dans différents types de cancers : myélome multiple (GIRLANDA, 2005), cancer du côlon (CORVAISIER, 2005), carcinome rénal (VIEY, 2005) et cancer de la vessie (ALEXANDROFF, 1997). Ces études pourraient ainsi permettre, à terme, d'améliorer l'activation de ces lymphocytes *in vivo* dans le cadre de protocoles immunothérapeutiques en cancérologie.

BIBLIOGRAPHIE

ABDALA, H., ROBERT, J.-M., LE PAPE, P., WIELGOSZ, G., ROBERT-PIESSARD, S.,
LE BAUT, G.

Synthesis and antileishmanial activity of new 1-(pyridin-2-yl)imidazolidin-2-ones derived
from 2-amino-4,6-dimethylpyridine. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **2000**, 50, 479-84.

ACUTO, O., CANTRELL, D.

T cell activation and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, 18, 165-84.

ACUTO, O., MICHEL, F.

CD28-mediated co-stimulation : a quantitative support for TCR signalling. *Nature Rev.
Immunol.* **2003**, 3, 939-51.

ALARCON, G. S.

Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective. *Immunopharmacology.*
2000, 47, 259-71.

ALEXANDROFF, A. B., BLACK, J., BOLLINA, P., ESUVARANATHAN, K., JAMES, K.

Are gamma delta T lymphocytes involved in intravesical bacillus Calmette-Guerin
immunotherapy of bladder cancer ? *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, 25, 363S.

a- ALLISON, A. C., EUGUI, E. M.

The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil.
Springer Semin. Immunopathol. **1993**, 14, 353-80.

b- ALLISON, A. C., KOWALSKI, W. J., MULLER, C. J. ET AL.

Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the
glycosylation of adhesion molecules. *Transplant. Proc.* 1993, 25, 67-70.

ALLISON, A. C., EUGUI, E. M.

Mycophenolate mofetil and its mechanism of action. *Immunopharmacology.* **2000**, 47, 85-
118.

AMLOT, P. L., RAWLINGS, E., FERNANDO, O. N., GRIFFIN, P. J., HEINRICH, G., SCHREIER, M. H., CASTAIGNE, J. P., MOORE, R., SWENY, P.

Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. **1995**, 60, 748-56.

ANDERSON, J. C., NAMLI, H.

Ambiant temperature unsymmetrical biaryl synthesis using Suzuki methodology. *Synlett*. **1995**, 765-6.

BACH, J.-F., CHATENAUD, L.

Immunologie, 4^{ème} édition, *Médecine-Sciences, Flammarion*. **2002**, 130-41.

BAI, L., WANG, J.-X., ZHANG, Y.

Rapid microwave-promoted Suzuki cross-coupling reaction in water. *Green Chemistry*. **2003**, 5, 615-7.

BAIER, G.

The PKC gene module : molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol. Rev.* **2003**, 192, 64-79.

BARNES, P. F., GRISSO, C. L., ABRAMS, J. S., BAND, H., REA, T. H., MODLIN, R. L.

Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. *J Infect Dis.* **1992**, 165, 506-12.

BATTISTINI, L., BORSELLINO, G., SAWICKI, G., POCCIA, F., SALVETTI, M., RISTORI, G., BROSAN, C. F.

Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J. Immunol.* **1997**, 159, 3723-30.

BECKER, Y. T., BECKER, B. N., PIRSCH, J. D.

Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am. J. Transplant.* **2004**, 4, 996-1001.

BEDFORD, R. B., HAZELWOOD (NEEWELCH), S. L., LIMMERT, M. E., ALBISSON, D. A., DRAPER, S. M., SCULLY, P; N., COLES, S. J., HURSTHOUSE, M. B.

Orthopalladated and -platinated bulky triarylphosphite complexes : synthesis, reactivity and application as high-activity catalysts for suzuki and stille coupling reactions. *Chemistry*. **2003**, 9, 3216-27.

BEGLEY, M., GAHAN, C. G., KOLLAS, A. K., HINTZ, M., HILL, C., JOMAA, H., EBERL, M.

The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls $\gamma\delta$ T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* **2004**, 561, 99-104.

BELLER, M., FISHER, H., N, W. A., OFELE, K., KROBMER, C.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1995**, 34, 1848.

BERGSTROM, J. D., BOSTEDOR, R. G., MASARACHIA, P. J., RESZKA, A. A., RODAN, G.
Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 373, 231-41.

BIERER, B. E., BURAKOFF, S. J.
T cell adhesion molecules. *FASEB J.* **1988**, 2, 2584-90.

BOGUSKI, M. S., MCCORMICK, F.
Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. **1993**, 366, 643-54.

BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U., STAHELIN, H.
Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. **1976**, 6, 468-75.

BORIE, D. C., CHANGELIAN, P. S., LARSON, M. J., SI, M.-S., PANIAGUA, R., HIGGINS, J. P., HOLM, B., CAMPBELL, A., LAU, M., ZHANG, S., FLORES, M. G., ROUSVOAL, G., HAWKINS, J., BALL, D. A., KUDLACZ, E. M., BRISSETTE, W. H., ELLIOTT, E. A., REITZ, B. A., MORRIS, R. E.

Immunosuppression by the JAK3 Inhibitor CP-690,550 delays rejection and significantly prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Transplantation*. **2005**, 79, 791-801.

BOULLIER, S., POQUET, Y., DEBORD, T., FOURNIE, J.-J., GOUGEON, M.L.

Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the Vgamma9Vdelta2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV-infected persons. *Eur. J. Immunol.* **1999**, 29, 90-9.

BRICKNER, S. J., HUTCHINSON, D. K., BARBACHYN, M. R., MANNINEN, P. R., ULANOWICZ, D. A., GARMON, S. A., GREGA, K. C., HENDGES, S. K., TOOPS, D. S., FORD, C. W., ZURENKO, G. E.

Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 673-9.

BROCKMEYER, C., ULBRECHT, M., SCHENDEL, D. J., WEISS, E. H., HILLEBRAND, G., BURKHARDT, K., LAND, W., GOKEL, M. J., RIETHMULLER, G., FEUCHT, H. E.

Distribution of cell adhesion molecules (ICAM1, VCAM1, ELAM1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation*. **1993**, 55, 610-5.

BROWN, D. L., BISHOP, D. K., WOOD, S. Y., CEDERNA, P. S.

Short-term anti-CD40 ligand costimulatory blockade induces tolerance to peripheral nerve allografts resulting in improved skeletal muscle function. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, 117, 2250-8.

BROWN, J., JU, S., SHAFER, S.A.

The hydrolysis and cyclization of some phthalamic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4468-72.

BUBECK WARDENBURG, J., PAPPU, R., BU, J. Y., MAYER, B., CHERNOFF, J., STRAUS, D., CHAN, A. C.

Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity*. **1998**, 9, 607-16.

BUDDE, K., SCHUTZ, M., GLANDER, P., PETERS, H., WAISER, J., LIEFELDT, L., NEUMAYER, H. H., BOHLER, T.

FTY720 (fingolimod) in renal transplantation. *Clin. Transplant*. **2006**, 20, 17-24.

BUKOWSKI, J. F., MORITA, C. T., TANAKA, Y., BLOOM, B. R., BRENNER, M. B., BAND, H.

V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol*. **1995**, 154, 998-1006.

BURKLY, L. C., JAKUBOWSKI, A., NEWMAN, B. M., ROSA, M. D., CHI-ROSSO, G., LOBB, R. R.

Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation. *Eur. J. Immunol*. **1991**, 21, 2871-5.

