

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Chimie Thérapeutique

Par

Viet Hung DAO

**Conception, synthèse et évaluation biologique de
benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines et dibenzo[*b,d*]furanes,
dérivés du cercosporamide d'origine naturelle**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 octobre 2018

Unité de recherche : EA1155 - IICiMed, Institut de Recherche en Santé 2

22 Boulevard Bénoni Goullin - 44200 NANTES

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Valérie THIERY, Professeur des Universités, Université de La Rochelle
Christophe ROCHAIS, Professeur des Universités, Université de Caen

Composition du Jury :

Président :	Patrice LE PAPE, Professeur des Universités, Université de Nantes
Examineur :	Jean-Pierre BAZUREAU, Professeur des Universités, Université de Rennes
Directeur de thèse :	Pascal MARCHAND, Professeur des Universités, Université de Nantes
Co-encadrante :	Isabelle OURLIAC-GARNIER, Maître de conférences, Université de Nantes

Liste des travaux

Publications

Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Jacquot C, Baratte B, Ruchaud S, Bach S, Grovel O, Le Pape P, Marchand P. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines inspired from cercosporamide CaPkc1 inhibitor: Synthesis and evaluation of fluconazole susceptibility restoration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *13*, 2250-2255.

Posters

Dréau AL, Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Le Pape P, Marchand P. **Evaluation de l'activité d'intermédiaires de synthèse du Cercosporamide sur *Candida albicans* résistants au fluconazole.** Journée Recherche UFR, Faculty of Pharmacy of the University of Nantes, 26th November 2015, Nantes (France).

Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Le Pape P, Marchand P. **Synthesis and biological evaluation of new heterocyclic compounds as antifungal agents.** Annual Meeting of the Doctoral School "Biologie-Santé" Nantes/Angers, 11th - 12th December 2015, Nantes (France).

Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Le Pape P, Marchand P. **Synthesis of new heterocyclic compounds as antifungal agents, and biological evaluation.** XXIVth conference of the Groupement des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique, 25th - 26th August 2016, Angers (France).

Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Le Pape P, Marchand P. **Synthesis of benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines as antifungal agents, and biological evaluation.** 24th Young Research Fellow Meeting in Medicinal Chemistry, 8th - 10th February 2017, Paris (France).

Communications orales

Dao VH, Ourliac-Garnier I, Bazin MA, Le Pape P, Marchand P. **Design, synthesis and biological evaluation of dibenzofuran derivatives inspired from cercosporamide as kinase inhibitors.** Joint 26th GP2A/32nd JFB Conferences, 13th - 15th June 2018, Asnelles sur Mer (France)

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein des départements de Chimie Thérapeutique et de Parasitologie et Mycologie Médicale de l'équipe EA1155 - IICiMed de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes, sous la direction du Professeur Pascal Marchand, et sous le co-encadrement du Docteur Isabelle Ourliac-Garnier - Maître de conférences.

Mes remerciements s'adressent au Professeur Patrice Le Pape, directeur de l'unité de recherche EA1155 - IICiMed, pour m'avoir accueilli pendant ces quatre années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet d'intérêt majeur pour le laboratoire. Je le remercie également pour ses suggestions, ses contributions ainsi que pour les discussions que nous avons partagées.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance envers le Professeur Pascal Marchand et le Docteur Isabelle Ourliac-Garnier pour m'avoir proposé ce sujet de recherche, merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir encadré et de m'avoir accordé une grande autonomie de travail. Ceci m'a ainsi permis de toujours explorer mes idées avec bonne humeur tout au long de ces quatre années.

Je tiens à remercier le Docteur Marc-Antoine Bazin - Maître de conférences pour ses nombreux conseils, ses compétences en chimie, et pour les bons moments de détente et de franche sympathie.

Je souhaite remercier aussi le Docteur Cédric Logé - Maître de conférences pour son aide précieuse dans ce projet, ainsi que pour les connaissances acquises durant son enseignement pendant mon année de Master 1.

J'adresse mes remerciements aux chercheurs du laboratoire IICiMed, le Professeur Jean-Michel Robert ainsi que le Professeur Muriel Duflos pour leurs enseignements.

Je tiens à remercier les Docteur Nidia Alvarez-Rueda - Maître de conférences, Docteur Catherine Jacquot - Maître de conférences, Carine Picot, Marjorie, pour leur accueil, leur soutien, leur aide et les bons moments passés ensemble.

Un grand merci à Marie-Renée Nourrisson pour la réalisation des spectres RMN, à Patricia Pinson pour sa bonne humeur quotidienne, sa gestion du centre de stockage.

Je remercie chaleureusement Monsieur Quang Loi Ha, Recteur Université de Phu Tho pour son soutien.

Je tiens aussi à remercier le Professeur François Resche - Ancien Président de l'Université de Nantes, le Docteur Yves Perraudeau - Ancien Directeur de l'IEMN-IAE, et le Docteur Christine Bobin-Dubigeon pour leur soutien et pour avoir été à l'origine de ma venue en France.

Mes remerciements s'adressent pareillement au Professeur Franck Suzenet (Université d'Orléans), et au Docteur El-Hassane Nazih - Maître de conférences (Université de Nantes) pour avoir accepté de consacrer du temps à l'examen de mes travaux de thèse lors des comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Christophe Rochais (Université de Caen), et le Professeur Valérie Thiery (Université de La Rochelle) pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean-Pierre Bazureau (Université de Rennes) et le Professeur Patrice Le Pape (Directeur EA1155 - IICiMed) pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire IICiMed qui m'ont permis de travailler dans de très bonnes et agréables conditions. Merci à Céline, notre secrétaire pour sa gentillesse quotidienne et sa disponibilité à tout moment. Merci à Alain, Cynthia, et Karen pour leur gentillesse et leur sympathie, mais aussi pour toute l'aide apportée lors de la réalisation de mes spectres IR.

Je remercie chaleureusement les stagiaires, les doctorants, et post-doctorants pendant ces quatre années : David, Ousmane, Gisèle, Juan Emmanuel, Marine, Thomas, Marlene, Arsênio, Dartagnan, Rafael, Denis, Alexis, Kerstin, ... Merci à tous pour l'ambiance que vous avez mise au laboratoire, votre bonne humeur, vos conseils et pour la sympathie que vous m'avez témoignée. Merci aussi pour tous les moments passés ensemble hors du laboratoire.

Je ne voudrais surtout pas oublier mes amis (Scott, Jean-Paul, Line, Nanie, Yves David, Yves Gendreau, Cong, Que, Quy, Camille,...), merci à toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, soutenu durant ma thèse. Merci pour tout. Merci de m'avoir soutenu durant ces quatre années, merci de m'avoir donné le courage et le sourire même pendant les moments les plus difficiles et surtout, merci de m'avoir motivé dans l'aboutissement de cette thèse.

Le plus grand merci s'adresse à ma famille :

A mes parents et à mes beaux-parents, qui m'ont encouragé et réconforté dès le début de mes études en France. Je vous dois tout, et vous serai éternellement reconnaissant pour tout l'amour et le soutien que vous m'avez apportés, je vous aime.

A mes deux filles Minh Chau et Minh Tram, sans qui la vie ne serait pas pareille.

A mon frère, Viet Phuong et à sa famille, qui m'ont fait confiance et qui ont toujours soutenu mes projets.

Enfin, mes derniers remerciements s'adressent tout particulièrement à celle qui partage ma vie, Van Anh - mon épouse, pour m'avoir soutenu, aimé pendant toutes ces années malgré les km de séparation. Tu es ma moitié, je ne pourrais pas avancer dans la vie sans toi à mes côtés. Merci de m'avoir attendu durant ces sept années.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Préambule	6
INTRODUCTION GENERALE	7
I. Biologie de <i>Candida</i>	7
1. Le genre <i>Candida</i>	7
2. Les candidoses.....	9
3. Epidémiologie.....	9
II. Traitements antifongiques	11
1. Les polyènes	12
1.1. Historique	12
1.2. Structure	12
1.3. Mode d'action et résistance aux polyènes	13
1.4. Pharmacologie	13
2. Les dérivés pyrimidiques	14
2.1. Historique	14
2.2. Structure	14
2.3. Mode d'action et résistance à la 5-FC	14
2.4. Pharmacologie	15
3. Les dérivés azolés.....	16
3.1. Historique	16
3.2. Structure	16
3.3. Mécanisme d'action.....	17
3.4. Résistance aux azolés	19
3.5. Pharmacologie	20
4. Les échinocandines	21
4.1. Historique	21
4.2. Structure	21
4.3. Mode d'action.....	22
4.4. Mécanismes de résistance.....	22
4.5. Pharmacologie	23
5. Nouveaux antifongiques en cours de développement.....	23
5.1. Inhibiteurs spécifiques du Cyp51 fongique : VT-1129, VT-1161, et VT-1598.....	24
5.2. Nouveaux inhibiteurs de la glucane synthase : CD101 et SCY-078.....	25
5.3. Nouvel inhibiteur de la biosynthèse de la pyrimidine fongique : F901318	25
5.4. Inhibiteur de la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol fongique : APX001 ..	26

III. Les protéines kinases C	27
1. Structures et fonctions des domaines PKC humains.....	27
2. Structures et fonctions des domaines PKC fongiques.....	28
IV. Cercosporamide	30
OBJECTIFS DE RECHERCHE	32
I. Description des objectifs.....	32
II. Outils informatiques (Modélisation moléculaire).....	32
1. Construction d'un modèle <i>CaPkc1</i>	32
2. Modélisation des interactions cercosporamide / modèle <i>CaPkc1</i>	35
3. Séries chimiques envisagées.....	37
PREMIER CHAPITRE	39
Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-<i>d</i>]pyrimidines	39
I. Partie théorique : Aperçu bibliographique	39
1. Les benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines	39
2. Applications en Chimie Thérapeutique des benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines	40
2.1. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines comme inhibiteurs d'enzymes	40
2.2. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine, potentialisateur de la voie de signalisation CREB	41
2.3. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines comme modulateurs du récepteur de l'histamine H ₄	42
2.4. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines comme inhibiteurs de Hsp90	42
2.5. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines comme antagonistes des récepteurs de l'adénosine... ..	43
2.6. Benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines comme inhibiteurs de primase de <i>E. coli</i>	44
3. Voies d'accès aux dérivés benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidiniques.....	44
3.1. La construction du noyau pyrimidinique.....	45
3.1.1. Sous forme d'acides.....	45
3.1.2. Sous forme d'esters	46
3.1.3. Sous forme d'amides	47
3.2. La construction du noyau benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidinique	48
3.2.1. Synthèse de la 8-chloro[1]benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-dione	48
3.2.2. Synthèse du 7-méthoxybenzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4-amine	49
3.2.3. Synthèse de benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidines fonctionnalisées.....	50
3.2.4. Synthèse de 2,4,8-trichloro[1]benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine	51
II. Partie théorique : Travaux réalisés.....	52
1. Synthèse du 3,5-dibenzyloxyphénol	53
1.1. Approche rétrosynthétique	53
1.2. Travaux réalisés	53
2. Synthèse du 7,9-dihydroxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine-6-carboxamide	55

2.1. Introduction directe de la fonction carboxamide après cyclisation (Voie 1).....	55
2.2. Accès au dérivé 4-oxobenzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine-6-carboxamide à partir du précurseur 2,6-diiodophénol et hydratation d'une fonction nitrile (Voie 2)	64
2.3. Accès au dérivé 4-oxobenzofuro[3,2- <i>d</i>]pyrimidine-6-carboxamide à partir de l'analogue iodé (Voie 3).....	68
2.4. Introduction de la fonction carboxamide sur le dérivé phénol de départ puis cyclisation (Voie 4)	71
3. Synthèse du 7,9-dihydroxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-<i>d</i>]pyrimidine-6-carboxamide	75
3.1. Rétrosynthèse envisagée.....	75
3.2. Travaux réalisés	76
4. Synthèse du 4-amino-7,9-dihydroxy[1]benzofuro[3,2-<i>d</i>]pyrimidine-6-carboxamide	78
4.1. Rétrosynthèse envisagée.....	78
4.2. Travaux réalisés	79
Partie B : Evaluation des benzofuro[3,2-<i>d</i>]pyrimidines	83
I. Evaluation de l'activité antifongique	83
1. Choix des souches utilisées pour les tests <i>in vitro</i>	83
2. Test de l'activité antifongique contre <i>C. albicans</i>	84
2.1. Principe de la mesure de l'activité antifongique	84
2.2. Analyse des résultats	86
3. Etude de la restauration de la sensibilité au fluconazole sur des souches résistantes de <i>C. albicans</i>	87
3.1. Principe de la co-administration.....	87
3.2. Détermination de FICI.....	88
3.3. Analyse des résultats	88
4. Test d'inhibition de biofilm	91
4.1. Principe du test	91
4.2. Résultats biologiques et discussion	91
II. Cytotoxicité	92
1. Principe du test	92
2. Analyse des résultats	92
III. Activités inhibitrices de kinases.....	93
1. Inhibition de l'activité kinase de la CaPkc1	93
1.1. Principe du test	93
1.2. Analyse des résultats	95
2. Evaluation d'inhibition sur les kinases humaines	96
2.1. Description rapide du protocole expérimental.....	97

2.2. Résultats et discussion	98
IV. Conclusion sur l'activité biologique des benzofuro[3,2-<i>d</i>]pyrimidines	99
DEUXIEME CHAPITRE.....	100
Partie A : Synthèse des dibenzo[<i>b,d</i>]furanes	100
I. Partie théorique : Aperçu bibliographique	100
1. Les dibenzo[<i>b,d</i>]furanes	100
2. Applications en Chimie Thérapeutique des dibenzo[<i>b,d</i>]furanes	100
2.1. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme antipaludiques	100
2.2. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme agents anti-diabétiques potentiels	101
2.3. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme antifongiques.....	101
2.4. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme cytotoxiques.....	102
2.5. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme antibactériens	102
2.6. Dibenzo[<i>b,d</i>]furanes comme agents antituberculeux	103
3. Synthèse des dérivés dibenzo[<i>b,d</i>]furanes	104
3.1. Formation de liaison C-C intramoléculaire à partir de diaryléthers	105
3.2. Formation d'une liaison C-O intramoléculaire à partir 2-arylphénols	110
3.3. Synthèse de nouveaux dérivés du dibenzofurane par réaction de Diels-Alder	118
II. Partie théorique : Travaux réalisés.....	120
1. Synthèse du 1,3-dihydroxydibenzo[<i>b,d</i>]furane-4-carboxamide	121
1.1. Formation du noyau dibenzofurane à partir des sels <i>ortho</i> -(aryloxy)aryldiazonium	122
1.2. Synthèse de dibenzofuranes par couplage diaryle oxydant pallado-catalysé	129
1.3. Formation d'une liaison C-O intramoléculaire à partir 2-arylphénols	135
1.4. Synthèse de dibenzofuranes par cyclisation pallado-catalysée d' <i>o</i> -iododiaryléthers	140
2. Synthèse du 8-acétyl-1,3-dihydroxydibenzo[<i>b,d</i>]furane-4-carboxamide.....	141
2.1. A partir du 1,3-diméthoxydibenzo[<i>b,d</i>]furane-4-carboxamide 64 (Voie 1).....	142
2.2. A partir du 3,5-diméthoxyphénol 42 (Voie 2).....	143
3. Synthèse du 1,3,7-trihydroxydibenzo[<i>b,d</i>]furane-4-carboxamide.....	145
3.1. Schéma rétrosynthétique.....	145
3.2. Travaux réalisés.....	146
4. Synthèse du 8-acétyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[<i>b,d</i>]furane-4-carboxamide	148
4.1. Voie 1 : acétylation du précurseur dibenzofurane 80	149
4.2. Voie 2 : couplage diaryle oxydant intramoléculaire.....	149
Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[<i>b,d</i>]furanes	153
I. Evaluation de l'activité antifongique	153
1. Souches utilisées pour les tests <i>in vitro</i>	153

2. Test de l'activité antifongique contre <i>C. albicans</i>	154
3. Etude de la restauration de la sensibilité au fluconazole sur des souches de <i>C. albicans</i>	156
4. Test d'inhibition de biofilm	158
II. Cytotoxicité	159
III. Activités inhibitrices de kinases.....	161
1. Inhibition de l'activité kinase de la <i>CaPkc1</i>	161
2. Evaluation d'inhibition sur les kinases humaines	162
IV. Conclusion sur l'activité biologique de la famille des dibenzo[b,d]furanes.....	164
CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	165
PARTIE EXPERIMENTALE	168
I. General chemistry	169
II. Table of methods	170
III. Evaluation de l'activité des composés sur les kinases.....	252
BIBLIOGRAPHIE	255

Liste des abréviations

A

acac	Acétylacétonate
Ac	Acétyle
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ATP	Adénosine triphosphate
ANOVA	Analysis of variance
AmB	Amphotéricine B

B

Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
BQ	Benzoquinone
BCA	Protein Quantification Kit

C

CaPkc	Pkc de <i>Candida</i>
CREB	Cyclic-AMP Response Element Binding
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
CMI	Concentration minimale d'inhibition
CDR	<i>Candida</i> drug resistance
cod	1,5-cyclooctadiène
CSI	Chlorosulfonylisocyanate
CuTC	Thiophène-2-carboxylate de cuivre(I)
CERCO	Cercosporamide
CAAL	<i>Candida albicans</i>

D

DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMA	<i>N,N</i> -Diméthylacétamide
DMI	<i>N,N'</i> -Diméthylimidazolidinone
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Diméthyl)aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DE ₅₀	Dose efficace 50
DAG	Diacylglycérol
δ	Déplacement chimique
d	doublet
dd	doublet de doublet
ddd	doublet de doublet de doublet

E

ECM	Extracellular Matrix
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
équiv	Equivalent(s)
ES	Enzyme-substrat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F

FDA	Food and Drug Administration
FLU	Fluconazole
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index

G

GBM	Glioblastome multiforme
GABA	Acide γ -aminobutyrique

H

HMPA	Hexaméthylphosphoramide
Hsp90	Heat shock protein, 90
HRP	Horseradish Peroxydase
H ₄ R	Récepteur de l'histamine H ₄

I

IPr	1,3-Bis(2,6-bis(diphenylmethyl)-4-methylphenyl)imidazo-2-ylidene
-----	--

L

L	Ligand
LSD	Last Square Difference

M

MAPK	Mitogen-activated protein kinases
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent
MDR	Multi drug resistance
Me	Méthyle
Mp	Melting point
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MOM	Méthoxyméthyl
MO	Micro-ondes

N

NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidyle

P

Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibenzylidèneacétone) dipalladium(0)
Pd(PPh ₃) ₄	Tétrakis(triphénylphosphine) de palladium(0)
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	Dichlorobis(triphénylphosphine)palladium(II)
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	Dichlorobis(triphénylphosphine)palladium(II)
PS	Phosphatidylsérine
Pyr.HCl	Chlorure de pyridinium
Piv	Pivalique
Pd-C	Palladium sur charbon
PCy ₃	Tricyclohexylphosphine
ppm	Partie par million
PK	Protéine kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PTP	Protéine tyrosine phosphatase

R

R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

S

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SAVI	<i>Staphylococcus aureus</i> intermédiaire vancomycine
s	singulet
SD	Déviatiion standard
SEAr	Substitution électrophile aromatique
SNAr	Substitution nucléophile aromatique
SNR1	Substitution nucléophile radicalaire d'ordre 1
S-Phos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diméthoxybiphényle

T

t.a.	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
t	triplet
t _{1/2}	Temps de demi-réaction
TMB	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine

U

UPLC-MS	Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry
UPRT	Uridine phosphoribosyl-transférase

V

VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VORI	Voriconazole

X

Xantphos	4,5-Bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène
----------	---

Préambule

Ce manuscrit présente les travaux réalisés au sein des départements de Chimie Thérapeutique et de Parasitologie et Mycologie Médicale de l'équipe EA1155 - IICiMed de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes.

Le projet de thèse développé ici, porte sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines et dibenzo[*b,d*]furanes, dérivés du cercosporamide d'origine naturelle.

Chez *C. albicans*, la protéine kinase C (*CaPkc1*), l'une des principales protéines impliquées dans les voies MAPK, est décrite comme un régulateur de l'intégrité de la paroi cellulaire durant la croissance, la morphogenèse et la réponse au stress pariétal. Les résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré que les inhibiteurs de la protéine Pkc1 rétablissent la sensibilité au fluconazole de souches résistantes si elles ne sont pas mutées au niveau du gène *ERG11* codant pour la lanostérol 14- α -déméthylase.

Le (-)-cercosporamide est un produit naturel isolé du champignon phytopathogène *Cercosporidium henningsii*. Il a été identifié comme un agent antifongique modéré contre *C. albicans* et il a montré un effet inhibiteur de *CaPkc1* qui lui confère des propriétés de restauration de la sensibilité au fluconazole (FLU), molécule antifongique azolée, de souches résistantes quand il est testé en association au FLU.

Dans un contexte où la synthèse totale du cercosporamide n'est pas décrite dans la littérature, il est envisagé de synthétiser des analogues hétérocycliques simplifiés en s'affranchissant de la présence d'un carbone asymétrique. Le but est d'obtenir une voie d'accès plus aisée vers des composés d'intérêt, d'améliorer l'activité biologique et de valider les pharmacophores présents sur la molécule de référence. En outre, le cercosporamide a une affinité pour reconnaître le site de fixation de l'ATP de la kinase Mnk2 par la présence du 3-OH et du 4-CONH₂ de la partie phényle, justifiant la stratégie de maintenir le dihydroxybenzofuran-carboxamide comme modèle du produit naturel pour la conception de nouveaux composés tricycliques, à structures benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine et dibenzo[*b,d*]furane.

Dans un premier temps, les voies de synthèse pour accéder aux molécules cibles ont donc été mises au point, puis, dans un deuxième temps, l'activité antifongique intrinsèque et les propriétés de restauration de la sensibilité au fluconazole des molécules ont été évaluées sur des souches de *C. albicans*. Par ailleurs, des évaluations biologiques complémentaires sur les kinases PKC fongique et humaine et sur un panel de 10 autres kinases humaines, pour déterminer le profil de sélectivité, nous ont permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs de kinases.

D'autre part, ce travail de recherche a permis la publication d'un article (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 13, 2250-2255), une communication orale et quatre communications par affiches.

INTRODUCTION GENERALE

I. Biologie de *Candida*

1. Le genre *Candida*

D'un point de vue taxonomique, les *Candida* font partie du Phylum *Ascomycota*, du sous-Phylum des *Saccharomycetales* et à la Famille des *Saccharomycetaceae*.¹

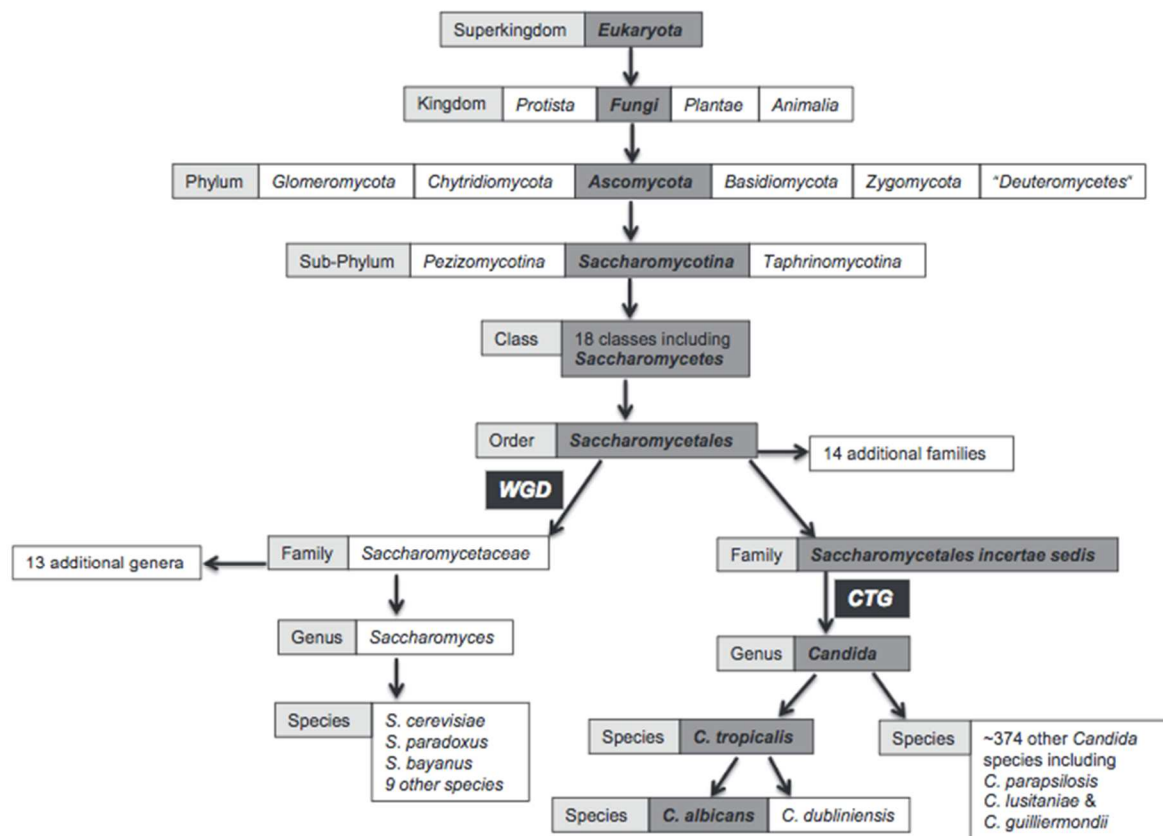


Figure 1 : Taxonomie du genre *Candida*

La figure est le résumé d'études phylogénétiques fongiques précédentes^{1,2,3,4,5,6}

Introduction générale

Actuellement, le genre *Candida* compte plus de 150 espèces. Cependant, seulement une vingtaine de ces espèces sont isolées chez des patients comme agents infectieux : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida auris*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* et *Candida norvegensis*.^{7,8,9,10}

Les *Candida* sont des levures rondes ou ovoïdes non capsulées, non pigmentées à bourgeonnement multilatéral, capables de former des filaments ou non (*C. glabrata*) et donnant des colonies blanches et crémeuses en culture. Les levures du genre *Candida* sont des levures commensales, faisant partie intégrante du microbiote des muqueuses digestives, respiratoires et génitales que l'on détecte chez plus de 50% de la population mondiale, en bonne santé.

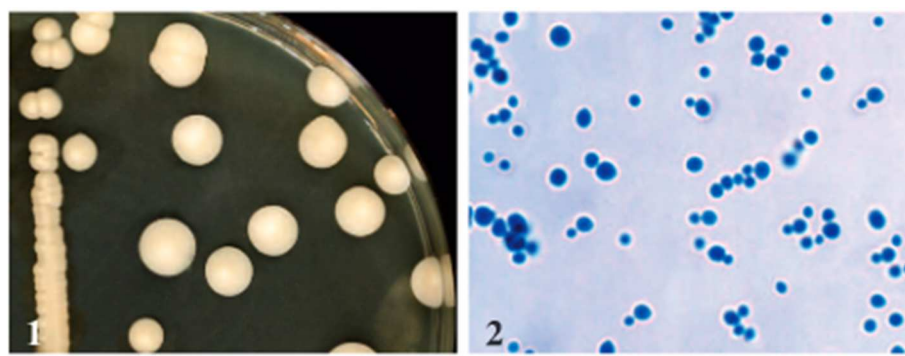


Figure 2 : *Candida albicans* : aspect macroscopique (1) et microscopique (2) de culture sur gélose Sabouraud¹¹

Une des caractéristiques de certaines espèces de *Candida* est de pouvoir former des biofilms, structures complexes qui les protègent contre le système de défense immunitaire de l'hôte et contre les traitements antifongiques. La formation d'un biofilm à *Candida* se fait en trois étapes : adhérence des levures, initiation du biofilm avec formation d'une couche basale puis filamentation, maturation du biofilm où des couches complexes de cellules polymorphiques sont ancrées dans la matrice extracellulaire suivie d'une dissémination vers de nouveaux sites (Figure 3).¹²

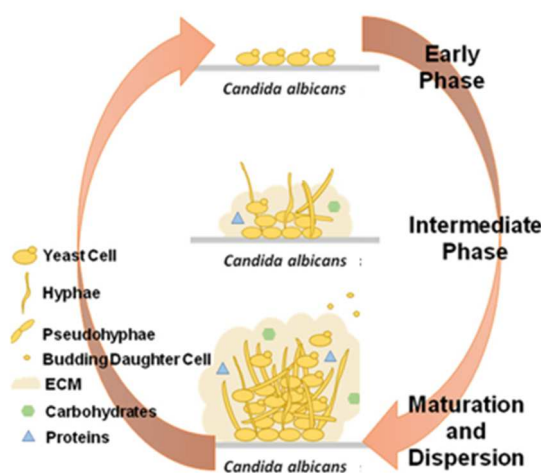


Figure 3 : Différentes étapes de formation du biofilm chez *C. albicans*¹²

Introduction générale

2. Les candidoses

Le terme candidose est un terme général qui désigne les infections superficielles (cutanées et des muqueuses) et invasives (des organes profonds) causées par des champignons du genre *Candida*. Elles peuvent survenir à tout âge et de nombreux facteurs locaux et généraux favorisent la survenue de ces infections.¹⁰

Les deux grands types de candidoses, les candidoses superficielles et les candidoses invasives ou systémiques, ont des manifestations multiples.

Les candidoses superficielles sont les affections fongiques les plus fréquentes et souvent bénignes, elles peuvent être divisées en trois groupes principaux.

- les candidoses digestives : Elles correspondent à des atteintes de l'appareil digestif (bouche, œsophage, intestin...). Elles se caractérisent par l'apparition d'un enduit crémeux blanchâtre. Sur la muqueuse buccale, cette prolifération porte le nom de muguet.

- les candidoses génito-urinaires : Elles peuvent être présentes aussi bien chez l'homme que chez la femme. Les atteintes vaginales sont les plus fréquentes, se traduisant par l'apparition d'un écoulement purulent et d'un prurit intense. La lésion inflammatoire peut s'étendre au périnée. Ces candidoses sont souvent récidivantes.

- les candidoses cutanées : Elles apparaissent au niveau de plis cutanés (plis du ventre, sous la poitrine, entre les doigts ou les orteils). On parle alors d'intertrigo qui se caractérise par l'apparition d'une lésion érythémateuse et d'une fissure au niveau du pli cutané.

Les candidoses superficielles peuvent être à l'origine d'une infection systémique chez les patients à haut risque.¹³

Les candidémies qui sont des infections à *Candida* prouvées avec présence d'une ou plusieurs hémocultures positives à *Candida* peuvent être classées en :¹⁴

- candidoses invasives, où une levure est isolée d'un site normalement stérile ;
- candidoses systémiques ou disséminées, où une levure est isolée d'au moins deux sites normalement stériles non contigus. Elles peuvent être qualifiées de profondes lorsqu'elles sont caractérisées histologiquement ou microbiologiquement

Les candidémies représentent de 10% à 15% des septicémies en milieu hospitalier.¹⁵ Elles sont préoccupantes du fait de leur morbidité-mortalité importante.

3. Epidémiologie

Les candidoses existent dans toutes les régions du monde mais d'importantes variations existent entre les régions. Il est difficile de donner une incidence moyenne des candidémies. En effet, beaucoup d'études sont réalisées mais le type de population recrutée est très variable, et les résultats rendus sont difficilement comparables. Il est cependant absolument nécessaire de connaître le profil de l'épidémiologie locale afin d'adapter au mieux le traitement antifongique.

Des études américaines rapportent que l'incidence annuelle des infections à *Candida* est de 8 pour 100 000 habitants.^{16,17} En Europe, les *Candida spp* sont responsables de 2 à 3% des septicémies se classant entre le 6^{ème} et 10^{ème} rang parmi les pathogènes les plus fréquents.¹⁸

Introduction générale

La répartition des espèces de *Candida* chez les patients atteints de candidose a évolué durant les 20 dernières années. L'incidence de *C. albicans* a diminué (de 70% à 50% quel que soit le type d'étude) alors que l'incidence des espèces CNA (*Candida non-albicans*), dont *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. auris* et *C. parapsilosis* a augmenté.^{9,19} Aujourd'hui *C. albicans* reste majoritairement responsable de ces infections invasives, mais la répartition des espèces CNA évolue et diffère suivant les régions du monde.^{10,17,20}

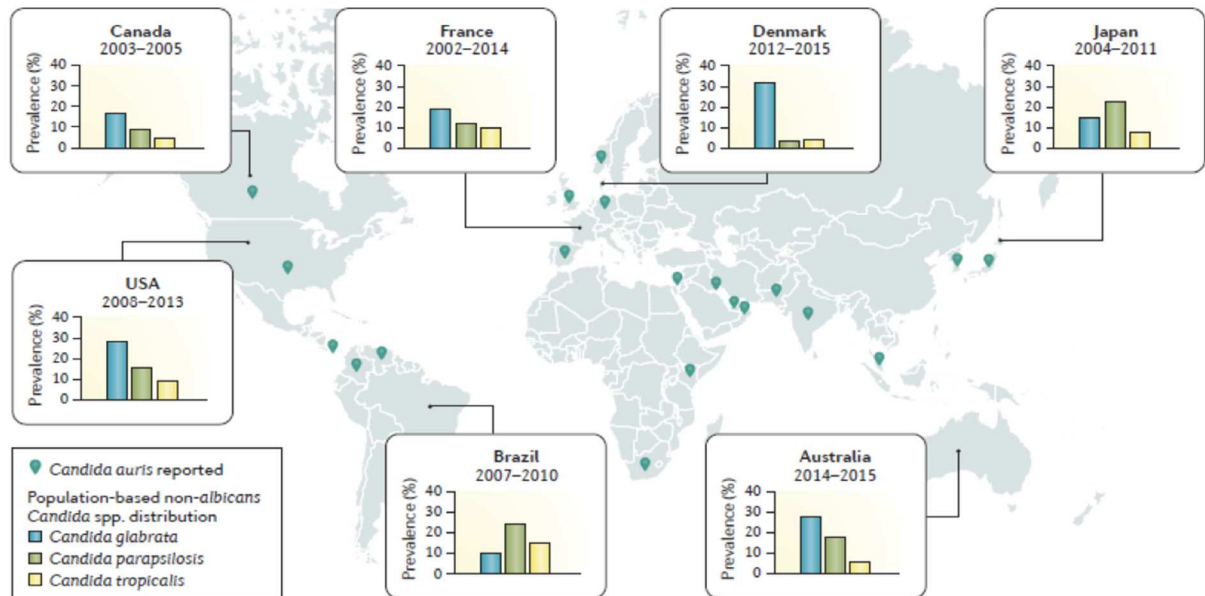


Figure 4 : Répartition géographique des différentes espèces de *Candida*. *C. albicans* est l'espèce prévalente associée aux candidoses invasives. La répartition des espèces CNA varie énormément et peut avoir varié depuis l'établissement de cette figure (mars 2018), notamment au niveau de l'apparition de cas de *C. auris*¹⁰

II. Traitements antifongiques

Les premiers antifongiques ont été disponibles dans les années 1950 mais l'arsenal antifongique a longtemps été restreint à l'amphotéricine B et à la nystatine. Les années 1980, ont vu le développement de molécules de la famille des azolés. Entre les années 1990 et 2000, le nombre de molécules antifongiques disponibles a doublé, passant de moins de 10 à plus de 20 molécules. Ainsi l'arsenal thérapeutique antifongique n'a cessé de s'enrichir depuis 30 ans, même si le nombre de molécules reste encore limité. Néanmoins, des connaissances toujours plus détaillées concernant la structure, la composition et la biochimie des cellules fongiques, ainsi que les diverses facettes des infections fongiques, contribuent encore à l'heure actuelle au développement de nouveaux agents antifongiques.

Actuellement, 5 grandes familles chimiques d'antifongiques existent :^{21,22} les polyènes, les fluoropyrimidines, les azolés, les allylamines et les échinocandines. Parmi elles, seulement 4 (les polyènes, les fluoropyrimidines, les azolés et les échinocandines) sont utilisées systématiquement.²³ Même si chaque antifongique possède sa propre cible sur la cellule fongique, il n'existe à l'heure actuelle que 3 cibles fongiques différentes :²⁴ les polyènes et les azolés agissent sur l'ergostérol de la membrane fongique,²⁵ les fluoropyrimidines interfèrent avec la synthèse de l'ADN et l'ARN des champignons²⁶ et les échinocandines interviennent au niveau de la paroi fongique²⁷ (Figure 5).^{24,28}

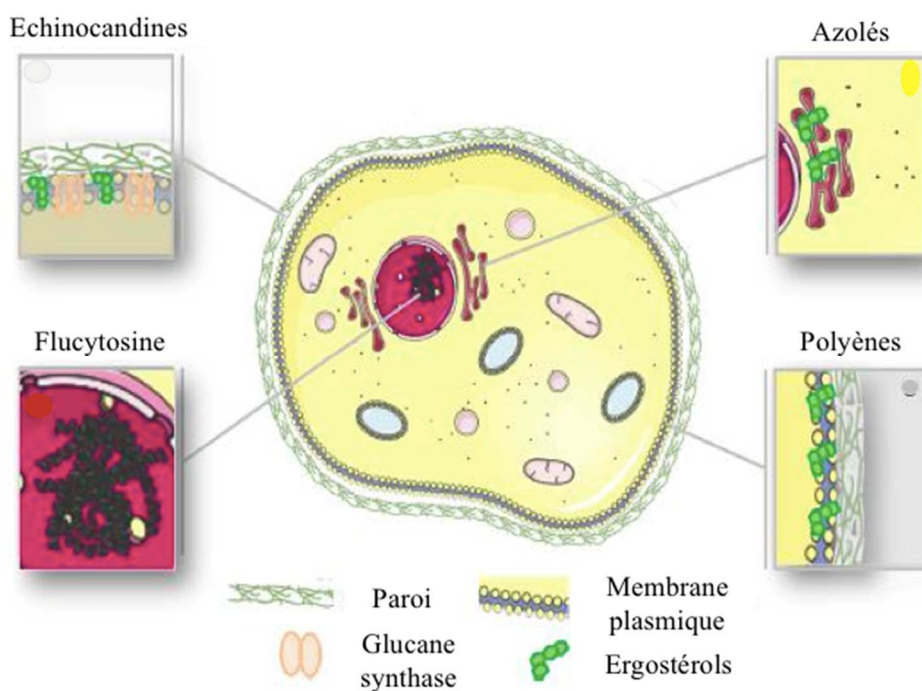


Figure 5 : Cibles principales des antifongiques²⁴

Introduction générale

1. Les polyènes

1.1. Historique

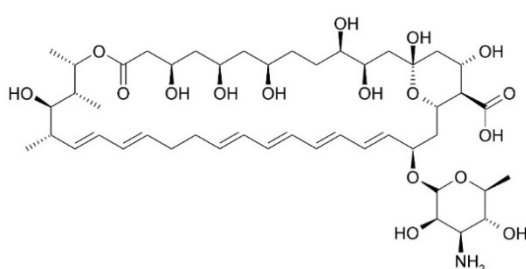
Les polyènes sont des macrolides. Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine.²⁹

Les polyènes ont été extraits de culture de *Streptomyces* à partir des années 1950. La nystatine a été extraite en 1950 à partir *S. noursei* par Hazen et Brown.^{30,31} En 1959, Dutcher et ses collaborateurs isolent l'amphotéricine B, produite par une culture de *S. nodosus*, bactérie prélevée dans un échantillon de sol de la rivière Orinoco au Vénézuéla.³⁰ La natamycine est quant à elle produite par la bactérie *S. natalensis*.³²

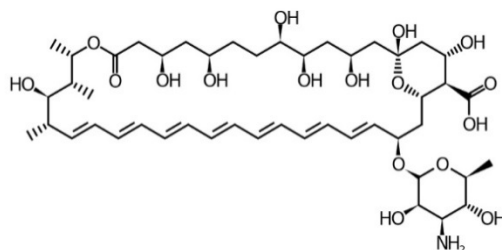
On sait aujourd'hui que la synthèse des polyènes par les bactéries du genre *Streptomyces* se fait par l'intermédiaire d'un cluster de gènes relativement bien conservés entre les différentes espèces de ce genre.³²

1.2. Structure

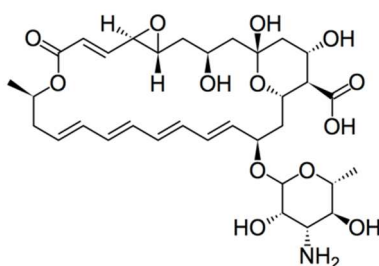
La structure des polyènes est constituée d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement d-mycosamine (Figure 6).³³



Amphotéricine B



Nystatine



Natamycine

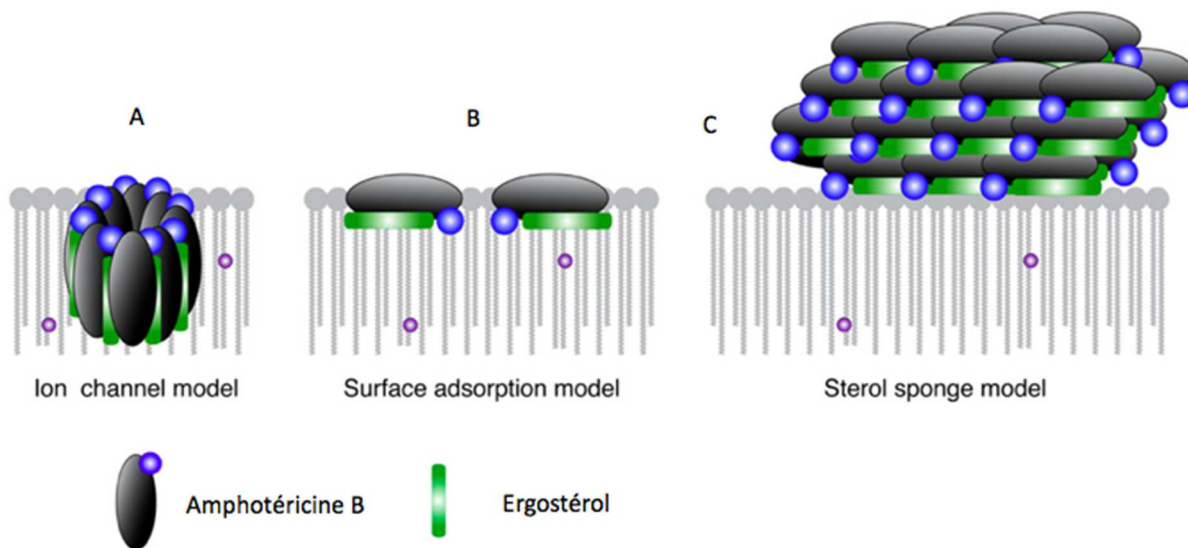
Figure 6 : Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs

L'amphotéricine B est une molécule amphiphile qui comprend une chaîne polyhydroxylée hydrophile, associée à une chaîne polyène lipophile.

Introduction générale

1.3. Mode d'action et résistance aux polyènes

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K^+ , à l'origine de la lyse cellulaire.^{34,22} Deux autres modèles d'action de l'amphotéricine B ont été proposés plus récemment (Figure 7).³⁵



- A.** Modèle classique des canaux ioniques pour la structure et la fonction de l'amphotéricine B ;
B. Modèle d'adsorption de surface ;
C. Un nouveau modèle d'éponge de stérol, dans lequel l'amphotéricine B existe principalement sous la forme de grands agrégats extramembraneux qui extraient l'ergostérol des bicouches lipidiques.

Figure 7 : Modèles possibles d'action de l'amphotéricine B³⁵

La résistance aux polyènes reste un événement relativement rare chez les isolats cliniques de champignons pathogènes. En effet les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe, ou alors restent uniquement en contact avec cette face externe.²³ Ils échappent ainsi à une éventuelle métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux. Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible.³⁶

1.4. Pharmacologie

Les polyènes possèdent une affinité non négligeable pour le cholestérol, l'équivalent chez l'homme de l'ergostérol fongique, ce qui leur confère une forte toxicité, à l'origine de multiples effets secondaires.³⁴ Seule l'amphotéricine B est utilisée par voie systémique en raison de sa moindre toxicité, la nystatine et la natamycine n'étant utilisées que par voie locale ou orale. Par contre, l'amphotéricine B étant très peu hydrosoluble et donc très peu absorbée au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, son action systémique nécessite une

Introduction générale

administration intraveineuse³⁷ qui s'accompagne d'effets indésirables parfois importants, surtout au niveau du foie et des reins. L'utilisation de formulations récentes, telles que les complexes lipidiques d'amphotéricine B ou l'amphotéricine B liposomale, permet de limiter ces effets secondaires.³⁸

2. Les dérivés pyrimidiques

2.1. Historique

L'un des agents antifongiques les plus anciens est la flucytosine (5-fluorocytosine, 5-FC), un analogue fluoré de la cytosine. Elle a été synthétisée pour la première fois en 1957 par Duchinsky et ses collaborateurs, à des fins antitumorales.³⁹ Ce n'est qu'en 1963 que l'équipe de Grunberg découvre son potentiel antifongique sur des modèles murins de candidose et de cryptococcose,⁴⁰ et en 1968, la 5-FC est utilisée avec succès chez l'homme pour traiter une candidose systémique et une méningite à cryptocoque.⁴¹

2.2. Structure

Les fluoropyrimidines sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (Figure 8).

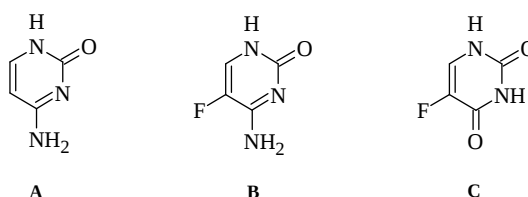


Figure 8 : Structure chimique de la cytosine (A), de la 5-fluorocytosine (B) et du 5-fluorouracile (C)

2.3. Mode d'action et résistance à la 5-FC

La 5-FC n'a pas d'activité antifongique intrinsèque, c'est sa conversion en 5-FU par les cellules fongiques qui lui confère son pouvoir fongistatique. En effet, la 5-FC pénètre rapidement à l'intérieur des cellules fongiques par des transporteurs plus ou moins spécifiques, tels que la cytosine perméase ou des transporteurs des pyrimidines, puis elle est métabolisée en 5-FU par la cytosine désaminase.⁴² Le 5-FU est ensuite converti en 5-fluorouracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase (UPRT). A partir de cette étape, deux voies distinctes permettent d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire. Le 5-fluorouracile monophosphate peut être converti en 5-fluorouracile triphosphate qui s'incorpore dans les ARN à la place de l'uracile triphosphate et bloque ainsi la synthèse protéique. Le 5-fluorouracile monophosphate peut également être converti par l'UPRT en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate, composé qui va inhiber la thymidylate synthétase, une enzyme clé de la biosynthèse de l'ADN, et bloque ainsi la multiplication cellulaire (Figure 9).^{42,43,29}

Introduction générale

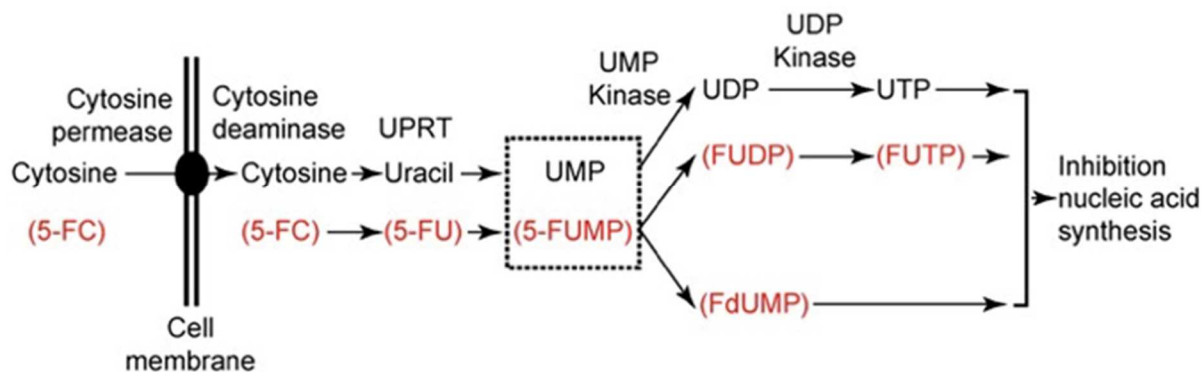


Figure 9 : Métabolisation intracellulaire de la 5-fluorocytosine (en rouge) et de la cytosine (en noir)⁴⁴

La résistance à la 5-FC peut être intrinsèque, cela ne concerne que 1 à 2% des isolats de *Candida*, ou acquise, par sélection de mutants résistants après exposition à l'antifongique, et cette dernière voie est très rapide. En raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC, de nombreux événements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique. Ils peuvent être regroupés en deux catégories.⁴⁵

- la résistance peut survenir par mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FC. Ainsi, le mécanisme le plus fréquent à l'origine de la résistance acquise à la 5-FC est une mutation sur le gène *FUR1*, codant l'UPRT.
- la résistance à la 5-FC peut également résulter d'une induction du métabolisme des pyrimidines, qui entrent alors en compétition avec l'antifongique. Ce mécanisme de résistance se traduit notamment par une surexpression du gène *CDC21*, codant la thymidylate synthétase.

Le problème de résistance, associé à l'utilisation de la 5-FC en monothérapie, a été mis en évidence dans plusieurs études.⁴⁶

2.4. Pharmacologie

La 5-FC possède un spectre d'activité étendu. Elle a ainsi démontré son efficacité sur les genres *Candida* et *Cryptococcus*, mais également chez les dématiés *Phialophora* et *Cladosporium* ainsi que chez les filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*.⁴²

Du fait d'une apparition rapide de résistance à la 5-FC, celle-ci est rarement utilisée en monothérapie,^{47,48} mais plutôt en association avec un autre antifongique, l'amphotéricine B.²¹ ou des antifongiques azolés.⁴⁹

Introduction générale

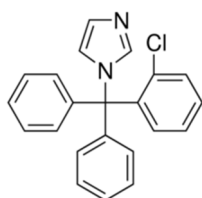
3. Les dérivés azolés

3.1. Historique

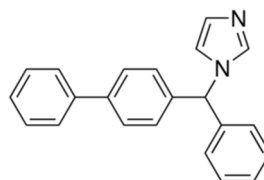
Les dérivés azolés sont les antifongiques les plus étudiés et utilisés depuis 70 ans.³⁶ Le premier antifongique azolé, le benzimidazole, a été synthétisé par Woolley en 1944, mais ce n'est qu'en 1958 que la communauté scientifique commence à s'intéresser aux azolés pour leurs propriétés antifongiques, avec le chlormidazole.⁵⁰ Vers la fin des années 1960, le clotrimazole, l'éconazole et le miconazole, trois imidazolés, sont mis sur le marché.⁵¹ En 1981, la Food and Drug Administration (FDA) approuve un nouvel imidazolé, le kétoconazole, développé par Heeres et ses collaborateurs.⁵² Il sera pendant près de 10 ans le seul antifongique disponible pour traiter les infections fongiques systémiques. En 1990, le fluconazole, premier triazolé, est utilisé pour la première fois en clinique.⁵³ Dans le but de trouver une molécule ayant un spectre plus étendu que le fluconazole, l'itraconazole est mis au point et approuvé par la FDA en 1992.⁵⁴ Depuis le début des années 2000, trois composés triazolés dits de « seconde génération » ont été mis sur le marché : le voriconazole, le posaconazole, respectivement approuvés par la FDA en 2002 et en 2006.⁵⁵ Un autre triazolé, l'isavuconazole a été approuvé par la FDA en 2015 pour le traitement des aspergilloses invasives et des mucormycoses.⁵⁶

3.2. Structure

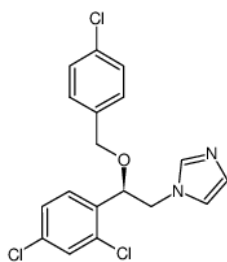
Les molécules de la famille des azolés sont des molécules synthétiques. Ces composés sont répartis en deux groupes : les imidazolés, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Figure 10).⁵⁷



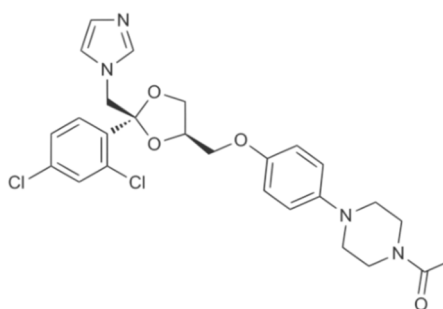
Clotrimazole



Bifonazole

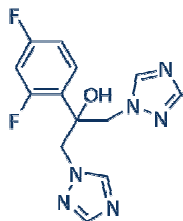


Econazole

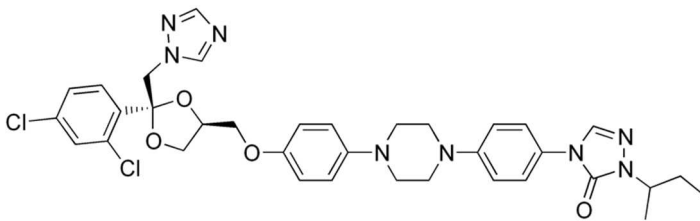


Kétoconazole

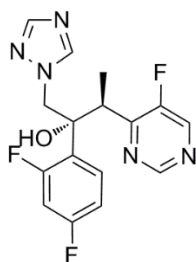
Introduction générale



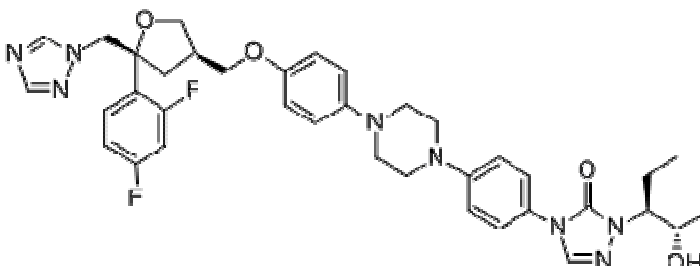
Fluconazole



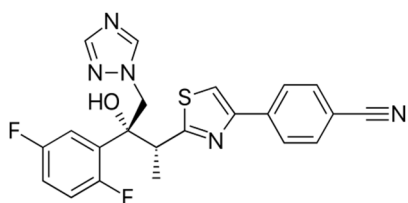
Itraconazole



Voriconazole



Posaconazole



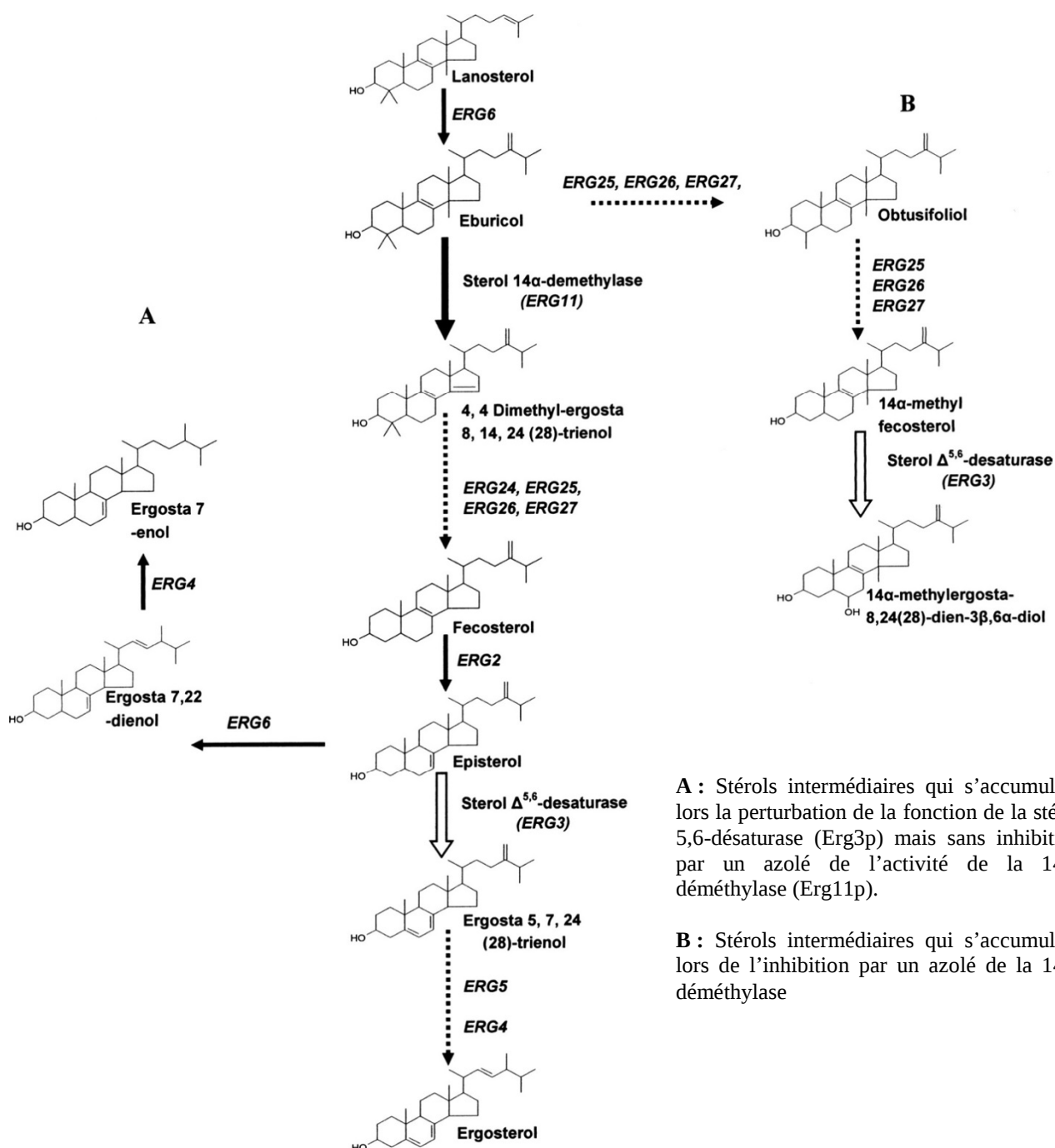
Isavuconazole

Figure 10 : Structure chimique des principaux antifongiques azolés

3.3. Mécanisme d'action

Chez les champignons, l'ergostérol est le stérol majoritaire de la membrane plasmique, il remplace le cholestérol présent chez l'homme. Il joue un rôle dans le maintien de l'intégrité et de la fluidité membranaire. La synthèse de l'ergostérol nécessite un apport en oxygène et se déroule en une vingtaine d'étapes, à partir de l'Acétyl-coenzyme A (Figure 11).

Introduction générale



A : Stérols intermédiaires qui s'accumulent lors la perturbation de la fonction de la stérol 5,6-désaturase (Erg3p) mais sans inhibition par un azolé de l'activité de la 14 α -déméthylase (Erg11p).

B : Stérols intermédiaires qui s'accumulent lors de l'inhibition par un azolé de la 14 α -déméthylase

Figure 11 : Biosynthèse de l'ergostérol chez *C. albicans*^{57,58}

Le mode d'action des azolés consiste en l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol,⁵⁹ via l'inhibition spécifique de la lanostérol 14 α -déméthylase (aussi appelée Erg11p et Cyp51p), une enzyme à cytochrome P450 codée par le gène *ERG11*.^{60,61} Cette enzyme intervient dans la cascade qui convertit le lanostérol en ergostérol.⁶² L'inhibition de la 14 α -déméthylase par les azolés entraîne l'accumulation de 14 α -méthylstérols dont le 14 α -méthylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol qui est toxique. L'accumulation de 14 α -méthylstérols désorganise, dans la membrane du champignon, l'agencement des chaînes acyle des phospholipides et gêne ainsi les fonctions des systèmes enzymatiques liés à la membrane comme l'ATPase et les enzymes responsables du transfert d'électrons (Figure 12).^{63,64,65}

Introduction générale

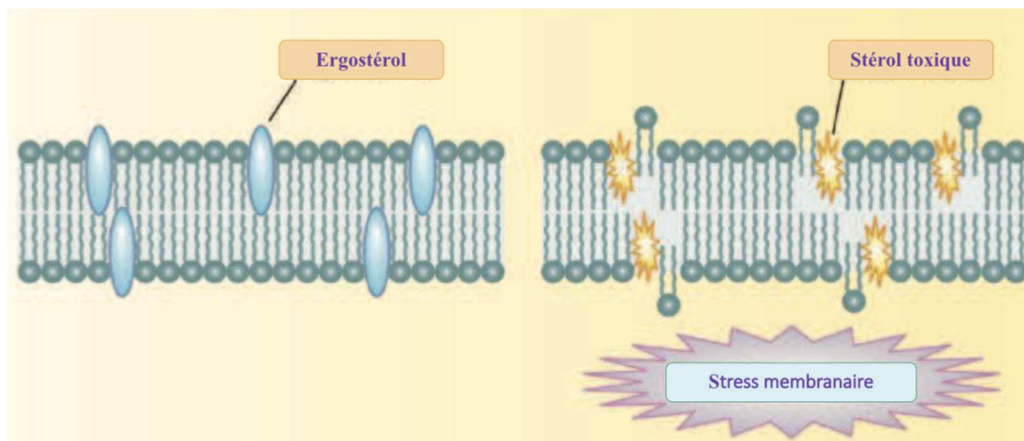


Figure 12 : Mécanisme d'action des azolés⁶⁴

3.4. Résistance aux azolés

La résistance aux azolés chez les espèces de *Candida* est devenue un problème mondial depuis l'introduction puis l'utilisation généralisée des triazoles au début des années 1990. Le nombre d'espèces de *Candida* résistantes aux azoles et multirésistantes, telles que *C. glabrata* ou, récemment, *C. auris*, augmentent à une fréquence alarmante.⁶⁶

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la résistance aux azolés chez *Candida*.⁶⁷ Ils peuvent se dérouler séparément mais ils sont souvent associés.³⁶

Le premier mécanisme de résistance aux azolés implique une surproduction de la lanostérol 14 α -déméthylase, due à la surexpression ou mutation du gène *ERG11*.⁶⁸ Dans cette situation, les azolés ne sont plus en quantité suffisante pour inhiber la conversion du lanostérol en 14 α -stérols déméthylés (Figure 13, A).⁶⁹

Le deuxième mécanisme associé à la résistance aux azolés est la surexpression des gènes *CDR* de la super famille ATP-binding cassette et des gènes *MDR*^{70,63} qui codent pour les pompes à efflux chez *Candida*. L'induction de pompes MDR (multidrug resistance) se traduit par une réduction des concentrations de médicament au niveau de l'enzyme cible, la lanostérol 14 α -déméthylase (Figure 13, B).⁷¹

Le troisième mécanisme de résistance aux azolés correspond à des mutations du gène *ERG3* qui empêchent la formation du 14 α -méthyl-3,6-diol (stérol toxique) à partir du 14 α -méthylfécostérol (Figure 13, C).⁷²

Introduction générale

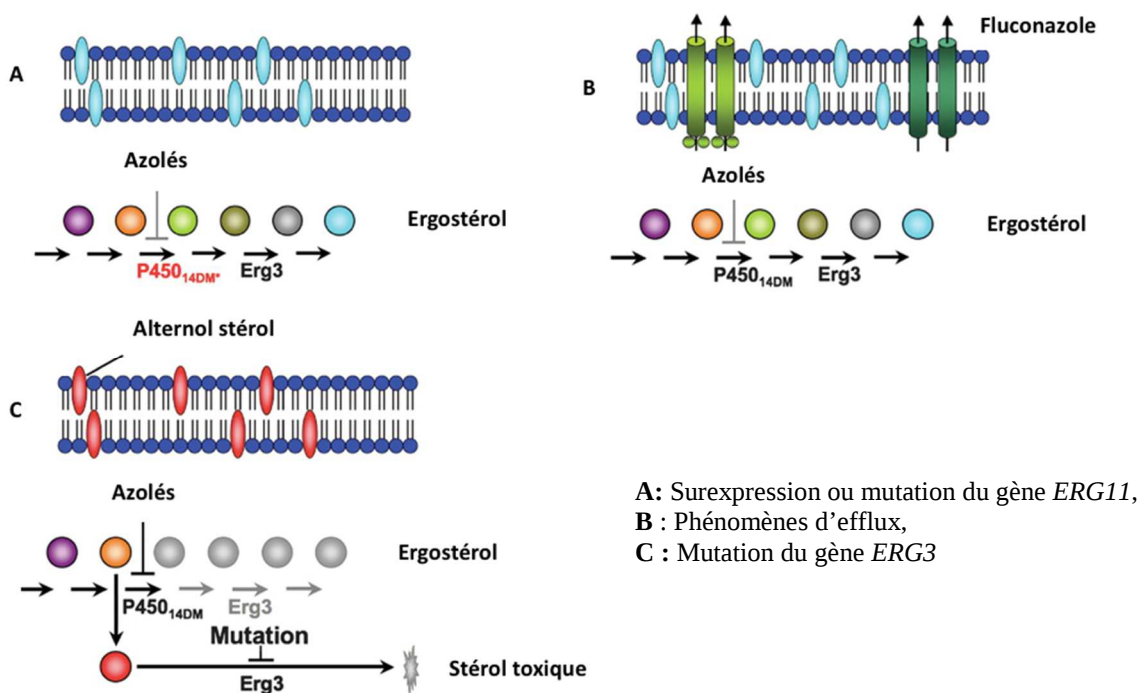


Figure 13 : Mécanismes de résistance aux azolés chez *C. albicans*⁶³

3.5. Pharmacologie

Le premier groupe azolé à avoir été mis sur le marché sont le clotrimazole, l'éconazole, le bifonazole et le miconazole. Cependant, leur utilisation se limite à un usage externe en raison de leur forte toxicité lors d'une administration orale.

Le fluconazole est très hydrosoluble et donc facilement administré par voie intraveineuse, son absorption après administration orale est quasi totale et il diffuse largement dans tout l'organisme, y compris dans le liquide céphalo-rachidien.^{73,74} Il est indiqué pour le traitement des candidoses superficielles (oropharyngées, oesophagiennes ou vaginales), des candidoses disséminées, des méningites à cryptocoques, des coccidioïdomycoses et des candidoses mucocutanées.

Cependant, son utilisation systématique aussi bien à titre curatif que prophylactique a joué en sa défaveur ; en effet on observe l'augmentation des cas de résistance aux antifongiques azolés ainsi qu'un changement de l'incidence des différentes espèces rencontrées en mycologie médicale.

L'itraconazole a un spectre est élargi aux champignons filamenteux. En raison de son caractère liposoluble, l'itraconazole possède une toxicité plus forte que le fluconazole ainsi que des propriétés pharmacocinétiques moins intéressantes. Il est indiqué pour le traitement des onychomycoses et des infections fongiques superficielles ainsi que dans certains cas d'aspergilloses systémiques.⁷⁵

Le voriconazole, le posaconazole, le ravuconazole, l'isavuconazole et l'albaconazole possèdent un spectre d'activité plus étendu que l'itraconazole, puisqu'ils sont actifs sur les

Introduction générale

genres *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium* et *Trichosporon*, les champignons dimorphiques, les dermatophytes et sur *Cryptococcus neoformans*.^{76,73}

Les triazolés font partie des agents les plus utilisés en clinique pour le traitement des infections fongiques invasives.^{77,78}

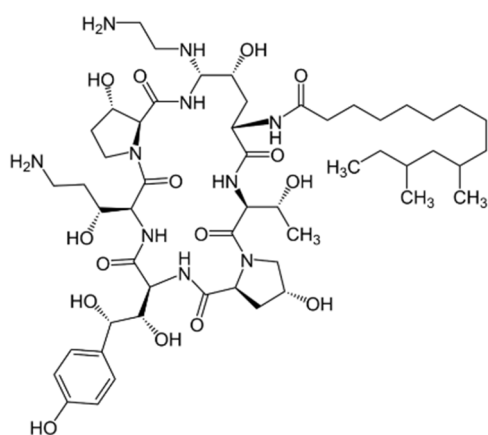
4. Les échinocandines

4.1. Historique

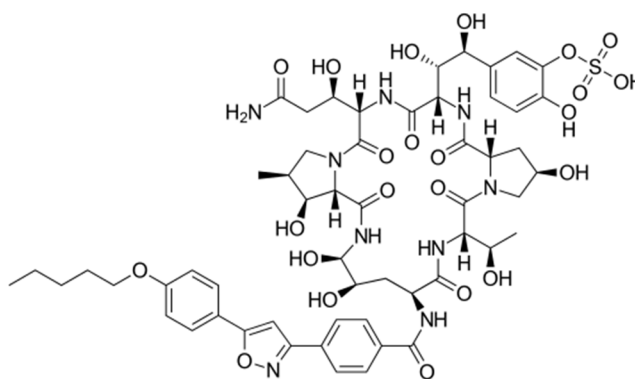
Depuis ces 18 dernières années, les échinocandines représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives.⁴⁴ A l'heure actuelle, trois échinocandines sont approuvées aux Etats-Unis par la FDA et par l'EMA : la caspofungine en 2001 par la FDA et en 2002 par l'EMA, la micafungine en 2005 et enfin l'anidulafungine en 2006.⁷⁹

4.2. Structure

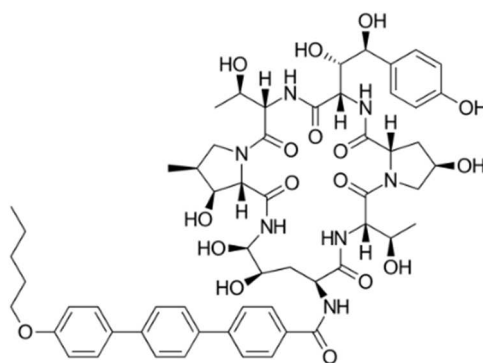
Les échinocandines sont des lipopeptides amphiphiles semisynthétiques, comprenant un noyau hexapeptide cyclique et une chaîne latérale lipidique (Figure 14).^{80,81}



Caspofungine



Micafungine



Anidulafungine

Figure 14 : Structure chimique des trois échinocandines actuellement utilisées en clinique

Introduction générale

4.3. Mode d'action

Les échinocandines ciblent la paroi fongique. Cette dernière est constituée de composants qui n'ont pas d'équivalents chez l'Homme et son intégrité est indispensable à la survie du micro-organisme. Elle joue un rôle de protection physique vis-à-vis des cellules immunitaires ou des autres micro-organismes, elle est également responsable du maintien de l'osmolarité, de la forme et de la taille de la cellule fongique. Enfin elle est aussi le siège de nombreuses réactions enzymatiques et a un rôle important dans la communication intercellulaire.⁸²

La paroi est composée d'une couche interne, constituée par un enchevêtrement de polysaccharides, les $\beta(1-3)$ -glucanes et la chitine, dans lequel sont insérées des mannoprotéines, et d'une couche externe de mannoprotéines.⁸³ La $\beta(1,3)$ -glucane est responsable du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique (Figure 15).

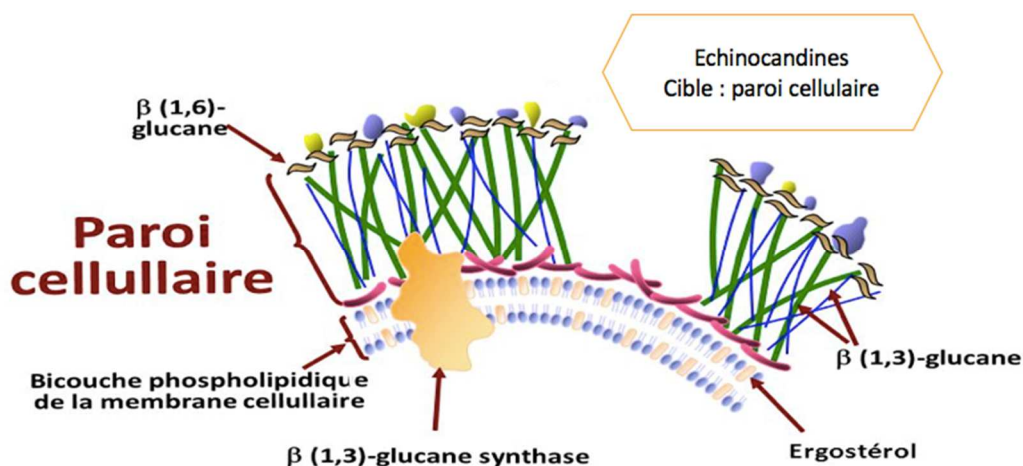


Figure 15 : Structure de la paroi cellulaire du champignon⁸⁴

Les échinocandines inhibent de manière non compétitive l'action de la $\beta(1,3)$ -glucane synthase.^{85,86} La $\beta(1,3)$ -glucane synthétase est composée d'une sous-unité activatrice et d'une sous-unité catalytique, codée par les gènes *FKS*.⁸⁷ Chez la plupart des champignons, deux gènes *FKS* sont présents, *FKS1* serait exprimé lors de la phase végétative de croissance tandis que *FKS2* serait exprimé lors de la sporulation. Le blocage de la $\beta(1,3)$ -glucane synthétase entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la lyse de la cellule fongique.⁴⁴

4.4. Mécanismes de résistance

Le phénomène de résistance aux échinocandines est rare : plus de 97% des isolats cliniques du genre *Candida* sont sensibles aux échinocandines. Le principal mécanisme de résistance de *Candida spp.* aux échinocandines est l'altération de l'enzyme cible : la $\beta(1,3)$ -glucane synthase (Figure 16).

Introduction générale

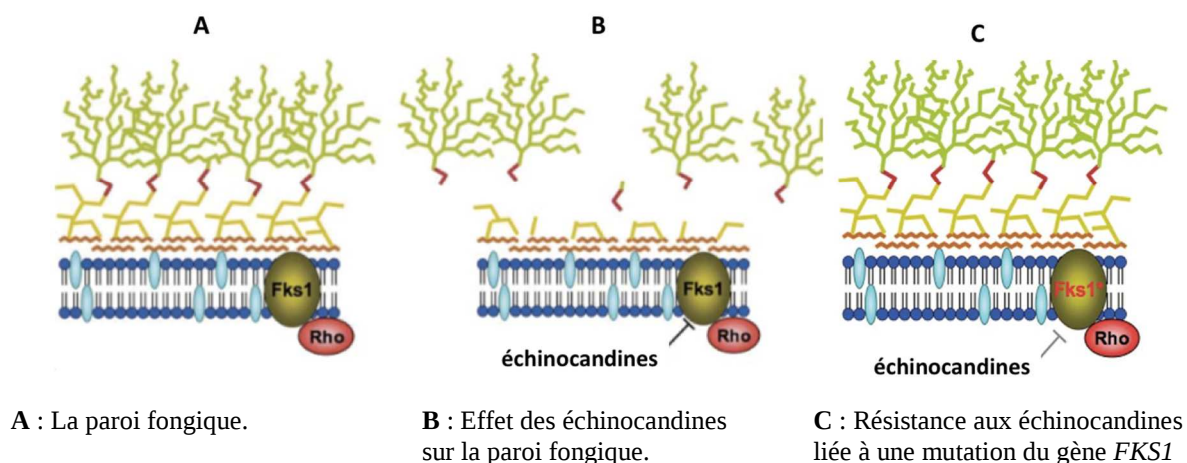


Figure 16 : Mode d'action des échinocandines et mécanisme de résistance⁶³

Deux types d'altération sont observées : soient des mutations ponctuelles sur les gènes *FKS1* ou *FKS2* soit une surexpression de la glucane synthase.⁸⁵

L'étude de Pfaller *et al.* a mis en évidence l'existence de résistance croisée entre les trois échinocandines.⁸⁸

4.5. Pharmacologie

En raison de leur haut poids moléculaire, ces molécules sont très peu absorbées par voie orale et sont uniquement utilisées par voie intraveineuse. Ces molécules présentent une faible toxicité (très peu d'effets secondaires, pour la plupart mineurs, ayant été rapportés), une vitesse d'élimination très lente qui permet de n'effectuer qu'une administration par jour, ainsi qu'une faible interaction avec d'autres médicaments.⁸⁹

L'autre point d'intérêt des échinocandines est leur spectre d'activité. En effet, les échinocandines ont des effets fongicides sur les genres *Candida* et *Aspergillus*.⁹⁰ D'autres espèces semblent être sensibles aux échinocandines, par exemple *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans* et *Cladophialophora bantiana*.⁸⁹

5. Nouveaux antifongiques en cours de développement

Les cliniciens sont actuellement confrontés à plusieurs défis émergents dans la résistance aux antifongiques. En effet on observe, des susceptibilités réduites voire l'apparition de résistance franche aux antifongiques utilisés en clinique suite à une exposition clinique ou environnementale à ces agents.

Plusieurs antifongiques expérimentaux font actuellement l'objet d'une évaluation préclinique et clinique. Ils peuvent être divisés en deux classes :⁹¹

- des composés similaires aux classes antifongiques cliniquement disponibles en termes de mécanismes d'action, mais qui offrent des avantages du point de vue de la toxicité ou de la biodisponibilité.

Introduction générale

- des composés avec des mécanismes d'action nouveaux sont également en cours de développement.

Quelques exemples sont détaillés dans les paragraphes qui suivent :

5.1. Inhibiteurs spécifiques du Cyp51 fongique : VT-1129, VT-1161, et VT-1598

L'une des limites de la classe des antifongiques azolés réside dans les interactions médicamenteuses cliniquement significatives qui se produisent avec les membres de cette classe. En effet les azolés, de par leurs mécanismes d'action, sont des inhibiteurs de certains isoformes des cytochromes hépatiques humains par exemple le cytochrome P450 (CYP450) responsable, notamment métabolisme de nombreux autres médicaments. Le développement d'inhibiteurs spécifiques du Cyp51 fongique est donc une priorité.

Viamet Pharmaceuticals a remplacé le groupe triazole métal-binding par un tétrazole modifié sur la partie reconnue par les acides aminés du site de liaison au substrat. Ces modifications ont abouti à des composés avec une inhibition plus spécifique du Cyp51 fongique.

Les résultats précliniques de trois composés ont été rapportés dans la littérature VT-1129,⁹² VT-1161,⁹³ et VT-1598⁹⁴ (Figure 17). Le VT-1161 est actuellement en essais cliniques de phase II.

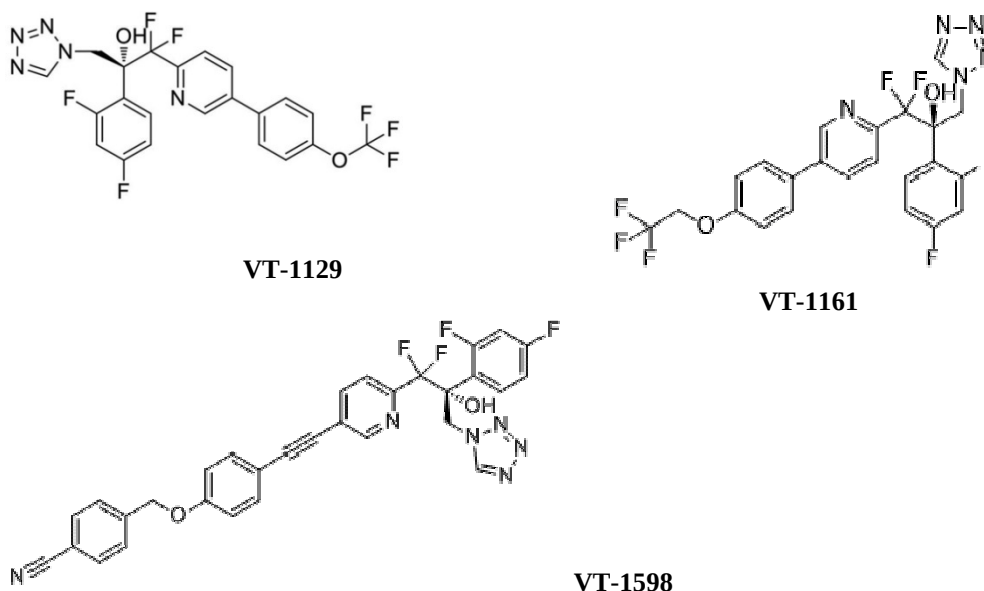


Figure 17 : Composés VT-1129, VT-1161, et VT-1598

Introduction générale

5.2. Nouveaux inhibiteurs de la glucane synthase : CD101 et SCY-078

Les échinocandines doivent être administrées par voie intraveineuse sur une base quotidienne, de sorte qu'une utilisation prolongée en tant que traitement peut poser des problèmes. Le composé **CD101** (Figure 18) est une échinocandine expérimentale en cours de développement qui a été structuellement modifiée pour conférer une longue demie-vie (> 80 h), afin de permettre une administration intraveineuse moins fréquente (une fois par semaine).⁹⁵

Des études *in vitro* ont rapporté une activité très intéressante contre les espèces *Candida* (notamment *C. auris*) et *Aspergillus*,⁹⁶ confirmée par une efficacité *in vivo* dans les modèles murins de candidose invasive.⁹⁷ Cette molécule était en Phase II d'essais cliniques en septembre 2017.⁹¹

Un autre inhibiteur de la glucane synthase actuellement mis au point pour l'administration orale et intraveineuse est le composé **SCY-078** ou enfumafungin (Figure 18). L'originalité du SCU-078 vient de sa structure (il s'agit d'un triterpène) et de son administration par voie orale. Le composé **SCY-078** démontre une activité *in vitro* importante contre diverses espèces de *Candida*, y compris certains isolats avec des mutations connues dans les gènes *FKS1* et *FKS2*, ainsi que des isolats résistants au fluconazole et des isolats de *C.auris*.^{98,99} Cette molécule était en Phase II d'essais cliniques en septembre 2017.⁹¹

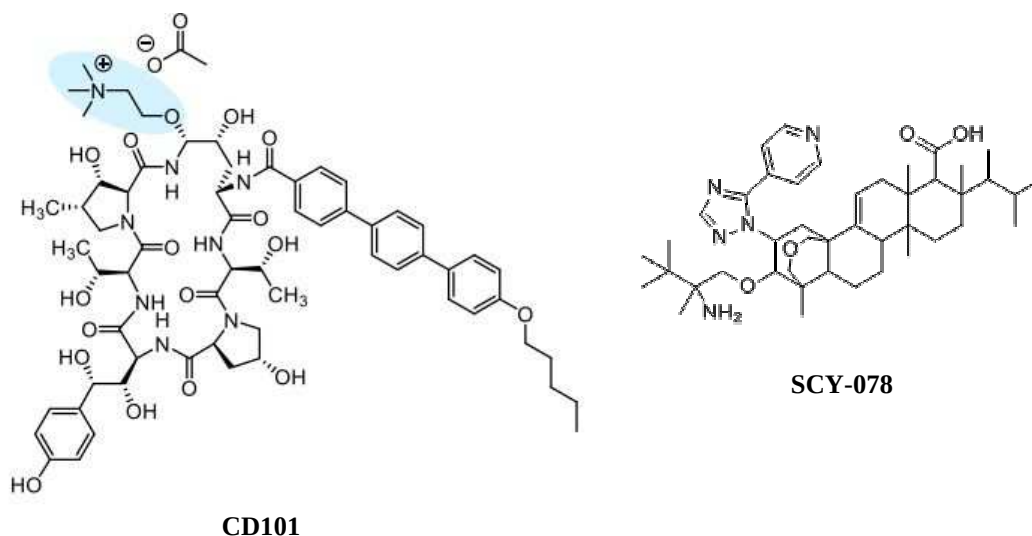


Figure 18 : Composés CD101 et SCY-078

5.3. Nouvel inhibiteur de la biosynthèse de la pyrimidine fongique : F901318

Le composé **F901318** (Figure 19) inhibe l'enzyme oxydoréductase dihydroorotate déshydrogénase, qui est importante pour la biosynthèse de la pyrimidine. Des préparations orales et intraveineuses sont en cours de développement¹⁰⁰ et des essais cliniques de phase II sont en cours.⁹¹

Introduction générale

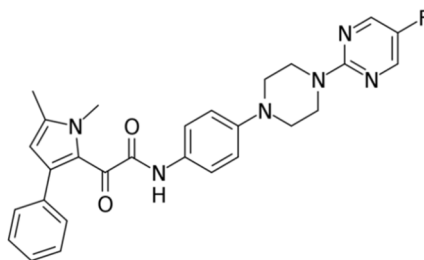


Figure 19 : Composé F901318

5.4. Inhibiteur de la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol fongique : APX001

Le composé **APX001** (Figure 20) inhibe l'inositol acyltransférase, empêchant la maturation des protéines ancrées au GPI (glycosylphosphatidylinositol) de se fixer à la paroi cellulaire. Une activité *in vitro* importante a été rapportée pour le composé **APX001** contre un large spectre de champignons : différents espèces de *Candida*, d'*Aspergillus*, de *Fusarium* et de *Scedosporium*. De plus l'efficacité *in vivo* a été montrée dans des modèles animaux d'infections fongiques invasives diverses (candidoses invasives, aspergilloses et fusarioses).^{101,96} Ce composé était en essai clinique de Phase II en septembre 2017.⁹¹

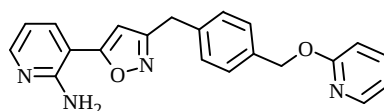


Figure 20 : Composé APX001

Ainsi plusieurs nouveaux antifongiques sont actuellement en cours de développement permettant d'espérer pouvoir surmonter la résistance aux antifongiques classiques et d'éviter les effets indésirables et les interactions médicamenteuses associées aux agents actuellement disponibles. Les travaux menés dans les prochaines années nous diront si ces agents parviendront à atteindre ces objectifs.