CAMBIER, J. C.

New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today*. **1995**, 16, 110.

CARBONNELLE, D., EBSTEIN, F., RABU, C., PETIT, J.-Y., GREGOIRE, M., LANG, F.

A new carboxamide compound exerts immunosuppressive activity by inhibiting dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol*. **2005**, 35, 546-56.

CARBONNELLE, D., LARDIC, M., DASSONVILLE, A., VERRON, E., PETIT, J.-Y., DUFLOS, M., LANG, F.

Synthetic *N*-pyridinyl(methyl)-indol-3-ylpropanamides as new potential immunosuppressive agents. *Eur. J. Immunol*. **2007**, 42, 686-93.

CARLSON, R. P., BAEDER, W. L., CACCESE, R. G., WARNER, L. M., SEHGAL, S. N.
Effects of orally administered rapamycin in animal models of arthritis and other autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, 685, 86-113.

CARR, S. F., PAPP, E., WU, J. C., NATSUMEDA, Y.
Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27286-90.

CETKOVIC-CVRLJE, M., DRAGT, A. L., UCKUN, F. M.
Prevention of islet allograft rejection in diabetic mice by targeting Janus Kinase 3 with 4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (JANEX-1). *Arzneim.-Forsch.* **2003**, 53, 648-54.

CHAN, A. C., DALTON, M., JOHNSON, R., KONG, G. H., WANG, T., THOMA, R., KUROSAKI, T.
Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO. J.* **1995**, 14, 2499-508.

CHAN, G. L., ERDMANN, G. R., GRUBER, S. A., MATAS, A. J., CANAFAX, D. M.
Azathioprine metabolism : pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J. Clin. Pharmacol.* **1990**, 30, 358-63.

CHANGELIAN, P. S., FLANAGAN, M. E., BALL, D. J., KENT, C. R., MAGNUSON, K. S., MARTIN, W. H., RIZZUTI, B. J. ET AL.
Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor. *Science.* **2003**, 302, 875-8.

CHER, D. J., MOSMANN, T. R.
Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* **1987**, 138, 3688-94.

COBB, M. H., GOLDSMITH, E. J.
How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14843-6.

COLIC, M., STOJIC-VUKANIC, Z., PAVLOVIC, B., ET AL.

Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2003**, 134, 63-9.

COLLEGE UNIVERSITAIRE DES ENSEIGNANTS DE NEPHROLOGIE

Néphrologie, *Ellipses Edition.* **2003**, 295-321.

CONSTANT, P., DAVODEAU, F., PEYRAT, M.-A., POQUET, Y., PUZO, G., BONNEVILLE, M., FOURNIE, J.-J.

Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* **1994**, 264, 267-70.

CORVAISIER, M., MOREAU-AUBRY, A., DIEZ, E., BENNOUNA, J., MOSNIER, J. F., SCOTET, E., BONNEVILLE, M., JOTEREAU, F.

V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J. Immunol.* **2005**, 175, 5481-8.

COSIMI, A. B., CONTI, D., DELMONICO, F. L., PREFFER, F. I., WEE; S. L., ROTHLEIN, R., FAANES, R. COLVIN, R. B.

In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J. Immunol.* **1990**, 144, 4604-12.

COUNCE, C., SMITH, P., BARTER, R., SNELL, G. D.

Strong and weak histocompatibility fine differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann. Surg.* **1956**, 144, 198-204.

CRABTREE, G. R., CLIPSTONE, N. A.

Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 1045-83.

DAMLE, N. K., ARUFFO, A.

Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, 88, 6403-7.

DANTAL, J., SOULILLOU, J.-P.

Cluster-function relationship of rat-anti-mouse P55 IL-2 receptor monoclonal antibodies. *In vitro* studies of CTL-L2 mouse cell line and *in vivo* studies in a delayed-type hypersensitivity model in mice. *Transplantation*. **1991**, 52, 110-5.

DAVIES, S. G., ANDREW, A.

Bifunctional chiral auxiliaries 3 : The synthesis of homochiral 1,3-diols via asymmetric aldol reactions of dialkylboron enolates of 1,3-dipropionyl-trans-4,5-diphenyl-imidazolidin-2-one and aldehydes. *Tetrahedron : Asymmetry*. **1991**, 2, 1001-4.

DAVIES, S. G., MORTLOCK, A. A.

Bifunctional chiral auxiliaries 5 : The synthesis of 1,3-diacylimidazolidine-2-thiones and 1,3-diacylimidazolidin-2-ones from diamines. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 4419-38.

DAVIES, S. G., EVANS, G. B., MORTLOCK, A. A.

Bifunctional chiral auxiliaries 6 : Alkylations of enolates derived from 1,3-diacylimidazolidine-2-thiones and 1,3-diacylimidazolidin-2-ones. *Tetrahedron : Asymmetry*. **1994**, 5, 585-606.

a- DAVODEAU, F., PEYRAT, M. A., HALLET, M. M., GASCHET, J., HOUDE, I., VIVIEN, R., VIE, H., BONNEVILLE, M.

Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *J. Immunol*. **1993**, 151, 1214-23.

b- DAVODEAU, F., PEYRAT, M. A., HALLET, M. M., HOUDE, I., VIE, H., BONNEVILLE, M.

Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur. J. Immunol*. **1993**, 23, 804-8.

DENTON, M. D., REUL, R. M., DHARNIDHARKA, V. R., FANG, J. C., GANZ, P., BRISCOE, D. M.

Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr. Transplant*. **1998**, 2, 6-15.

DENTON, M. D., MAGEE, C. C., SAYEGH, M. H.

Immunosuppressive strategies in transplantation. *The Lancet*. **1999**, 353, 1083-91.

DEVILDER, M. C., MAILLET, S., BOUYGE-MOREAU, I., DONNADIEU, E., BONNEVILLE, M., SCOTET, E.

Potential of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J. immunol.* **2006**, 176, 1386-93.

DURIE, F. H., FOY, T. M., MASTERS, S. R., LAMAN, J. D., NOELLE, R. J.

The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol. Today*. **1994**, 15, 406-11.

ELJAAFARI, A., VAN SNICK, J., VOISIN, A., CORMONT, F., FARRE, A., BIENVENU, J., BERNAUD, J., RIGAL, D., THOMAS, X.

Alloreaction increases or restores CD40, CD54, and/or HLA molecule expression in acute myelogenous leukemia blasts, through secretion of inflammatory cytokines : Dominant role for TNFbeta, in concert with IFNgamma. *Leukemia*. **2006**, 20, 1992-2001.

ENGLISH, J., PEARSON, G., WILSBACHER, J., SWANTEK, J., KARANDIKAR, M., XU, S., COBB, M. H.

New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell. Res.* **1999**, 253, 255-70.

EPINETTE, W. W., PARKER, C. M., JONES, E. L., GREIST, M. C.

Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J Am. Acad. Dermatol.* **1987**, 17, 962-71.

ESPEVIK, T., NISSEN-MEYER, J.

A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods*. **1986**, 95, 99-105.

ESPINOSA, E., BELMANT, C., PONT, F., LUCIANI, B., POUPOT, R., ROMAGNE, F., BRAILLY, H., BONNEVILLE, M., FOURNIE, J.-J.

Chemical Synthesis and biological activity of bromohydrine pyrophosphate, a potent stimulator of human $\gamma\delta$ T cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 18337-44.

EUGUI, E. M., ALMQUIST, S. J., MULLER, C. D., ALLISON, A. C.

Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro : role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand. J. Immunol.* **1991**, 33, 161-73.

FARINA, V., KRISHNAN, B., MARSHALL, D. R., ROTH, G. P.

Palladium-catalysed coupling of arylstannanes with organic sulfonates : a comprehensive study. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5434-44.

FEUERSTEIN, M., LAURENTI, D., BOUGEANT, C., DOUCET, H., SANTELLI, M.

Tetraphosphine/palladium-catalyzed Suzuki cross-coupling with sterically hindered aryl bromides and arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6667-70.

a- FISCH, P., MALKOVSKY, M., BRAAKMAN, E., STURM, E., BOLHUIS, R. L., PRIEVE, A., SOSMAN, J. A., LAM, V. A., SONDEL, P. M.

Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity. *J Exp Med.* **1990**, 171, 1567-79.

b- FISCH, P., MALKOVSKY, M., KOVATS, S., STURM, E., BRAAKMAN, E., KLEIN, B. S., VOSS, S. D., MORRISSEY, L. W., DEMARS, R., WELCH, W. J., ET AL.

Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science.* **1990**, 250, 1269-73.

FLOCH, R.

Contribution à l'étude des dérivés de la dihydro-2,3-1H-isoindolone-1. *Thèse n°57, Université de Nantes, France.* **1979**.

FRANKLIN, T. J., COOK, J. M.

The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J.* **1969**, 113, 515-24.

FUJITA, T., INOUE, K., YAMAMOTO, S., IKUMOTO, T., SASAKI, S., TOYAMA, R., CHIBA, K., HOSHINO, Y., OKUMOTO, T.

Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J. Antibiot.* (Tokyo). **1994**, 47, 208-15.

GABRIEL, S., STELZNER, R.

Ueber vinylamin. *Chem. Ber.* **1895**, 28, 2938.

GAN, L., SEYEDSAYAMDOST, M. R., SHUTO, S., MATSUDA, A., PETSKE, G. A.,

The immunosuppressive agent mizoribine monophosphate forms a transition state analogue complex with inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. **2003**, 42, 857-63.

GASCHET, J., MAHE, B., MILPIED, N., DEVILDER, M.-C., DRENO, B., BIGNON, J. D., DAVODEAU, F., HALLET, M., BONNEVILLE, M., VIE, H.

Specificity of T cells invading the skin during acute graft-vs.-host disease after semiallogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **1993**, 91, 12-20.

GAUEN, L. K., ZHU, Y., LETOURNEUR, F., HU, Q., BOLEN, J. B., MATIS, L. A., KLAUSNER, R. D., SHAW, A. S.

Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs : defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 3729-41.

GIBSON, M.S., BRADSHAW, R.W.

Gabriel synthesis of primary amines. *Angew. Chem. Internat. Edn.* **1968**, 7, 919-30.

GIMMI, C. D., FREEMAN, G. J., GRIBBEN, J. G., GRAY, G., NADLER, L. M.

Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1993**, 90, 6586-90.

GIRLANDA, S., FORTIS, C., BELLONI, D., FERRERO, E., TICOZZI, P., SCIORATI, C., TRESOLDI, M., VICARI, A., SPIES, T., GROH, V., CALIGARIS-CAPPIO, F., FERRARINI, M.

MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes. *Cancer. Res.* **2005**, 65, 7502-8.

GOBER, H. J., KISTOWSKA, M., ANGMAN, L., JENO, P., MORI, L., DE LIBERO, G.
Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* **2003**, 197, 163-8.

GOBIN, S. J., VAN ZUTPHEN, M., WOLTMAN, A. M., VAN DEN ELSEN, P. J.
Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J. Immunol.* **1999**, 163, 1428-34.

GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J., OSBORNE, B. A.
Immunologie, le cours de Janis Kuby, 4^{ème} édition, *W.H. Freeman and Company*. **2000**.

GOODIER, M. R., LUNDQVIST, C., HAMMARSTROM, M. L., TROYE-BLOMBERG, M., LANGHORNE, J.
Cytokine profiles for human V gamma 9+ T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* **1995**, 17, 413-23.

GOSIO, B.
Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Riv Igiene Sanità Pubblica*. **1896**, 7, 825-68.

GUILLONNEAU, C., AUBRY, V., RENAUDIN, K., SEVENO, C., USAL, C., TEZUKA, K., ANEGON, I.
Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation*. **2005**, 80, 546-54.

HANABUCHI, S., KOYANAGI, M., KAWASAKI, A., SHINOHARA, N., MATSUZAWA, A., NISHIMURA, Y., KOBAYASHI, Y., YONEHARA, S., YAGITA, H., OKUMURA, K.
Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, 91, 4930-4.

HATADA, M. H., LU, X., LAIRD, E. R., GREEN, J., MORGENSTERN, J. P., LOU, M., MARR, C. S., PHILLIPS, T. B., RAM, M. K., THERIAULT, K., ET AL.
Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*. **1995**, 377, 32-8.

HEDSTROM, L.

The immunosuppressive agent mizoribine monophosphate forms a transition state analogue complex with inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. **2003**, 42, 857-63.

HEIDEMPERGHER, F., PILLAN, A., PINCIROLI, V., VAGHI, F., ARRIGONI, C., BOLIS, G., CACCIA, C., DHO, L., MCARTHUR, R., VARASI, M.
Phenylimidazolidin-2-one and derivatives as selective 5-HT₃ receptor antagonists and refinement of the pharmacophore model for 5-HT₃ receptor binding. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3369-3380.

HENTZER, B., KOBAYASI, T.

The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **1977**, 71, 157-6.

HERRMANN, M. L., SCHLEYERBACH, R., KIRSCHBAUM, B. J.

Leflunomide : an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology*. **2000**, 47, 273-89.

HOFFMEYER, A., GROSSE-WILDE, A., FLORY, E., NEUFELD, B., KUNZ, M., RAPP, U. R., LUDWIG, S.

Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor α gene expression in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4319-27.

HOLOSHITZ, J., ROMZEK, N. C., JIA, Y., WAGNER, L., VILA, L. M., CHEN, S. J., WILSON, J. M., KARP, D. R.

MHC-independent presentation of mycobacteria to human gamma delta T cells. *Int. Immunol.* **1993**, 5, 1437-43.

HOOGWATER, D. A., REINHARDT, D. N., LIE, T. S., GUNNEWEG, J. J., BEYERMAN, H. C.

Recueil de travaux chimiques de Pays Bas. **1973**, 92, 819-25.

HORAK, V., NOVOTNY, L.

Cleavage of secondary amines by phthalic anhydride method. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1953**, 18, 80-5.

<http://agemed.sante.gouv.fr>

<http://rsb.info.nih.gov/ij>

<http://test.efg.ddo.net>

ISOBE, M., YAGITA, H., OKUMURA, K., IHARA, A.

Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM1 and LFA1. *Science*. **1992**, 255, 1125-7.

JENSEN, K. N., ROOS, G. H. P.

Imidazolidin-2-ones as practical, efficient chiral auxiliaries in Diels-Alder reactions. *Tetrahedron : Asymmetry*. **1992**, 3, 1553-4.

JOMAA, J., FEURLE, K., LUHS, V., KUNZMANN, H. P., TONY, M., HERDERICH, M., WILHELM, M.

V γ 9/ δ 2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1999**, 25, 371-8.

JONGENEEL, C. V.

Transcriptional regulation of the tumor necrosis factor α gene. *Immunobiol.* **1995**, 193, 210-6.

KALTENBACH, R. F., III, PATEL, M., WALTERMIRE, R. E., HARRIS, G. D., STONE, B. R. P., KLABE, R. M., GARBER, S., BACHELER, L. T., CORDOVA, B. C., LOGUE, K., WRIGHT, M. R., ERICKSON-VIITANEN, S. TRAINOR, G. L.