III. Les protéines kinases C

Les protéines kinases C (PKC) sont des sérine/thréonine kinases capables de phosphoryler d'autres protéines sur les fonctions alcools.¹⁰² Elles sont considérées comme des médiateurs classiques de nombreux agonistes intra- et extracellulaires¹⁰³ et jouent un rôle dans la cascade des MAPK.¹⁰⁴ Elles sont impliquées dans différentes fonctions physiologiques de la cellule comme les phénomènes d'apoptose, l'activation des plaquettes, la conformation de l'actine dans la cytosquelette, la modulation de l'activité des canaux ioniques, la sécrétion et la prolifération cellulaire.¹⁰⁵

Les membres de la famille des PKCs sont présents chez les eucaryotes, de la levure à l'homme.¹⁰⁶ L'enzyme a été nommée d'après les premières isoformes humaines décrites, qui sont activées par interaction avec les lipides et les ions calcium, d'où le "C" (conventionnel ou cPKCs).¹⁰⁷ Plus tard, d'autres isoformes de PKC de mammifères ont été identifiées, dont certaines ne sont pas activées par le calcium (nPKCs) ou les lipides (aPKCs). Il existe au moins dix isoformes de PKC chez les mammifères alors que dans le règne fongique seulement une ou deux isoformes ont été décrites (Figure 21).

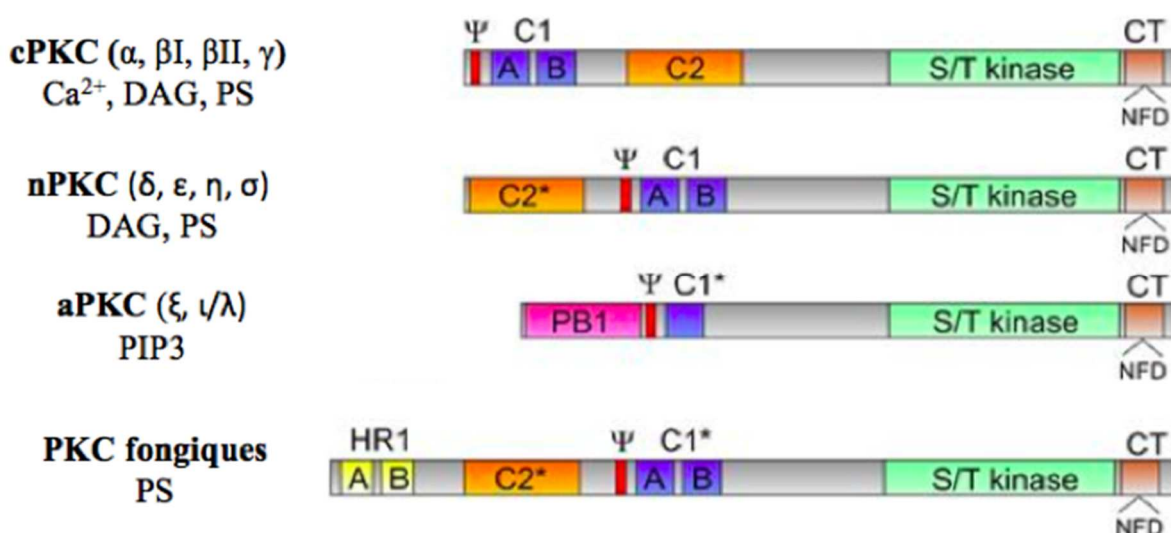


Figure 21 : Différents domaines des isozymes PKC humains et fongique¹⁰⁸

1. Structures et fonctions des domaines PKC humains

Neuf gènes codent pour des isozymes PKC chez l'Homme. Il existe 10 isoformes de PKC qui peuvent être réparties en 3 groupes en fonction de leurs cofacteurs et de leurs structures : classique ou conventionnelle (cPKC), nouvelle (nPKC) et atypique (aPKC).¹⁰⁸

- Les PKC classiques : α , β I, β II, γ qui sont activées par le diacylglycérol (DAG), la phosphatidylsérine (PS) et Ca^{2+} ,
- Les PKC nouvelles : δ , ϵ , η , σ qui sont activées par le DAG et la phosphatidylsérine mais qui ne sont pas calcium-dépendantes,
- Les PKC atypiques : ξ , ι/λ , qui ont pour cofacteurs des céramides et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3).

Introduction générale

Ces isoformes sont différenciées par leur expression tissulaire, leur localisation et les facteurs capables de les activer (Tableau 1). Il est à remarquer que les mécanismes d'activation semblent similaires pour l'ensemble des isoenzymes malgré des activateurs différents.

Tableau 1 : Isoformes de la PKC dans les tissus humains¹⁰⁸

Groupe	Sous type	Activateur	Localisation
cPKC	α	Ca ²⁺ , DAG, PS	Ubiquitaire
	β I	Ca ²⁺ , DAG, PS	Quelques tissus
	β II	Ca ²⁺ , DAG, PS	Nombreux tissus
	γ	Ca ²⁺ , DAG, PS	Cerveau
nPKC	δ	DAG, PS	Ubiquitaire
	ε	DAG, PS	Cerveau et autre
	η	DAG, PS	Peau, poumons, coeur
	σ	PS	Muscles, cellules T
aPKC	ξ	PIP3	Ubiquitaire
	ι/λ	PIP3	Quelques tissus

2. Structures et fonctions des domaines PKC fongiques

Contrairement aux mammifères, qui possèdent au moins 9 gènes codant la PKC, les champignons n'en ont qu'un.¹⁰⁸ Les PKC fongiques semblent être étroitement apparentées au sous-type nPKC humain, puisqu'une délétion de *pkc1* chez *S. cerevisiae* peut être palliée par la présence de PKC η mais pas par des membres des sous-types cPKC ou aPKC.¹⁰⁹

De plus, la structure des PKC fongiques ressemble à celle des nPKC, avec l'addition d'une extension N-terminale portant deux domaines HR1. Etant donné l'absence de résidus d'acides aminés clés dans leurs domaines C2, les PKC fongiques ne sont pas activées par Ca²⁺ et, en dépit de la présence de deux domaines C1, elles ne sont pas non plus activées par DAG ou par les esters de phorbol.¹¹⁰ Cependant, il a été montré récemment que la PS se lie au domaine C1 et favorise son interaction avec Rho1, une GTPase.¹¹¹

Chez *C. albicans*, la protéine kinase C, est l'une des protéines impliquées dans les voies MAPK, (Figure 22). Elle est décrite comme un régulateur de l'intégrité de la paroi cellulaire durant la croissance, la morphogenèse et la réponse au stress pariétal.^{112,113,114} Elle joue aussi un rôle dans la formation des biofilms.¹¹⁵

Introduction générale

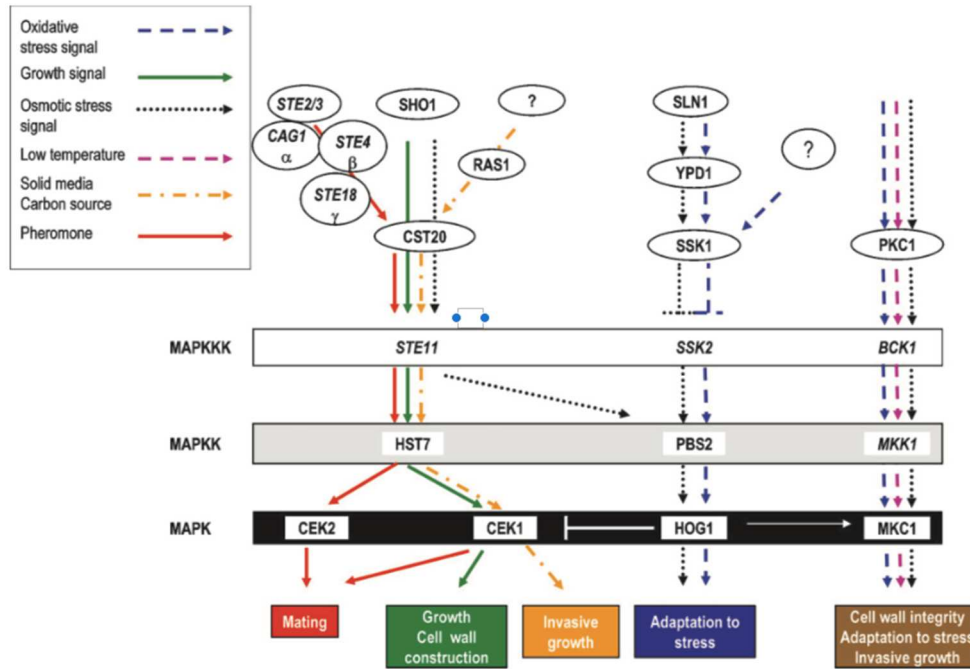


Figure 22 : La voie de signalisation des MAPK chez *C. albicans*¹¹⁶

La Fayette *et al.*¹¹⁷ ont montré un nouveau rôle pour PKC dans les mécanismes de tolérance aux antifongiques. En effet, une déficience pharmacologique ou génétique de Pkc1 entraîne une restauration de la sensibilité aux azolés. L'activation de la voie de signalisation MAPK dépendante de Pkc1 est représentée sur la figure 23.

De plus, des résultats antérieurs obtenus en laboratoire ont montré que des inhibiteurs de la protéine PKC (de la famille des bisindolylmaléimides) rétablissaient la sensibilité au fluconazole de souches résistantes, non mutées au niveau du gène *ERG11*.

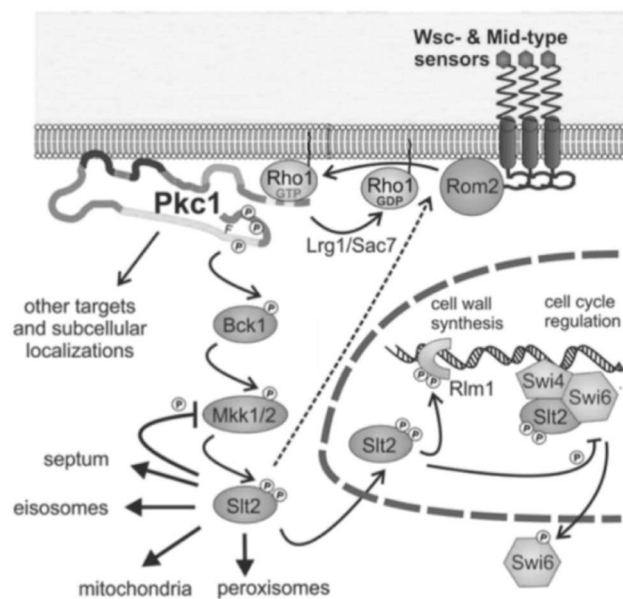


Figure 23 : Activation de la voie de signalisation impliquant PKC suite à un stress à la surface des cellules¹⁰⁸

Dans ce contexte, le ciblage de la voie de transduction du signal médiée par PKC représente une nouvelle stratégie intéressante pour la thérapie antifongique.¹⁰⁸

IV. Cercosporamide

Le (-)-cercosporamide est un produit naturel isolé à l'origine en 1991 par extraction à partir du champignon phytopathogène *Cercosporidium henningsii*.¹¹⁸ Ce composé est de structure de type dibenzo[*b,d*]furane de nomenclature suivante : (9*aS*)-8-acétyl-9,9*a*-dihydro-1,3,7-trihydroxy-9*a*-méthyl-9-oxodibenzo[*b,d*]furane-4-carboxamide.

Il possède donc une partie benzénique avec 2 substituants hydroxy en C-1 et C-3 et un carboxamide en C-4. Le carbone asymétrique en C-9*a*, de configuration absolue *S*, porte un méthyle et la molécule est lévogyre. Son énantiomère *R* n'a pas encore été isolé et n'est pas décrit dans la littérature. Enfin sur la partie non aromatique, il possède un oxo en C-9, un acétyle en C-8 et un hydroxy de type énoïque en C-7. Cet énoïl est conjugué avec la cétone en C-9 pouvant entraîner un équilibre céto-énoïque mais les données spectrales de la littérature confirment la forme indiquée dans la figure 24.

Enfin, ce composé est apparenté à l'acide usnique, un métabolite secondaire extrait de lichens, qui existe sous 2 formes énantiomériques dans la nature et en mélange racémique.¹¹⁹

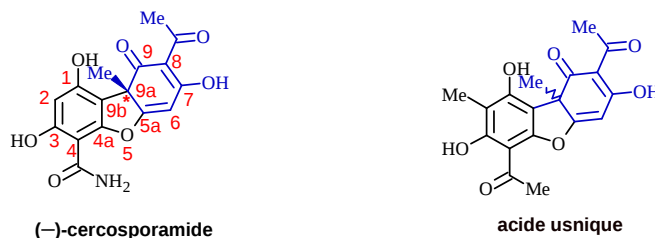


Figure 24 : Structure du (-)-cercosporamide et de l'acide usnique

Le cercosporamide a été identifié comme un agent antifongique à large spectre présentant une CMI *in vitro* allant de 89 µg/mL¹²⁰ à 10 µg/mL¹²¹ contre différentes souches de *C. albicans*.

C. henningsii est un agent pathogène important du manioc (*Manihot esculenta*). Parmi les souches de *C. henningsii* étudiées, Sugawara *et al.*¹¹⁸ se sont intéressés à deux souches, une souche d'origine africaine et une souche d'origine thaïlandaise. Celles-ci ont été mises en culture agitée pendant 3 semaines à 23 °C sur un milieu contenant un extrait de feuilles de manioc. Les chercheurs ont montré que les deux souches produisaient des phytotoxines différentes, la citrinine pour la souche thaïlandaise et le cercosporamide pour la souche africaine (Figure 25).

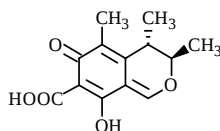


Figure 25 : Structure de la citrinine

L'amide de l'acide usnique, une phytotoxine apparentée à l'acide (-)-usnique et au (-)-cercosporamide, a également été isolé à partir de l'agent pathogène fongique du manioc, *C. henningsii*. L'amide de l'acide usnique présente également une activité antifongique modérée et une inhibition de la protéine kinase C humaine (CI₅₀ = 0,8 µM) (Figure 26).¹²⁰

Introduction générale

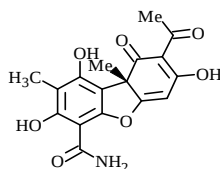


Figure 26 : Structure de l'amide d'acide usnique

Hoffman *et al.*¹²² ont isolé l'acide usnique et deux de ses dérivés, le cercosporamide et la phomodione, à partir d'un milieu de culture de l'espèce endophyte *Phoma*.

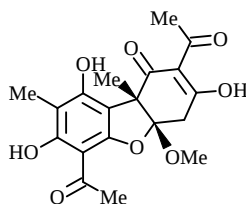


Figure 27 : Structure de la phomodione

En 2004, Sussman *et al.*¹²¹ ont montré que le cercosporamide était un puissant inhibiteur ATP-compétitif de la kinase fongique de *C. albicans* (CaPkc1), avec une CI_{50} de 44 nM. La voie de signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire médiée par Pkc1 est essentielle pour la croissance fongique. Ainsi, l'activité antifongique du cercosporamide pourrait être attribuée à l'inhibition de la kinase Pkc1, constituant ainsi une piste à explorer dans la conception de composés aux propriétés antifongiques potentielles.

Le cercosporamide inhibe aussi les PKC α et PKC β humains (CI_{50} = 1 μ M et 0,3 μ M, respectivement)¹²¹ ce qui s'explique par l'homologie élevée entre le domaine catalytique de la Pkc1 fongique et les PKC de mammifères. Il a été démontré plus tard qu'il inhibe d'autres kinases humaines, y compris Mnk1/2, Jak3, GSK3 β , ALK4 et PIM1, dans des gammes allant du nanomolaire au micromolaire.^{123,124}

OBJECTIFS DE RECHERCHE

I. Description des objectifs

Le projet de recherche, à l'interface de la chimie et de la biologie, vise à développer des composés hétérocycliques, inhibiteurs spécifiques de Pkc1 de *C. albicans*, puis à évaluer leur potentiel antifongique intrinsèque ou leur propriété de contournement de la résistance aux azolés, c'est-à-dire leur aptitude à restaurer la sensibilité aux azolés de souches résistantes lors d'une co-administration avec le fluconazole. Leur propriété d'inhibition de biofilm sera aussi évaluée.

La stratégie consistant à mimer un produit naturel pour la conception d'agents antifongiques pour lutter contre la résistance fongique a été très récemment validée par la découverte de xanthones dérivées de l' α -mangostine.^{125,126}

A notre connaissance, aucun composé hétérocyclique présentant une activité antifongique associée à l'inhibition de CaPkc1 n'a été décrit dans la littérature, à l'exception du cercosporamide.¹²¹ En conséquence, le cercosporamide constitue un modèle d'étude pertinent pour la conception de nouvelles molécules biologiquement actives dans le domaine des antifongiques.

Dans un contexte où la synthèse totale du cercosporamide n'est pas décrite dans la littérature, il est envisagé de synthétiser des analogues hétérocycliques simplifiés en s'affranchissant de l'asymétrie. Le but est d'obtenir une voie d'accès plus aisée aux composés d'intérêt, d'améliorer l'activité biologique et de valider les pharmacophores présents sur la molécule de référence.

II. Outils informatiques (Modélisation moléculaire)

La connaissance d'une structure 3D de PKC1 *C. albicans* (CaPkc1) permettrait de modéliser les interactions du cercosporamide dans le site ATP de l'enzyme (docking), déterminer un pharmacophore, et proposer les pharmacomodulations idéales en vue d'améliorer les profils affinité / sélectivité.

1. Construction d'un modèle CaPkc1

En l'absence d'une cristallographie de cette enzyme, un modèle 3D a été réalisé sur le site de la SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) par homologie comparative, à partir de la séquence primaire du domaine kinase de CaPkc1 (code UniProtKB : P43057, positions 748-1097) et de la structure 3D connue de la PKC β II humaine en complexe avec un inhibiteur ATP-compétitif de type bis-indolylmaléimide (code PDB : 2I0E.pdb, résolution = 2,6 Å). Le choix de cette structure de référence s'est imposé suite à une recherche par similarité (Blast) dans la base de données PDB (47% d'identité au niveau des séquences primaires en acides aminés) mais également par le fait que le cercosporamide possédait une CI_{50} expérimentale de 0,349 μ M sur PKC β .¹²¹

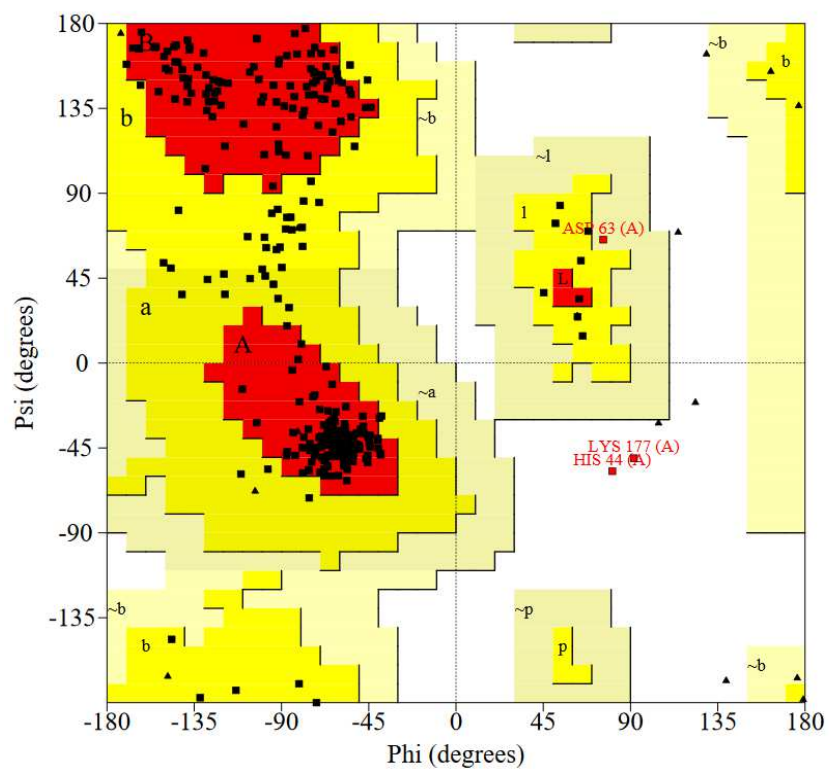
Objectifs de recherche

		339	350	360	370	
2I0E	-----	LTDFN	FLMVLGKGS	FGKVMLSER	KGTD	ELYAVKILKKDVVI
		:	::::	:::::	:::::	..
PKC1		RTHSSGKSGKSKRRR	KRVGLDDFQFLAVL	GKGNFGKVMLAES	RHTSKLCAIK	VLLKKDFIV
		10	20	30	40	50 60
	380	390	400	410	420	430
2I0E	QDDDV	ECTMVEKRV	LALPG--KPP	FLTQLHSCFQ	TMDRL	YFVMEYVNGGDL
		..		..		..
PKC1	ENDEA	ESVKSEKRV	FLTANKEM	HPFLNLHCCFQ	TENRI	YFVMEYISGGDL
	70	80	90	100	110	
	440	450	460	470	480	490
2I0E	FKEPHAV	FYAAEIAIGL	FFLQSKGII	YRDLKLDN	VMLDSEGH	IKIADFGMCKENI
	:	..				:
PKC1	FTAKRAK	FYACEVLLGL	KYFHDNGI	VYRDLKLDN	ILLTTKGHI	KIGDYGLCKEDM
	120	130	140	150	160	170
	500	510	520	530	540	550
2I0E	TKTFCG	TPDYIAPEII	AYQPYGKS	VDWMAFGV	LLYEMLAGQ	APFEGEDELFQ
		..				..
PKC1	TSTFCG	TPEFMAPEI	VAGKAYDRS	VDWMAFGV	LLFQMLLCQ	SPFKGDEDDIF
	180	190	200	210	220	230
	560	570	580	590	600	610
2I0E	VAYPKS	MSKEAVAICK	GLMTKHPG	KRLGCGPE	GERDIKEHA	FFRYIDWEKLER
	:					
PKC1	VKYPIN	LSRQTVLV	LQALLTKD	PSQRLGSG	PKDAEEME	HPYFHDVNFDD
	240	250	260	270	280	290
	620	630	640	650	660	
2I0E	KPKA-	CGRNAENF	DRFFTRHPP	VLTTPDQEV	IRNIDQSE	FEFGFSFVNSE
	...	..				
PKC1	IPEVQSE	HDYSNFDKE	FTSETPRL	TPVET-VLT	SEMQEQRG	FSHISDN
	300	310	320	330	340	350

Figure 28 : Alignement « pairwise » de la séquence primaire de CaPkc1 (domaine kinase) avec celle de la PKCβ (2I0E.pdb)

L'alignement des deux séquences (Figure 28) constitue le point de départ d'une construction automatisée du modèle (assignation des coordonnées des régions structurellement conservées, reconstruction des parties non conservées (chaînes latérales)), à l'issue de laquelle une minimisation énergétique est effectuée par la méthode Powell dans le but d'obtenir une conformation stable (méthode à gradient conjugué, champ de force : Tripos, charges partielles atomiques : Gasteiger-Hückel, constante diélectrique : 4, gradient énergétique : 0,1 kcal.mol⁻¹.Å⁻¹). Les paramètres géométriques (angles ϕ et ψ , Ramachandran) ainsi que le repliement 3D ont été évalués respectivement par les programmes Procheck et Verify3D (<http://servicesn.mbi.ucla.edu>) et permettent finalement de valider le modèle (Figures 29 et 30).

Objectifs de recherche



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	244	82.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	49	16.6%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	1	0.3%
Residues in disallowed regions	2	0.7%

Number of non-glycine and non-proline residues	296	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	17	
Number of proline residues	13	

Total number of residues	330	

Figure 29 : Diagramme de Ramachandran du modèle *CaPkc1*
(99% des acides aminés sont situés à l'intérieur des zones les plus favorables)

Objectifs de recherche

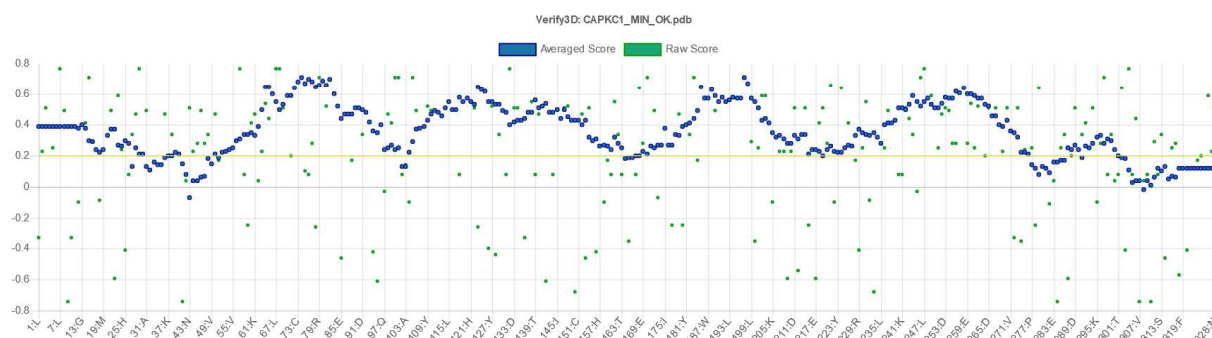
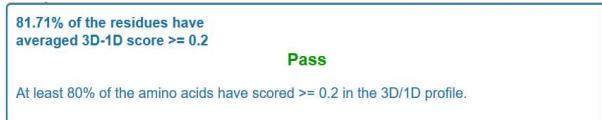


Figure 30 : Graphique obtenu par Verify3D pour le modèle *CaPkc1*

2. Modélisation des interactions cercosporamide / modèle *CaPkc1*

Le docking du cercosporamide (logiciel Gold) dans le site ATP du modèle *CaPkc1* montre plusieurs possibilités d'ancrage. Parmi celles-ci, une 1^{ère} hypothèse (Figure 31, solution 1) consisterait en la principale implication du benzamide par liaisons-H fondamentales avec les acides aminés Glu104 et Ile106 de la région de fixation du noyau adénine de l'ATP « hinge region ». Cette solution serait alors conforme à celle obtenue par une équipe australienne sur les kinases Mnk1/2 impliquées en cancérologie.¹²⁴

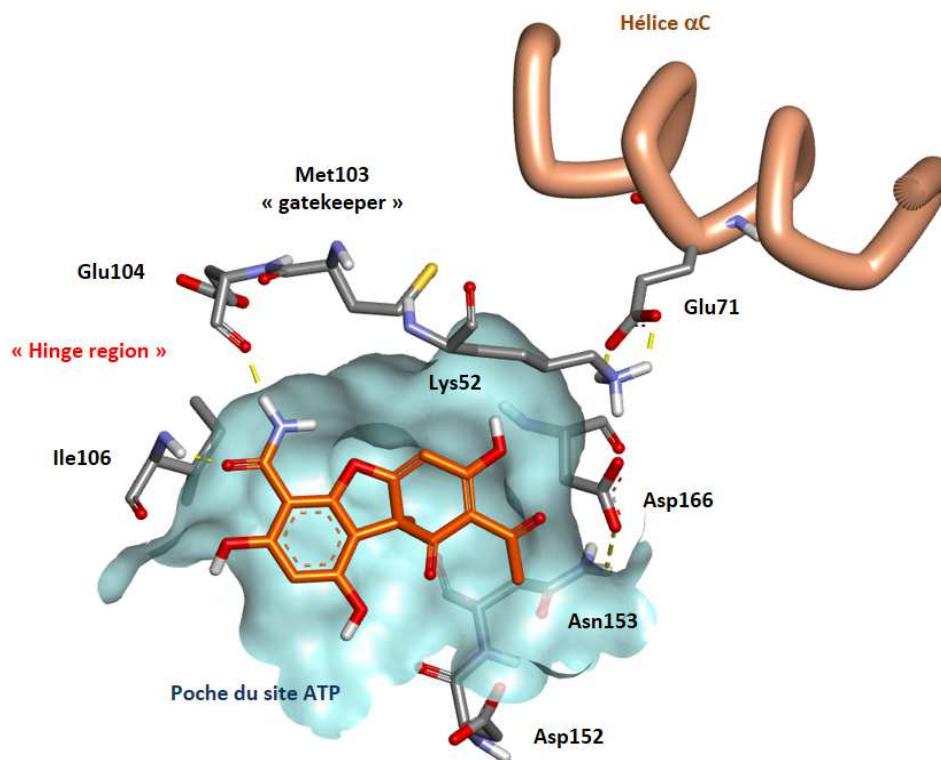


Figure 31 : Hypothèse de docking du (S)-cercosporamide dans le site ATP du modèle *CaPkc1* (solution 1)

Objectifs de recherche

Une 2^{ème} hypothèse envisage une toute autre conformation par retournement de 180° de la molécule (Figure 32, solution 2). Dans ce cas précis, le groupe acétyle effectue l'ancrage fondamental par liaison-H avec le NH de l'Ile106 (hinge region) alors que d'autres interactions par liaisons-H s'établissent d'une part entre le benzamide et les Asp166/Asn153, et d'autre part entre le phénol (position 7) et l'Asp152. En particulier, ce dernier acide aminé (analogue Asp470 sur PKC β II) est particulièrement intéressant puisque conservé dans la zone de reconnaissance du substrat chez tous les sous-types PKC.¹²⁷ Sur la structure cristallographique de référence (PKC β II humaine, 2I0E.pdb), cet Asp470 effectuait déjà une interaction ionique avec la chaîne diméthylpropylamine du bis-indolylmaléimide (Figures 33), ce qui pourrait moduler la sélectivité.

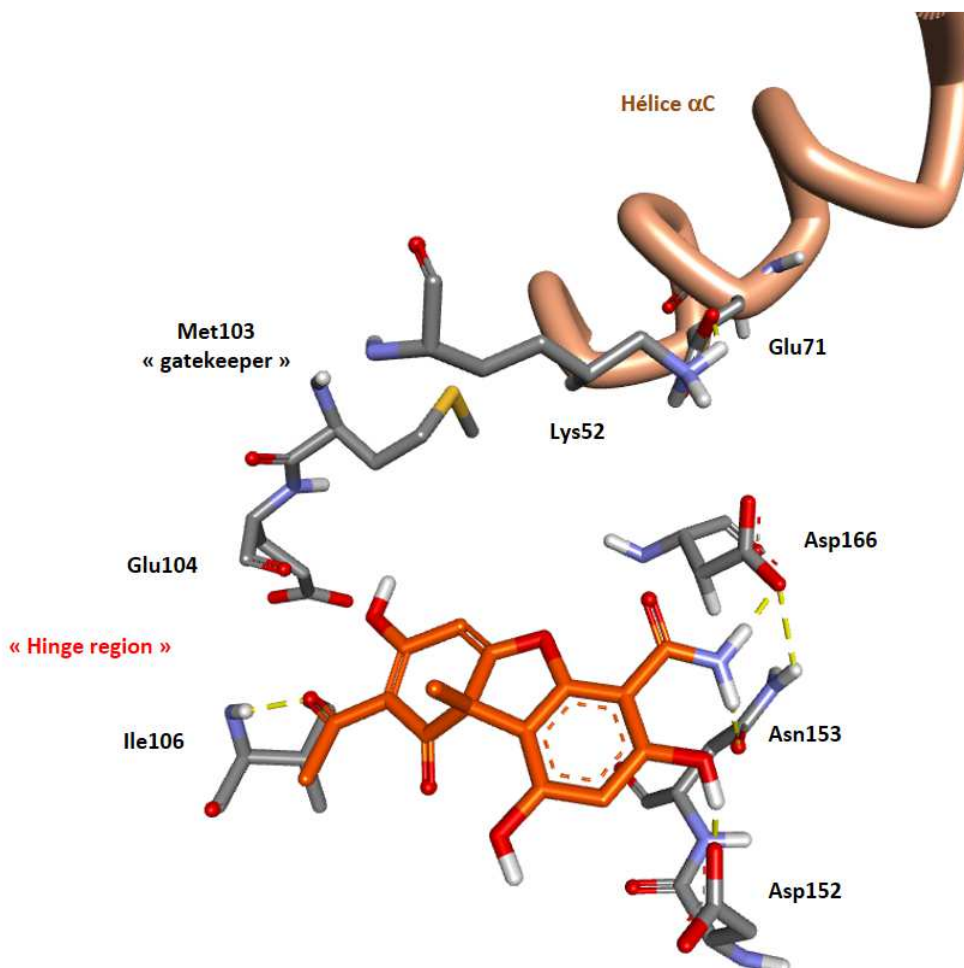


Figure 32 : Hypothèse de docking du (S)-cercosporamide dans le site ATP du modèle CaPkc1 (solution 2)

Objectifs de recherche

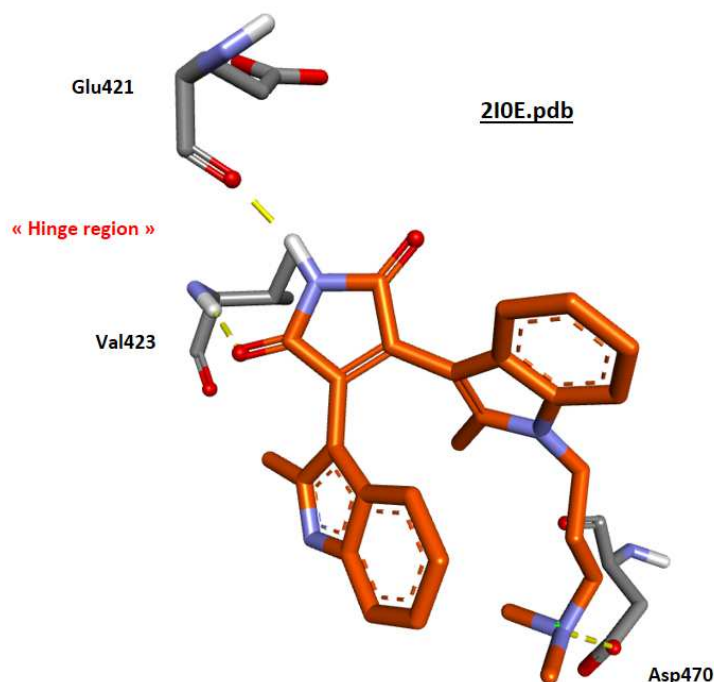


Figure 33 : Interaction du bis-indolylmaléimide dans le site ATP de la PKC β II (2I0E.pdb)

3. Séries chimiques envisagées

Selon la 1^{ère} hypothèse de docking, le cercosporamide s'est avéré reconnaître le site de liaison à l'ATP dans le modèle *CaPkc1* par l'intermédiaire de plusieurs liaisons hydrogène apportées le 4-CONH₂ de la partie phényle et aussi par les groupements 3-OH sur Mnk2 humaine d'après les travaux de Hou *et al.*¹²⁴

D'autre part, les données de la littérature indiquent que les propriétés biologiques associées au cercosporamide, comme l'inhibition de *CaPkc1*, ne se retrouvent pas pour son analogue structural l'acide usnique, alors que ces 2 molécules présentent une partie structuralement similaire (Figure 24 *rf.* p 30).¹²⁸ Ainsi, les modes d'interaction proposés et les remarques précédentes tendent à montrer que la « partie ouest » du cercosporamide constitue le pharmacophore de la molécule. Tous ces arguments justifient la stratégie de maintenir le dihydroxybenzofurane-carboxamide (en couleur bleue) du produit naturel utilisé comme modèle pour la conception de nouveaux composés tricycliques (Figure 34).

Pour la modulation de la « partie est » de la molécule (couleur verte), notre choix s'est porté sur l'introduction d'un système de type pyrimidine (pyrimidinone, pyrimidinedione ou aminopyrimidine) susceptible d'apporter des groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène et d'entraîner des interactions supplémentaires avec les acides aminés du site actif pour une meilleure activité inhibitrice de kinase et une sélectivité améliorée. En série dibenzo[*b,d*]furane, il nous a semblé pertinent, d'introduire pas à pas les différents substituants hydroxy et acétyle présents initialement sur la « partie est » du cercosporamide avec l'avantage de permettre à ces molécules rigides de s'adapter au site ATP en proposant de multiples conformations bioactives. Ces modulations permettront aussi de vérifier l'incidence du chaque substituant sur l'activité biologique.

Objectifs de recherche

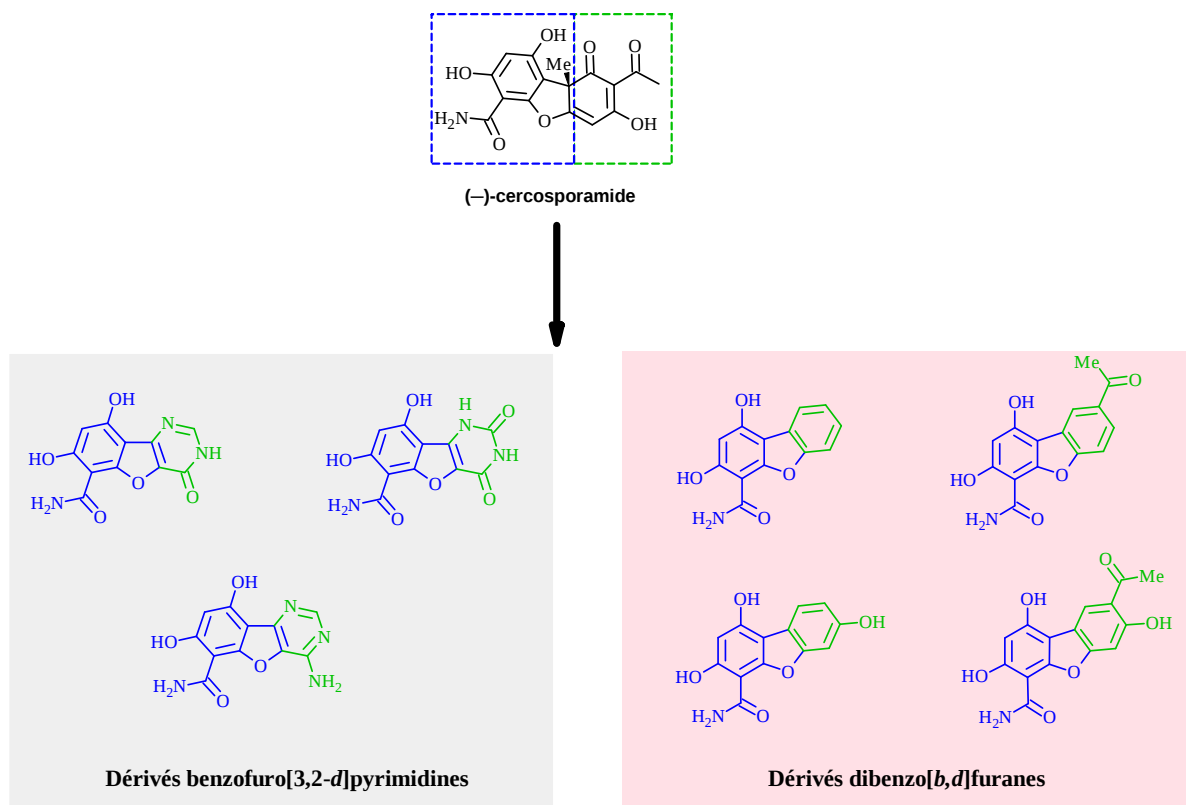


Figure 34 : Conception des composés cibles suivant la 1^{ère} hypothèse

Les séries chimiques pouvant émerger de la 2^{ème} hypothèse, bien que fort intéressantes, ne feront pas l'objet de cette étude, dans un premier temps.

PREMIER CHAPITRE

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

I. Partie théorique : Aperçu bibliographique

1. Les benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

L'hétérocycle benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine est largement retrouvé comme structure de base dans une grande variété de substances qui présentent des activités biologiques importantes. La synthèse de dérivés benzofuopyrimidiniques a reçu une attention considérable en raison de leur présence dans un grand nombre de produits naturels et de produits pharmaceutiques synthétiques.^{129,130,131} Il existe deux isomères dont la structure varie en fonction de la position relative des azotes sur l'hétérocycle (Figure 35).



Figure 35 : Structure des dérivés benzofuopyrimidiniques

Les sites privilégiés de fonctionnalisation du noyau benzofuro[3,2-*d*]pyrimidinique dépendront du type de régioisomère travaillé. La nomenclature de ce noyau et sa numérotation sont détaillées sur la figure 36.

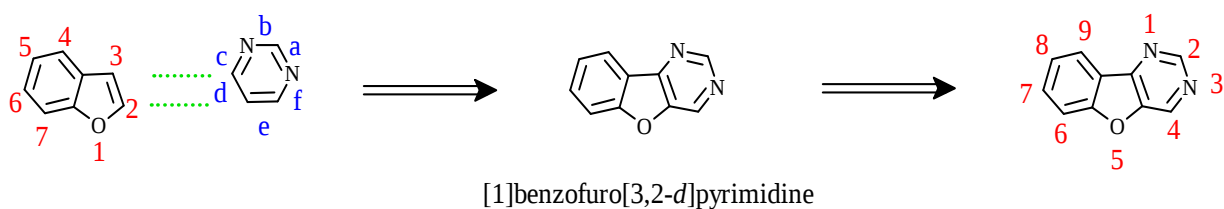


Figure 36 : Nomenclature du cycle benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine

L'objectif de notre étude pharmacochimique consistera à synthétiser et à fonctionnaliser des dérivés benzofuro[3,2-*d*]pyrimidiniques. Tout d'abord, les cibles et les applications thérapeutiques de ce type de composés, déjà décrits dans la littérature, seront présentées. Les voies d'accès à cet hétérocycle ainsi que sa réactivité seront également rappelées.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

2. Applications en Chimie Thérapeutique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Grâce à la facilité de la synthèse de cet hétérocycle, à sa bonne stabilité ainsi qu'aux récentes méthodes développées de fonctionnalisation, les benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines ont fait l'objet de nombreuses publications, illustrant la diversité des propriétés pharmacologiques de ces dérivés.