Synthesis, antiviral activity and pharmacokinetics of P1/P1' substituted 3-aminoindazole cyclic urea HIV protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 605-8.

KANE, L. P., LIN, J., WEISS, A.

Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, 12, 242-9.

KATZUNG, G. B.

Pharmacologie fondamentale et clinique, 7^{ème} édition, Piccin Nuova Libreria S.p.A., **2000**, 947-63.

KAZMIERSKI, W. M., FURFINE, E., GRAY-NUNEZ, Y., SPALTENSTEIN, A., WRIGHT, L.

Potent inhibitors of the HIV-1 protease incorporating cyclic urea P1-P2 scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5685-7.

KEENAN, C., LONG, A., KELLEHER, D.

Protein kinase C and T cell function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, 1358, 113-26.

KIANI, A., GARCIA-COZAR, F. J., HABERMANN, I., LAFORSCH, S., AEBISCHER, T., EHNINGER, G., RAO, A.

Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood.* **2001**, 98, 1480-8.

KIM, J.-M., WILSON, T. E., NORMAN, T. C., SCHULTZ, P. G.

Synthesis of a cyclic urea as a nonnatural biopolymer scaffold. *Tetrahedron Letters.* **1996**, 37, 5309-12.

KIM, T. H., RAPOPORT, H.

2-imidazolidin-2-ones from 1,2-amino alcohols. Application to the synthesis of a 2-imidazolidinone analogue of pilocarpine. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3699-702.

KIM, T. H., LEE, G.-J.

Regiocontrolled cyclization reaction of *N*-(2-hydroxyethyl)ureas by transfer of activation : One-pot synthesis of 2-imidazolidinones. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2941-3.

KINO, T., HATANAKA, H., MIYATA, S., INAMURA, N., NISHIYAMA, M., YAJIMA, T., GOTO, T., OKUHARA, M., KOHSAKA, M., AOKI, H.

FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1987**, 40, 1256-65.

KISSMEYER-NIELSEN, F., OLSEN S., PETERSEN, V. P., FJELDBORG, O.

Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. **1966**, 2, 662-5.

KNECHTLE, S. J., PIRSH, J.D., FECHNER, J. JR., BECKER, B. N., FRIEDL, A., COLVIN, R. B., LEBECK, L. K., CHIN, L. T., BECKER, Y. T., ODORICO, J. S., D'ALESSANDRO, A. M., KALAYOGLU, M., HAMAWY, M. M., HU, H., BLOOM, D. D., SOLLINGER, H. W.

Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation : results of a pilot study. *Am. J. Transplant.* **2003**, 3, 722-30.

KNECHTLE, S. J.

Campath-1H in renal transplantation : The University of Wisconsin experience. *Surgery*. **2004**, 136, 754-60.

KOBAYASHI, H., TANAKA, Y., YAGI, J., TOMA, H., UCHIYAMA, T.

Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* **2001**, 50, 115-24.

KOLCH, W., HEIDECKER, G., KOCHS, G., HUMMEL, R., VAHIDI, H., MISCHAK, H., FINKENZELLER, G., MARME, D., RAPP, U. R.

Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*. **1993**, 364, 249-52.

KONNO, Y., NATSUMEDA, Y., NAGAI, M., YAMAJI, Y., OHNO, S., SUZUKI, K., WEBER, G.

Expression of IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 506-9.

KOYAMA, H., TSUJI, M.

Genetic and biochemical studies on the activation and cytotoxic mechanism of bredinin, a potent inhibitor of purine biosynthesis in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, 32, 3547-53.

KUDLACZ, E., PERRY, B., SAWYER, P., CONKLYN, M., MCCURDY, S., BRISSETTE, W., FLANAGAN, M., CHANGELIAN, P.

The novel JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent immunosuppressive agent in various murine models. *Am. J. Transplant.* **2004**, 4, 51-7

KUNZMANN, V., BAUER, E., WILHELM, M.

Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **1999**, 340, 737-8.

KURIHARA, M., ROUF, A. S. S., KANSUI, H., KAGECHIKA, H., OKUDA, H., MIYATA, N.

Design and synthesis of cyclic urea compounds : a pharmacological study for retinoidal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4131-4.

KUSUMI, T., TSUDA, M., KATSUNUMA, T., YAMAMURA, M.

Dual inhibitory effect of bredinin. *Cell. Biochem. Funct.* **1989**, 7, 201-4.

LAEMMLI, U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, 227, 680-5.

LAFONT, V., LIAUTARD, J., GROSS, A., LIAUTARD, J.-P., FAVERO, J.

Tumor necrosis factor- α production is differently regulated in $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 19282-7.

LAFONT, V., LIAUTARD, J., SABLE-TEYCHENE, M., SAINTE-MARIE, Y., FAVERO, J.

Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 15961-7.

LANG, F., PEYRAT, M. A., CONSTANT, P., DAVODEAU, F., DAVID-AMELINE, J., POQUET, Y., VIE, H., FOURNIE, J.-J., BONNEVILLE, M.

Early activation of human V gamma 9 V delta 2 T cell broad toxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol.* **1995**, 154, 5986-94.

LANG, F., CARBONNELLE, D., PETIT, J.-Y., ROBERT, J.-M.

French Patent, n° 01.16443. **2001**.

LECHLER, R. I., SYKES, M., THOMSON, A. W., TURKA, L. A.

Organ transplantation – how much of the promise has been realized ? *Nat. Med.* **2005**, 11, 605-13.

LI, G. Y.

The first phosphine oxide ligand precursors for transition metal catalyzed cross-coupling reactions: C-C, C-N, and C-S bond formation on unactivated aryl chlorides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1513-6.

LI, G. Y.

Highly active, air-stable palladium catalysts for the C-C and C-S bond-forming reactions of vinyl and aryl chlorides: use of commercially available [(t-Bu)₂P(OH)]₂PdCl₂, [(t-Bu)₂P(OH)PdCl₂](₂), and [[(t-Bu)₂PO...H...OP(t-Bu)₂]PdCl₂](₂) as catalysts. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3643-50.

LIBBY, P., POBER, J. S.

Chronic rejection. *Immunity.* **2001**, 14, 387-97.

LIGHTBODY, J. J., ROSENBERG, J. J.

Antibody dependent cell mediated cytotoxicity in prospective kidney transplant recipients. *J. Immunol.* **1974**, 112, 890-6.

LIN, H., BOLLING, S. F., LINSLEY, P. S., WEI, R. Q., GORDON, D., THOMPSON, C. B., TURKA, L. A.

Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J. Exp. Med.* **1993**, 178, 1801-6.

LIN, J., WEISS, A.

T cell receptor signalling. *J. Cell. Sci.* **2001**, 114, 243-4.

LINSLEY, P. S., BRADY, W., URNES, M., GROSMIRE, L. S., DAMLE, N. K., LEDBETTER, J. A.

CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation B7. *J. Exp. Med.* **1991**, 174, 561-9.

LINSLEY, P. S., LEDBETTER, J. A.

The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, 11, 191-212.

LITTKE, A. F., FU, G. C.

A convenient and general method for Pd-catalyzed Suzuki cross-couplings of aryl chlorides and arylboronic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3387-8.

LITTKE, A. F., DAI, C., FU, G. C.

Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4020-8.

LITTKE, A. F., FU, G. C.

Palladium-catalyzed coupling reactions of aryl chlorides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4176-211.

LIU, J., FARMER, J. D. JR., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., SCHREIBER, S. L.

Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. **1991**, 66, 807-15.

LIU, Z., SUN, Y., XI, Y.

Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* **1993**, 177, 1643-50.

LOWRY, R. P., GURLEY, K. E.

Immune mechanisms in organ allograft rejection. III. Cellular and humoral immunity in rejection of organ allografts transplanted across MHC subregion disparity RT1.B (RT1.D). *Transplantation*. **1983**, 36, 405-11.

LOWRY, R. P., MARGHESCO, D. M., BLACKBURN, J. H.

Immune mechanisms in organ allograft rejection. VI. Delayed-type hypersensitivity and lymphotoxin in experimental renal allograft rejection. *Transplantation*. **1985**, 40, 183-8.

LUTZ, C., BLEICHER, K. H.,

Multipin solid-phase synthesis of biaryls via Suzuki cross-coupling reaction of aryltriflates. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 2211-4.

LYONS, A. B., PARISH, C. R.

Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. **1994**, 171, 131-7.

MACHADO, A. L., LIMA, L. M., ARAUJO-JR, J. X., FRAGA, C. A. M., KOATZ, V. L. G., BARREIRO, E. J.

Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2005**, 15, 1169-72.

MALE, D.

Immunologie, aide mémoire illustré, 3^{ème} édition, *De Boeck Université Paris*. **1999**.

MALISSEN, B., MALISSEN, M.

Functions of TCR and pre-TCR subunits : lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, 383.

MARRACK, P., KAPPLER, J.

T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature (Lond.)*. **1988**, 322, 840-3.

MARTEL, R. R., KLICIUS, J., GALET, S.

Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1977**, 55, 48-51.

MASON, D.

The roles of T cell subpopulations in allograft rejection. *Transplant. Proc.* **1988**, 20, 239-42.

MATIS, L.A., SORGER, S.B., MCELLIGOTT, D.L., FINK, P.J., HEDRICK, S.M.

The molecular basis of alloreactivity in antigen specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones. *Cell*. **1987**, 51, 59-69.

MATOSIUK, D., KULINSKI, T., TKACZYNSKI, T.

Synthesis of new 1-aryl-3-piperidinylcarbonylimidazolidine-2-ones and -2-thiones. *Acta. Pol. Pharm.* **1996**, 53, 75-77.

MATSUDA, S., KOYASU, S.

Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*. **2000**, 47, 119-25.

MATSUDA, S., KOYASU, S.

Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. *Curr. Top. Med.* **2003**, 31, 1358-67.

MAYER, P., BRUNEL, P., CHAPLAIN, C., PIEDECOQ, C., CALMEL, F., SCHAMBEL, P., CHOPIN, P., WURCH, T., PAUWELS, P. J., MARIEN, M., VIDALUC, J.-L., IMBERT, T.

New substituted 1-(2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin-2-ylmethyl)piperidin-4-yl derivatives with α_2 -adrenoceptor antagonist activity. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3653-64.

MEHLING, A. GRABBE, S., VOSKORT, M. ET AL.

Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Immunol.* **2000**, 165, 2374-81.

MEIER-KRIESCHE, H. U., SCHOLD, J. D., KAPLAN, B.

Long-term renal allograft survival : have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies ? *Am. J. Transplant.* **2004**, 4, 1289-95.

MIAO, W., CHAN, T. H.,

Exploration of ionic liquids as soluble supports for organic synthesis. Demonstration with a Suzuki coupling reaction. *Org. Let.* **2003**, 5, 5003-5.

MICHELS, J. G., GEVER, G.

Chemotherapeutic nitrofurans. IV. Some derivatives of 1-amino-2-imidazolidinone, 1-amino-2-pyrrolidinone and 3-amino-2-thiazolidinone. *J. Med. Pharm. Chem.* **1956**, 78, 5349-51.

MINO, T., SHIRAE, Y., SAKAMOTO, M., FUJITA, T.

Phosphine-free hydrazone-Pd complex as the catalyst precursor for a Suzuki-Miyaura reaction under mild aerobic conditions. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2191-4.

MITSUNOBU, O., WADA, M., SANO, T.

Stereospecific and stereoselective reactions. I. Preparation of amines from alcohols. *J. Amer. Chem.* **1972**, 94, 679-80.

MIYACHI, H., AZUMA, A., OGASAWARA, A., UCHIMURA, E., WATANABE, N., KOBAYASHI, Y., KATO, F., KATO, M., HASHIMOTO, Y.

Novel biological response modifiers : phtalimides with Tumor Necrosis Factor- α production-regulating activity. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2858-65.

MIYAURA, N., YANAGI, T., SUZUKI, A.

The palladium-catalysed cross-coupling reactions of phenylboronic acid with haloarenes in the presence of bases. *Synth. Commun.*, **1981**, 11, 513-9.

MIYAURA, N., YAMADA, K., SUGINOME, H., SUZUKI, A.

Novel and convenient method for the stereo- and regiospecific synthesis of conjugated alkadienes and alkenynes via the palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with bromoalkenes and bromoalkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 972-80.

MIYAURA, N., SUZUKI, A.

Palladium-catalysed cross-coupling reactions of organoboron compounds, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-83.

MIZUNO, K., TSUJINO, M., TAKADA, M., HAYASHI, M., ATSUMI, K.

Studies on bredinin. I. Isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1974**, 27, 775-82.

MOLL, M., BINIECKI, S.

Condensation of meso-1,2-diphenylethylenediamine with phosgene, oxalyl chloride and malonyl chloride. *Acta. Pol. Pharm.* **1974**, 31, 731-4.

MOREL, Ch.

Über Harnstoff- und Tetrahydroimidazol-Derivate von D-Glucosamin. *Helv. Chim. Acta.* **1961**, 44, 403-12.

MORITA, C.T., VERMA, S., APARICIO, P., MARTINEZ, C., SPITS, H., BRENNER, M. B.

Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur. J. Immunol.* **1991**, 21, 2999-3007.

MORITA, C. T., BECKMAN, E. M., BUKOWSKI, J. F., TANAKA, Y., BAND, H., BLOOM, B. R., GOLAN, D. E., BRENNER, M. B.

Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. **1995**, 3, 495-507.

MORITA, C. T., MARIUZZA, R. A., BRENNER, M. B.

Antigen recognition by human gamma delta T cells : pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol.* **2000**, 22, 191-217.

MORRIS, R. E., MEISER, B. M., WU, J., SHORTHOUSE, R., WANG, J.

Use of rapamycin for the suppression of alloimmune reactions in vivo : schedule dependence, tolerance induction, synergy with cyclosporine and FK 506, and effect on host-versus-graft and graft-versus-host reactions. *Transplant. Proc.* **1991**, 23, 521-4.

MORRISON, D. K., CUTLER, R. E.

The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1997**, 9, 174-9.

NAGAI, M., NATSUMEDA, Y., WEBER, G.

Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.* **1992**, 52, 258-261.

NAKAMURA, T., NOGUCHI, T., KOBAYASHI, H., MIYACHI, H., HASHIMOTO, Y.

Mono- and dihydroxylated metabolites of thalidomide : synthesis and TNF- α production-inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 1709-14.

NANISHI, F., NOMOTO, K., TANIGUCHI, K., KUBO, C.

Analysis of the mechanism of allograft rejection and cell-mediated immunity. I. Accelerated rejection of tumour allografts without augmented cytotoxicity in the spleen cells. *Immunology.* **1980**, 40, 67-76.

NEUHAUS, P., KLUPP, J., LANGREHR, J. M.

mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl.* **2001**, 7, 473-84.