Différents benzofuranes trouvent également une application en tant que capteurs fluorescents,¹³² oxydants,¹³³ antioxydants,¹³⁴ une variété de médicaments et dans d'autres domaines de la chimie et de l'agriculture.¹³⁵ Les composés englobant la fraction pyrimidine se sont avérés être utiles comme agents bactéricides,¹³⁶ antipaludéens,¹³⁷ analgésiques,¹³⁸ antihypertenseurs¹³⁶ et agents antitumoraux¹³⁹. Les pyrimidines et leurs dérivés fusionnés par cycle ont un large spectre d'activité biologique, ils sont notamment présents dans certaines bases d'acide nucléique.¹⁴⁰

Les structures hétérocycliques fusionnées contenant des systèmes cycliques pyrimidinique et furanique sont bien connues pour posséder diverses activités biologiques telles qu'une activité antimicrobienne,¹⁴¹ anti-inflammatoire,¹⁴² antivirale,¹⁴³ anti-VIH et antitumorale¹⁴⁴. De plus, les dérivés des benzofuropyrimidines sont d'une grande importance car ils sont associés à des activités analgésiques, anti-inflammatoires et antimicrobiennes.^{145,146} Certains de ces dérivés présentent également de bonnes activités anticoccidiennes et hypoglycémiantes.¹⁴⁷

La benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine est très présente dans la structure d'une grande variété de substances qui présentent des activités biologiques importantes. Par exemple, elle est décrite comme inhibiteur de tyrosine kinase.¹⁴⁸ En outre, le dérivé benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine est capable de potentialiser la voie de signalisation CREB (AMPC response element binding) qui est associée à l'amélioration de la mémoire à long terme.¹⁴⁹ Les membres d'une série de dérivés de benzofuropyrimidine servent d'agonistes inverses du récepteur de l'histamine H4.¹⁵⁰ On a également observé que les benzofuropyrimidines étaient des inhibiteurs de Hsp90,¹⁵¹ des antagonistes du récepteur de l'adénosine (A_{2A})¹⁵² et des inhibiteurs de *E. coli* primase.¹⁵³

2.1. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines comme inhibiteurs d'enzymes

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive (inhibiteur allostérique).¹⁵⁴

L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, et notamment dans la régulation des voies métaboliques. Puisque l'inhibition d'une enzyme peut tuer un pathogène ou corriger un déséquilibre métabolique, des applications existent dans de nombreux domaines : beaucoup de médicaments, pesticides ou insecticides sont des inhibiteurs enzymatiques.¹⁵⁵ En enzymologie, les inhibiteurs sont très utilisés pour déterminer le mécanisme d'action d'une enzyme.^{156,157}

La liaison d'un inhibiteur peut empêcher un substrat de se fixer au site actif de l'enzyme et/ou l'enzyme de catalyser sa réaction. Cette inhibition peut être réversible ou

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

irréversible. Les inhibiteurs irréversibles réagissent généralement avec l'enzyme et la modifient chimiquement. Ils se fixent de manière covalente et modifient des résidus clés, nécessaires à l'activité enzymatique. En revanche, les inhibiteurs réversibles se lient de façon non covalente et différents types d'inhibition en résultent selon que ces inhibiteurs lient l'enzyme, le complexe enzyme-substrat (ES) ou les deux.¹⁵⁸ Beaucoup de médicaments sont des inhibiteurs enzymatiques, de sorte que leur découverte et leur amélioration est un domaine de recherche actif en biochimie et en pharmacologie.¹⁵⁹

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive. Le traitement peut comprendre de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la chirurgie.¹⁶⁰

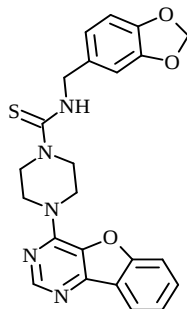


Figure 37: Structure du **MP470**, un inhibiteur de tyrosine kinase

Le MP470 (Figure 37, $CI_{50} = 1 \mu M$), un puissant inhibiteur de tyrosine kinase à petite molécule de c-Met, a radiosensibilisé plusieurs lignées cellulaires GBM à la fois *in vitro* et *in vivo*, et peut aider à améliorer les résultats pour les patients atteints de GBM. Le **MP470** ($5 \mu M$) entraîne une diminution de la phosphorylation de c-Met et aboutit à une diminution de 0,4 logs du nombre de cellules SF767 après irradiation (8 Gy). Les cellules prétraitées avec le MP470 présentaient plus de dommages à l'ADNdb que les cellules irradiées sans ajout du MP470. Mécaniquement, il a été démontré que le **MP470** inhibait la réparation des cassures de l'ADNdb et augmentait l'apoptose. Le **MP470** influence diverses protéines liées à la survie et à la réparation de l'ADN, telles que pAKT, RAD51 et GSK3 β . *In vivo*, la combinaison de **MP470** et de la radiation entraîne un retard dans la croissance tumorale et augmente le temps de survie des souris traitées.¹⁴⁸

2.2. Benzofuro[3,2-d]pyrimidine, potentialisateur de la voie de signalisation CREB

La protéine CREB est une protéine ubiquitaire eucaryote, exprimée dans tous les types de cellules. Elle agit comme un facteur de transcription qui interagit directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse, induisant la transcription de certains gènes. Cette protéine pour être active a besoin d'être phosphorylée par une protéine kinase A (PKA), elle-même activée par de l'AMPc. Elle joue un rôle important dans l'apprentissage et la formation de la mémoire à long terme en couplant l'activité neuronale avec des changements dans l'expression des gènes.^{161,149} L'inhibition de l'activité de la PKA par l'administration ciblée d'un peptide inhibiteur de la PKA entraîne une diminution de la phosphorylation de la protéine CREB et potentiellement des effets à long terme.¹⁶²

Parmi les 25 composés testés, le composé **NCGC00067819**, un dérivé de benzofuro[3,2-d]pyrimidine, améliore la production de l'AMPc entraînant une amélioration de la mémoire à long terme *via* la phosphorylation de CREB par PKA (Figure 38).¹⁵⁰

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

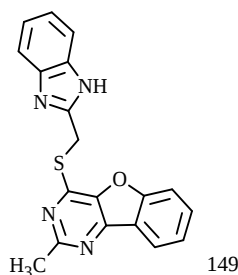


Figure 38 : Structure d'un potentialisateur de la voie de signalisation CREB, le **NGC00067819** ($CI_{50} = 79$ nM)

2.3. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines comme modulateurs du récepteur de l'histamine H₄

Le récepteur de l'histamine H₄ (H₄R) a été identifié à partir de séquence avec le récepteur de l'histamine H₃ comme les autres récepteurs de l'histamine, il possède les caractéristiques d'un récepteur couplé à la protéine G.¹⁶³ Le H₄R est exprimé sur diverses cellules du système immunitaire et il a été démontré qu'il influence la production de cytokines. En conséquence, il a été démontré que les antagonistes de l'histamine H₄ jouent un rôle dans plusieurs modèles animaux de maladies inflammatoires humaines telles que l'asthme, le prurit et la colite, ainsi que la douleur.¹⁵⁰

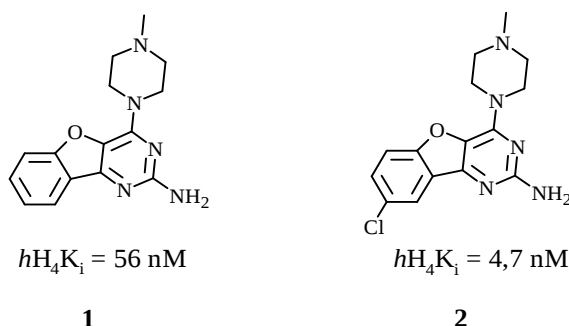


Figure 39 : Structure des antagonistes du H₄R

Le criblage initial à haut débit du récepteur H₄ a permis d'identifier plusieurs séries prometteuses, parmi elles, les aminopyrimidines tricycliques (Figure 39, composés **1** et **2**) ont été identifiées comme antagonistes du H₄R, bien qu'ils étaient instables pour les microsomes hépatiques humains ($t_{1/2} < 5$ min), ils représentaient néanmoins une série puissante méritant une étude supplémentaire.^{150,164}

2.4. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines comme inhibiteurs de Hsp90

Hsp90 est l'un des chaperons moléculaires les plus abondants dans les cellules eucaryotes, jouant un rôle important dans le repliement, la stabilisation, l'activation et l'assemblage des protéines "clientes".¹⁶⁵ Hsp90 fait partie des protéines chaperons impliquées dans les cancers et la prolifération de cellules tumorales.¹⁶⁶ En effet, Hsp90 permet l'activation d'oncoprotéines, comme par exemple la protéine kinase v-Src.¹⁶⁷ De ce fait, Hsp90 est une cible importante pour le traitement de cancers.¹⁶⁸

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

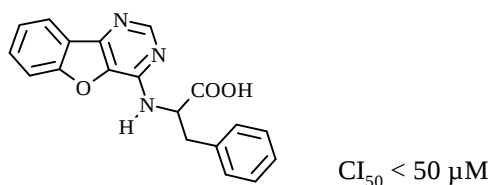


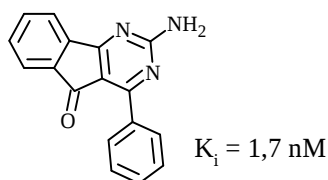
Figure 40 : Structure de l'acide 2-([1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-ylamino)-3-phénylpropanoïque

Park *et al.*¹⁵¹ a montré la stratégie globale de calcul et d'expérimentation pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de Hsp90. Parmi 85 000 composés, 300 composés ont été sélectionnés après criblage virtuel dont 285 ont été testés pour l'activité inhibitrice de Hsp90. 41 composés présentaient plus de 70% d'inhibition à une concentration de 50 μM . Parmi eux, l'acide 2-([1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-ylamino)-3-phenylpropanoic a été identifié comme inhibiteur de Hsp90.

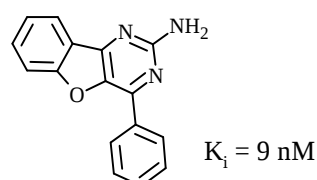
2.5. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines comme antagonistes des récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont abondants dans le putamen caudé, le nucleus accumbens et le tubercule olfactif chez plusieurs espèces. Dans le putamen caudé, les récepteurs A_{2A} de l'adénosine sont localisés dans plusieurs neurones et modulent la neurotransmission du GABA, de l'acétylcholine et du glutamate. Ces actions du récepteur de l'adénosine A_{2A} pourraient contribuer au comportement moteur. Par exemple, il a été démontré que les agonistes A_{2A} inhibent l'activité locomotrice et induisent la catalepsie chez les rongeurs. En revanche, les antagonistes de l'adénosine A_{2A} préviennent les troubles moteurs chez les souris n'expriment pas le récepteur de la dopamine D_2 .^{169,152}

L'évaluation de l'antagoniste des récepteurs A_{2A} a montré une activité antiparkinsonienne chez le singe sans produire d'hyperactivité et de dyskinésie, suggérant que les antagonistes des récepteurs A_{2A} pourraient constituer une nouvelle classe de médicaments antisymptomatiques pour la maladie de Parkinson.^{170,171}



1



4-phenyl[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine

Figure 41 : Structure d'antagonistes des récepteurs de l'adénosine

Les études de Matasi *et al.*¹⁵² pour découvrir les antagonistes du récepteur A_{2A} , le criblage des composés de fichier a identifié une nouvelle structure non purine **1** (Figure 41) comme un puissant antagoniste A_{2A} ($K_i = 1,7 \text{ nM}$). Ils ont montré que la réduction de la cétone et le remplacement par la liaison éther au composé 4-phenyl[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine produit un composé avec une affinité A_{2A} similaire à **1**.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

2.6. Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines comme inhibiteurs de primase de *E. coli*

Les efforts récents dans la recherche antibactérienne impliquent l'identification de nouvelles cibles afin de relever le défi de la résistance aux antibiotiques.¹⁵³

La primase ou ADN primase est une enzyme intervenant dans le processus de réplication de l'ADN. C'est une ARN polymérase qui permet la synthèse de courts segments d'ARN qui sont ensuite utilisés comme amorces par l'ADN polymérase répliquative. La majorité des ADN polymérases connues ont en effet besoin d'une amorce et ne sont capables que d'allonger une région déjà partiellement double brin, en ajoutant un nucléotide à une extrémité 3' hydroxyle déjà présente. La primase, en revanche, est capable de synthétiser une amorce d'ARN de *novo*, à partir d'une matrice d'ADN. Les primases se retrouvent chez toutes les espèces, dans les trois domaines du vivant (archées, eucaryotes et bactéries), c'est une enzyme essentielle à la réplication cellulaire. Dans la cellule, la primase fait partie du complexe multiprotéique de réplication de l'ADN appelé réplisome.¹⁷² La primase bactérienne est une cible bactérienne nouvelle et sous-explorée qui est essentielle à la réplication de l'ADN chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.¹⁵³

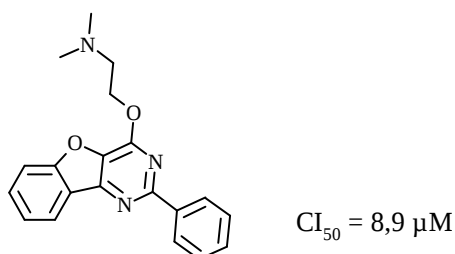


Figure 42 : Structure du *N,N*-diméthyl-2-[(2-phényl[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]éthanamine

Les travaux d'Agarwal *et al.*¹⁵³ ont montré que la *N,N*-diméthyl-2-[(2-phényl[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)oxy]éthanamine est un inhibiteur de primase de *E. coli* (Figures 42).

3. Voies d'accès aux dérivés benzofuro[3,2-*d*]pyrimidiniques

Compte tenu de l'importance des benzofuopyrimidines, certaines méthodologies de synthèse de ces hétérocycles fusionnés ont été rapportées. Pour réaliser la synthèse de ce scaffold, plusieurs approches peuvent être envisagées.

La première voie d'accès présente plusieurs avantages. Le procédé de synthèse classique utilisé pour la construction du squelette benzofuopyrimidine (Schéma 1) met en jeu les 2-carbonyl-3-aminobenzofuranes et leurs équivalents, sous forme d'acides,¹⁷³ d'esters,¹⁷⁴ d'amides,¹⁷⁵ qui servent des précurseurs des pyrimidines tricycliques.

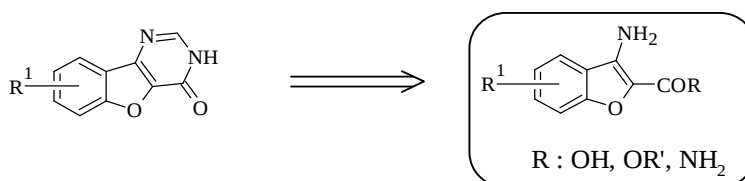


Schéma 1 : Première voie d'accès possible

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Poursuivant l'investigation des dérivés benzofuro[3,2-d]pyrimidiniques, une seconde voie d'accès met en avant une synthèse à partir de dérivé de type cyanoénamine (Schéma 2).¹⁷⁶

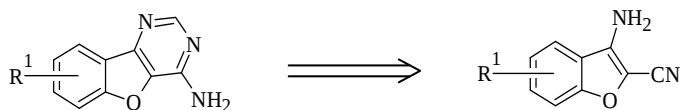


Schéma 2 : Seconde voie d'accès envisagée

Une nouvelle voie de synthèse a été décrite, dans laquelle le couplage de Suzuki entre la halogenopyrimidine et l'acide 2-méthoxyphénylboronique est suivi d'une déméthylation de la formation et d'une liaison C-O intramoléculaire (Schéma 3).¹⁷⁷

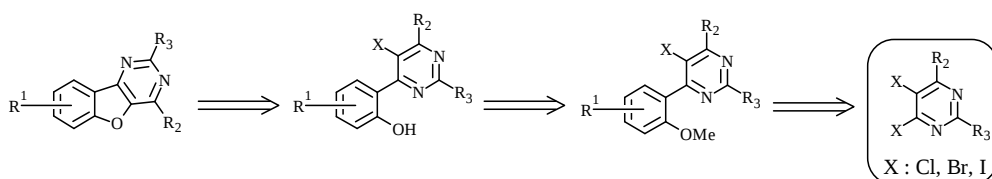


Schéma 3 : Troisième voie d'accès envisagée

Les travaux de Chao *et al.*¹³¹ ont montré une nouvelle réaction en cascade a été développée pour la synthèse de divers membres d'une série de dérivés benzofuro[3,2-d]pyrimidine (Schéma 4).

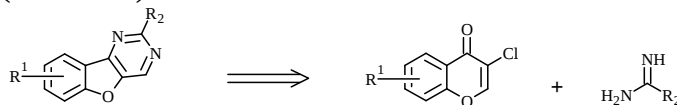


Schéma 4 : Synthèse de benzofuro[3,2-d]pyrimidines à partir de chromones halogénées

Le procédé utilise des 3-chlorochroménones facilement préparées et diverses amidines disponibles dans le commerce et leurs analogues comme matières de départ. Cette réaction *en tandem* est favorisée en utilisant un simple réactif de cuivre(I) et implique une séquence chimiosélective d'addition de Michael-hétérocyclisation-cyclisation intramoléculaire.¹³¹

3.1. La construction du noyau pyrimidinique

On note que la construction du noyau pyrimidinique est importante pour la synthèse des dérivés benzofuropyrimidinique. Une recherche bibliographique montre que certaines méthodes d'accès directement au noyau pyrimidinique décrites dans la littérature peuvent être appliquées à notre synthèse.

3.1.1. Sous forme d'acides

Zhu *et al.* ont décrit en 2011 la synthèse des dérivés benzopyrimidinediones. Dans leurs travaux, ils ont synthétisé, à partir de l'acide 5-nitro-2-aminobenzoïque **1a** ou de l'acide 2-aminobenzoïque **1b**, on obtient respectivement les composés **2a** et **2b** désirés (rendement **2a** : 80%, rendement **2b** : 65%) par traitement à l'urée sous irradiation micro-ondes (Schéma 5).¹⁷³

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

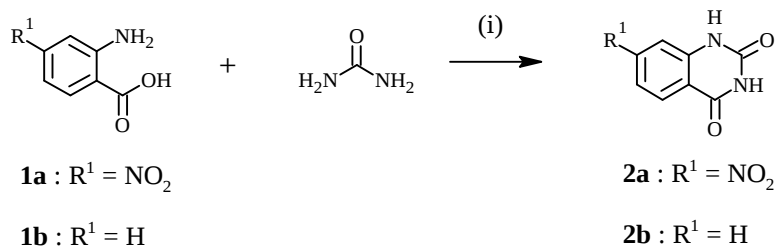
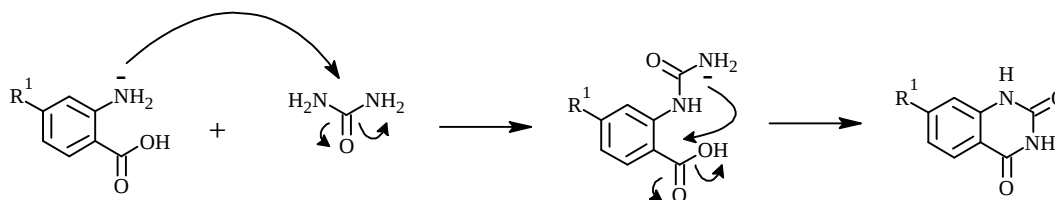


Schéma 5 : (i) Urée, reflux, MO

Nous proposons pour cette synthèse, dont le mécanisme n'a pas encore été clairement défini, deux hypothèses envisageables pour obtenir les composés **2a** et **2b** (Schéma 6).

Hypothèse 1 :



Hypothèse 2 :

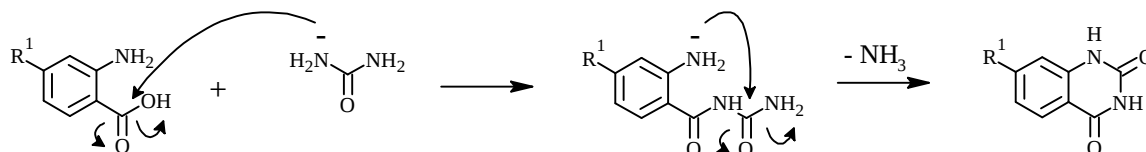


Schéma 6 : Mécanisme proposé par notre équipe

3.1.2. Sous forme d'esters

D'après les travaux réalisés par Hayakawa *et al.* pour la synthèse de la pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **3**. Le traitement du 2-chloronicotinonitrile **1** avec de l'hydroxyacetate d'éthyl en présence de DBU a donné un ester aromatique bicyclique **2**, qui a été traité avec du formamide pour donner une pyrimidone **3** (Schéma 7).¹⁷⁸

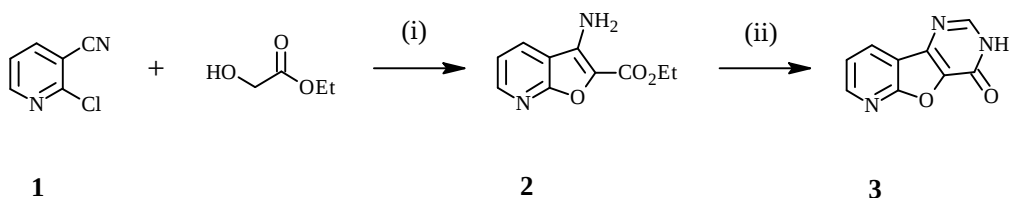


Schéma 7 : (i) DBU, EtOH, reflux, 76% ; (ii) Formamide, reflux, 97%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Le mécanisme réactionnel est le suivant (Schéma 8).

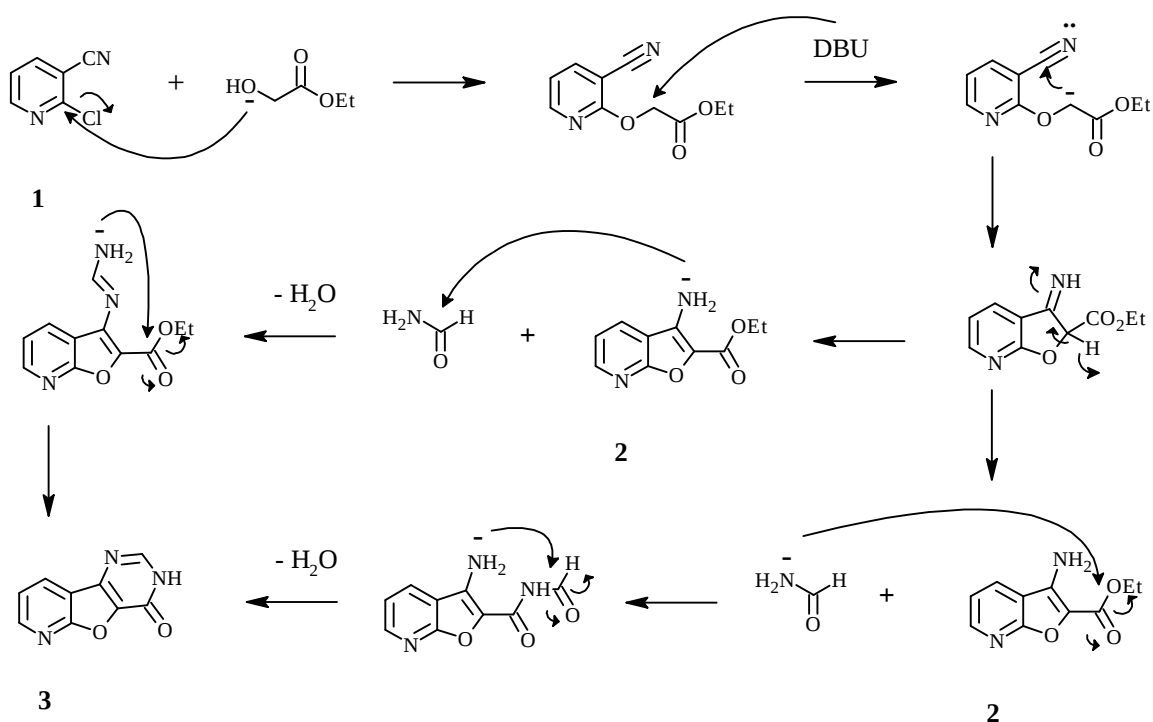


Schéma 8 : Mécanisme proposé par notre équipe

3.1.3. Sous forme d'amides

La synthèse de 3-quinazolin-4-one **2** à partir de la réaction du 2-aminobenzamide **1** et des orthoesters a déjà été rapportée dans les travaux de Heravi *et al.* (Schéma 9).¹⁷⁵

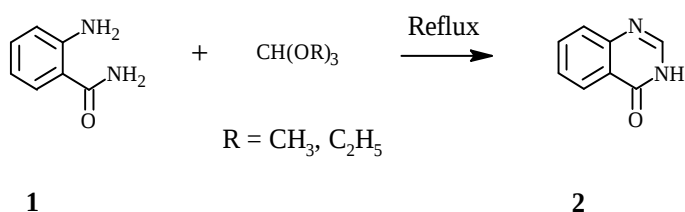


Schéma 9 : Synthèse de 3-quinazolin-4-one

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Nous proposons un mécanisme réactionnel (Schéma 10).

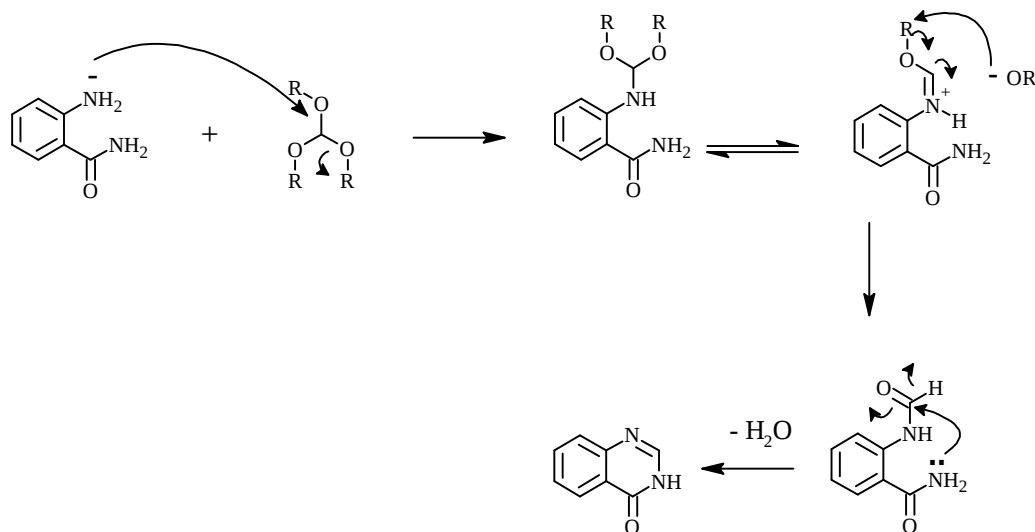


Schéma 10 : Mécanisme proposé par notre équipe

3.2. La construction du noyau benzofuro[3,2-*d*]pyrimidinique

3.2.1. Synthèse de la 8-chloro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione

Savall *et al.*¹⁵⁰ ont rapporté la synthèse de la 8-chloro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione **3**. Cette synthèse est préparée en 4 étapes à partir de 5-chloro-2-hydroxybenzonitrile **1**. L'alkylation d'un cyanophénol correspondant avec du bromoacétate d'éthyle suivie d'une fermeture de cycle en présence d'une base a donné l'aminoester bicyclique **2**. Une acylation suivie d'une condensation avec de l'hydrazine et une réduction ultérieure ont donné la pyrimidinedione tricyclique **3** (Schéma 11).

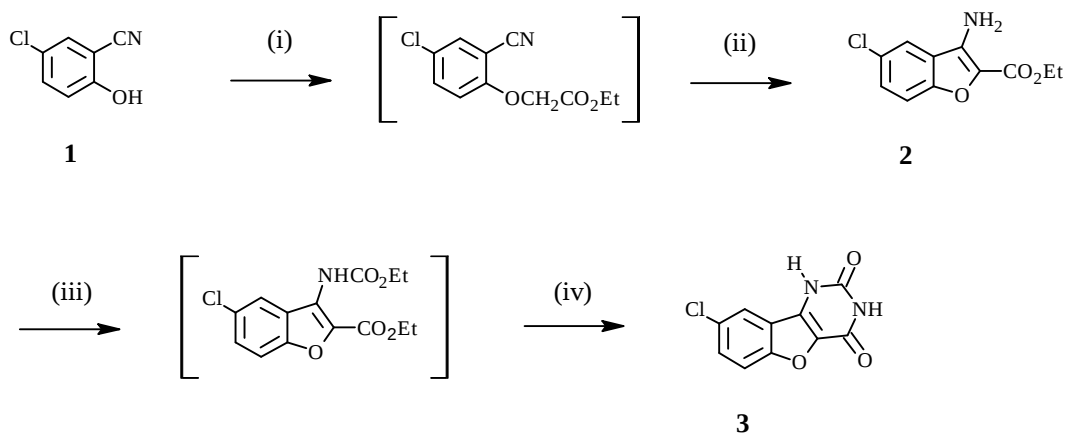


Schéma 11 : (i) K_2CO_3 , bromoacétate d'éthyle, acétone ; (ii) K_2CO_3 , DMF, 100 °C, 10 min, 92% ; (iii) chloroformiate d'éthyle, benzène, reflux; (iv) 1) NH_2NH_2 , EtOH, reflux ; 2) $NaNO_2$, AcOH, reflux, 89%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Le mécanisme réactionnel est le suivant (Schéma 12).

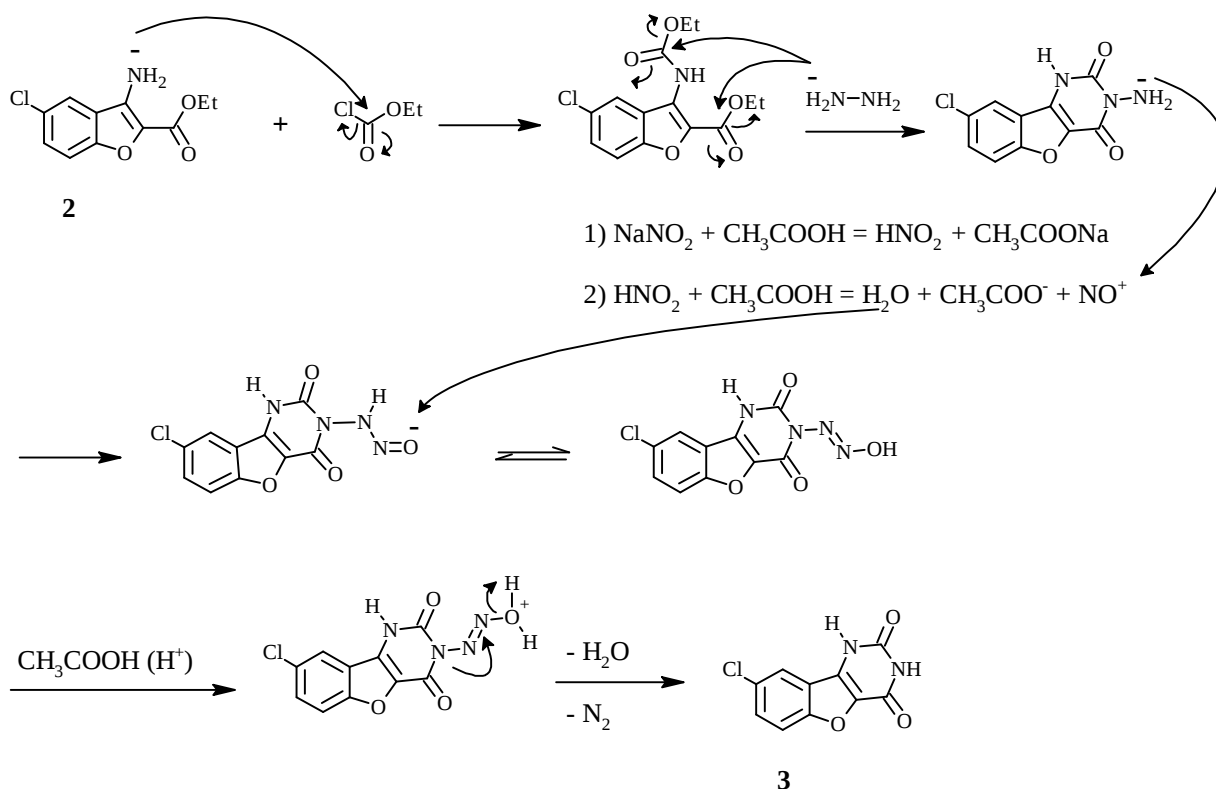


Schéma 12 : Mécanisme proposé par notre équipe

3.2.2. Synthèse du 7-méthoxybenzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-amine

Loidreau *et al.*¹⁷⁹ ont décrit la série pour l'obtention de 7-méthoxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-amine. La *O*-alkylation du 2-hydroxy-4-méthoxybenzonitrile **1** commercial et la cyclisation de l'intermédiaire cyanométhyléther correspondant (non isolé) ont été réalisées en présence de carbonate de potassium comme base. La synthèse du dérivé 4-aminopyrimidine **3** non substitué a été mise en œuvre avec un bon rendement de 84% par chauffage élevé (170 °C pendant 30 min) de la formimidamide intermédiaire en présence de formamide qui a joué le double rôle de solvant et de réactif (Schéma 13).

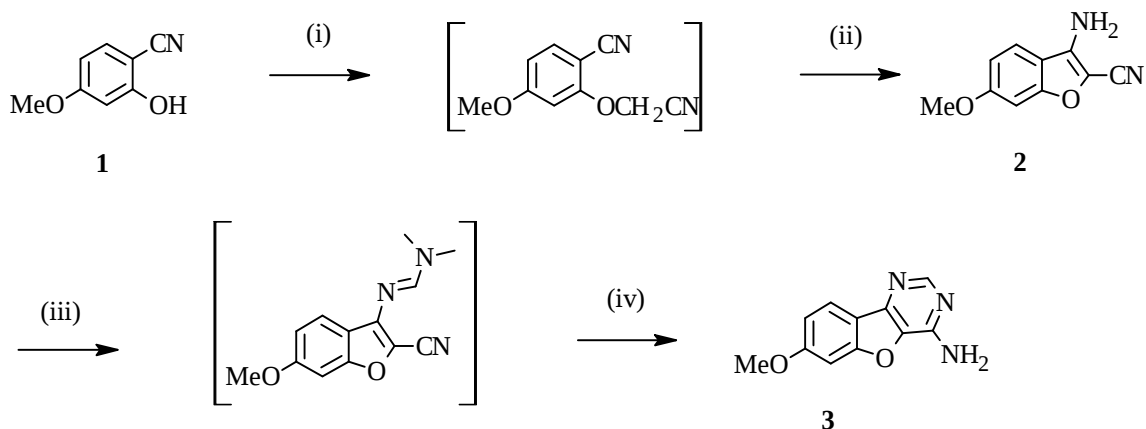


Schéma 13 : (i) Bromoacétonitrile, K_2CO_3 , DMF, t.a., 2 h ; (ii) 80 °C, 16 h, 79% ; (iii) DMF-DMA, 90 °C, MO, 30 min, 99% ; (iv) Formamide, 170 °C, MO, 30 min, 84%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

3.2.3. Synthèse de benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines fonctionnalisées

Bo Chao *et al.*¹³¹ ont présenté en 2012 une nouvelle réaction en cascade a été développée pour la synthèse de divers membres d'une série de dérivés benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines.

Le processus utilise des chromones 3-halogénées **1** facilement préparées et diverses amidines disponibles dans le commerce et leurs analogues comme matières de départ. Cette réaction *en tandem* est favorisée en utilisant un simple réactif de cuivre(I) et implique une séquence chimiosélective d'addition de Michael-hétérocyclisation-cyclisation intramoléculaire (Schéma 14).

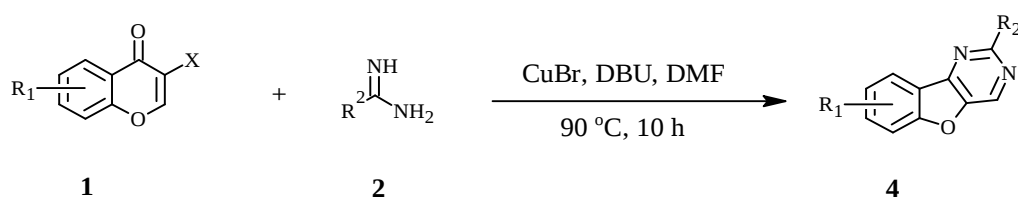


Schéma 14 : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines à partir des chromones halogénées

Le mécanisme est décrit par Bo Chao *et al.* (Schéma 15).

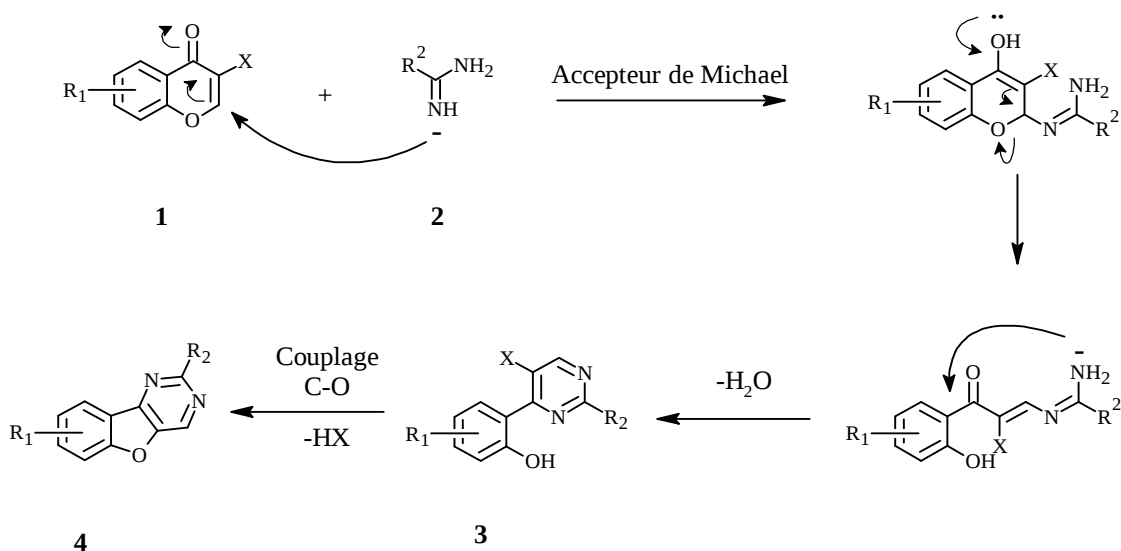


Schéma 15 : Mécanisme proposé¹³¹

Ils ont envisagé que des chromones 3-halogénées **1** participeraient avec des amidines **2** dans des séquences d'addition-élimination-double cyclisation intramoléculaire de Michael qui aboutissent à la formation de biarylphénols **3**. Si elle est utilisable, cette séquence produirait des phénols qui devraient subir une cyclisation formant des liaisons C-O pour produire des dérivés de benzofuro[3,2-*d*] pyrimidine **4**.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

3.2.4. Synthèse de 2,4,8-trichloro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine

Les travaux de Liu *et al.*¹⁷⁷ sur la synthèse de benzo[4,5]furo hétérocycles, publiés en 2008, présentent une voie d'accès au 2,4,8-trichloro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine **5**.

Tout d'abord, le couplage régiosélectif Suzuki entre **1** et **2** a été réalisé dans les conditions optimisées (Pd(OAc)₂, PPh₃ et K₃PO₄ dans CH₃CN/H₂O), la réaction donne de la phénylpyrimidine **3** avec un rendement de 87%. Le produit **3** a ensuite été déméthylé (BBr₃, CH₂Cl₂) pour donner du biarylphénol **4**. Ce composé **4** a été cyclisé en utilisant le thiophène-2-carboxylate de cuivre (CuTC) dans le DMA pour fournir le produit **5** avec un bon rendement de 83% (Schéma 16).

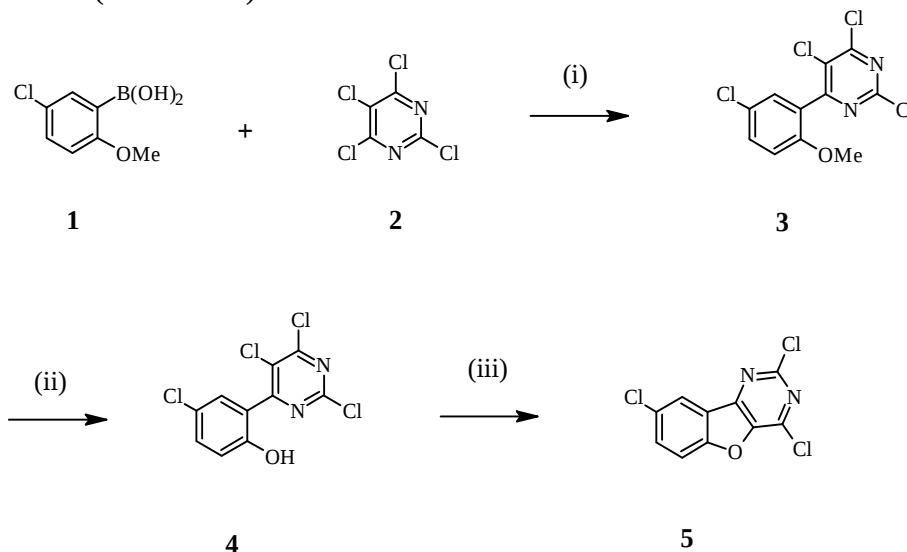


Schéma 16 : (i) Pd(OAc)₂, PPh₃, K₃PO₄, CH₃CN, H₂O, 60 °C, 87% ; (ii) BBr₃, CH₂Cl₂, t.a., 98% ; (iii) CuTC, DMA, 120-140 °C, 83%.

II. Partie théorique : Travaux réalisés

La première démarche de notre travail a consisté à déterminer les différentes voies d'accès envisageables pour la synthèse des molécules cibles analogues du cercosporamide.

Compte tenu de l'expertise du laboratoire dans la synthèse des dérivés pyrimidines fusionnés, des méthodes décrites dans la littérature, et dans le but d'introduire une fonctionnalité susceptible d'engendrer des liaisons hydrogènes donneur/accepteur au niveau de la cible protéique, notre choix s'est porté sur le design de 3 composés en série à partir du phloroglucinol commercial (Schéma 17).