NIGH, W.G.

Gabriel synthesis of benzylamine. Undergraduate organic experiment. *J. Chem. Educ.* **1975**, 52, 670-1.

NISHIMURA, M., UEDA, M., MIYAURA, N.

Palladium-catalyzed biaryl-coupling reaction of arylboronic acids in water using hydrophilic phosphine ligands. *Tetrahedron.* **2002**, 58, 5779-87.

OKUBO, M., KAMATA, K., YOKOTA, K., UCHIDA, H., MASAKI, Y., ISHIGAMORI, E., KATO, M., ASO, K., KASHIWAGI, N.

Effect of Bredinin on cellular and humoral immune responses and on canine kidney allograft survival. *Transplant. Proc.* **1980**, 12, 515-9.

ONO, K., HAN, J.

The p38 signal transduction pathway : activation and function. *Cell. Signal.* **2000**, 12, 1-13.

OTTO, M.-C., ZEGUI, Y.

Linear and macrocyclic ligands containing alternating pyridine and imidazolidin-2-one units. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1998**, 423-36.

PAGANI, G., BARUFFINI, A., BORGNA, P., CACCIALANZA, G.

Different *N*-substituents of phthalamic acid. Effect on geotropism of germinating roots of *Lens esculenta* Moench s.l. *Il Farmaco Ed. Sci.* **1968**, 23, 448-67.

PAGANI, G., CACCIALANZA, G., VICARINI, L., BARUFFINI, A.

Effect of a series of substances related to *N*-alpha-naphthylphthalamic acid on root geotropism of *Lens esculenta* Moench s.l. seeds *Il Farmaco Ed. Sci.* **1970**, 25, 203-25.

PAGE, B., PAGE, M., NOEL, C.

A new fluorometric assay for cytotoxicity measurement in vitro. *Int. J. Oncol.* **1993**, 3, 473-6.

PASCHER, A., RADKE, C., DIGNASS, A., SCHULZ, R. J., VELTZKE-SCHLIEKER, W., ADLER, A., SAUER, I. M., PLATZ, K., KLUPP, J., VOLK, H. D., NEUHAUS, P., MUELLER, A. R.

Successful infliximab treatment of steroid and OKT3 refractory acute cellular rejection in two patients after intestinal transplantation. *Transplantation.* **2003**, 76, 615-8.

PETERSON, E. J., WOODS, M. L., DMOWSKI, S. A., DERIMANOV, G., JORDAN, M. S., WU, J. N., MYUNG, P. S., LIU, Q. H., PRIBILA, J. T., FREEDMAN, B. D., SHIMIZU, Y., KORETZKY, G. A.

Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science.* **2001**, 293, 2263-5.

POCCIA, F., AGRATI, C., MARTINI, F., CAPOBIANCHI, M. R., WALLACE, M., MALKOVSKY, M.

Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect.* 2005, 7, 518-528.

POUPOT, M., FOURNIE, J.-J.

Non-peptide antigens activating human V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *Immunol. Lett.* **2004**, 95, 129-38.

PRETSCH, E., BÜHLMANN, P., AFFOLTER, C.

Tables of spectral data for structure determination of organic compounds, 3^{ème} édition, *Springer*. **2000**.

PUENTE, L. G., STONE, J. C., OSTERGAARD, H. L.

Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells : potential role of additional diacylglycerol binding proteins. *J. Immunol.* **2000**, 165, 6865-71.

PUENTE, L. G., HE, J. S., OSTERGAARD, H.L.

A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK. *Eur J Immunol.* **2006**, 36, 1009-18.

QIU, Y, LI, D. M., HE, X. J., ZHANG, H., LI, J., LIANG, S. N., HU, Y.X.

Effect of rapamycin and dexamethasone on differentiation and maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* **2006**, 22, 582-4.

RAO, V., PIRSCH, J. D., BECKER, B. N.

Sirolimus monotherapy following Campath 1H induction. *Transplant. Proc.* **2003**, 35 (suppl), S128-30.

RESPLANDY, A., LEROUX, P.

Synthesis of 6-phenanthridone-7-carboxylic acids from N-arylphthalamic acids. *Bull. Soc. Chim. France.* **1968**, 12, 4947-53.

RETH, M.

Antigen receptor tail clue. *Nature*. **1989**, 338, 383-4.

RILEY, J. L.,

Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS and CTLA-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, 99, 11790-5.

ROBERT, J.-M., ROBERT-PIESSARD, S., DUFLOS, M., LE BAUT, G., KHETAB, E.N., GRIMAUD, N., PETIT, J.-Y., WELIN, L.

Non-acidic antiinflammatory compounds II. Synthesis and activity of 6-amino-2,4-lutidine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, 29, 841-54.

ROBERT, J.-M., ROBERT-PIESSARD, S., COURANT, J., LE BAUT, G., ROBERT, B., LANG, F., PETIT, J.-Y., GRIMAUD, N., WELIN, L.

Non-carboxylic antiinflammatory compounds. III. *N*-(4,6-dimethylpyridin-2-yl)arylcarboxamides and arylthiocarboxamides acting as brain edema inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 915-24.

ROBERT, J.-M. H., SABOURIN, C., ALVAREZ, N., ROBERT-PIESSARD, S., LE BAUT, G., LE PAPE, P.

Synthesis and antileishmanial activity of new imidazolidin-2-one derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 711-8.

ROBERT-PIESSARD, S., LE BAUT, G., COURANT, J., BRION, J. D., SPARFEL, L., BOUHAYAT, S., PETIT, J.-Y., SANCHEZ, R.-Y., JUGE, M., GRIMAUD, N., WELIN, L.

Non acidic anti-inflammatory compounds : activity of *N*-(4,6-dimethyl-2-pyridinyl)benzamides and derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, 25, 9-19.

ROBINSON, M. J., COBB, M. H.

Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9, 180.

RODERICK, W. R., BHATTA, P. L.

Action of trifluoroacetic anhydride on *N*-substituted amic acids. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 2018-2024.

ROOSE, J. P., MOLLENAUER, M., GUPTA, V. A., STONE, J., WEISS, A.

A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 4426-41.

ROSEN, M. K., STANDAERT, R. F., GALAT, A., NAKATSUKA, M., SCHREIBER, S. L.

Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506 : twisted amide surrogate. *Science.* **1990**, 248, 863-6.

ROSS, K.

For organ transplant recipients, cancer threatens long-term survival. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2007**, 99, 421-2.

ROTH, P. A., MIKULKA, W. R., SMITH, C. U., BOLTON, W. E., ZHANG, C., SCHLOSSMAN, S. F.

A novel marker for the measurement of apoptotic cells. *Cytometry.* **1996**, 8, 44.

ROTHHUT, B., CLOIX, J. F., RUSSO-MARIE, F.

Dexamethasone induces the synthesis of "renocortins", two antiphospholipase proteins in rat renomedullary interstitial cells in culture. *Adv. Prostaglandin. Thromboxane Leukot. Res.* **1983**, 12, 51-6.

ROUVIER, E., LUCIANI, M. F., GOLSTEIN, P.

Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **1993**, 177, 195-200.

ROZKOVA, D., HORVATH, R., BARTUNKOVA, J., SPISEK, R.

Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin. Immunol.* **2006**, 120, 260-71.

SABOURIN, C., ROBERT, J.-M. H., ROBERT-PIESSARD, S., CARBONNELLE, D., LANG, F.

Synthesis and evaluation of disubstituted N^1 - and N^3 -imidazolidin-2-ones acting as potential immunosuppressive agents. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2004**, 19, 459-65.

SAEMANN, M. D., DIAKOS, C., KELEMEN, P., KRIEHBUBER, E., ZEYDA, M., BOHMIG, G. A., HORL, W. H., BAUMRUKER, T., ZLABINGER, G. J.

Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3. *Am. J. Transplant.* **2003**, 3, 1341-9.

SAKAGUCHI, K., TSUJINO, M., YOSHIKAWA, M., MIZUNO, K., HAYANO, K.

Action of bredinin on mammalian cells. *Cancer Res.* **1975**, 35, 1643-8.

SALMELA, K., WRAMNER, L., EKBEG, H., HAUSER, I., BENTDAL, O., LINS, L. E., ISONIEMI, H., BACKMAN, L., PERSSON, N., NEUMAYER, H. H., JORGENSEN, P. F., SPIEKER, C., HENDRY, B., NICHOLLS, A., KIRSTE, G., HASCHE, G.

A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* **1999**, 67, 729-36.

SARIN, A., CONAN-CIBOTTI, M., HENKART, P. A.

Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J. Immunol.* **1995**, 155, 3716-8.

SASAKI, K., SHIBATA, Y., HASHIMOTO, Y., IWASAKI, S.

Benzylphthalimides and phenylphthalimides with thalidomide-like activity on the production of Tumor Necrosis factor alpha. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, 18, 1228-33.

SAYEGH, M., WATSCHINGER, B., CARPENTER, C.

Mechanisms of T cell recognition of alloantigen : the role of peptides. *Transplantation.* **1994**, 57, 1295-302.

SAYEGH, M. H., TURKA, L. A.

The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 1813-21.

SCALISE, F., GERLI, R., CASTELLUCCI, G., SPINOZZI, F., FABIETTI, G. M., CRUPI, S., SENSI, L., BRITTA, R., VACCARO, R., BERTOTTO, A.

Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunology.* **1992**, 76, 668-70.

SCHEINMAN, R. I., COGSWELL, P. C., LOFQUIST, A. K., BALDWIN, A. S. JR.

Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* **1995**, 270, 232-3.

SCHORDERET, M.

Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} édition, *Editions Frison-Roche et éditions Slatkine.* **1998**, 923.

SCHULER, W., SEDRANI, R., COTTENS, S., HABERLIN, B., SCHULZ, M., SCHUURMAN, H. J., ZENKE, G., ZERWES, H. G., SCHREIER, M. H.

SDZ RAD, a new rapamycin derivative : pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation.* **1997**, 64, 36-42.

SCHUURMAN, H. J., COTTENS, S., FUCHS, S., JOERGENSEN, J., MEERLOO, T., SEDRANI, R., TANNER, M., ZENKE, G., SCHULER, W.

SDZ RAD, a new rapamycin derivative : synergism with cyclosporine. *Transplantation.* **1997**, 64, 32-5.

SCHWARTZ, R., DAMESHEK, W.

Drug-induced immunological tolerance. *Nature.* **1959**, 183, 1682-3.

SCHWARTZ, R., DAMESHEK, W.

The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest.* **1960**, 39, 952-8.

SEARLE, N.E.

U.S. Pat. n° 2,444,536. **1948**.

SEDRANI, R., COTTENS, S., KALLEN, J., SCHULER, W.

Chemical modification of rapamycin : the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc.* **1998**, 30, 2192-4.

SEHGAL, S. N., BAKER, H., VEZINA, C.

Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1975**, 28, 727-32.

SEGHAL, S. N.

Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus) : mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* **1998**, 31, 335-40.

SHAUGHNESSY, K. H., BOOTH, R. S.

Sterically demanding, water-soluble alkylphosphines as ligands for high activity Suzuki coupling of aryl bromides in aqueous solvents. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2757-9.

SHAW, B. L.

Chelating diphosphine-palladium(II) dihalides; outstandingly good catalysts for Heck reactions of aryl halides. *Chem. commun.* **1998**, 1863.

SHIA, K.-S., LI, W.-T., CHANG, C.-M., HSU, M.-C., CHERN, J.-H., LEONG, M. K., TSENG, S.-N., LEE, C.-C., LEE, Y.-C., CHEN, S.-J., PENG, K.-C., TSENG, H.-Y., CHANG, Y.-L., TAI, C.-L., SHIH, S.-R.

Design, synthesis, and structure-activity relationship of pyridylimidazolidinones : a novel class of potent and selective human enterovirus 71 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1644-55.

SHIBATA, Y., SASAKI, K., HASHIMOTO, Y., IWASAKI, S.

Tumor necrosis factor alpha production enhancers with a phenylphthalimide skeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 205, 1992-7.

SHIBATA, Y., SASAKI, K., HASHIMOTO, Y., IWASAKI, S.

Phenylphthalimides with tumor necrosis factor alpha production-enhancing activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 156-62.

SIEGEL, J. N., KLAUSNER, R. D., RAPP, U. R., SAMELSON, L. E.

T cell antigen receptor engagement stimulates c-raf phosphorylation and induces c-raf associated kinase activity via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol.Chem.* **1990**, 265, 18472-80.

SLATER, E. P., ANDERSON, T., CATTINI, P., ISAACS, R., BIRNBAUM, M. J., GARDNER, D. G., EBERHARDT, N. L., BAXTER, J. D.

Mechanisms of glucocorticoid hormone action. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1986**, 196, 67-80.

SMYTH, M. J., TRAPANI, J. A.

Granzymes : exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* **1995**, 16, 202-6.

SNELL, G. D.

Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* **1948**, 49, 87-103.

SOLSKY, M. A., WALLACE, D. J.

New therapies in systemic lupus erythematosus. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2002**, 16, 293-312.

STANFORTH, S. P.

Catalytic cross-coupling reactions in biaryl synthesis. *Tetrahedron.* **1998**, 54, 263-303.

STEPKOWSKI, S. M.

Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert. Rev. Mol. Med.* **2000**, 1-23.

STERK, L., MAKO, J., NADOR, K.

New reactions of phthalimide formation. *Arzneim. Forsch. Dtsch.* **1968**, 18, 798-812.

STILLE, J. K.

The palladium-catalysed cross-coupling reactions of organotin reagents with organic electrophiles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 508-24.

STRAUS, D. B., WEISS, A.

Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell.* **1992**, 70, 585-93.

STRONG, D. M., AHMED, A. A., THURMAN, G. B., SELL, K. W.

In vitro stimulation of murine spleen cells using a microculture system and multiple automated sample harvester. *J. Immunol. Methods.* **1973**, 2, 279-91.

SUCHIN, E. J.

Quantifying the frequency of alloreactive Tcells in vivo : new answers to an old question. *J. Immunol.* **2001**, 166, 973-81.

SZAMEL, M., LEUFGEN, H., KURRLE, R., RESCH, K.

Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1235, 33-42.

TANAKA, Y. MORITA, C. T., NIEVES, E., BRENNE, M. B., BLOOM, B. R.

Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* **1995**, 375, 155-8.

TAO, B., BOYKIN, D. W.

Pd(OAc)₂/2-aryl-2-oxazolines catalyzed Suzuki coupling reactions of arylbromides and arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4955-7.

TAO, B., BOYKIN, D. W.

Simple amine/Pd(OAc)₂-catalyzed Suzuki coupling reactions of aryl bromides under mild aerobic conditions. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4330-5.

THEDREZ, A., SABOURIN, C., GERTNER, J., DEVILDER, M.-C., ALLAIN-MAILLET, S., FOURNIE, J.-J., SCOTET, E., BONNEVILLE, M.