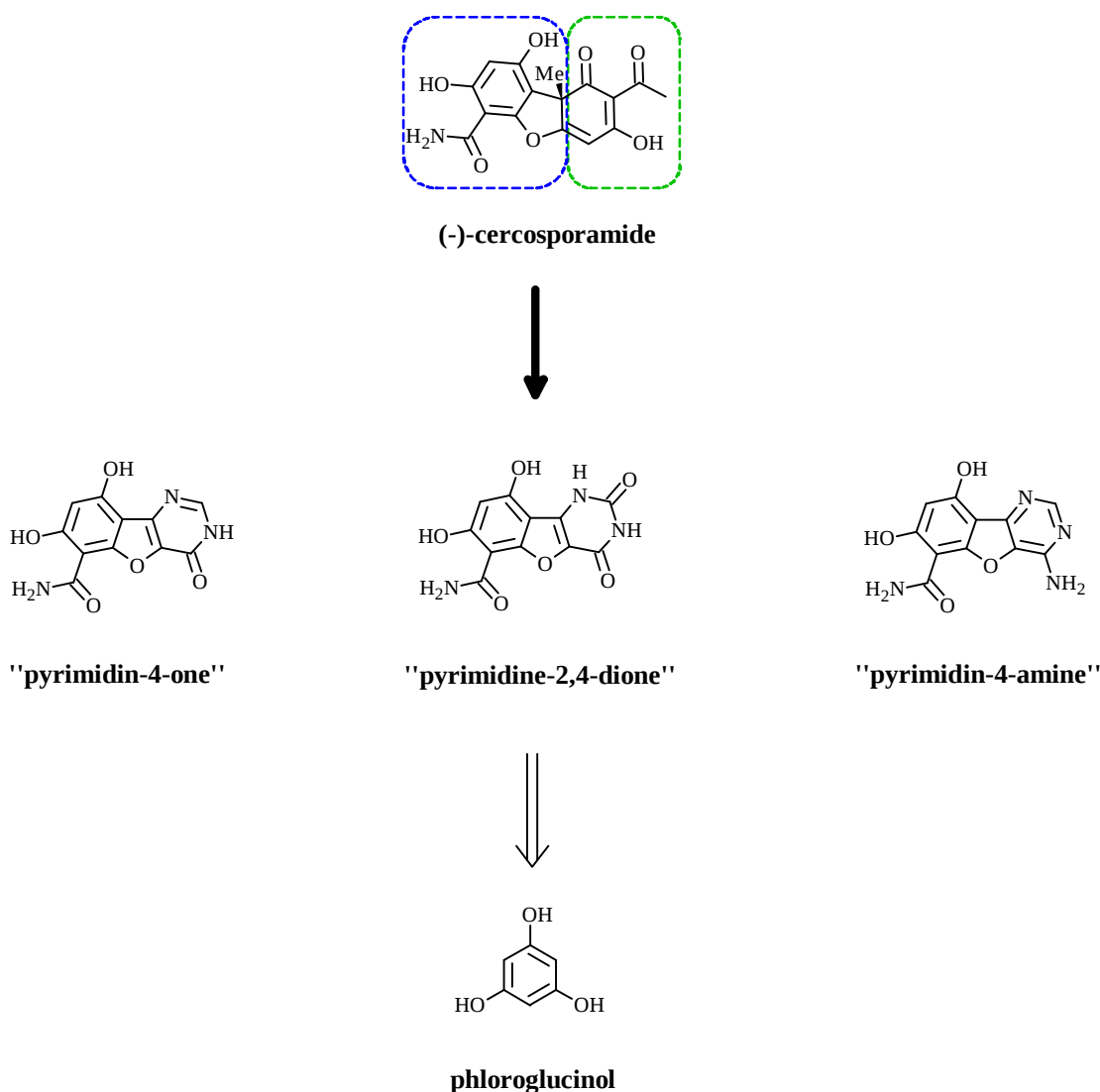


Schéma 17 : Dérivés de benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine

L'analyse structurale de ces derniers conduit à envisager 3 étapes clés dans la conception des molécules cibles (Figure 43).

- Le choix des groupements protecteurs au niveau des groupes hydroxyles pour l'obtention du tricycle.
- La méthode et l'étape d'introduction de la fonction carboxamide.
- Le choix du benzofurane précurseur pour la construction du noyau pyrimidique.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

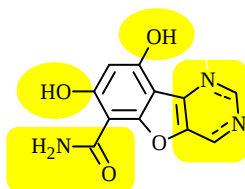


Figure 43 : Conception des molécules cibles

Plusieurs voies de synthèse sont proposées pour l'obtention de ces trois composés. Dans un premier temps, le 3,5-dibenzzyloxyphénol a été préparé pour deux raisons :

- 1) La présence des benzyles facilement déprotégés dans une étape finale.
- 2) OH libre pour permettre la formation du noyau benzofurane.

1. Synthèse du 3,5-dibenzzyloxyphénol

1.1. Approche rétrosynthétique

La synthèse du 3,5-dibenzzyloxyphénol comporte 3 étapes à partir du phloroglucinol commercial **IV**. Le schéma rétrosynthétique proposé est présenté ci-dessous (Schéma 18) :

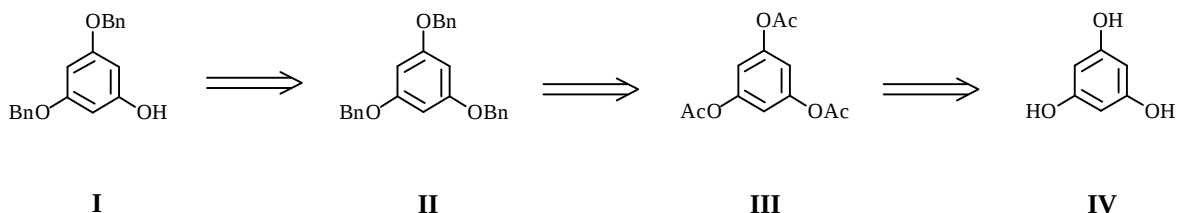


Schéma 18 : Rétrosynthèse envisagée pour la synthèse de 3,5-dibenzzyloxyphénol

L'accès au dérivé phénolique **I** est envisagé par monodéprotection du précurseur tribenzylé **II**. La *O*-benzylation du phloroglucinol **IV** difficile à cause de la *C*-benzylation compétitive, a été réalisée avec succès par une méthode utilisant le triacétate de phloroglucinol **III** comme intermédiaire permettant ainsi la désactivation du noyau aromatique vis-à-vis d'une attaque électrophile.

1.2. Travaux réalisés

Le groupement benzylique est un groupe protecteur classique de l'hydroxyle phénolique en synthèse organique, car l'éther correspondant est stable dans des conditions basiques ou légèrement acides, mais il est facilement clivé par hydrogénolyse.¹⁸⁰ Ainsi, le 3,5-dibenzzyloxyphénol (**4**), est obtenu en trois étapes à partir du phloroglucinol (**1**) (Schéma 19).

La première étape consiste à dissoudre le phloroglucinol (**1**) dans la pyridine et d'y ajouter de l'anhydride acétique (Ac_2O), puis de chauffer au reflux pendant 5 h.^{128,181} Le phloroglucinol triacétate (**2**) est obtenu avec un rendement satisfaisant de 87%.^{182,183}

Lors de la deuxième étape, un mélange de composé **2**, de chlorure de benzyle et d'hydruure de sodium dans le DMF a été refroidi à 0 °C et une faible quantité d'eau a été ajoutée.¹²⁸ La présence d'eau dans le milieu réactionnel permet d'hydrolyser le NaH en excès qui va générer du NaOH permettant de libérer *in situ* la protection acétate du phloroglucinol avant l'étape de benzylation. Le mélange réactionnel est agité pendant 10 h à la température ambiante pour donner l'éther phloroglucinol de tribenzyle (**3**) avec un rendement de 96%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Une monodéprotection par un mécanisme de trans hydrogénation et réalisée en présence de cyclohexène et de palladium sur charbon (Pd-C) à 10% dans une solution d'acétate d'éthyle/éthanol (3/1) au reflux pendant 2 h,¹²⁸ permet d'obtenir le dérivé phénolique **4** avec un rendement de 45%.¹⁸⁴ Le faible rendement s'explique par le fait qu'il convient de stopper la réaction avant la conversion totale du produit de départ pour éviter la formation d'une quantité importante de double ou triple débenzylation. Le produit de départ est récupéré facilement par colonne chromatographique sur gel de silice.

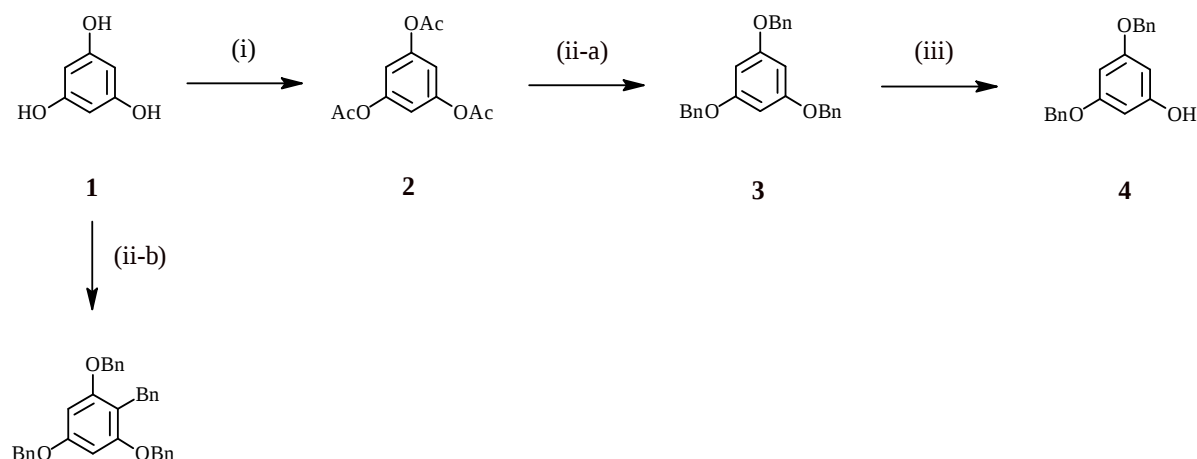


Schéma 19 : (i) Pyridine, Ac₂O, 120 °C, 5 h, 87% ; (ii-a) BnCl, NaH, DMF, H₂O, 0 °C, 10 h, 96% ; (ii-b) BnCl, NaH, DMF, 0 °C, 10 h ; (iii) C₆H₁₀, Pd-C 10%, AcOEt/EtOH (3/1), 110 °C, 2 h, 45%.

Le composé **4** est obtenu en 3 étapes avec un rendement de 38%. Ce composé est un intermédiaire clé de la séquence réactionnelle proposée puisqu'il va permettre de synthétiser les précurseurs benzofuranes des composés finaux.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

2. Synthèse du 7,9-dihydroxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**I**)

Comme précédemment présenté, les voies d'accès au 7,9-dihydroxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**I**) sont d'abord envisagées ci-dessous (Schéma 20) :

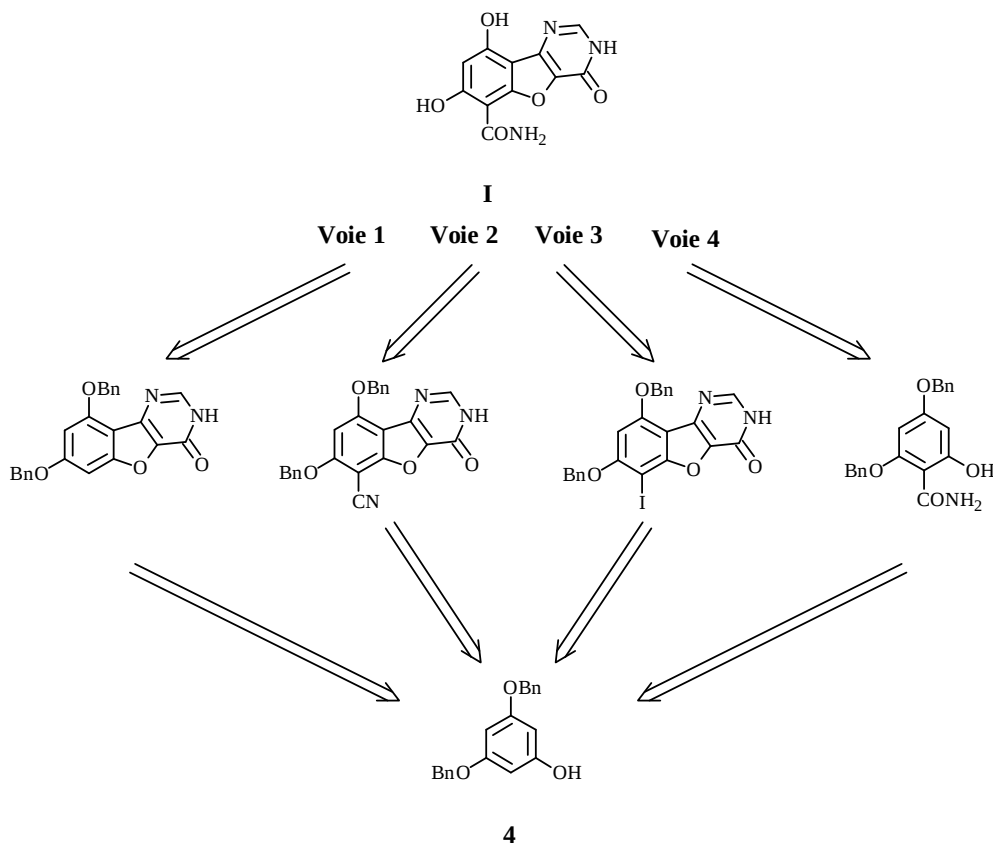


Schéma 20 : Voies d'accès à la 4-oxobenzofuro[3,2-*d*]pyrimidine

Plusieurs voies de synthèse sont proposées pour l'obtention de ce composé cible, possédant une partie dihydroxyphénylcarboxamide à partir du précurseur dibenzyl **4**.

L'introduction de la fonction carboxamide sera réalisée après cyclisation finale, ou pourra être conduite avant cyclisation initiale en benzofurane.

2.1. Introduction directe de la fonction carboxamide après cyclisation (Voie 1)

2.1.1. Stratégie de synthèse

Afin d'accéder au composé cible **I**, la rétrosynthèse envisagée est la suivante (Schéma 21) :

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

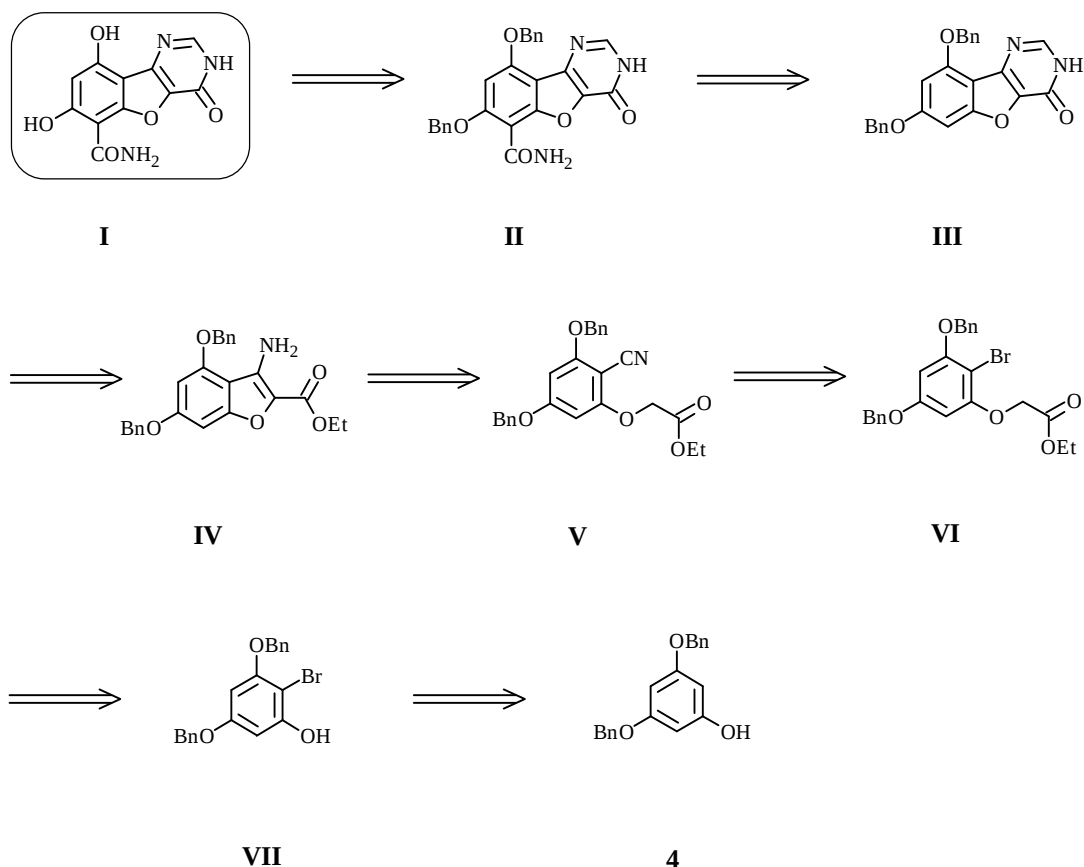


Schéma 21 : Rétrosynthèse envisagée

La déprotection des benzyles du composé **II** permet d'accéder au composé attendu **I**. Le groupe carboxamide en position 6 du composé tricyclique **II** pourra être incorporé directement par substitution électrophile aromatique avec l'isocyanate de chlorosulfonyle à partir du composé attendu **III**.

L'accès au dérivé tricyclique benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4-one **III**, sera donc envisagé à partir du précurseur benzofurane **IV** après la cyclisation du composé **V**.

L'introduction du groupement cyano du composé **V** pourra être obtenue à partir du précurseur bromé **VI**.

La *O*-alkylation sera envisagé avec une base et le bromoacétate d'éthyle à partir du dérivé bromophénolique **VII** synthétisé par une bromation régiosélective du dérivé phénolique **4**.

2.1.2. Travaux réalisés

La première étape consiste à effectuer une monobromation du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**). L'introduction régiosélective d'un atome de brome en position 2 sur le composé **4** pourra permettre par la suite d'accéder à une fonction nitrile au moyen de réaction de substitution nucléophile.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

La position la plus réactive pour l'attaque électrophile est la position 2, suivie de la position 6. Différents essais de monobromation du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**) ont été réalisés pour donner le dérivé bromophénolique **5** (Schéma 22; Tableau 2):

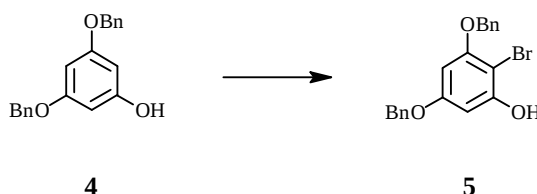


Schéma 22 : Réaction de bromation sur le composé 4

Tableau 2 : Mise au point de la réaction de bromation sur le composé 4

Essai	Réactifs	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	Na ₂ CO ₃ (3 éq), Br ₂ (3 éq)	H ₂ O	t.a.	24 h	Produit de départ
2	HBr, H ₂ O ₂	-	t.a.	24 h	Produit de départ
3	NBS (1 éq)	CH ₂ Cl ₂	0 °C	10 min	3 produits mono-, di-, tribromés
4	NBS (1 éq)	CH ₂ Cl ₂	-78 °C	2 min	95%

La substitution électrophile aromatique (essai 1) par le dibrome dans l'eau en présence de carbonate de sodium s'est soldée par un échec, seul le produit de départ est récupéré.

La bromation par l'acide bromhydrique dans l'eau oxygénée (essai 2) ne conduit pas à la formation du 3,5-bis(benzyloxy)-2-bromophénol (**5**).¹⁸⁵

En présence de *N*-bromosuccinimide en quantité stœchiométrique dans le dichlorométhane à 0 °C (essai 3), la formation d'un mélange de produits mono, di et tri-bromés est observée par suivi UPLC/MS. La présence des composés mono-, di- et tri-bromés est confirmée par spectrométrie de masse et par RMN du proton. Cependant, des soucis de purification et de séparation du mélange ont conduit à l'abandon de ces conditions réactionnelles.^{186,187}

Seul l'essai 4 en présence de *N*-bromosuccinimide (1 équivalent) dans le dichlorométhane à basse température a permis de bromer régiosélectivement le composé **4** avec un bon rendement de 95%.¹⁸⁸

C'est donc cette dernière méthode qui sera retenue.

Lors de la deuxième étape, la *O*-alkylation a été envisagée avec une base et le bromoacétate d'éthyle à la température ambiante.¹⁸⁹ La méthode utilise du carbonate de potassium ou de l'hydruure de sodium, jouant le rôle de base, comme agent de déprotonation dans le DMF. Divers essais de *O*-alkylation par le bromoacétate d'éthyle sur le composé **5** sont réalisés de manière classique (Schéma 23) selon des modes opératoires décrits et résumés dans le tableau suivant :

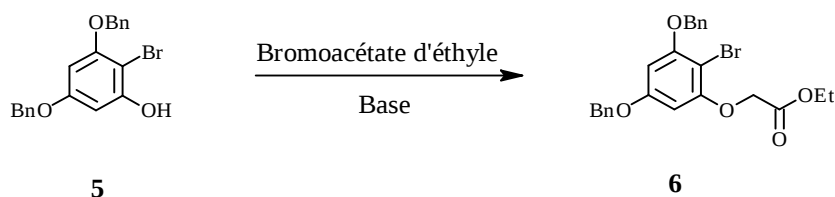


Schéma 23 : Réaction de *O*-alkylation

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 3 : Conditions opératoires et résultats pour la réaction de O-alkylation

Essai	Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K ₂ CO ₃ (1,5 éq)	DMF	0 °C - t.a.	24 h	Produit de départ
2	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	t.a.	24 h	Produit de départ
3	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	80 °C	24 h	15% de conversion
4	NaH (1,5 éq)	DMF	0 °C - t.a.	24 h	83%

Les essais 1 et 2 à partir du dérivé bromophénolique (5) se sont soldés par des échecs, seul le produit de départ est récupéré en présence de carbonate de potassium à 0 °C ou à la température ambiante.¹²⁸ Lorsqu'on chauffe le milieu réactionnel à 80 °C (essai 3), on note l'apparition du produit attendu, mais la conversion reste très faible après 24 h de réaction.

Finalement, en présence d'hydruure de sodium (essai 4) le composé **6** est obtenu avec un rendement de 83% à la température ambiante.¹⁹⁰

Lors de la troisième étape, nous avons réalisé une cyanation sur le composé **6** et deux méthodes de cyanation ont été tentées.

- **Par la réaction de Rosenmund-Von Braun** : Différentes méthodes de cyanation à partir d'un dérivé halogénoaryle peuvent être effectuées par la réaction de Rosenmund-Von Braun.¹⁹¹ Cette cyanation est réalisée en présence de sels de cuivre au reflux de la pyridine. Elle peut aussi être effectuée en utilisant le DMF comme solvant.

Un mélange de composé **6** et de cyanure de cuivre(I) dans le DMF a été chauffé à 160 °C pendant 1 h pour donner l'ester **7**. Le composé cyané **7** est isolé avec un rendement de 19% (Schéma 24). Le faible rendement obtenu pour le dérivé cyané **7** est lié à une purification difficile.

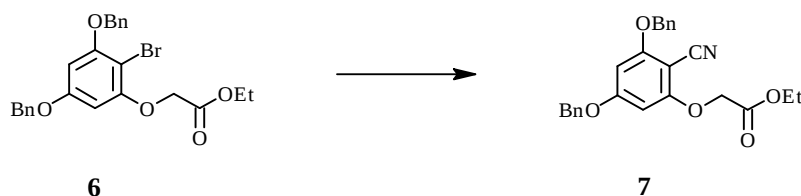


Schéma 24 : CuCN, DMF, 160 °C, 1 h, 19%.

Lorsque le temps de réaction est augmenté à 4 h, la formation de produits secondaires est observée sans amélioration du rendement.

Un essai de chauffage à 200 °C est resté sans succès.

- **Par des réactions pallado-catalysées** : Un accès aux dérivés cyanés consiste à effectuer des réactions pallado-catalysées en présence de Pd₂(dba)₃ utilisé comme catalyseur de la réaction, de cyanure de zinc et de S-Phos comme ligand.¹⁹²

Cette voie consiste en un échange halogène/nitrile sur le noyau aryle. La réaction est conduite dans le DMF en présence de cyanure de zinc et d'une quantité catalytique de Pd₂(dba)₃.^{193,194} Le mécanisme de la réaction d'échange halogène/nitrile est le suivant (Schéma 25) :

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

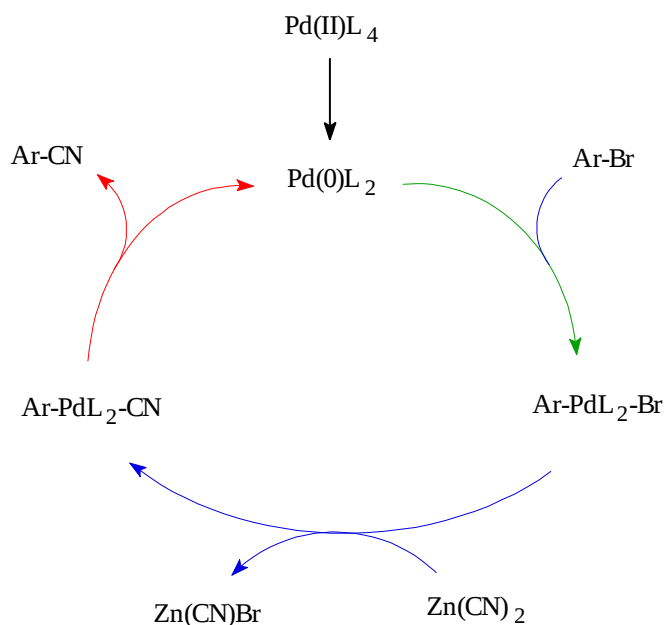


Schéma 25 : Cycle catalytique de la réaction d'échange Brome/Nitrile¹⁹³

Le catalyseur subit tout d'abord deux éliminations non réductrices afin de libérer deux sites de coordination.

Le palladium subit ensuite une addition oxydante par le dérivé arylé, suivie d'une modification de ligand, l'halogène étant remplacé par le groupement cyano.

Le complexe palladié subit enfin une élimination réductrice permettant de régénérer le catalyseur actif et d'obtenir le dérivé nitrile.

Cette méthode démontre la réactivité de l'échange entre le brome et le cyano, cependant le taux de conversion obtenu est faible (Schéma 26).

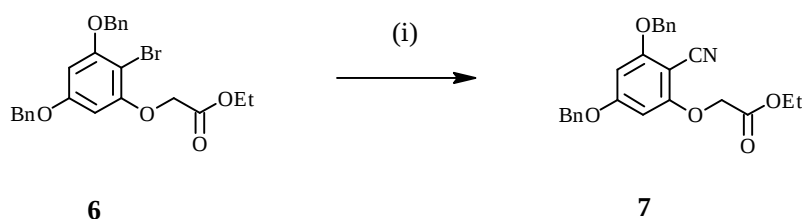


Schéma 26 : (i) Zn(CN)_2 , $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, *S*-Phos, DMF/ H_2O (19/1), 12 h, 140 °C, 24% de conversion.

À cause du faible taux de conversion, nous avons décidé de réaliser la réaction de *O*-alkylation après la cyanation. La réaction de cyanation sur le composé 5 (Schéma 27) est mise en œuvre suivant deux méthodes répertoriées dans le tableau 4.

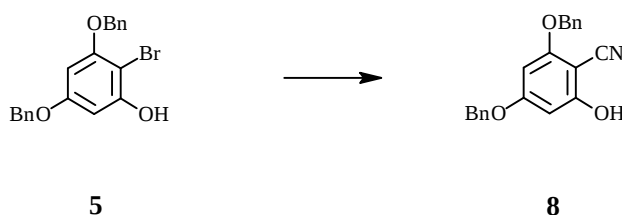


Schéma 27 : Réaction de cyanation sur le composé 5

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 4 : Conditions opératoires et résultats pour la réaction de cyanation

Essai	Réactifs	Solvants	Conditions	Résultats
1	CuCN	DMF	140 °C, 14 h	14% de conversion
2	Zn(CN) ₂ , Pd ₂ (dba) ₃ , S-Phos	DMF/H ₂ O (19/1)	MO, 2 h, 140 °C	Échec

Le taux de conversion faible issu de la réaction de Rosenmund-Von Braun, dû en partie à des difficultés de purification (essai 1), a engendré des essais de cyanation pallado-catalysés afin d'améliorer le rendement.

Un essai non optimisé d'irradiation micro-ondes en utilisant le cyanure de zinc, le catalyseur Pd₂(dba)₃, et le ligand S-Phos s'est soldé par un échec (essai 2).

Le groupe hydroxyle pourrait être une explication à cet échec de cyanation pallado-catalysé et au faible rendement obtenu pour la réaction de Rosenmund-Von Braun.

Pour améliorer cette étape de cyanation, il est envisagé de remplacer l'atome de brome par atome d'iode qui est un meilleur groupe partant.

Lors de la première étape, différents essais de monoiodation du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**) ont été réalisés pour donner le composé **9** (Schéma 28; Tableau 5).

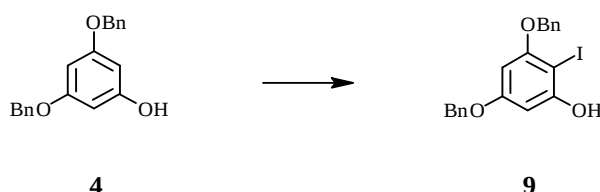


Schéma 28 : Réaction d'iodation sur le composé 4

Tableau 5 : Mise au point de la réaction d'iodation sur le composé 4

Essai	Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	Na ₂ CO ₃ (3 éq), I ₂ (3 éq)	H ₂ O	t.a.	24 h	Produit de départ
2	H ₂ O ₂ (3 éq), I ₂ (3 éq)	-	t.a.	24 h	Produit de départ
3	NIS (1 éq)	CH ₂ Cl ₂	-78 °C	2 min	76%

La substitution électrophile aromatique (essai 1) par le diiode dans l'eau en présence de carbonate de sodium s'est soldée par un échec, seul le produit de départ est récupéré.

Dans l'essai 2, l'iodation par le diiode dans l'eau oxygénée ne conduit pas à la formation du 3,5-bis(benzyloxy)-2-iodophénol (**9**). Le produit de départ est à nouveau récupéré.¹⁸⁵

L'essai 3 en présence de *N*-iodosuccinimide dans le dichlorométhane à basse température a permis d'isoler le composé **9** avec un rendement acceptable.¹⁸⁸ Le résultat obtenu de cette iodation aboutit à un mélange des composés mono ou diiodés sur le cycle benzénique qui sont cependant difficilement séparables sur la colonne de gel de silice.

Lors de la deuxième étape, la *O*-alkylation a été réalisée avec une base et le bromoacétate d'éthyle à la température ambiante pour obtenir le (2-iodo-3,5-dibenzyloxyphénoxy)acétate d'éthyle (**10**) avec un très bon rendement de 96% (Schéma 29).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

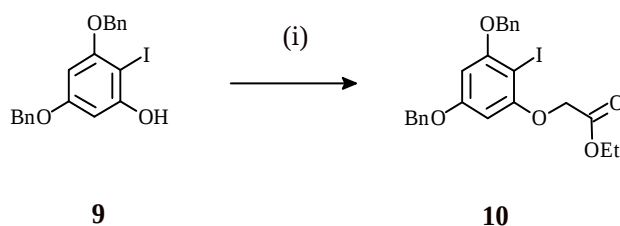


Schéma 29 : (i) NaH, DMF, bromoacétate d'éthyle, t.a., 12 h, 96%.

Lors de la troisième étape, un mélange de composé **10** et de cyanure de cuivre(I) dans le DMF a été chauffé à 160 °C pendant 1 h pour donner le composé **7** avec un bon rendement de 92%,¹⁹⁵ contrairement à l'utilisation du précurseur bromé **6** (Schéma 30).

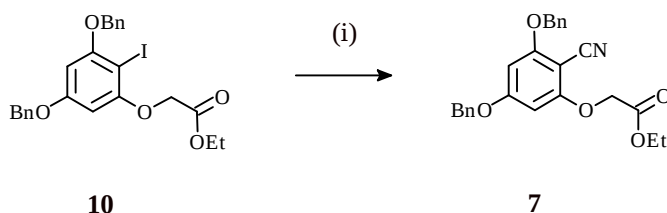


Schéma 30 : (i) CuCN, DMF, 160 °C, 2 h, 92%.

La cyclisation du composé **7** a été effectuée en utilisant une base dans le DMF pour donner le dérivé benzofurane portant un groupe aminé en position 3 et une fonction ester en position 2 (Schéma 31). Plusieurs bases ont été testées pour optimiser la réaction. Cette étape a nécessité quelques mises au point (Tableau 6).

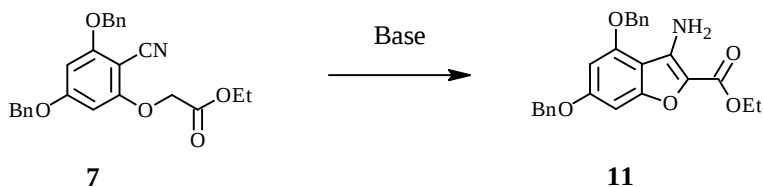


Schéma 31 : Cyclisation du composé **7**

Tableau 6 : Mise au point de la cyclisation du composé **7**

Essai	Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	KOH (1,5 éq)	EtOH	0 °C	15 min	16% de conversion
2	K ₂ CO ₃ (1,5 éq)	DMF	0 °C - t.a.	24 h	Produit de départ
3	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	t.a.	24 h	Produit de départ
4	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	50 °C	24 h	16% de conversion
5	<i>t</i> -BuOK (3 éq)	THF	0 °C - t.a.	2 h	28% de conversion
6	NaH (1,5 éq)	DMF	0 °C	30 min	66%

La mise au point a consisté à étudier le nombre d'équivalents de base nécessaire, la température et le temps réactionnel pour l'obtention du composé souhaité avec un rendement optimal.

Un premier essai en présence de 1,5 équivalents d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol n'entraîne que 16% de conversion.¹⁹⁶ À cause de la présence de la fonction ester, le chauffage du milieu réactionnel est limité par risque d'hydrolyse.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Les essais 2 et 3 en présence de 1,5 et 3 équivalents de carbonate de potassium dans le DMF à température ambiante ne donnent que le produit de départ.¹⁷⁹

En utilisant 3 équivalents de ce dernier, à 50 °C (essai 4), le produit voulu est formé avec un faible taux de conversion.¹⁹⁷

L'essai 5 a été effectué en utilisant 3 équivalents de *tert*-butylate de potassium (*t*-BuOK) dans le THF, le taux de conversion est meilleur mais reste faible (28%).¹⁹⁸

Enfin, les meilleures conditions mettent en jeu 1,5 équivalents d'hydruure de sodium dans le DMF, à 0 °C (essai 6), le composé **11** étant obtenu avec un rendement de 66%.¹⁹⁹

L'accès au composé tricyclique **12**, a été envisagé dans un premier temps à partir du précurseur benzofurane **11**. Un mélange de 3-amino-4,6-dibenzoyloxybenzofurane-2-carboxylate d'éthyle **11** dans de l'orthoformate de triéthyle a été irradié sous micro-ondes à 200 °C pendant 15 min. La solution jaune résultante a été évaporée à sec et l'intermédiaire formamide brut a été dissous dans une solution d'ammoniac dans le méthanol. Le mélange est irradié sous micro-ondes à 140 °C pendant 15 min pour donner le composé **12**. Le composé **12** a alors été isolé avec un rendement global sur les deux étapes de 31% à partir du composé **11** (Schéma 32).^{200,201,202}

Le faible rendement est essentiellement dû à des problèmes d'extraction lors du traitement et de la purification malgré une conversion totale des produits de départ.

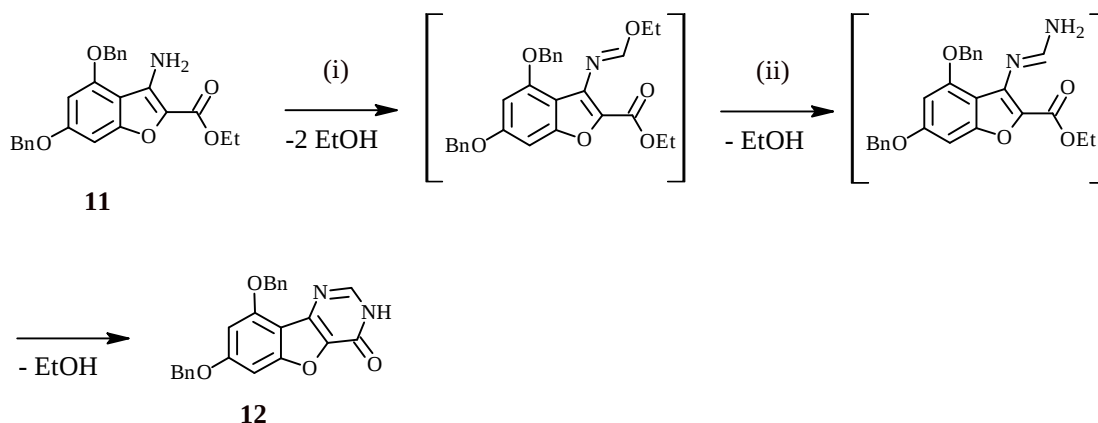


Schéma 32 : (i) HC(OEt)₃, MO, 200 °C, 15 min, (ii) NH₃/MeOH 7N, MO, 140 °C, 15 min, 31%.

Afin de mener à bien la nouvelle stratégie envisagée, le groupe carboxamide en position 6 de l'hétérocycle benzofuopyrimidine **12** a été incorporé directement par substitution électrophile aromatique avec l'isocyanate de chlorosulfonyle (CSI).¹²⁸ Après 24 h, le produit souhaité n'a pas été observé malgré l'ajout de réactifs en excès à température ambiante. Par chauffage du milieu réactionnel à 50 °C, le produit a été dégradé (Schéma 33).

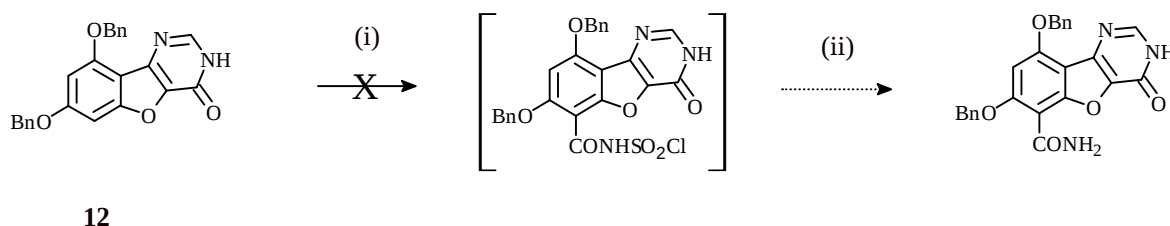


Schéma 33 : (i) CSI, CH₃CN, t.a., 24 h ; (ii) HCl 1 N, t.a., 24 h.

Ces résultats négatifs nous ont conduits à envisager une nouvelle stratégie pour la fonctionnalisation (Schéma 34). Malheureusement, le groupe carboxamide en position 7 du

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

précurseur benzofurane **11** n'a pas pu être incorporé directement selon les conditions précédemment décrites car le produit de départ a été dégradé dans le milieu réactionnel.

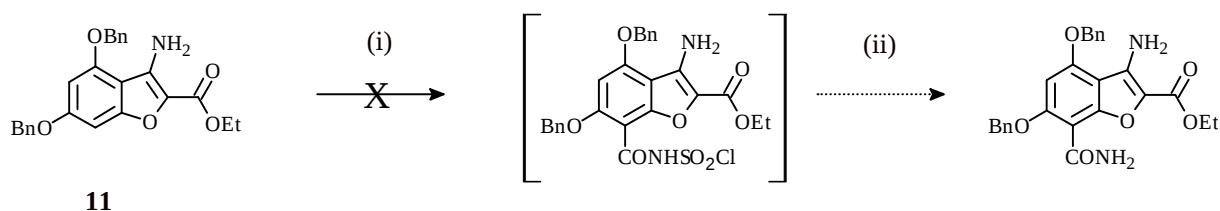


Schéma 34 : (i) CSI, CH₃CN, t.a., 24 h ; (ii) HCl 1 N, t.a., 24 h.

Il semble que la réaction d'introduction de la fonction amide n'a pas fonctionné à cause du groupement amine libre en position 3 du composé **11**, cette fonction a donc été protégée.

Des groupements tels que l'acétyle, le trifluoroacétyle ou bien le *tert*-butoxycarbonyl (Boc) pourront être utilisés comme protecteurs.^{204,205}

La protection par un groupement Boc est effectuée en présence de Boc₂O et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) catalytique dans le THF à 80 °C. Le composé **13** est obtenu avec un rendement de 91% (Schéma 35).^{206,187}

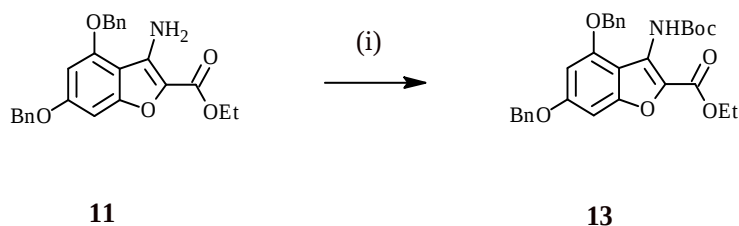


Schéma 35 : Boc₂O, DMAP, THF, 80 °C, 2 h, 91%.

Malheureusement, la protection du groupement amine en position 3 sur le dérivé benzofurane **13** ne permet pas, une nouvelle fois, l'introduction du carboxamide (Schéma 36).

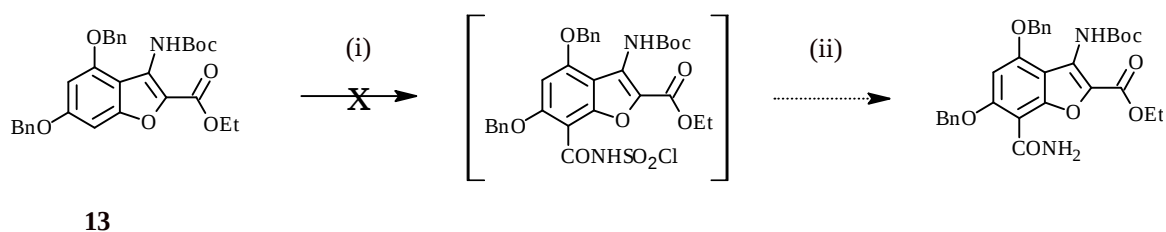


Schéma 36 : (i) CSI, CH₃CN, t.a., 24 h ; (ii) HCl 1 N, t.a., 24 h.