Self/non-self discrimination by human $\gamma\delta$ T cells : simple solutions for a complex issue ? *Immunological Reviews*. **2007**, 215, 123-35.

THOMPSON, K., ROJAS-NAVEA, J., ROGES, M. J.

Alkylamines causes Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood*. **2006**, 107, 651-4.

TSAI, E. Y., YIE, J., THANOS, D., GOLDFELD, A. E.

Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 5232-44.

ULLMANN, F., BIELECKI, J.

Über Synthesen in der Biphenylreihe. *Chem. Ber.* **1901**, 34, 2174-85.

VELLA, J., SPADEFORMA-FERREIRA, M., MURPHY, B.

Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. **1997**, 64, 795-800.

VENETZ, J. P., PASCUAL, M.

New treatments for acute humoral rejection of kidney allografts. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. **2007**, 16, 625-33.

VIEY, E., LAPLACE, C., ESCUDIER, B.

Peripheral gammadelta T-lymphocytes as an innovative tool in immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* **2005**, 5, 973-86.

VINCENTI, F., KIRKMAN, R., LIGHT, S., BUMGARDNER, G., PESCOVITZ, M., HALLORAN, P., NEYLAN, J., WILKINSON, A., EKBERG, H., GASTON, R., BACKMAN, L., BURDICK, J.

Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 1700-1.

VINCENTI, F., LARSEN, C., DURRBACH, A., WEKERLE, T., NASHAN, B., BLANCHO, G., LANG, P., GRINYO, J., HALLORAN, P. F., SOLEZ, K., HAGERTY, D., LEVY, E., ZHOU, W., NATARAJAN, K., CHARPENTIER, B.

Belatacept Study Group. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 353, 770-81.

VOGEL, A. I.

Textbook of practical organic chemistry, *Longman Scientific and Technical*. **1989**, 426-8.

WANGE, R. L., MALEK, S. N., DESIDERIO, S., SAMELSON, L. E.

Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 19797-801.

WANGE, R. L., GUITIAN, R., ISAKOV, N., WATTS, J. D., AEBERSOLD, R., SAMELSON, L. E.

Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol. Chem.* **1995**, 270, 18730-3.

WEISS, A.

Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 487-510.

WEISS, A., LITTMAN, D. R.

Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* **1994**, 76, 263-74.

WILSON, A. L.

US Patent N° 2.517.750. **1950**.

a- WOLFE, J. P., BUCHWALD, S. L.

A highly active catalyst for the room-temperature amination and Suzuki coupling of aryl chlorides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2413-16.

b- WOLFE, J. P., SINGER, R. A., YANG, B., BUCHWALD, S. L.

Highly active palladium catalysts for Suzuki coupling reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9550-61.

WRIGHT, W. B., JR., BRABANDER, H. J., HARDY, R. A., JR., OSTENBERG, A. C.

Central nervous system depressants. I. 1-aminoalkyl-3-aryl derivatives of 2-imidazolidinone, 2-imidazolidinethione, and tetrahydro-2(1*H*)-pyrimidinone. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 852-7.

YANG, Z., CHEN, M., FIALKOW, L. B., ELLETT, J. D., WU, R., BRINKMANN, V., NADLER, J. L., LYNCH, K. R.

The immune modulator FYT720 prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice small strain, B6.B-H2^d. *Clin Immunol.* **2003**, 107, 30-5.

YIN, J., RAINKA, M. P., ZHANG, X., BUCHWALD, S. L.

Highly active Suzuki catalyst for the synthesis of sterically hindered biaryls : novel ligand coordination. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1162-3.

YOPP, A. C., LEDGERWOOD, L. G., OCHANDO, J. C., BROMBERG, J. S.

Sphingosine-1-phosphate receptor modulators : a new class of immunosuppressants. *Clin. Transplant.* **2006**, 20, 788-95.

ZAPF, A., EHRENTAUT, A., BELLER, M.

A new highly efficient catalyst system for the coupling of nonactivated and deactivated aryl chlorides with arylboronic acids palladium-catalyzed reactions for fine chemical synthesis, Part 17. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4153-5.

ZAUGG, H.E., DENET, R.W., FRASER, J.E., KOTRE, A.M.

Tscherniac-Einhorn reaction. II. Kinetics and mechanism. *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 14-18.

ZHANG, C., AO, Z., SETH, A., SCHLOSSMAN, S. F.

A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J. Immunol.* **1996**, 157, 3980-7.

ZHANG, W., CHEN, C. H.-T., LU, Y., NAGASHIMA, T.

A highly efficient microwave-assisted Suzuki coupling reaction of aryl perfluorooctylsulfonates with boronic acids. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1473-6.

ZHAO, X., WEI, Y. Q., KARIYA, Y., TESHIGAWARA, K., UCHIDA, A.

Accumulation of gamma/delta T cells in human dysgerminoma and seminoma : roles in autologous tumor killing and granuloma formation. *Immunol; Invest.* **1995**, 24, 607-18.

ZHUORU, L., SUN, Y.-K., XI, Y.-P., MAFFEI, A., REED, E., HARRIS, P., SUCIU-FOCA, N.

Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* **1993**, 177, 1643-50.

ANNEXES

[Articles parus dans diverses revues] : voir thèse papier ou Pubmed

SYNTHESE ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE D'IMIDAZOLIDIN-2-ONES ET D'ANALOGUES A PTOTENTIALITES IMMUNOSUPPRESSIVES

Résumé :

Les immunosuppresseurs, actuellement utilisés dans la prévention et/ou le traitement du rejet d'allogreffe ou dans certaines maladies auto-immunes, sont des molécules très toxiques, et peu efficaces sur la survenue des rejets chroniques à long terme. Il devient donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques.

La première partie de ce mémoire décrit les études pharmacochimiques réalisées sur une série d'analogues cycliques d'urées. Ces travaux ont mis en évidence l'intérêt du noyau imidazolidin-2-one dans l'induction d'une activité immunosuppressive et ont permis d'identifier le benzonitrile **68** comme molécule chef de file.

La deuxième partie expose les études pharmacologiques effectuées sur le composé **68**. *In vitro*, cette molécule inhibe, de façon dose-dépendante, la prolifération et la production de cytokines de lymphocytes T humains stimulés de manière antigénique. Enfin, les expériences de western blot réalisées ont démontré une activité inhibitrice de cette molécule à l'égard de la voie des ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2).

Mots clés : Imidazolidin-2-one, urée, immunosuppresseur, lymphocyte T Vgamma9/Vdelta2, MAP kinase

SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF IMIDAZOLIDIN-2-ONES AND DERIVATIVES ACTING AS POTENTIAL IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS

Abstract :

Immunosuppressant drugs are mainly used in organ transplantation for the prevention and the treatment of allograft rejection. They are also part of auto-immune diseases therapy. However these drugs are associated with significant toxicities and have few efficiency on chronic graft dysfunction. It is therefore necessary to develop new therapeutic ways.

The first part describes the synthesis and structure/activity relationship of a series of cyclic ureas. This work permitted us to highlight the interest of imidazolidin-2-one scaffold in the immunosuppressive activity induction and to identify the benzonitrile **68** as a lead compound.

The second part deals with the pharmacological studies on compound **68**. *In vitro*, this molecule inhibits in a dose-dependent manner human T lymphocytes proliferation and cytokine production when they are stimulated by their specific antigen. At last, western blot analysis demonstrated an inhibitory effect of benzonitrile **68** on the ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2) signaling pathway.

Key words : Imidazolidin-2-one, urea, immunosuppressant agent, Vgamma9/Vdelta2 T lymphocyte, MAP kinase