Face aux difficultés rencontrées lors des tentatives d'introduction du groupement carboxamide sur le noyau benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine et sur le précurseur benzofurane, nous avons décidé d'exploiter une autre voie pour obtenir le composé cible.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

2.2. Accès au dérivé 4-oxobenzofuro[3,2-d]pyrimidine-6-carboxamide à partir du précurseur 2,6-diiodophénol et hydratation d'une fonction nitrile (Voie 2)

2.2.1. Stratégie de synthèse

L'autre stratégie consiste à introduire le groupement cyano avant la cyclisation en benzofurane par l'intermédiaire d'un précurseur diodé à partir du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**). La rétrosynthèse envisagée est la suivante (Schéma 37) :

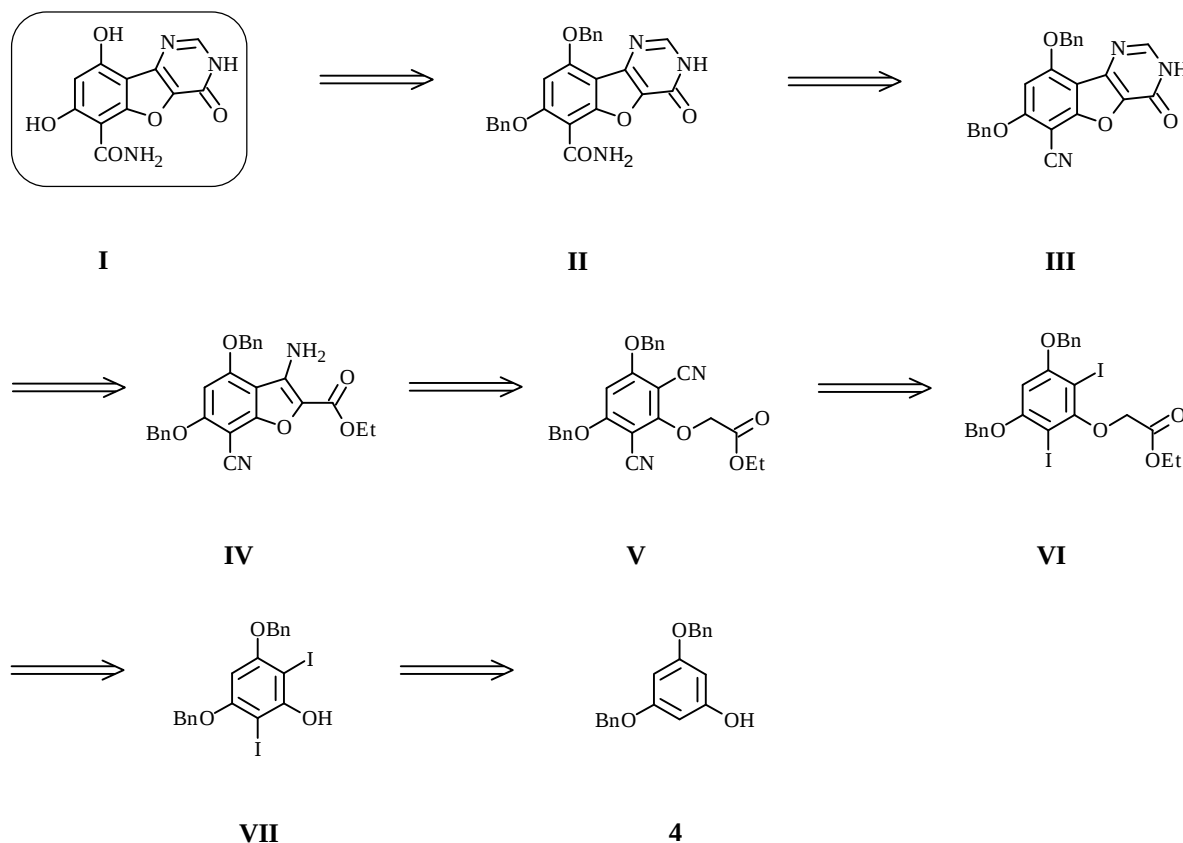


Schéma 37 : Rétrosynthèse envisagée à partir du 2,6-diiodophénol

Le composé cible **I** sera obtenu après la déprotection des benzyles du composé **II**. Le groupe amide en position 6 du composé tricyclique **II** sera obtenu avec une hydratation de la fonction nitrile de l'azahétérocycle **III**.

L'accès au dérivé tricyclique benzofuro[3,2-d]pyrimidin-4-one **III**, sera donc envisagé à partir du précurseur benzofurane **IV**. Celui-ci sera engagé dans la cyclisation du composé **V**. La cyanation à partir du précurseur diodé **VI** conduira à l'obtention du composé **V**.

La O-alkylation sera effectuée avec une base et le bromoacétate d'éthyle à partir du dérivé diiodophénolique **VII** synthétisé par une diiodation du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

2.2.2. Travaux mis en œuvre

La première étape consiste à effectuer une diiodation très rapide (2 min) du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**) par l'ajout de *N*-iodosuccinimide à -78 °C pour obtenir le 2,6-diiodo-3,5-dibenzyloxyphénol (**14**) avec un rendement de 83% (Schéma 38).¹⁸⁸

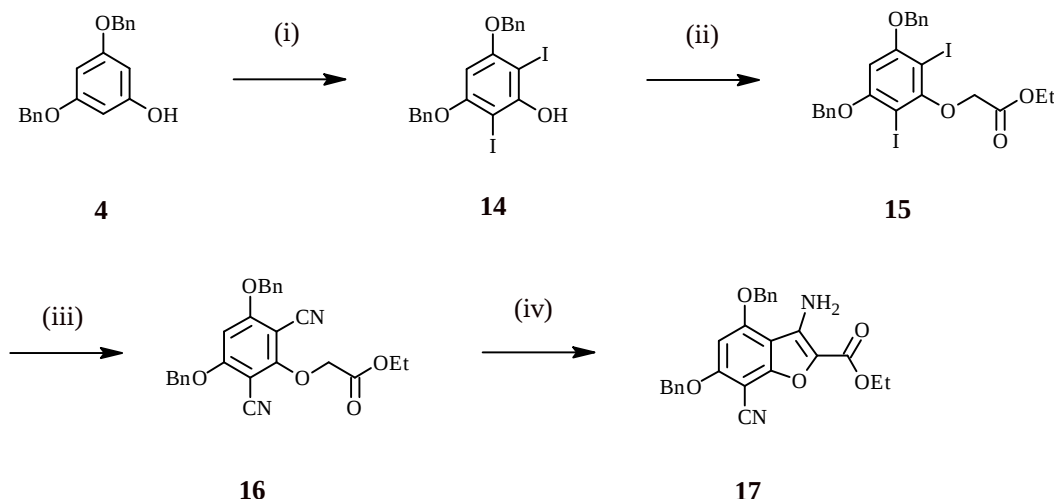


Schéma 38 : (i) NIS (2 éq), CH₂Cl₂, -78 °C, 2 min, 83% ; (ii) NaH, DMF, bromoacétate d'éthyle, t.a., 12 h, 91% ; (iii) CuCN, DMF, 160 °C, 2 h, 87% ; (iv) NaH, DMF, 0 °C, 30 min, 71%.

Lors de la deuxième étape, à une solution du composé **14** dans le DMF ont été ajoutés de l'hydruide de sodium et du bromoacétate d'éthyle à température ambiante.^{206,191} Après 12 h de réaction, le 2,6-diiodo-3,5-dibenzyloxyphénoxyacétate d'éthyle (**15**) est obtenu avec un très bon rendement de 91%.

Un mélange de composé diiodé **15** et de cyanure de cuivre(I) dans le DMF a été ensuite chauffé à 160 °C pendant 2 h pour donner l'analogue dicyané **16** avec un rendement de 87%.²⁰⁸

Enfin, lors de l'étape de cyclisation, à une solution du composé **16** dans le DMF a été ajouté de l'hydruide de sodium à 0 °C. Le mélange a été agité pendant 30 min pour donner le 3-amino-4,6-dibenzyloxy-7-cyanobenzofurane-2-carboxylate d'éthyle (**17**) avec un rendement de 71%.¹⁹⁹

Ensuite, l'hydratation du groupement cyano en position 7 du composé **17** a été envisagée. Afin de mettre au point les conditions d'hydratation du groupement cyano pour obtenir la fonction carboxamide, différents réactifs ont été testés à partir du composé cyané **17** (Schéma 39; Tableau 7).

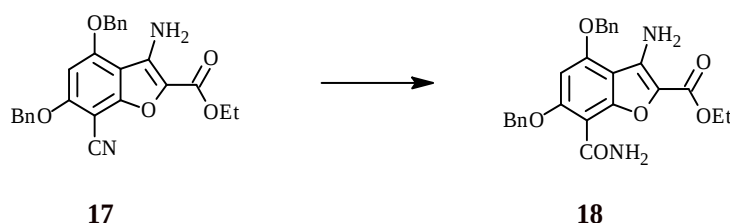


Schéma 39 : Réaction d'hydratation du groupement cyano

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 7 : Mise au point de l'hydratation du groupement cyano

Essai	Réactifs	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	H ₂ O ₂ 35%, K ₂ CO ₃	DMSO	t.a.	24 h	12% de conversion
2	H ₂ O ₂ 35%, NaOH	EtOH	t.a.	24 h	dégradation
3	H ₂ SO ₄ cc	-	t.a.	2 h	dégradation
4	Urée-peroxyde d'hydrogène, K ₂ CO ₃	Acétone/eau	t.a.	24 h	Produit de départ
5	BF ₃ .2CH ₃ COOH	-	120 °C	30 min	dégradation

Seul l'essai 1 en présence de peroxyde d'hydrogène, de carbonate de potassium dans le DMSO a permis une hydratation partielle du groupement cyano après 24 h de réaction mais ensuite la réaction n'évolue plus malgré la prolongation du temps réactionnel. On note l'apparition du produit voulu.²⁰⁸

Malheureusement, en présence de peroxyde d'hydrogène, de soude concentrée dans l'éthanol (essai 2),¹⁹⁵ lorsqu'il y a disparition du produit de départ, des produits de dégradation non identifiés se forment.

En présence d'acide sulfurique concentré (essai 3), au bout de 15 min, une débenzylation est observée sans hydratation du groupement cyano. En augmentant le temps réactionnel, la dégradation du milieu réactionnel est observée.²⁰⁶

La présence d'urée-peroxyde d'hydrogène et de carbonate de potassium (essai 4), ne permet pas d'obtenir le composé voulu, seul le produit de départ est récupéré.²¹⁰

Enfin, une tentative d'hydratation du cyano en amide primaire, par traitement avec BF₃.2CH₃COOH à 120 °C pendant 30 min,^{211,212} ne permet pas de donner le composé voulu. Dans ce cas, la dégradation réactionnelle est observée.

L'échec de la réaction d'hydratation peut être dû à la présence de la fonction ester potentiellement non compatible avec les conditions de réaction.

Ainsi, l'accès au composé tricyclique **19** a été envisagé à partir du précurseur benzofurane **17** (Schéma 40), suivant les conditions précédemment décrites (pour obtenir le composé **12**) avec un rendement de 54%.²⁰²

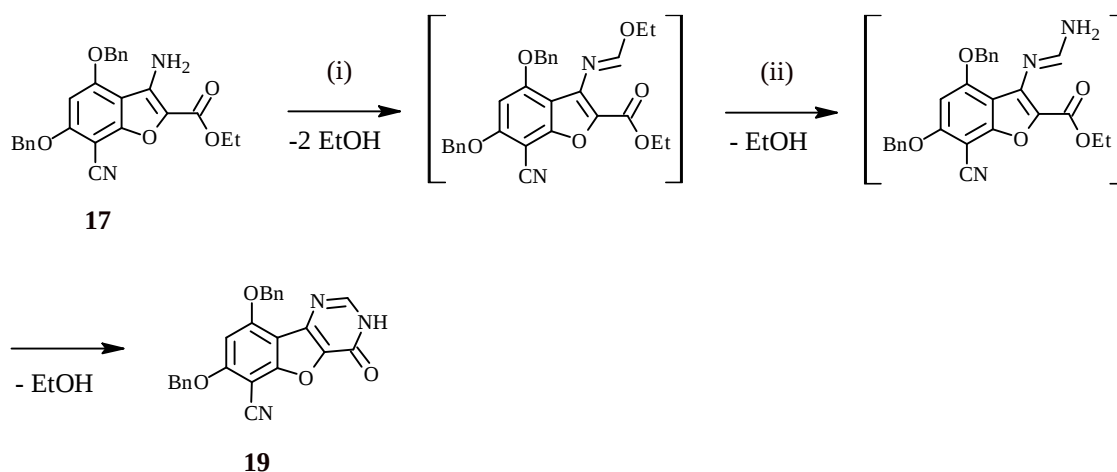


Schéma 40 : (i) HC(OEt)₃, MO, 200 °C, 15 min ; (ii) NH₃/MeOH 7N, MO, 140 °C, 15 min, 54%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

A partir de l'azahétérocyle **19**, les mêmes conditions précédentes d'hydratation du cyano ont été mises en œuvre (Schéma 41 ; Tableau 8).

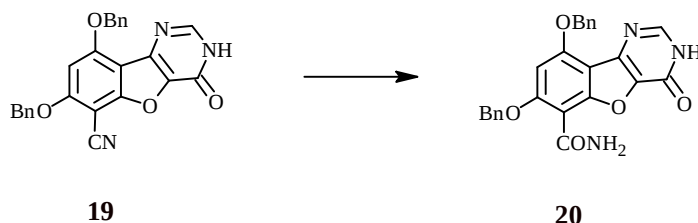


Schéma 41 : Réaction d'hydratation du groupement cyano

Tableau 8 : Mise au point des essais complémentaires d'hydratation du groupement cyano

Essai	Réactifs	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	H ₂ O ₂ 35%, K ₂ CO ₃	DMSO	t.a.	24 h	Produit de départ
2	H ₂ O ₂ 35%, NaOH	EtOH	t.a.	24 h	dégradation
3	H ₂ SO ₄ cc	-	t.a.	2 h	dégradation
4	Urée-peroxyde d'hydrogène, K ₂ CO ₃	Acétone/eau	t.a.	24 h	Produit de départ
5	BF ₃ .2CH ₃ COOH	-	120 °C	30 min	dégradation

L'essai 1 en présence de peroxyde d'hydrogène, de carbonate de potassium dans le DMSO n'a pas permis l'hydratation du groupement cyano.²⁰⁸

En présence de peroxyde d'hydrogène, de soude concentrée dans l'éthanol (essai 2), lorsque le temps est allongé, la dégradation du milieu réactionnel est observée.²⁰⁶

L'apparition de débenzylation (UPLC/MS) est observée en présence d'acide sulfurique concentré après 15 min (essai 3),²⁰⁹ la réactivité du groupement cyano est inexistante. Après 2 h, la dégradation du milieu réactionnel est observée.

En présence d'urée-peroxyde d'hydrogène, de carbonate de potassium (essai 4), après 24 h seul le produit de départ est récupéré.²¹⁰

En présence de BF₃.2CH₃COOH à 120 °C, il y a disparition du produit de départ, mais des produits de dégradation se forment après 30 min.²¹²

Il ne nous a pas été possible pour l'instant de transformer la fonction nitrile en carboxamide. Cependant, en présence d'acide sulfurique concentré, nous observons une déprotection des benzyles au lieu de l'hydratation du cyano. Cette réactivité a été mise à profit afin d'isoler les composés dihydroxylés **21** et **22** issus des dérivés benzofuranique **17** et benzofuro[3,2-*d*]pyrimidique **19**, respectivement (Schéma 42).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

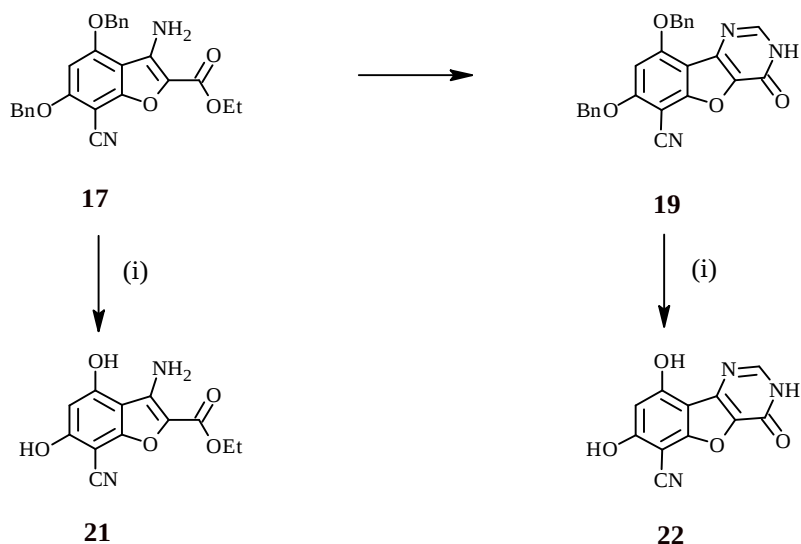


Schéma 42: (i) H_2SO_4 , t.a., 15 min, 73% pour le composé **21** et 61% pour le composé **22**.

Les composés, bien que ne présentant pas la fonction carboxamide mais une fonction cyano précurseur à la place, pourront faire aussi l'objet d'une évaluation biologique afin de vérifier l'importance de la présence du carboxamide par rapport au modèle de départ.

2.3. Accès au dérivé 4-oxobenzofuro[3,2-d]pyrimidine-6-carboxamide à partir de l'analogue iodé (Voie 3)

2.3.1. Rétrosynthèse envisagée

Une autre stratégie consiste à garder un atome d'iode sur le cycle benzénique avant la cyclisation en benzofurane grâce au précurseur diiodé **15**. Le schéma rétrosynthétique ci-dessous est envisagé (Schéma 43).

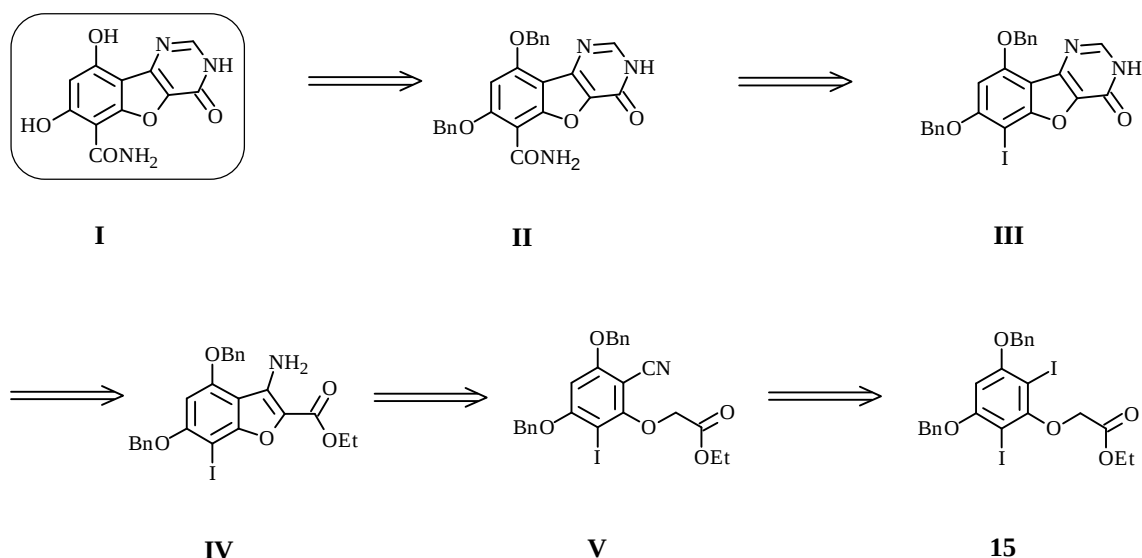


Schéma 43 : Rétrosynthèse envisagée

La synthèse du composé cible **I** a été envisagée à partir du précurseur diiodé **15**. La déprotection des benzyles du composé **II** permet l'obtention du composé final **I**.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

L'accès à la fonction carboxamide du composé **II** à partir du précurseur d'iodo tricyclique benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-4-one **III** sera effectué.

La tricyclic pyrimidine **III** sera obtenue à partir du dérivé benzofurane **IV** après la cyclisation du composé **V**.

Une monocyanoation du précurseur diiodé **15** permet de donner le composé **V**.

2.3.2. Travaux réalisés

La première étape, qui consiste à effectuer une monocyanoation sur le dérivé diiodé **15** en présence d'un équivalent de cyanure cuivreux dans le DMF à 160 °C, a donné l'ester **23** avec un rendement satisfaisant de 86% (Schéma 44).¹⁹⁵

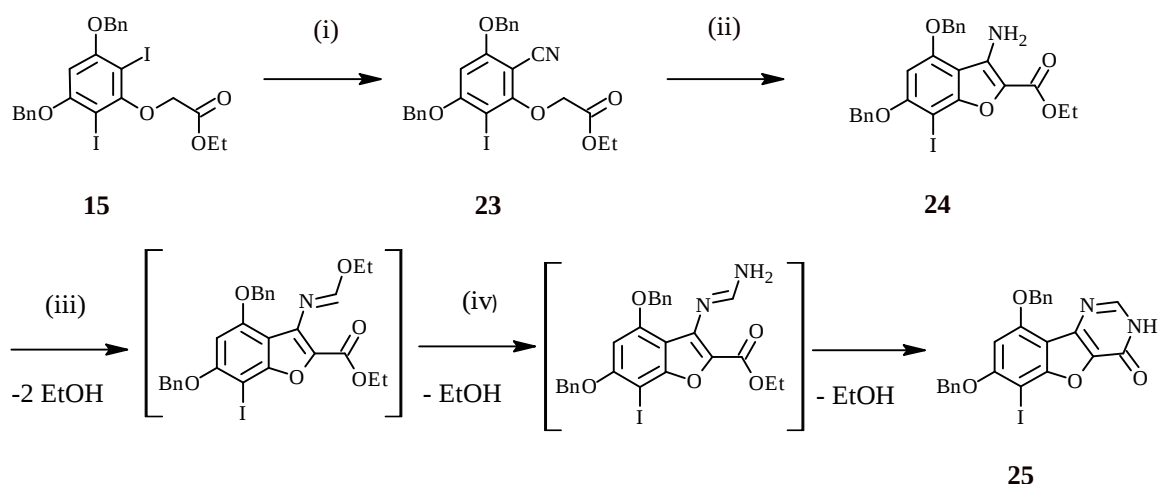


Schéma 44 : (i) CuCN (1 éq), DMF, 160 °C, 2 h, 86% ; (ii) NaH , DMF, 0 °C, 30 min, 76% ; (iii) HC(OEt)_3 , MO, 200 °C, 10 min ; (iv) NH_3/MeOH 7N, MO, 140 °C, 10 min, 33%.

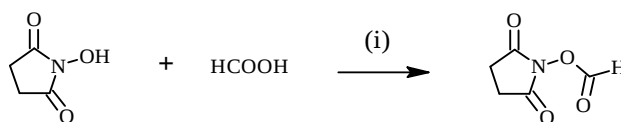
La cyclisation a été ensuite effectuée comme précédemment en utilisant l'hydruire de sodium pour donner le dérivé benzofurane **24** avec un rendement de 76%.¹⁹⁹

Dans les conditions opératoires déjà utilisées et à partir du dérivé benzofurane **24**, le composé tricyclique iodé **25** est isolé avec un rendement moyen de 33%.^{200,201}

Selon Barré *et al.*,²⁰⁷ un protocole efficace de carbonylation catalysée par le palladium est décrit pour le couplage d'un grand panel d'halogénures d'aryle, d'hétéroaryle, de benzyle, de vinyle et d'allyle avec le formate de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en tant que substitut au CO pour obtenir les esters de NHS correspondants. Une conversion élevée des produits de couplage a été obtenue avec un rendement allant jusqu'à 98% au moyen d'un système de catalyseur/ligand $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{Xantphos}$.

Dans un premier temps, le formate NHS **26** a été préparé avec un rendement de 99% à partir d'hydroxysuccinimide et d'acide formique dans l'anhydride acétique de 0 °C à température ambiante pendant 12 h (Schéma 45).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines



26

Schéma 45 : (i) Ac₂O, 0 °C-t.a., 12 h, 99%.

A partir du précurseur iodé **25**, la réaction a été effectuée en utilisant NHS (**26**), du Pd(OAc)₂, du Xantphos et de la triéthylamine (NEt₃) à 60 °C dans divers solvants comme le THF, le DMF, l'acétonitrile. Malheureusement, l'introduction du carboxamide est restée infructueuse (Schéma 46).

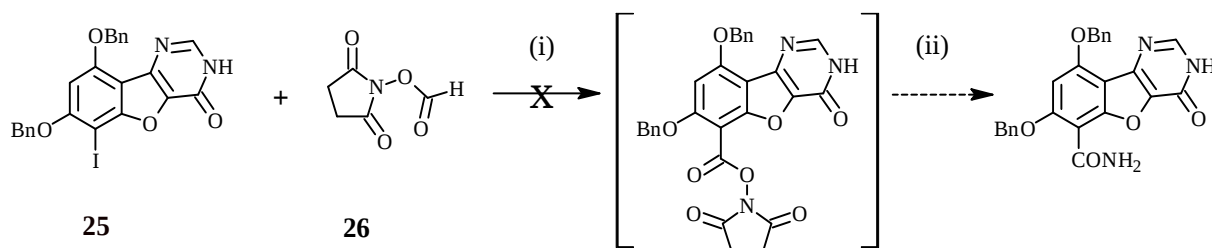


Schéma 46 : (i) Pd(OAc)₂, xantphos, NEt₃, THF, 60 °C, 20 h ; (ii) NH₃.

Face à l'échec de carbonylation sur le composé **25**, ces mêmes conditions, à partir du précurseur **24**, ont été testées (Schéma 47). Seul le produit départ est retrouvé en fin de réaction.

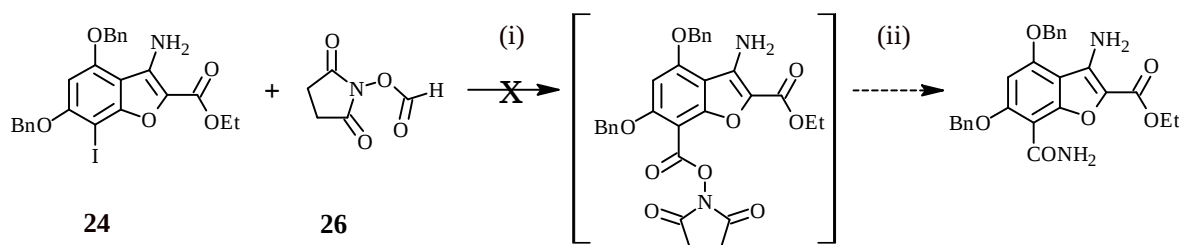
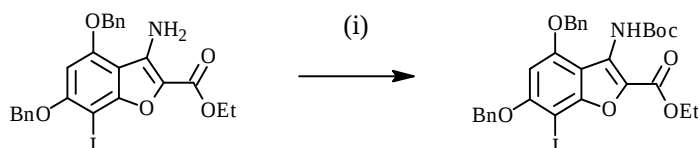


Schéma 47 : (i) Pd(OAc)₂, xantphos, NEt₃, THF, 60 °C, 20 h ; (ii) NH₃.

Une protection du groupe amino en position 3 du composé **24** est envisagée car le NH₂ libre peut gêner la réaction palado-catalysée. La protection de l'azote est réalisée avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle et en présence de 4-diméthylaminopyridine pour obtenir le composé **27** avec un rendement de 92% (Schéma 48).²⁰⁵



24

27

Schéma 48 : (i) Boc₂O, DMAP, THF, 80 °C, 2 h, 92%.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Encore une fois, à partir du précurseur iodé **27**, les mêmes conditions de carbonylation se sont révélées sans succès (Schéma 49). Le produit de départ est retrouvé en fin de réaction.

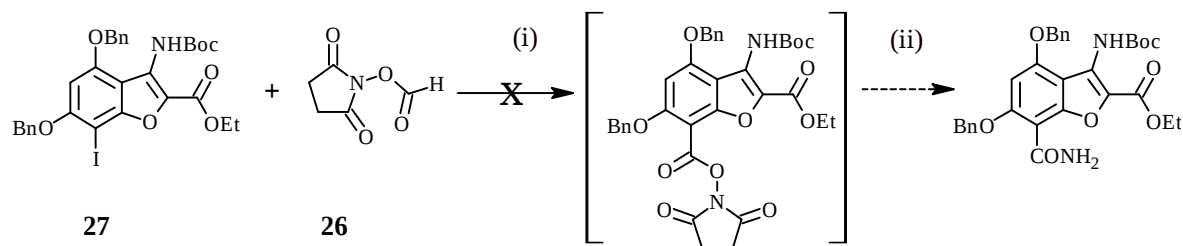


Schéma 49 : (i) Pd(OAc)₂, xantphos, NEt₃, THF, 60 °C, 20 h ; (ii) NH₃.

En conclusion, les molécules cibles n'ont pas été obtenues et les essais qui ont été tentés pour introduire le groupement carboxamide par réaction pallado-catalysée se sont soldés par des échecs. Face aux difficultés rencontrées lors des tentatives d'introduction du groupement carboxamide sur le noyau benzofuro[3,2-d]pyrimidine-4-one, nous avons décidé d'exploiter une autre voie pour obtenir le composé cible.

2.4. Introduction de la fonction carboxamide sur le dérivé phénol de départ puis cyclisation (Voie 4)

2.4.1. Rétrosynthèse envisagée

Pour contourner le problème de fonctionnalisation, nous avons décidé d'une autre stratégie qui consiste à introduire le groupement carboxamide au début de la synthèse à partir du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**) selon le schéma rétrosynthétique suivant (Schéma 50) :

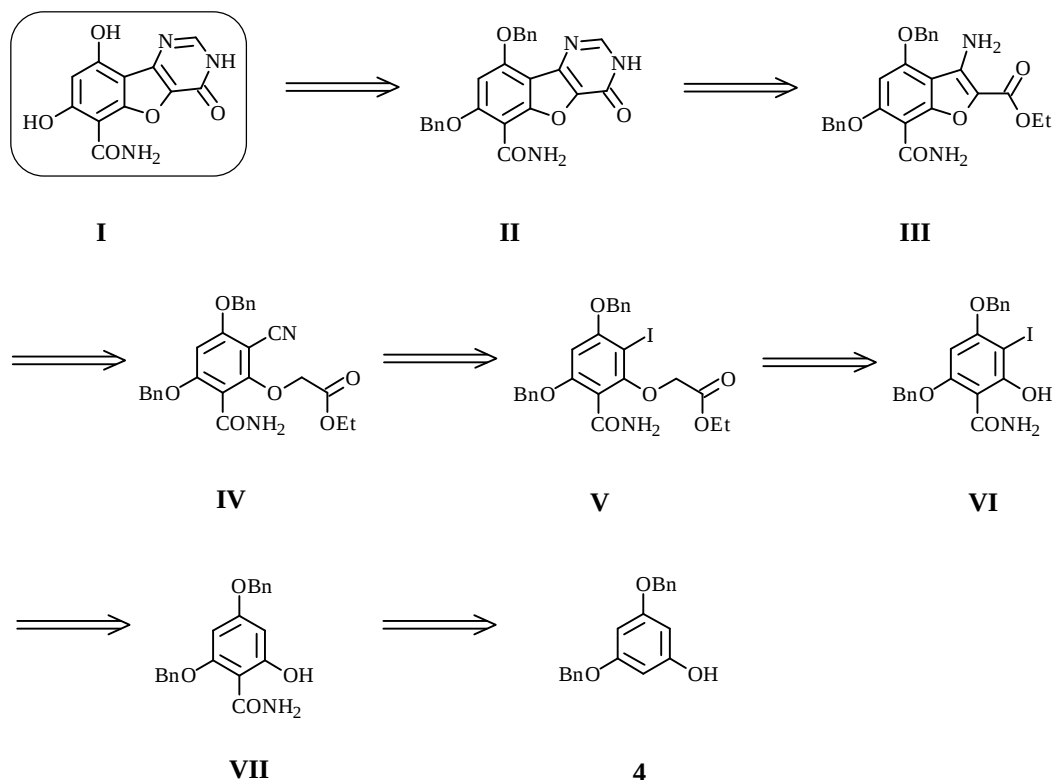


Schéma 50 : Rétrosynthèse envisagée

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Le clivage benzylique sera accompli avec de l'acide sulfurique concentré pour fournir le composé cible **I**.

Ensuite, la même séquence réactionnelle, comme décrite précédemment, sera appliquée pour obtenir le dérivé benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-4-one **II** portant l'appendice carbamoyle en position C-6 de l'azahétérocycle.

Dans cette stratégie, le groupe carboxamide du dérivé phénolique **VII** pourra être incorporé directement par substitution électrophile aromatique avec l'isocyanate de chlorosulfonyle à partir du composé **4**.

2.4.2. Travaux réalisés

Une aminocarbonylation directe de 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**), en utilisant l'isocyanate de chlorosulfonyle en tant que réactif électrophile, donne le composé **28** après hydrolyse acide du *N*-chlorosulfonylcarboxamide intermédiaire correspondant avec un rendement de 53% (Schéma 51).¹²⁸ Les tentatives de fonctionnalisation, dans les mêmes conditions, mais après monoiodation, *O*-alkylation ou cyanation ont conduit à un échec.

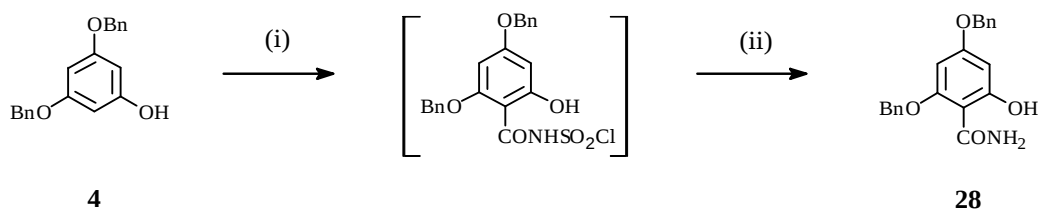


Schéma 51 : (i) CSI, CH₃CN, 0 °C, 10 min ; (ii) HCl 1M, t.a., 10 h, 53%.

Ensuite, une mono-iodation a été réalisée très rapidement en présence de *N*-iodosuccinimide et l'attaque électrophile se fait bien en position 3 du dérivé benzamide **28**. Le composé **29** est isolé avec un rendement de 80% (Schéma 52).¹⁸⁸ La seule différence de cette réaction était la possibilité d'effectuer la mono-iodation à 0 °C au lieu de l'effectuer à -78 °C par rapport à la réaction de monoiodation du dérivé phénolique **4** (Schéma 28 cf. p 60).

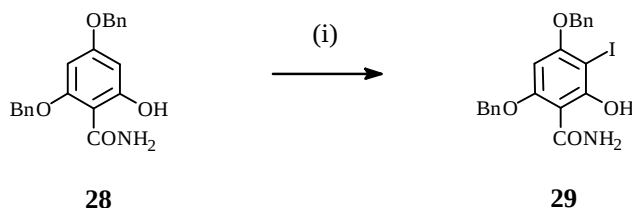


Schéma 52 : (i) NIS, CH₂Cl₂, 0 °C, 10 min, 80%.

La *O*-alkylation a été réalisée avec une base et le bromoacétate d'éthyle à la température ambiante pour obtenir le composé iodé **30** avec un bon rendement de 86% (Schéma 53).²⁰⁶

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

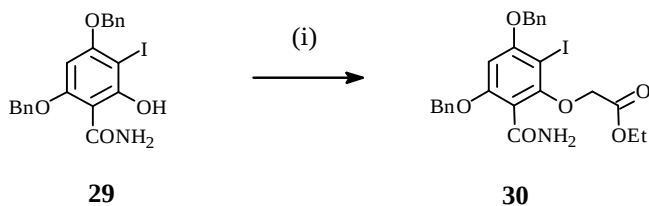


Schéma 53 : (i) NaH, bromoacétate d'éthyle, DMF, t.a., 24 h, 86%.

Lors de l'étape de cyanation, dans les mêmes conditions que précédemment, un mélange de composé **30** et de cyanure de cuivre(I) dans le DMF a été chauffé à 160 °C pendant 6 h pour l'obtention de **31** avec rendement de 20% (Schéma 54).²⁰⁸

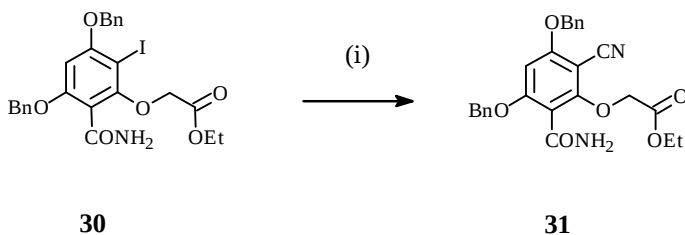


Schéma 54 : (i) CuCN, DMF, 160 °C, 6 h, 20%.

Le rendement n'étant pas satisfaisant, nous avons décidé dans un premier temps d'augmenter la température jusqu'à 200 °C. Cependant, cette modification n'a pas produit l'effet escompté (à savoir l'augmentation du taux de conversion du composé **30** en composé **31**).

Augmenter la température n'est donc pas la solution pour améliorer le taux de conversion et le rendement de la réaction. Nous avons donc modifié un autre paramètre opératoire : le temps de réaction jusqu'à 24 h. Malheureusement, cette modification a conduit à plusieurs produits secondaires.

Ainsi, nous avons décidé de réaliser d'abord la cyanation sur le dérivé iodé **29** pour donner le composé **32** avec le rendement satisfaisant de 73% (Schéma 55).²⁰⁸

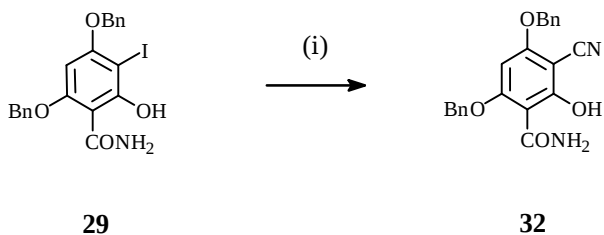


Schéma 55 : (i) CuCN, DMF, 160 °C, 6 h, 73%.

Par la suite, la *O*-alkylation a été réalisée avec une base et le bromoacétate d'éthyle à la température ambiante pour conduire au composé **31** avec un bon rendement de 90% (Schéma 56).²⁰⁶ Pour obtenir le composé **31** avec un meilleur rendement, il était préférable d'effectuer d'abord la cyanation puis la *O*-alkylation.

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

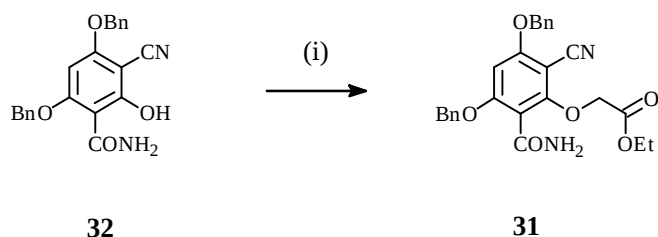


Schéma 56 : (i) NaH, bromoacétate d'éthyle, DMF, t.a., 24 h, 90%.

La cyclisation a été effectuée en utilisant l'hydruure de sodium pour donner le dérivé benzofurane (**18**) avec un rendement satisfaisant de 67% (Schéma 57).¹⁹⁹

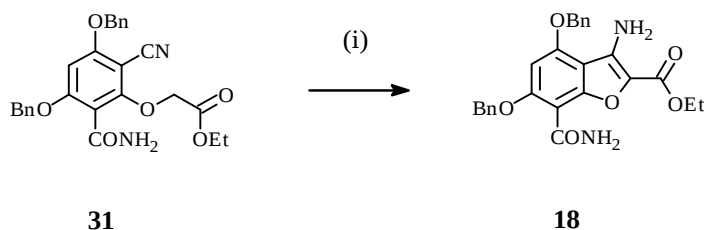


Schéma 57 : (i) NaH, DMF, 0 °C, 10 min, 67%.

Le composé tricyclique **20** a été synthétisé à partir du précurseur benzofurane **18** dans les mêmes conditions que précédemment. Le composé **20** est isolé avec un rendement satisfaisant de 62% (Schéma 58).²⁰²

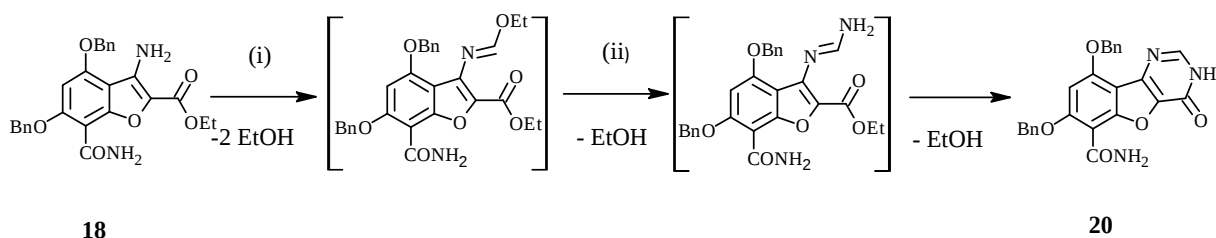


Schéma 58 : (i) HC(OEt)₃, MO, 200 °C, 15 min ; (ii) NH₃/MeOH 7N, MO, 140 °C, 15 min, 62%.

Enfin, la déprotection des benzyles a été effectuée avec de l'acide sulfurique concentré et donne le composé cible **33** avec un rendement de 53% (Schéma 59), qui fera l'objet de l'évaluation biologique.

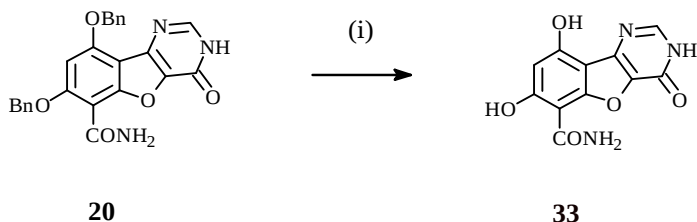


Schéma 59 : (i) H₂SO₄ cc, t.a., 15 min, 53%.

Une autre méthode de débenzylation a été testée pour essayer d'améliorer le rendement en présence de cyclohexène et de palladium sur charbon (Pd-C) à 10% dans une solution d'acétate d'éthyle/éthanol (3/1) au reflux pendant 24 h (Schéma 60).^{184,128}

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

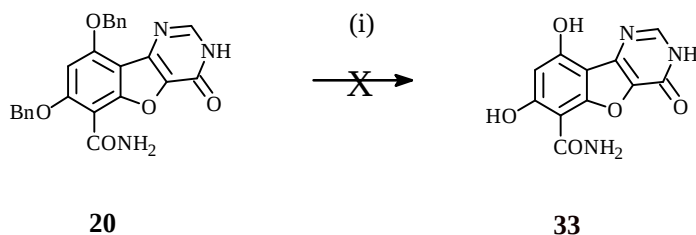


Schéma 60 : C₆H₁₀, Pd-C 10%, AcOEt/EtOH (3/1), 110 °C, 24 h.

La réaction de débenzylation par trans-hydrogénation s'est soldée par un échec, seul le produit de départ est récupéré.

En conclusion, le produit final **33** a été synthétisé en 8 étapes à partir du composé **4**, avec un rendement global de 6%. Cette voie s'est avérée efficace, il conviendrait, en perspective, de transposer ce schéma réactionnel pour obtenir des autres composés finaux à partir du dérivé de benzamide **32**. Le composé **32** est un intermédiaire clé pour accéder aux dérivés de benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine. Le composé **32** est obtenu en 7 étapes à partir du phloroglucinol commercial **1** avec un rendement global faible de 11%.

3. Synthèse du 7,9-dihydroxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide

La seconde modulation a consisté à introduire une fonction carbonylée supplémentaire sur la partie pyrimidique du tricycle pour conduire à un composé de type benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-2,4-dione. La structure du composé cible est présentée ci-dessous (Figure 45) :

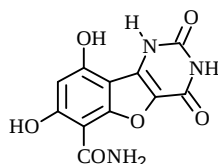


Figure 45 : 7,9-dihydroxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide

3.1. Rétrosynthèse envisagée

Le 7,9-dihydroxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide sera préparé à partir du précurseur **32**. Le schéma rétrosynthétique ci-dessous est envisagé (Schéma 61) :

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

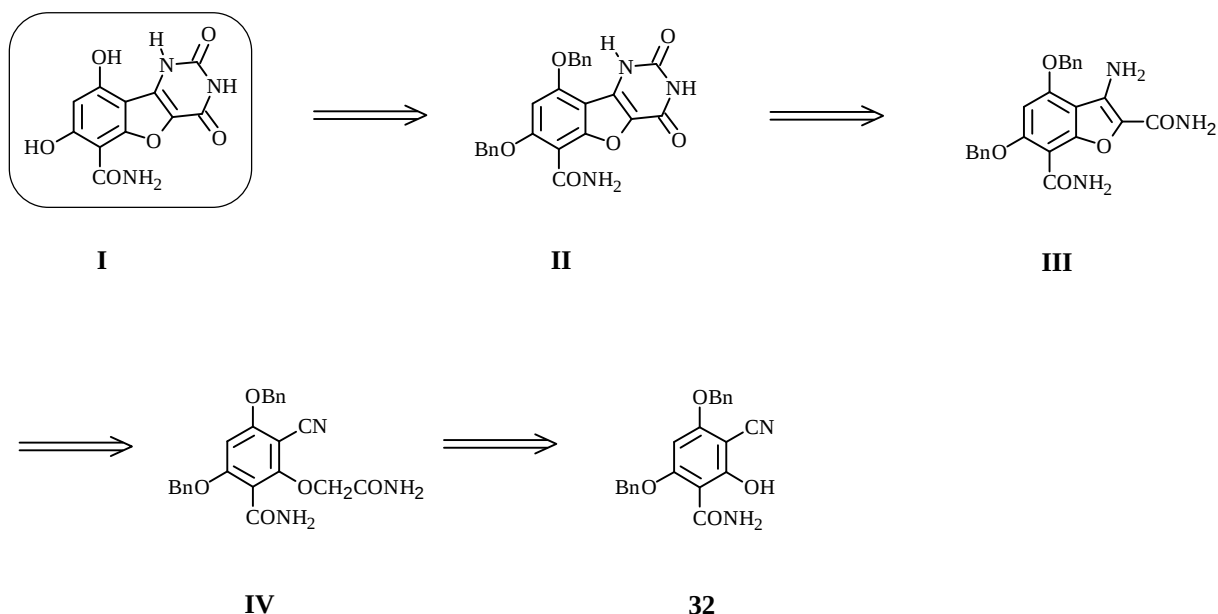


Schéma 61 : Rétrosynthèse envisagée

Le composé cible **I** sera formé par traitement avec de l'acide sulfurique concentré comme procédé de débenzylation.

Le dérivé de benzofuopyrimidinedione **II** sera obtenu à partir du précurseur de benzofurane **III** synthétisé par une cyclisation en utilisant une base à partir du composé **IV**.

La *O*-alkylation du dérivé de benzamide **32** sera réalisée avec le 2-iodoacétamide pour fournir le composé **IV**.

3.2. Travaux réalisés

Dans un premier temps, l'alkylation du dérivé de benzamide **32** a été réalisée par formation du sel de sodium en présence d'hydruide de sodium comme base suivie de sa réaction avec le 2-iodoacétamide à 60 °C pour donner l'éther correspondant **34** avec un rendement de 69% (Schéma 62).²⁰⁶

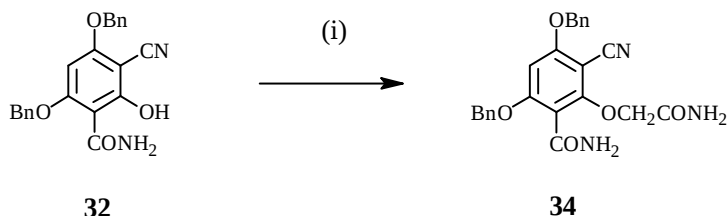


Schéma 62 : (i) 2-iodoacétamide, NaH, DMF, 60 °C, 12 h, 69%.

La cyclisation a ensuite été effectuée en utilisant une base pour donner le dérivé benzofurane portant un groupe aminé en position 3 et la fonction carboxamide en position 2. Plusieurs bases ont été testées pour optimiser la réaction (Schéma 63 ; Tableau 9).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

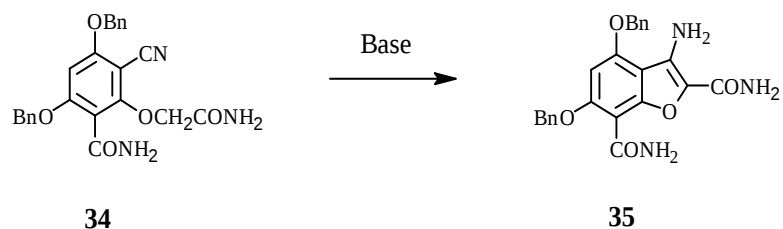


Schéma 63 : Réaction de cyclisation

Tableau 9 : Mise au point de la cyclisation du composé 34

Essai	Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K ₂ CO ₃ (1,5 éq)	DMF	t.a.	24 h	Produit de départ
2	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	t.a.	24 h	Produit de départ
3	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	60 °C	24 h	32% de conversion
4	KOH (1,5 éq)	EtOH	60 °C	30 min	56%
5	NaH (1,5 éq)	DMF	0 °C	30 min	51%

Les essais 1 et 2, en présence de 1,5 et 3 équivalents de carbonate de potassium dans le DMF à température ambiante ne donnent que le produit de départ.¹⁹⁰

L'utilisation de 3 équivalents de K₂CO₃ à 60 °C (essai 3) ne permet une conversion que de 32% après 24 h de réaction.¹⁹⁷

L'essai 4 en présence de 1,5 équivalents d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol à 60 °C pendant 30 min conduit rapidement au composé souhaité avec 56% de rendement.²¹³

Enfin, en présence de 1,5 équivalents d'hydruure de sodium dans le DMF à 0 °C (essai 5), le rendement obtenu est de 51% en 30 min.¹⁹⁹

Ainsi, nous avons observé que les conditions basiques en présence d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol étaient plus efficaces que la combinaison NaH/DMF.

Le dérivé pyrimidine tricyclique **36** a été synthétisé à partir du précurseur de benzofurane **35** via un intermédiaire urée avec un rendement de 56% (Schéma 64).

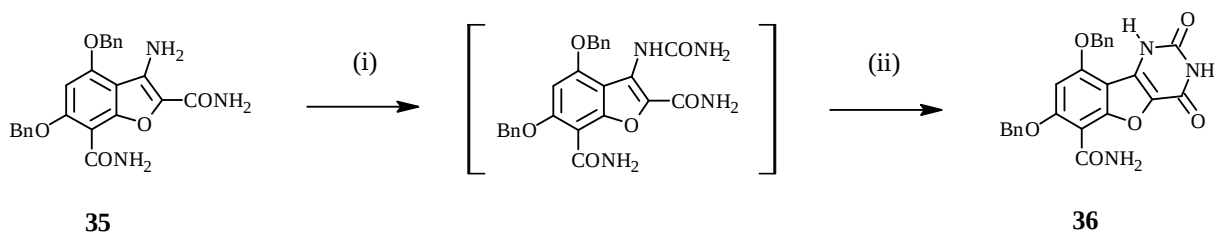


Schéma 64 : (i) KOCN, CH₃COOH, 100 °C, 1 h ; (ii) KOH/EtOH, 90 °C, 1 h, 56%.

Finalement, le produit cible **37**, a été obtenu en utilisant de l'acide sulfurique concentré comme réactif de débenzylation à partir du composé **36** avec un rendement de 48% (Schéma 65).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

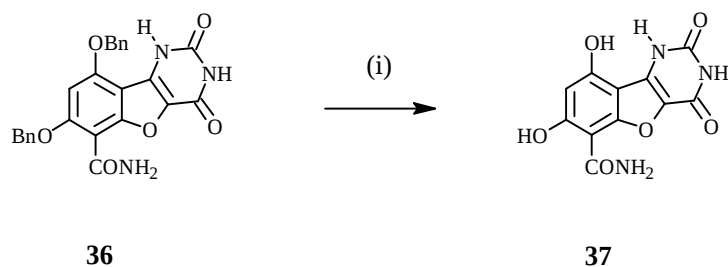


Schéma 65 : (i) H₂SO₄ cc, t.a., 5 min, 48%.

Une autre méthode a été testée pour la débenzylation en présence de cyclohexène et de palladium sur charbon à 10% dans une solution d'acétate d'éthyle/éthanol (3/1) au reflux pendant 24 h (Schéma 66).^{184,128}

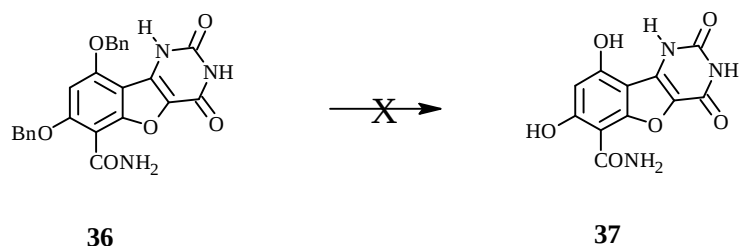


Schéma 66 : C₆H₁₀, Pd-C 10%, AcOEt/EtOH (3/1), 110 °C, 24 h.

Contrairement à ce que nous pouvions espérer, la réaction de débenzylation s'est soldée par un échec, seul le produit de départ est récupéré.

Les travaux réalisés lors de cette voie nous ont permis d'obtenir le produit final 37 à partir du dérivé de benzamide 32 en 5 étapes, avec le rendement global de 10%.

4. Synthèse du 4-amino-7,9-dihydroxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide

Le troisième composé envisagé dans cette série benzofuopyrimidine est substitué en position 4 pour un groupement amino selon la structure représentée ci-dessous (Figure 44) :

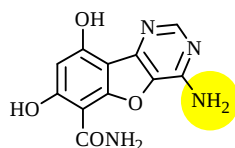


Figure 44 : Structure envisagée

4.1. Rétrosynthèse envisagée

Afin d'accéder à ce composé, la rétrosynthèse suivante est préconisée (Schéma 67):

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

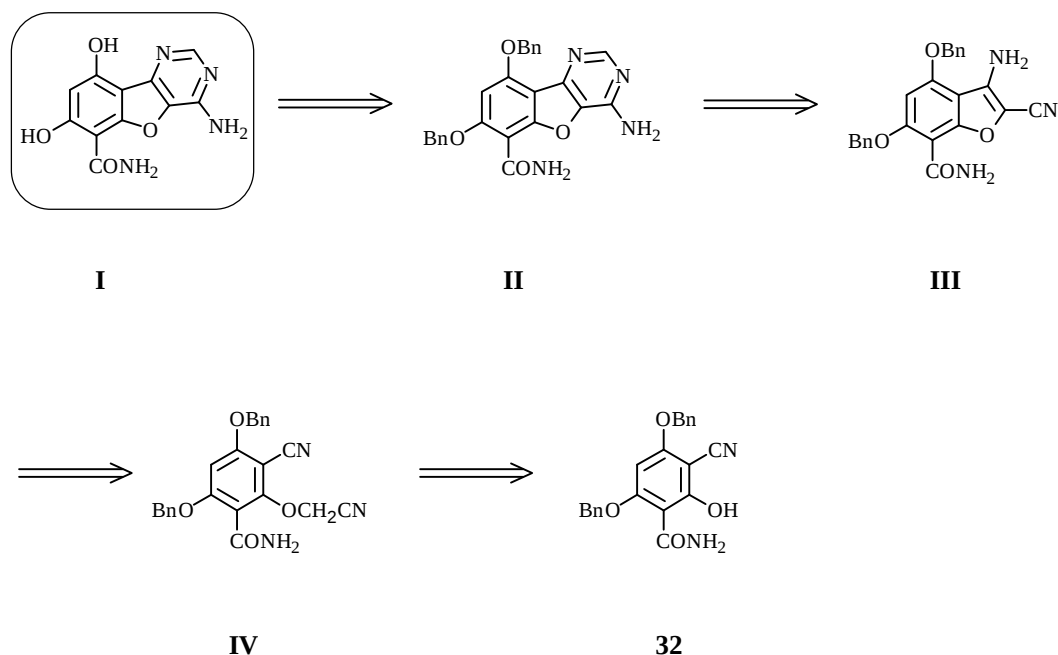


Schéma 67 : Rétrosynthèse envisagée

Le composé cible **I** sera formé par traitement avec de l'acide sulfurique concentré comme procédé de débenzylation.

Le dérivé de benzofuopyrimidinedione **II** sera obtenu à partir du précurseur de benzofurane **III** synthétisé par une cyclisation en utilisant une base à partir du composé **IV**.

La O-alkylation du dérivé de benzamide **32** sera réalisée avec le bromoacétonitrile pour donner le composé **IV**.

4.2. Travaux réalisés

Dans un premier temps, l'alkylation du dérivé de benzamide **32** a été obtenue par formation du sel de potassium, en utilisant du carbonate de potassium suivie de sa réaction avec le bromoacétonitrile à 80 °C pour donner l'éther phénolique **38** avec un rendement de 72% (Schéma 68).¹⁷⁹

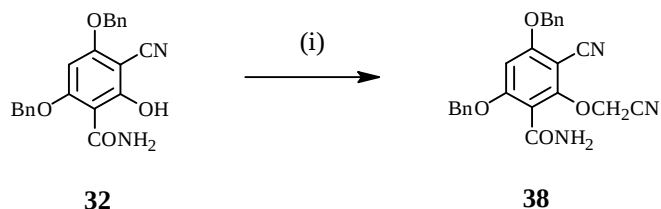


Schéma 68 : (i) Bromoacétonitrile, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 24 h, 72%.

Une hétérocyclisation du composé **38** en utilisant une base permet l'obtention du 3-amino-2-cyano-4,6-dibenzyloxy-l-benzofuran-7-carboxamide (**39**) (Schéma 69).

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

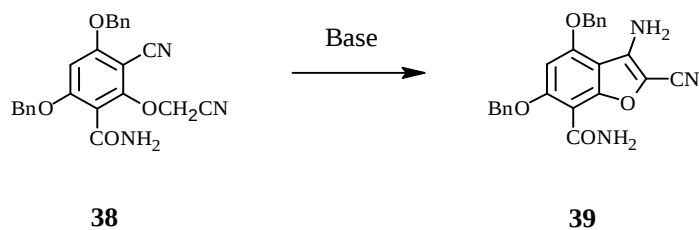


Schéma 69 : Cyclisation du composé 38

Etant donné qu'il semble difficile d'induire la cyclisation du produit **38**, plusieurs essais ont été mis en œuvre afin de rendre complète la conversion du dérivé **38** en produit cyclisé **39**. La température, le temps de réaction, le mode de chauffage, la quantité de base sont autant de paramètres qui ont été modifiés pour rendre totale la conversion. Le tableau 10 récapitule l'ensemble des conditions opératoires testées.

Tableau 10 : Conditions de cyclisation du composé 38

Essai	Base	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	KOH (1,5 éq)	EtOH	0 °C - t.a.	30 min	6% de conversion
2	K ₂ CO ₃ (1,5 éq)	DMF	0 °C - t.a.	24 h	5% de conversion
3	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	t.a.	24 h	13% de conversion
4	K ₂ CO ₃ (3 éq)	DMF	50 °C	24 h	24% de conversion
5	<i>t</i> -BuOK (3 éq)	THF	0 °C - t.a.	2 h	38% de conversion
6	NaH (1,5 éq)	DMF	0 °C	30 min	64%

Les paramètres de temps et de température de réaction sont importants pour le bon déroulement de la réaction.

En effet, en ne chauffant pas assez ou pas suffisamment longtemps, l'intégralité du produit **39** n'est pas consommée. Au contraire, en forçant davantage les conditions (chauffage plus long ou température plus élevée) le produit cyclisé est majoritaire mais une partie du milieu réactionnel est dégradée.

Le composé **39** a été préparé avec une conversion très faible en présence d'hydroxyde de potassium (essai 1), de carbonate de potassium (les essais 2, 3, et 4) et de *tert*-butylate de potassium (essai 5).^{213,196}

Cette même réaction a été effectuée avec de l'hydrure de sodium (essai 6). Le composé **39** a été obtenu avec un rendement de 64%.¹⁹⁹

Par la suite, le dérivé de pyrimidine tricyclique **40** a été synthétisé à partir du précurseur 3-aminobenzofurane **39** via un intermédiaire formamide (Schéma 70).

Un mélange de composé **39** dans de l'orthoformiate de triéthyle a été irradié dans un four micro-ondes à 200 °C pendant 15 min. La solution jaune résultante a été évaporée à sec et le résidu a été dissous dans une solution d'ammoniac dans le méthanol. Le mélange a été irradié dans un four micro-ondes à 140 °C pendant 15 min pour donner le composé **40** avec un rendement de 45%.^{200,202}

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

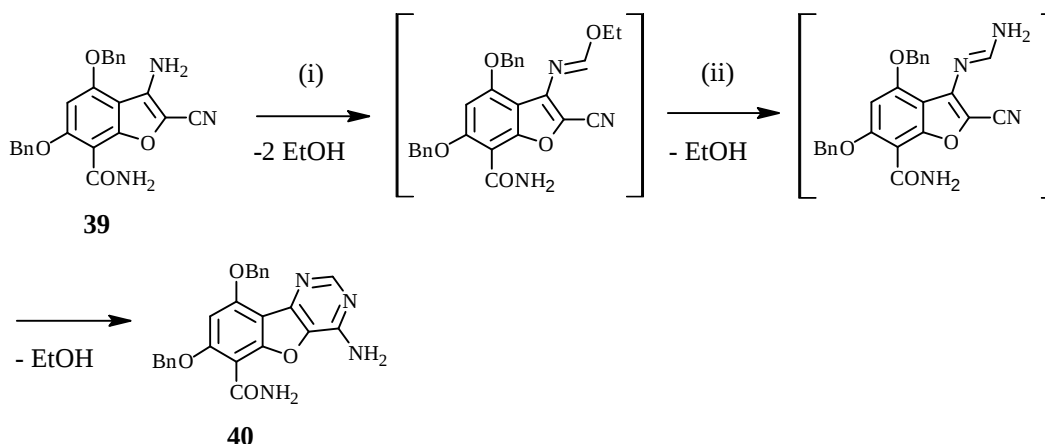


Schéma 70 : (i) $\text{CH}(\text{OEt})_3$, MO, 200 °C, 15 min ; (ii) NH_3/MeOH 7N, MO, 140 °C, 15 min, 45%.

Enfin, la déprotection des benzyles a été effectuée avec de l'acide sulfurique concentré et donne le composé dihydroxylé **41** avec un rendement acceptable (Schéma 71).

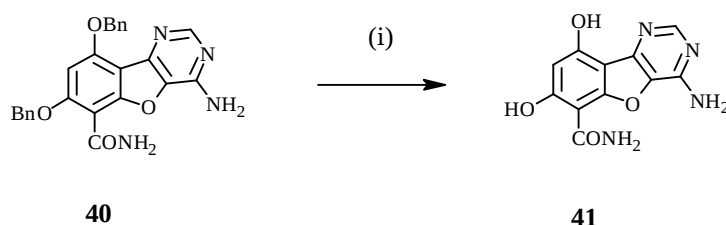


Schéma 71: (i) H_2SO_4 cc, t.a., 5 min, 66%.

Comme dans la série précédente, la réaction de trans-hydrogénation est restée sans succès pour débenzyler le composé **40** (Schéma 72).^{184,128}

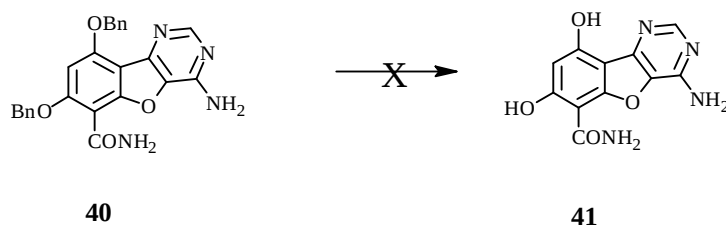


Schéma 72 : C_6H_{10} , Pd-C 10%, AcOEt/EtOH (3/1), 110 °C, 24 h.

En conclusion, le composé cible **41** est obtenu. Cependant, les rendements obtenus pour cette synthèse à partir du composé **32** sont faibles (21%). L'étape de déprotection des benzyles du composé **40** pour obtenir le composé **41** provoque une baisse de la masse du composé. On passe d'une masse molaire de 440 g/mol pour le composé **40** à une masse molaire de 260 g/mol pour le composé **41**. Dans le but de les améliorer, nous avons décidé de développer un autre schéma réactionnel pour obtenir le composé **41** à partir du 3,5-diméthoxyphénol commercial **42** (Schéma 73).

La même séquence réactionnelle, comme décrite précédemment, a été appliquée pour cette synthèse. La seule différence était dans la dernière étape, la déméthylation du groupement méthoxy a été réalisée par chauffage dans du chlorhydrate de pyrimidine pure dans le but d'obtenir le composé attendu **41**.²¹⁴

Partie A : Synthèse des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

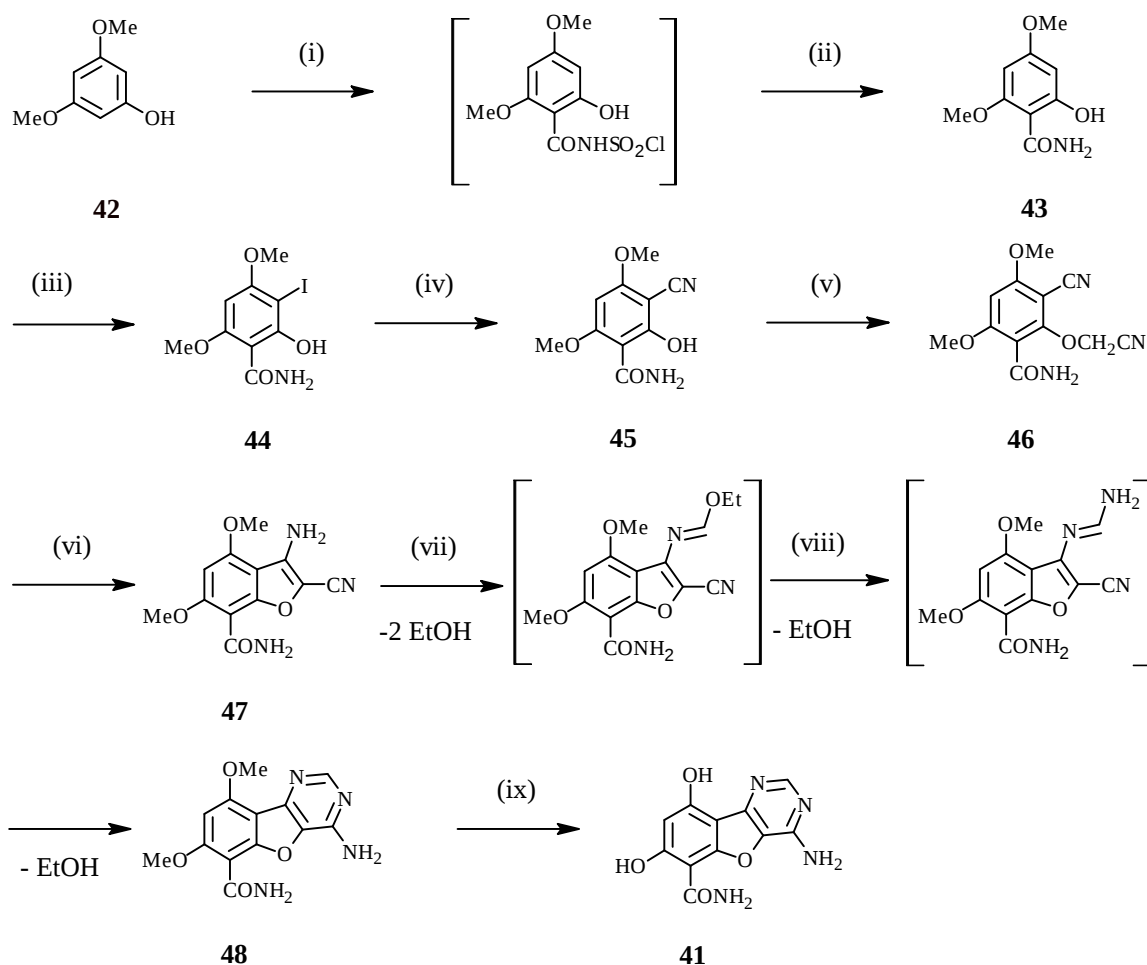


Schéma 73 : (i) CSI, CH₃CN, 0 °C, 10 min ; (ii) HCl 5M, t.a., 10 h, 45% ; (iii) NIS, CH₂Cl₂, 0 °C, 10 min, 60% ; (iv) CuCN, DMF, 160 °C, 6 h, 38% ; (v) Bromoacétonitrile, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 24 h, 62% ; (vi) NaH, DMF, 0 °C, 5 min, 52% ; (vii) CH(OEt)₃, MO, 200 °C, 15 min ; (viii) NH₃/MeOH 7N, MO, 140 °C, 15 min, 41% ; (ix) Pyridine.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 43%.

Les rendements obtenus pour cette synthèse sont faibles. Le composé cible **41** a été obtenu en 9 étapes à partir du 3,5-diméthoxyphénol commercial **42** au lieu de 12 étapes à partir du phloroglucinol commercial **1** comme précédemment. Cependant, l'approche a été réalisée avec des rendements globalement faibles.

Partie B : Evaluation des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

I. Evaluation de l'activité antifongique

Une fois les molécules cibles obtenues, un panel de tests biologiques a été effectué *in vitro* afin de déterminer leur efficacité au niveau de :

- l'activité antifongique contre *C. albicans*,
- la restauration de la sensibilité aux azolés de souches résistantes de *C. albicans*,
- l'inhibition de la formation de biofilm,
- l'inhibition de l'activité PKC *in vitro*.

Des tests de cytotoxicité sur cellules HeLa ont aussi été faits afin de vérifier que ces molécules étaient moins toxiques pour l'homme que pour le pathogène.

L'objectif de cette thèse étant d'obtenir des analogues du cercosporamide ayant une activité biologique plus importante et/ou plus spécifique, tous les résultats obtenus pour les molécules cibles ont été analysés par comparaison à ceux obtenus pour le cercosporamide.

Le cercosporamide que nous avons utilisé comme molécule de référence dans tous les tests biologiques effectués a été obtenu par extraction à partir d'une culture de 4 semaines de *Mycosphaerella henningsii* faite par le laboratoire MMS de l'Université de Nantes.

1. Choix des souches utilisées pour les tests *in vitro*

L'ensemble des souches utilisées proviennent de la souchothèque du laboratoire IICiMed. Ces souches proviennent d'isolats cliniques issus de prélèvements biologiques provenant du laboratoire de Parasitologie et de Mycologie Médicale du CHU de Nantes, de l'Institut Pasteur, de l'Institut de microbiologie de Lausanne et de l'Université de Georgetown (USA).

Pour effectuer l'ensemble du travail, 10 souches ont été sélectionnées en fonction de leur sensibilité ou de leur résistance au fluconazole ou de leur capacité à former du biofilm. Pour les souches résistantes aux azolés, les mécanismes de résistance ont été précédemment caractérisés au laboratoire.^{215,216,217}

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 11 : Origine et caractéristiques des souches sélectionnées* pour les tests biologiques effectués au cours de cette thèse.

Nom de la souche	Origine	Sensibilité au fluconazole	Mécanisme de résistance	Test <i>in vitro</i> effectué sur la souche
CAAL93	CHU Nantes	Sensible	-	Activité antifongique et inhibition de l'activité PKC <i>in vitro</i>
CAAL97	Institut Pasteur	Sensible	-	Activité antifongique
CAAL2	CHU Nantes	Résistante	Mutation sur <i>erg3</i>	Activité antifongique, restauration de la sensibilité et inhibition activité PKC <i>in vitro</i>
CAAL28	CHU Nantes	Résistante	Mutation sur <i>erg11</i> et efflux	Activité antifongique et restauration de la sensibilité
CAAL111	Institut de microbiologie de Lausanne	Résistante	Efflux (Surexpression CDR1/CDR2)	Activité antifongique et restauration de la sensibilité
CAAL117	Institut de microbiologie de Lausanne	Résistante	Mutation sur <i>erg11</i> et mutation sur <i>MDR1</i>	Activité antifongique et restauration de la sensibilité
CAAL121	CHU Nantes	Sensible	-	Biofilm
CAAL123	CHU Nantes	Sensible	-	Biofilm
CAAL124	CHU Nantes	Sensible	-	Biofilm
CAAL146	Université Georgetown (USA)	Sensible	-	Biofilm

* La sélection a été faite en fonction de leur sensibilité ou de leur résistance au fluconazole ou de leur capacité à former du biofilm

Les souches sont conservées à long terme dans l'azote liquide et à -80 °C. Avant tout test (activité antifongique, restauration de la sensibilité, biofilm), les souches sont mises en culture sur une gélose Sabouraud pendant 24 h à 37 °C.

2. Test de l'activité antifongique contre *C. albicans*

2.1. Principe de la mesure de l'activité antifongique

La mesure de l'activité antifongique est faite au laboratoire IICiMed selon une méthode EUCAST²¹⁸ modifiée sur plusieurs points :

- Pour un screening plus rapide, une gamme de seulement 3 concentrations de molécules est testée (3 µM, 30 µM et 300 µM ou 1 µM, 10 µM et 100 µM) (Figure 45).
- L'ajout de résazurine pendant 3 h, après 24 h d'incubation, permet une mesure d'intensité de fluorescence et donc une quantification précise du nombre de cellules vivantes dans chaque puits.^{219,220}

La gamme de concentration utilisée pour le screening des molécules (3 µM, 30 µM et 300 µM) ne correspond pas à la gamme habituellement utilisée au laboratoire (1 µM, 10 µM et 100 µM). Ce choix a été orienté par les résultats obtenus par Lafayette *et al.*¹¹⁷ où l'ensemble des expériences menées avec le cercoposramide a lieu jusqu'à une dose maximale de 100 µg/mL (c'est-à-dire 300 µM). C'est pour cela que nous avons adapté la gamme de concentration utilisée pour les composés cibles.

Comme préconisé par l'EUCAST, les tests sont faits dans des plaques 96 puits à fond plat (Figure 45). Le milieu de culture est du RPMI 1640 (à 2% de glucose et à pH 7, ajout

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

d'un tampon MOPS à 0,0165 M final). Les dilutions des molécules se font à partir d'une solution stock dans le DMSO à 30 mM (ou 10 mM). Une première série de dilutions successives au 1/10° sont faites dans le DMSO (3 mM et 0,3 mM ou 1 mM et 0,1 mM). Puis une série de dilution au 1/50° est faite dans le RPMI (600 μ M, 60 μ M et 6 μ M ou 200 μ M, 20 μ M et 2 μ M). 100 μ L de chacune de ces solutions dans le RPMI sont dispensés en triplicate dans la plaque 96 puits. Une fois préparée les plaques sont conservées à -80 °C.

Une suspension de *C. albicans* est préparée à partir d'une culture de 24 h sur milieu Sabouraud, dans un mélange sérum physiologique/tween 80 (0,01%). Le dénombrement de la suspension se fait sur une cellule de Malassez ce qui permet de réaliser ensuite une dilution à 10⁴ levures/mL. 100 μ L de cette suspension sont dispensés dans chacun des puits de la plaque qui est alors incubée à 37 °C pendant 24 h.

Au bout de 24 h d'incubation, la résazurine (10 μ L à 700 μ M) est ajoutée à chaque puits pour une incubation à 37 °C allant de 2 h à 4 h. Pendant cette incubation la résazurine (bleue) est réduite de manière irréversible en résorufine (rose) par les cellules viables (Schéma 74). La résorufine est une molécule fluorescente (longueur d'onde d'excitation 550 nm et d'émission 590 nm). Une mesure de la fluorescence est alors faite au spectrofluorimètre.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	T ⁺	
C		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	T ⁺	
D		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	T ⁺	
E		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	T ⁻	
F		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	T ⁻	
G		3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	3 μ M	30 μ M	300 μ M	T ⁻	
H												

				Molécules testées
				FLU
				T ⁺
				T ⁻

Témoin positif (souche sans traitement)
Témoin négatif (RPMI)

Figure 45 : Plan d'une plaque pour les tests de l'activité antifongique des molécules

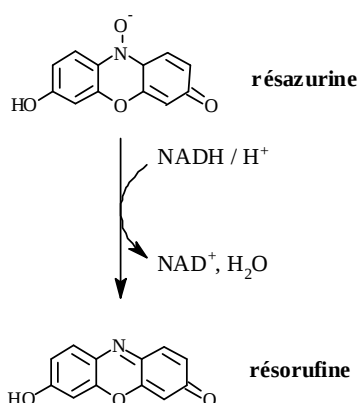


Schéma 74 : Réduction de la résazurine en résorufine dans les cellules vivantes (en présence de NADH).

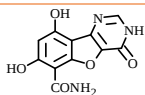
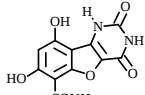
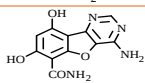
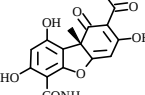
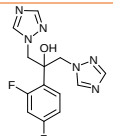
Les CMI ont été déterminées et exprimées comme étant la concentration de molécule testée qui entraîne 50% d'inhibition de la croissance des cellules en comparaison au témoin positif (cellules non traitées).

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

2.2. Analyse des résultats

L'activité antifongique sur six isolats cliniques de *C. albicans* a été évaluée pour trois composés de la série benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine : les composés **33**, **37**, **41**. L'ensemble des résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12 ci-dessous :

Tableau 12 : Activité des composés **33, **37**, **41**, du cercosporamide (CERCO) et du fluconazole (FLU) sur 6 isolats cliniques de *C. albicans***

Composé	Structure	CMI (μM)*					
		CAAL93	CAAL97	CAAL2	CAAL28	CAAL111	CAAL117
33		>300	>300	>300	>300	>300	>300
37		>300	>300	>300	>300	>300	>300
41		>300	>300	>300	>300	>300	>300
CERCO		103,2±23,2	93,3±18,5	90,1±11,3	>300	>300	>300
FLU		0,14±0,07	0,19±0,11	>100	>100	>100	>100

* Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type des expériences réalisées au moins deux fois. Les CMI ont été déterminées comme étant les concentrations de composés qui produisent 50% d'inhibition de la croissance par rapport à celle du témoin non traité.

Les valeurs de CMI obtenues pour le fluconazole sont en adéquation avec le comportement des souches vis-à-vis d'un traitement au fluconazole : environ 0,2 μM (0,06 mg/mL) pour les souches sensibles et >100 μM (>30 mg/mL) pour les souches résistantes.

Sur les deux souches sensibles et une des souches résistantes, le cercosporamide présente une valeur de CMI d'environ 100 μM (environ 30 μg/mL) ce qui est en accord avec les résultats de la littérature qui vont de 30 μM (10 μg/mL)¹²⁶ à 270 μM (90μg/mL)¹²⁰. Par contre pour trois des souches résistantes aucune valeur de CMI n'a pu être calculée aux doses testées.

En ce qui concerne les composés **33**, **37** et **41**, aucun effet d'inhibition de la croissance n'est observé quelle que soit la souche, sensible ou résistante.

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

3. Etude de la restauration de la sensibilité au fluconazole sur des souches résistantes de *C. albicans*

Une des hypothèses de départ de ce travail de thèse était que l'inhibition de *CaPkc1* pouvait entraîner une restauration de la sensibilité au fluconazole de souches résistantes, comme publié par La Fayette *et al.*¹¹⁷ Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis en place un test qui permet de mesurer les effets de la co-administration du fluconazole et des molécules cibles sur la croissance des souches résistantes au fluconazole sélectionnées pour cette étude. Ce test de co-administration est inspiré du test en damier^{221,222} et de la méthode EUCAST pour déterminer la restauration de la sensibilité d'une souche.

3.1. Principe de la co-administration

Le test de co-administration mis en place a les caractéristiques suivantes :

- Conditions de milieu (RPMI), de dilutions des molécules (dans le DMSO puis dans le milieu RPMI) et de culture cellulaire préconisées par l'EUCAST.
- Ajout de la résazurine afin de pouvoir quantifier, par fluorimétrie, le nombre de cellules viables dans chaque puits.

La préparation des plaques se fait en deux temps. D'abord les puits sont remplis avec le fluconazole aux différentes doses choisies (0 - 12,5 - 25 - 50 μ M final dans le RPMI) puis congelées. Les molécules cibles sont ajoutées, juste avant les cellules, aux doses choisies (0 - 3 - 30 - 300 μ M final dans le RPMI) afin de limiter au maximum les interactions possibles entre le fluconazole et les molécules cibles. Les cellules sont ensuite ajoutées à partir d'une suspension à 10^4 cellules/mL obtenue à partir d'une culture de 24 h sur gélose Sabouraud. La résazurine est ajoutée dans les mêmes conditions que dans le test de mesure de l'activité antifongique, c'est-à-dire après 24 h d'incubation à 37°C des cellules en présence de fluconazole et des molécules cibles dans les plaques 96 puits (Figure 46).

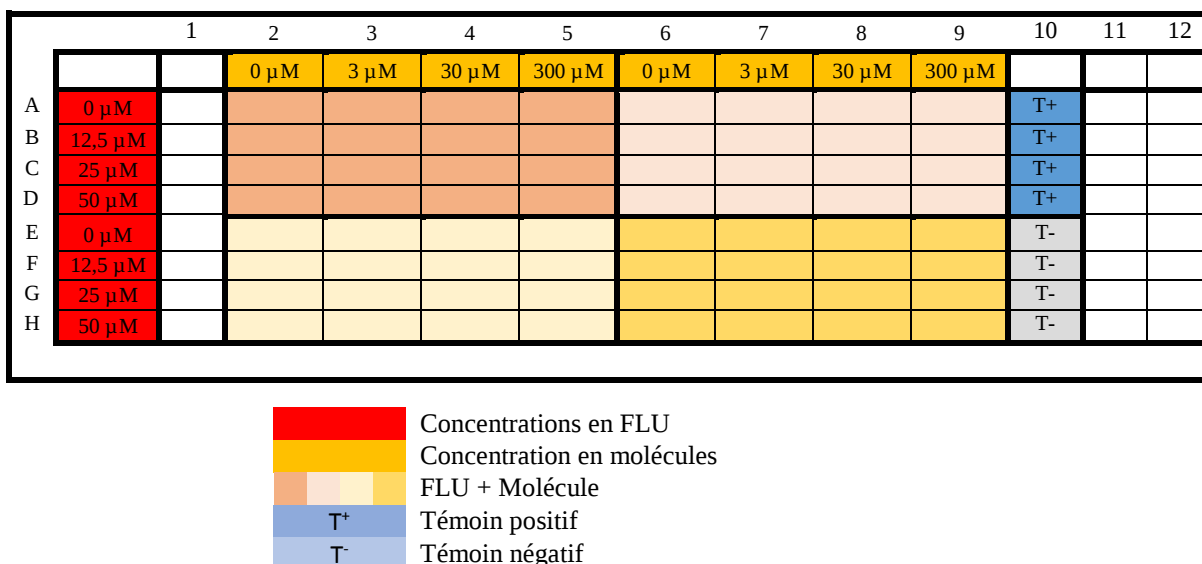


Figure 46 : Conception d'une plaque pour les tests en co-administration

3.2. Détermination de FICI

Afin de quantifier les effets de la co-administration du fluconazole et des molécules cibles sur la croissance des différentes souches testées un index FIC ou FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) a été calculé comme décrit dans la littérature.²²³

Afin de déterminer l'index FIC, il faut d'abord calculer le FIC (Fractional Inhibitory Concentration) de chacun des composés. Pour un composé donné, le FIC est défini comme la CMI du composé déterminée lors du test en co-administration divisée par la CMI du composé lorsqu'il est administré seul. Le FIC est calculé pour chacune des molécules co-administrées. L'index FIC (FICI) correspond à la somme des FIC des différents composés testés en co-administration.

Autrement dit si l'on teste en co-administration une molécule A et le fluconazole, on utilise les formules ci-dessous :

$$FICI = FIC_A + FIC_{FLU} \quad \text{en sachant que } FIC_A = \frac{CMI_{A+FLU}}{CMI_A} \quad \text{et } FIC_{FLU} = \frac{CMI_{FLU+A}}{CMI_{FLU}}$$

Nous avons utilisé le calcul du FIC index pour classer les interactions entre 2 molécules co-administrées comme recommandé par Odds : “synergie” ($FICI \leq 0,5$), “antagonisme” ($FICI > 4,0$) et “pas d'interaction” ($0,5 < FICI < 4,0$). Dans la littérature l'index FIC compris entre 0,5 et 4,0 est souvent utilisé pour définir un effet additif mais il a été montré que la plupart du temps il ne s'agissait pas d'un effet additif “réel” des deux molécules mais plutôt de l'addition de deux effets sans interaction entre eux/elles.²²⁴

3.3. Analyse des résultats

La détermination des FICIs des composés **33**, **37** et **41** et du **cercosporamide** en co-administration avec le **fluconazole** sur 4 isolats cliniques de *C. albicans* résistants au fluconazole est présentée dans les tableaux 13, 14, 15 et 16.

Pour chaque composé **33**, **37**, **41** et pour le cercosporamide les CMIs ont été déterminés en combinaison avec le fluconazole. Deux valeurs ont été obtenues : la $CMI_{\text{composé}}$ (notée [composé] dans le tableau) déterminée comme étant la concentration en composé qui permet d'obtenir 50% d'inhibition de croissance en présence de fluconazole et la $CMI_{\text{fluconazole}}$ (notée [FLU] dans le tableau) déterminée comme étant la concentration en fluconazole qui permet d'obtenir 50% d'inhibition de croissance en présence de composé. A partir des CMI qui avaient été déterminées pour chaque composé testé seul, lors des tests de mesure de l'activité antifongique, des CMI du fluconazole pour chaque souche et à partir des CMI obtenues en co-administration, nous avons calculé les FIC pour chaque composé et pour le fluconazole pour chaque souche. L'addition du FIC du composé et du FIC du fluconazole a permis de calculer le FICI de chaque molécule cible et du cercosporamide pour chacune des souches résistantes.

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 13 : Détermination des FICIs^a des composés 33, 37 et 41 et du CERCO en co-administration avec le FLU sur CAAL2

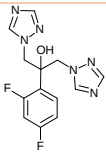
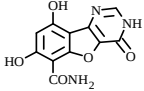
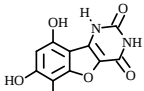
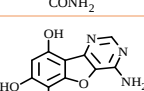
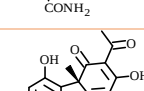
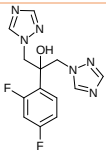
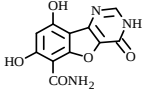
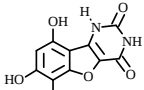
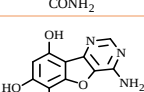
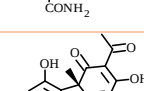
Composé	Structure	CAAL2		
		CMI (μM)	[FLU]/[composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b
FLU		>100	-	-
33		> 300	4/300	1,04
37		> 300	> 100/> 300	2,00
41		> 300	> 100/> 300	2,00
CERCO		100	0,5/50	0,50

Tableau 14 : Détermination des FICIs^a des composés 33, 37 et 41 et du CERCO en co-administration avec le FLU sur CAAL28

Composé	Structure	CAAL28		
		CMI (μM)	[FLU]/[composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b
FLU		>100	-	-
33		> 300	> 100/> 300	2,00
37		> 300	> 100/> 300	2,00
41		> 300	> 100/> 300	2,00
CERCO		> 300	> 100/> 300	2,00

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 15 : Détermination des FICIs^a des composés 33, 37 et 41 et du CERCO en co-administration avec le FLU sur CAAL111

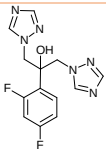
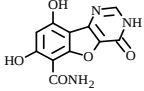
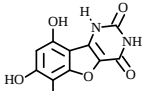
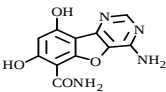
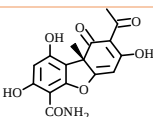
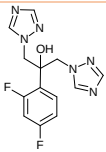
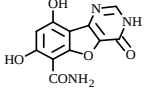
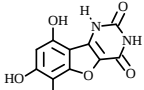
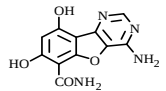
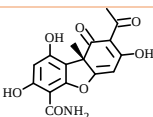
Composé	Structure	CAAL111		
		CMI (μM)	[FLU]/[composé] ^a	FICI _{[FLU] / [composé]} ^b
FLU		>100	-	-
33		> 300	> 100/> 300	2,0
37		> 300	25/30	0,35
41		> 300	> 100/> 300	2,00
CERCO		> 300	> 100/> 300	2,00

Tableau 16 : Détermination des FICIs^a des composés 33, 37 et 41 et du CERCO en co-administration avec le FLU sur CAAL117

Composé	Structure	CAAL117		
		CMI (μM)	[FLU]/[composé] ^a	FICI _{[FLU] / [composé]} ^b
FLU		>100	-	-
33		> 300	50/300	1,5
37		> 300	> 100/> 300	2,00
41		> 300	> 100/> 300	2,00
CERCO		> 300	100/> 300	2,00

^a FICI est la somme des FICs de chacun des composés, qui à son tour est définie comme la CMI de chaque composé lorsqu'il est utilisé en combinaison divisée par la CMI du composé lorsqu'il est utilisé seul. La valeur FICI la plus élevée ne peut pas être supérieure à 2,0 en raison des concentrations les plus élevées testées pour chaque composé.

^b CMI en combinaison exprimée en [FLU]/[composé]

Tout d'abord le cercosporamide montre un effet synergique avec le fluconazole uniquement dans le cas de la souche CAAL2. On peut alors parler de restauration de la sensibilité au fluconazole de cette souche en présence d'un traitement au cercosporamide. Par contre les trois molécules cibles ne montrent pas d'effet synergique sur cette même souche et ne permettent donc pas la restauration de la sensibilité. Il faut de plus noter une addition des

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

effets du fluconazole et du composé **33**, sans interaction, sur cette souche. Aucune des molécules testées (cercosporamide inclus) ne permet de restauration de la sensibilité sur la souche CAAL28 ou sur la souche CAAL117 (même si pour cette dernière on observe une addition des effets du fluconazole et du composé **33**, sans interaction). Pour la souche CAAL111, le fluconazole et la molécule **37** ont un effet synergique avec un FICI égal à 0,35. Une restauration de la sensibilité de cette souche au fluconazole est donc possible grâce à la co-administration du composé **37** avec le fluconazole.

4. Test d'inhibition de biofilm

Il a été montré que les MAPK étaient impliquées dans la formation du biofilm. La *CaPkc* faisant parti des MAPK, il est possible que l'inhibition de cette protéine ait un effet sur le biofilm. C'est pourquoi nous avons testé les effets d'un des composés sur l'inhibition de la croissance de biofilm déjà formé.

4.1. Principe du test

Nous avons choisi de tester les effets du composé **33** et du cercosporamide sur du biofilm déjà formé. Trois souches de *C. albicans* (CAAL121, CAAL124 et CAAL146) ont été choisies pour leur capacité à former du biofilm en milieu EUCAST (RPMI-MOPS) et dans des plaques 96 puits après 24 h d'incubation à 37 °C. Après 24 h de culture, un biofilm mature est formé dans chacun des puits de la plaque 96 puits. Le milieu est alors enlevé avec soin pour être remplacé par du milieu "frais" contenant le cercosporamide ou le composé **33** pour atteindre les concentrations finales suivantes : 0 - 3 - 30 - 300 µM. Les dilutions des molécules dans le RPMI sont faites comme préconisé par l'EUCAST et comme décrit dans la partie "test de l'activité antifongique". Ainsi une première dilution est faite dans le DMSO à partir d'une solution stock à 30 mM puis des dilutions intermédiaires sont faites dans le RPMI. Chaque concentration de molécule est testée en triplicate. Après 24 h d'incubation à 37 °C, 10 µL de résazurine à 700 µM sont ajoutés dans chaque puits. Après 2 h d'incubation supplémentaire à 37 °C, la fluorescence de la résorufine est mesurée suivant le principe décrit dans la partie "test de l'activité antifongique". L'amphotéricine B est utilisée comme témoin d'inhibition de la croissance du biofilm aux concentrations finales suivantes : 0 - 0,1 - 1 - 10 µM. On a ensuite déterminé une CMI qui correspond à la concentration d'antifongique qui entraîne 50% d'inhibition de la croissance du biofilm par rapport à la croissance du biofilm sans traitement antifongique.

4.2. Résultats biologiques et discussion

Le cercosporamide montre une **inhibition** du biofilm mature des souches CAAL124 et CAAL146 avec des CMI d'environ 120 µM. Par contre, aucun effet sur la croissance du biofilm de CAAL121 n'a été observé même à 300 µM. Ces résultats laissent à penser que l'inhibition de *CaPkc1* pourrait être une bonne stratégie pour lutter contre la croissance du biofilm dans certaines souches. Par contre, aucun effet sur la croissance du biofilm n'a été observé pour le composé **33**, sur aucune des souches.

Les pharmacomodulations proposées sur la série des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines ne permet pas de conserver la capacité du cercosporamide à inhiber le biofilm. D'autres pharmacomodulations sont donc à envisager si l'on souhaite conserver cette propriété d'inhibition du biofilm.

II. Cytotoxicité

Dans la mesure où des effets de restauration de sensibilité et d'inhibition de croissance de biofilm mature ont été observés sur des souches de *C. albicans*, il est absolument nécessaire de vérifier la cytotoxicité des composés cibles. En effet, il faut vérifier que ces molécules sont moins toxiques pour l'hôte que pour le pathogène. Nous avons choisi d'effectuer ces tests sur des cellules HeLa.

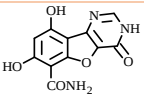
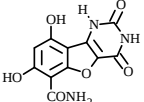
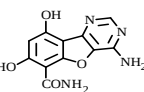
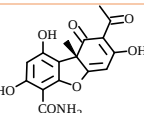
1. Principe du test

Le test de cytotoxicité sur cellules HeLa mis au point au laboratoire se fait sur des cellules mises en culture en milieu RPMI 1640 (10% SBF) pendant 3 jours dans des flasques T250. Après trypsination, les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits à une concentration de 10^5 par mL. Après 24 h d'incubation à 37 °C (à 5% de CO₂), les molécules à des concentrations finales de 0, 3, 30 et 300 µM sont ajoutées en triplicate dans la plaque 96 puits. Le choix des concentrations a été fait en fonction de celles utilisées pour le test d'activité antifongique et pour le test de restauration de la sensibilité au fluconazole. Comme dans la plupart des tests *in vitro* faits au laboratoire, de la résazurine est ajoutée après 4 jours d'incubation. La fluorescence est mesurée après 2 à 4 h d'incubation, comme décrit précédemment. La CMI est calculée comme étant la concentration d'antifongique qui entraîne 50% d'inhibition de la croissance des cellules après 4 jours d'incubation à 37 °C.

2. Analyse des résultats

La cytotoxicité sur la lignée cellulaire HeLa a été évaluée pour les 3 composés benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines **33**, **37** et **41** et le **cercosporamide**. Les résultats de cytotoxicité obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 17).

Tableau 17 : Valeurs de la CMI des composés cibles sur les cellules HeLa

Composé	Structure	CMI (µM)
		HeLa
33		227,53±27,97
37		> 300
41		> 300
CERCO		< 3

Le cercosporamide avait une cytotoxicité assez élevée, <3 µM. Par contre, les composés **33**, **37** et **41** ont des cytotoxicités beaucoup plus faibles (au moins 100 fois).

Aux vues des résultats obtenus *in vitro*, nous avons cherché à comprendre le mode d'action de ces molécules qui montrent une activité antifongique au niveau de la restauration de la sensibilité au fluconazole comparable à celles du cercosporamide et une cytotoxicité beaucoup plus faible. Une compréhension du mécanisme d'action devrait permettre ainsi d'améliorer les molécules cibles en travaillant sur de nouvelles pharmacomodulations.

III. Activités inhibitrices de kinases

Les molécules cibles obtenues, sont des dérivés du cercosporamide, inhibiteur connu de la Pkc de *Candida*.¹²¹ Nous avons donc cherché à vérifier l'activité inhibitrice des molécules cibles, en comparaison à celle du cercosporamide. Plus récemment, il a été montré que le cercosporamide était un inhibiteur d'autres kinases notamment de la famille des Mnk.^{226,124} C'est pour cela que les composés **33**, **37** et **41** ont aussi été testés sur un panel de kinases par la plateforme de criblage KISSf de Roscoff.

1. Inhibition de l'activité kinase de la CaPkc1

1.1. Principe du test

L'inhibition de l'activité de la CaPkc1 est mesurée à l'aide du kit : "PKC kinase activity" de chez Enzo Life Sciences. Ce kit est basé sur le principe d'un test ELISA et utilise un peptide synthétique spécifique comme substrat de la PKC ainsi qu'un anticorps polyclonal qui reconnaît la forme phosphorylée de ce substrat. Ce kit est développé pour mesurer l'activité kinase des PKC humaines.

Aux vues des homologies de séquence des PKC humaines et de celle de *Candida*, notamment au niveau du site de phosphorylation, nous avons fait des mises au point afin de pouvoir mesurer, avec ce kit, l'activité de la Pkc de *Candida* sur un extrait protéique brut de *C. albicans*. Nous avons ensuite mis au point un protocole qui permettait de mesurer l'inhibition de l'activité de la Pkc de *Candida* par les composés cibles toujours sur un extrait protéique brut.

Le protocole suivi mis au point au laboratoire est brièvement décrit ici. Afin d'extraire au mieux les protéines, une lyse mécanique est faite dans un premier temps (cycle chaud/froid par bain dans l'azote liquide puis broyage mécanique des cellules en utilisant des billes de verre et un broyeur Miller pendant 6 min à vitesse maximale) puis une lyse « chimique » et une extraction sont faites par traitement avec du tampon de lyse (MPER). Les extraits protéiques ainsi obtenus sont ensuite quantifiés à l'aide d'un kit BCA puis conservés à -80°C.

Le substrat spécifique de PKC est adsorbé à la surface des puits de la microplaque. Les échantillons à tester (extrait protéique seul pour une mesure de l'activité kinase et extrait protéique + composé à tester pour une mesure de l'inhibition de l'activité kinase) sont mis dans les différents puits de la plaque à une concentration mise au point au préalable. L'ATP est ensuite ajouté pour initier la réaction de phosphorylation et la plaque est mise à incuber 90 min à 30 °C (Figure 47 - étape 1).

Lorsque la réaction de phosphorylation est terminée, les puits sont vidés et l'anticorps spécifique du substrat phosphorylé est ajouté avant d'incuber la plaque à température ambiante pendant 60 min (Figure 47 - étape 2).

A la fin de la réaction, les puits sont vidés et après plusieurs lavages qui permettent d'éliminer les anticorps primaires qui ne sont pas fixés de manière spécifique, un anticorps secondaire couplé HRP est ensuite ajouté pour une incubation de 30 min à température ambiante (Figure 47 - étape 3).

A la fin de la réaction, les puits sont vidés et de nouveaux lavages sont alors effectués afin d'éliminer tous les anticorps secondaires qui sont fixés de manière non spécifiques. Un substrat TMB est ensuite ajouté et la couleur bleue observée est proportionnelle à l'activité de phosphotransférase de la protéine kinase présente (Figure 47 - étape 4).

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

La présence d'un inhibiteur de l'activité kinase entraîne une absence de coloration des puits. L'ajout d'une solution acide permet de stopper la réaction du TMB avec l'HRP et d'effectuer une mesure de l'absorbance à 450 nm (Figure 47 - étape 5).

Les résultats sont exprimés sous forme de rapport de l'absorbance obtenue pour les échantillons en présence des composés testés sur l'absorbance obtenue pour l'extrait protéique total (ou la PKC humaine pure) en l'absence de traitement.

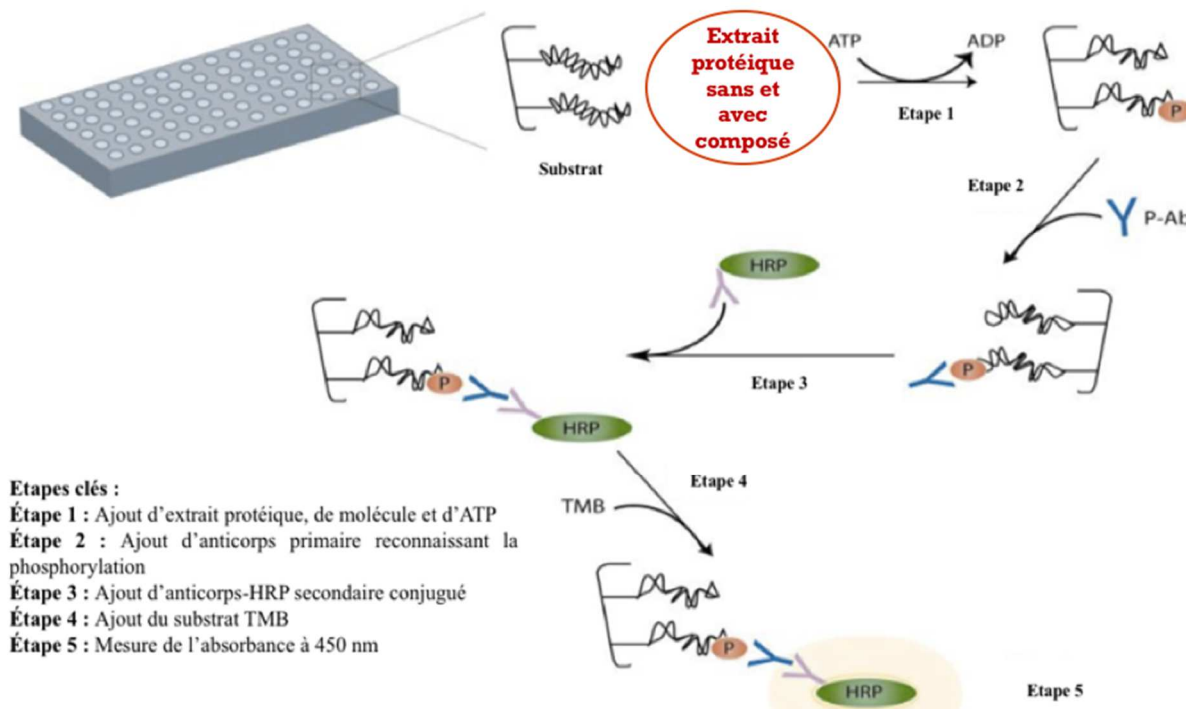


Figure 47 : Résumé du protocole de test de mesure de l'inhibition de l'activité de la protéine kinase C de *Candida*.

Un certain nombre de mises au point ont été nécessaires pour valider la quantité d'extrait protéique à utiliser (0,8 µg/puits) quelle que soit la souche testée (CAAL2 ou CAAL93), la concentration en inhibiteur testée (100 µM que ce soit pour le cercosporamide ou pour les composés **33**, **37** et **41**), le temps de pré-incubation des extraits protéiques avec les inhibiteurs avant d'initier la réaction de phosphorylation par ajout de l'ATP (15 min), le temps d'incubation du TMB (variable d'une expérience à l'autre et dépend surtout de la température du laboratoire).

La concentration en inhibiteur choisie (100 µM) peut paraître élevée. Une gamme de concentration de notre molécule témoin (le cercosporamide) a été testée que ce soit sur la protéine PKC humaine fournie par le kit et sur les extraits protéiques totaux de CAAL2 et CAAL93. A la concentration de 100 µM en cercosporamide, on a observé une inhibition de l'activité de phosphorylation de 65% sur la PKC humaine (20 ng/puits comme préconisé dans le kit) et de 40% sur l'extrait protéique total de CAAL2 (0,8 µg/puits). Ces valeurs obtenues nous ont paru acceptables afin de pouvoir mettre en évidence si les composés testés, dans ces mêmes conditions (100 µM), présentent une activité inhibitrice plus importante (supérieure à 65%) ou une activité inhibitrice plus faible (inférieure à 40%) en comparaison au cercosporamide.

Nous avons donc fixé à 100 µM la concentration en composés **33**, **37** et **41** pour l'ensemble des tests de mesure de l'activité PKC.

1.2. Analyse des résultats

Afin de pouvoir comparer l'inhibition de l'activité kinase obtenue pour les composés 33, 37 et 41 à celle obtenue pour le cercosporamide nous avons effectué une analyse statistique des résultats en utilisant le logiciel Graphpad prism 7.0. Les moyennes d'au moins deux manipulations indépendantes dans chacune des conditions sont comparées en utilisant une "one-way" ANOVA suivie d'un test de Fisher dit LSD (Last Square Difference = Différence des moindres Carrés) non corrigé. Les résultats sont considérés comme étant statistiquement significatifs lorsque la valeur de *p* est inférieure à 0,05.

L'ensemble des résultats obtenus sont résumés dans la figure 48.

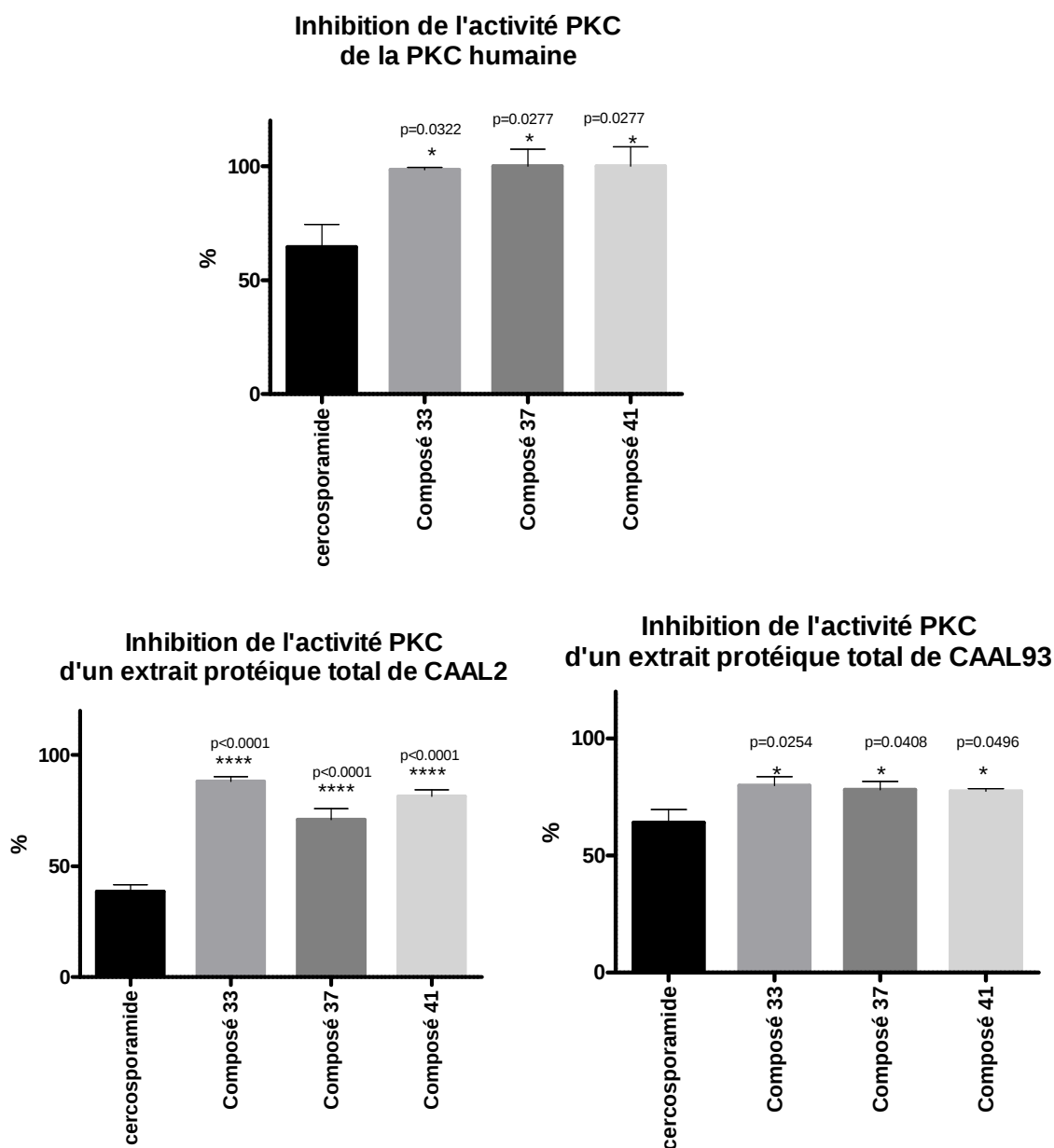


Figure 48 : Inhibition de l'activité kinase de la PKC humaine et des extraits protéiques totaux de CAAL2, CAAL93 par le cercosporamide et les composés 33, 37 et 41.

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Les expériences ont été considérées comme valides lorsque le pourcentage d'inhibition de l'activité kinase du cercosporamide était compris entre 35% (CAAL2) et 65% (CAAL93 et PKC humaine). Que ce soit sur la PKC humaine ou sur les extraits protéiques de *Candida*, on a observé que le cercosporamide montre une activité inhibitrice plus faible que les composés **33**, **37** et **41**. Cependant, il n'y a que sur l'extrait protéique de CAAL2 que la différence d'inhibition par rapport au cercosporamide est statistiquement significative, quel que soit le composé.

Les trois composés testés montrent une activité inhibitrice très importante (à 100 μ M) quel que soit la PKC sur laquelle elle est mesurée : entre 98% et 100% sur la PKC humaine, entre 71% et 88% sur l'extrait protéique de CAAL2 et environ 80% sur l'extrait protéique de CAAL93.

Ces 3 composés sont donc bien des inhibiteurs de l'activité kinase, que ce soit de la PKC humaine ou d'un extrait brut de protéines de *C. albicans*. Nous pouvons conclure que ce sont de meilleurs inhibiteurs que le cercosporamide, en particulier lorsque les tests sont faits sur l'extrait protéique brut de CAAL2.

Ce test de mesure de l'inhibition de l'activité kinase, valide bien la CaPkc comme cible potentielle des composés **33**, **37** et **41**. Par contre l'effet inhibiteur important mesuré aussi sur la PKC humaine, laisse à penser que ces composés ne sont peut-être pas spécifiques de la CaPkc. Ceci est conforté par le fait que dans nos tests, le cercosporamide ne semble pas non plus spécifique de CaPkc. Des travaux publiés plus récemment montrent que le cercosporamide n'est peut-être pas aussi spécifique de la CaPkc que ce qui avait été décrit initialement. Enfin, dans la littérature, les pyrimidines tricycliques sont décrites comme des inhibiteurs de kinase et ont montré de multiples applications pharmacologiques.^{123,225,227} Deux possibilités sont à envisager vis-à-vis de l'absence d'activité antifongique (tableau 12 p.87) :

- soit les composés n'arrivent pas à atteindre leur cible,
- soit le fait d'inhiber la CaPkc1 n'est pas suffisant pour conférer une activité antifongique.

Nous avons aussi fait tester les composés **33**, **37** et **41** à la plateforme KISSf (Kinase Inhibitor Specialised Screening facility), pour déterminer leur activité inhibitrice sur un panel de kinases.

2. Evaluation d'inhibition sur les kinases humaines

Les évaluations biologiques ont été faites sur différentes kinases. Les kinases choisies pour cette étude sont HsCDK2/CyclineA, HsCDK5/p25, HsCDK9/CyclineT, HsPIM1, HsHaspine, MmCLK1, RnDYRK1A, SscGSK3 α/β , SscCKI δ/ϵ et HsAurora B. Le tableau 18 résume l'origine et le rôle des ces kinases.

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

Tableau 18 : Origine et rôle, chez l'homme, des kinases testées

Kinase	Origine	Famille	Rôle
HsCDK2/CyclineA ²²⁸	Humaine	CDK	CDK2/Cycline A joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, notamment au niveau de l'entrée en mitose des cellules
HsCDK5/ p25 ²²⁹	Humaine exprimée par <i>Escherichia coli</i> .	CDK	CDK5 est une protéine clé de la dégénérescence des neurones et est impliqué dans un certain nombre de maladies neurodégénératives
HsCDK9/CyclineT ²³⁰	Humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9	CDC2-like kinases	La CDK9 est surexprimée dans les myélomes, les cancers de la prostate et les cancers pulmonaires.
HsPIM1 ²³¹	Proto-oncogène humain recombinant exprimé dans une bactérie	PIM	Des taux élevés de PIM1 sont observés dans différents types de cancers.
HsHaspin ²³²	Humaine	-	Une perte d'activité de l'Haspin s'accompagne irrémédiablement d'erreurs dans l'alignement des chromosomes, la cohésion centromérique et l'intégrité des fuseaux mitotiques.
MmCLK1 ²³³	<i>Mus musculus</i>	CDC2-like kinases	CLK1 est une cible thérapeutique intéressante pour la maladie d'Alzheimer
RnDYRK1A ²³⁴	<i>Rattus norvegicus</i>	CMGC	DYRK1A est surexprimée dans diverses pathologies (syndrome de Down, maladie d'Alzheimer et de Huntington), différents types de cancers (cancers hématologiques et cancers du cerveau) et dans l'hypertrophie cardiaque.
SscGSK3α/β	Porcine et purifiée	-	GSK3 est impliquée dans des maladies psychiatriques et neurologiques, des maladies inflammatoires et différents cancers.
SscCK1δ/ϵ	Porcine et purifiée	CK	Les protéines de la famille CK1 sont impliquées dans la tumorigénèse et dans les voies de signalisation liée à la progression tumorale.
HsAurora B ²³⁵	Humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9	-	Aurora-B est impliquée dans la séparation de l'hétérochromatine centromérique et télomérique.

2.1. Description rapide du protocole expérimental

L'activité kinasique est déterminée dans les solutions tampons appropriées en présence du substrat, protéine ou peptide, fourni par Protéogénix. La réaction se déroule en présence d'ATP marqué ($[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/mL).^{243,236} La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard après addition de liquide scintillant ACS (Amersham).

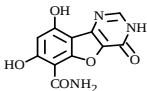
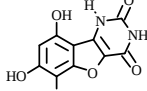
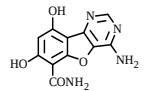
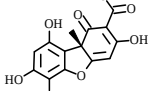
Les tests, réalisés en triplicate, permettent de mesurer le taux de phosphorylation des protéines substrats associées aux différentes kinases. Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité maximale, c'est-à-dire en absence d'inhibiteur et des CI_{50} sont calculées quand cela est possible.

Partie B : Evaluation biologique des benzofuro[3,2-d]pyrimidines

2.2. Résultats et discussion

Le tableau 19 résume l'ensemble des CI_{50} mesurées au cours des essais faits par la plateforme KISSf. Chaque valeur, exprimée en $\mu\text{mol/L}$, est la moyenne d'au moins deux manipulations indépendantes et les écarts type ont des valeurs comprises entre $\pm 15\%$.

Tableau 19 : Activité inhibitrice des benzofuro[3,2-d]pyrimidines **33**, **37**, **41** et du **cercosporamide** contre un panel de 10 protéines kinases

Kinase	CI_{50} (μM) ^a			
	33 	37 	41 	CERCO ^b 
HsCDK2/CyclineA	>10	>10	>10	0,77
HsCDK5/p25	>10	>10	>10	5,60
HsCDK9/CyclineT	>10	>10	>10	0,22
HsPIM1	>10	>10	1,29	8,10
HsHaspin	>10	>10	>10	>10
MmCLK1	>10	>10	2,69	>10
RnDYRK1A	>10	>10	8,23	>10
SscGSK3α/β	>10	>10	>10	>10
SscCK1δ/ϵ	>10	>10	>10	>10
HsAurora B	>10	>10	>10	2,40

^a Les valeurs sont la moyenne d'au moins deux déterminations indépendantes et sont dans les limites de $\pm 15\%$ SD.

^b Le (-)-cercosporamide est utilisé comme composé de référence.

Les résultats obtenus pour le cercosporamide sur les différentes kinases testées sont en accord avec la littérature. En effet, une activité inhibitrice à l'échelle sub-micromolaire a été mesurée contre CDK2 ($CI_{50} = 0,77 \mu\text{M}$) et CDK9 ($CI_{50} = 0,22 \mu\text{M}$). De plus, une activité inhibitrice inférieure a été mesurée contre Aurora B ($CI_{50} = 2,40 \mu\text{M}$), CDK5 ($CI_{50} = 5,60 \mu\text{M}$) et PIM1 ($CI_{50} = 8,10 \mu\text{M}$). Par contre aucune activité n'a été détectée contre les autres kinases. La pyrimidinone tricyclique **33** et son homologue de pyrimidinedione **37** sont restées inactives sur le panel de kinases. En tenant compte de l'activité inhibitrice de *CaPkc* mesurée lors du test ELISA, ceci suggère que la restauration de la sensibilité d'une souche résistante au fluconazole (CAAL111) par le composé **37** pourrait être le résultat de l'inhibition de la *CaPkc*. Le dérivé 4-aminopyrimidine **41** présente une inhibition de l'activité kinase significative contre PIM1 ($CI_{50} = 1,29 \mu\text{M}$), CLK1 ($CI_{50} = 2,69 \mu\text{M}$) et DYRK1A ($CI_{50} = 8,23 \mu\text{M}$). Il faut de plus noter que ces activités inhibitrices sont plus importantes que celles du cercosporamide sur ces mêmes kinases. Ce composé, malgré son activité inhibitrice de la *CaPkc in vitro*, n'a démontré aucune activité de restauration de la sensibilité au fluconazole lors des tests effectués au cours de cette thèse. Les résultats obtenus sur ce panel de kinases humaines offrent de nouvelles cibles potentielles pour ce composé.

Nous avons effectué l'alignement de séquences de kinases humaines avec des kinases de *C. albicans*. Nous avons alors observé que le domaine kinase de Fun31p, une sérine/thréonine kinase présente une similitude de 51% avec le domaine kinase de PIM1 humain. Cette kinase fongique impliquée dans la régulation des dommages de la paroi cellulaire chez *C. albicans* pourrait être une cible potentielle pour le composé **41**. Des tests complémentaires restent donc à faire pour vérifier si Fun31p est bien une cible pour le composé **41**.

IV. Conclusion sur l'activité biologique des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines

Tout d'abord, l'activité antifongique des 3 composés benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines **33**, **37** et **41** et du **cercosporamide** a été testée *in vitro* sur 6 souches de *C. albicans*. Aucun effet antifongique n'a pu être montré pour ces 3 composés, que ce soit sur les deux souches sensibles au fluconazole ou sur les quatre souches résistantes. Le cercosporamide n'a quant à lui montré qu'un effet antifongique limité (CMI d'environ 100 μ M) sur seulement trois des souches testées. Ces résultats obtenus pour le cercosporamide sont en accord avec d'autres résultats publiés dans la littérature.

La restauration de la sensibilité au fluconazole des quatre souches résistantes a ensuite été testée lors d'essais de co-administration. Le cercosporamide montre un effet synergique avec le fluconazole uniquement sur la souche CAAL2 (dont le mécanisme de résistance passe par une mutation sur Erg3). Le composé cible **37** montre un effet synergique avec le fluconazole sur la souche CAAL111 (dont le mécanisme de résistance passe par des mécanismes d'efflux).

Dans la mesure où des effets de restauration de la sensibilité de souches résistantes aux azolés avaient été observés, des tests de cytotoxicité sur cellules HeLa ont été menés. Les composés **33**, **37** et **41** n'ont démontré aucune cytotoxicité alors que celle du cercosporamide est de l'ordre du micromolaire.

Les tests d'inhibition de biofilm fongique mature ont été réalisés pour le composé **33** et le **cercosporamide** sur trois souches de *C. albicans* choisies pour leur capacité à former du biofilm. Le **cercosporamide** montre une inhibition du biofilm sur deux des souches mais aucun effet sur la croissance du biofilm n'a été observé pour le composé **33**.

Par la suite, l'activité inhibitrice des différents composés synthétisés et le **cercosporamide** a été évaluée sur la CaPkc1 (à partir d'extraits bruts protéiques) et sur la PKC humaine (une protéine recombinante). Les composés **33**, **37** et **41** se sont montrés plus actifs que le cercosporamide en termes d'activité inhibitrice sur la CaPkc1 et sur la PKC humaine.

Enfin, l'activité inhibitrice des 3 composés **33**, **37** et **41** et le **cercosporamide** ont été évaluées sur 10 kinases humaines. Au niveau des kinases testées, le composé **41** présente une inhibition de l'activité kinasique significative sur PIM1, CLK1 et DYRK1A, plus importante que celle du cercosporamide.

DEUXIEME CHAPITRE

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

I. Partie théorique : Aperçu bibliographique

1. Les dibenzo[*b,d*]furanes

Les dibenzofuranes sont des composés hétéroaromatiques importants dont le motif structural est largement retrouvé dans les produits d'origine naturelle et leurs dérivés qui présentent une grande variété d'activités biologiques, suscitant un vif intérêt de la part des pharmacochimistes et des biologistes. Des applications sont également retrouvées dans les sciences des matériaux pour les diodes électroluminescentes organiques phosphorescentes bleues.²³⁷ Ainsi, des efforts considérables ont été consacrés au développement de méthodes efficaces pour la construction de ces systèmes tricycliques aromatiques. La structure, la nomenclature et la numérotation du dibenzofurane sont détaillées sur la figure 49.

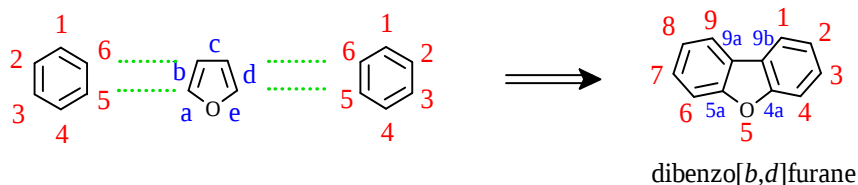


Figure 49 : Nomenclature du dibenzofurane

Nous présenterons dans ce chapitre les principaux travaux décrits dans la littérature en série dibenzo[*b,d*]furane. Tout d'abord, les cibles et les applications thérapeutiques de ce type de composés seront présentées. Les voies d'accès à cet hétérocycle oxygéné seront ensuite rappelées.

2. Applications en Chimie Thérapeutique des dibenzo[*b,d*]furanes

Les composés qui contiennent un élément de structure dibenzo[*b,d*]furane présentent un large éventail d'activités biologiques, y compris des propriétés antipaludiques, anti-diabétiques, antifongiques, cytotoxiques, antituberculeuses et antimycobactériennes.

2.1. Dibenzo[*b,d*]furanes comme antipaludiques

Les karnatakafurans **1** et **2**, deux dibenzofuranes (Figure 50), ont été isolés à partir d'*Aspergillus karnatakaensis*.²³⁸ Les deux composés ont montré une activité modérée *in vitro* contre un parasite *Plasmodium falciparum* (3D7) sensible à la chloroquine (Tableau 20).

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

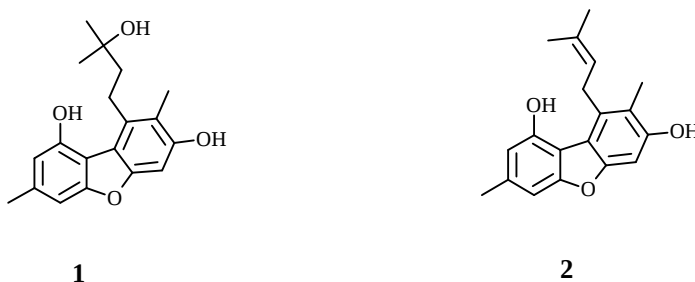


Figure 50 : Structure des karnatakafurans 1 et 2

Tableau 20 : Valeurs de la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) contre *Plasmodium falciparum*

Composé	<i>Plasmodium falciparum</i> (3D7) CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,9
2	3,6
Chloroquine	0,012

2.2. Dibenzo[b,d]furanes comme agents anti-diabétiques potentiels

La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), une PTPase intracellulaire non-réceptrice, joue un rôle essentiel dans la régulation du taux d'insuline en déphosphorylant le récepteur de l'insuline activée.²³⁹ En 2010, Lakshminarayana *et al.* ont décrit une série de nouveaux dérivés de l'acide dibenzo[b,d]furanne monocarboxylique. Les dérivés de l'acide dibenzo[b,d]furanne monocarboxylique ont été synthétisés, caractérisés et évalués pour leur capacité à inhiber la PTP1B *in vitro* afin de les utiliser comme agents antidiabétiques potentiels. Parmi les composés testés, le composé **5E** a présenté une capacité à inhiber la PTP1B *in vitro* avec une valeur CI_{50} de 82 nM. Il a été criblé *in vivo* en tant que candidat médicament pour l'activité anti-diabétique. Il a montré une réduction significative du poids corporel, de la glycémie à l'état d'alimentation, de la glycémie à jeûn, des taux plasmatiques de glucose et de cholestérol plasmatique et une réduction non significative des taux de triglycérides plasmatiques à jeûn chez la souris.²⁴⁰

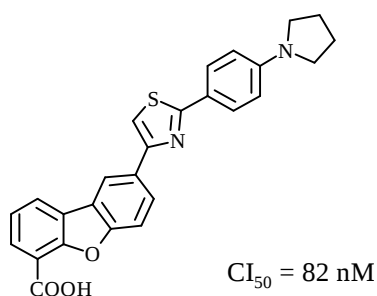


Figure 51 : Structure du composé 5E

2.3. Dibenzo[b,d]furanes comme antifongiques

Carotenuto *et al.*²⁴¹ ont effectué un criblage systématique des composés bioactifs chez les *Allium* du sud de l'Italie. Ils ont trouvé trois nouveaux dibenzofuranes dans les bulbes du poireau, *Allium porrum*. Ils rapportent l'isolement et la caractérisation de ces composés, ainsi que leur activité vis-à-vis du champignon *Fusarium culmorum*. C'est le premier rapport sur la présence de dibenzofuranes chez des plantes appartenant au genre *Allium*.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Trois dibenzofuranes **1**, **2** et **3** ont été isolés à partir d'*Allium porrum*. Lorsqu'ils ont été testés contre le champignon *Fusarium culmorum*, les composés **1**, **2** et **3** présentaient des valeurs de DE_{50} de 20-30 $\mu\text{g/mL}$. Ils ont donc montré une activité antifongique contre *Fusarium culmorum*.

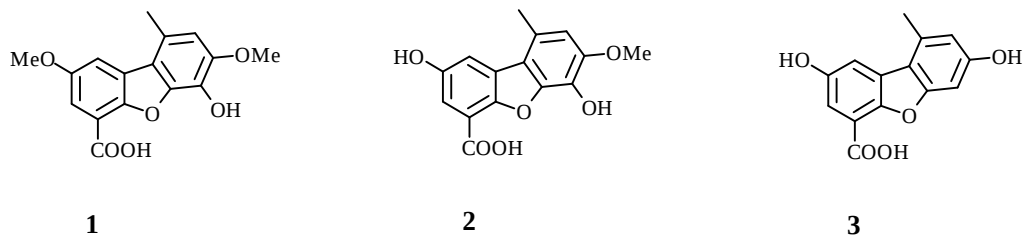


Figure 52 : Structure des 3 composés dibenzofuranes **1**, **2** et **3** isolés d'*Allium porrum*

2.4. Dibenzo[b,d]furanes comme cytotoxiques

Les topoisomérases de type II sont indispensables à la vie cellulaire : présentes partout dans l'organisme, elles sont d'excellentes cibles d'agent médicamenteux. Les inhibiteurs de la topoisomérase II empêchent la séparation de l'enzyme et de l'ADN puis créent des complexes de clivage qui empêchent la multiplication bactérienne. Les topoisomérases sont aussi la cible de plusieurs médicaments anticancéreux qui augmentent les complexes de clivages pour aboutir à l'apoptose de la cellule.²⁴²

La popolophuanone **E** (Figure 53), isolée de l'éponge marine de Pohnpei *Dysidea spp* par Carney *et al.* en 1993,²⁴³ est un puissant inhibiteur de la topoisomérase II et présente une cytotoxicité hautement sélective contre les cellules cancéreuses pulmonaires non à petites cellules humaines.²⁴⁴

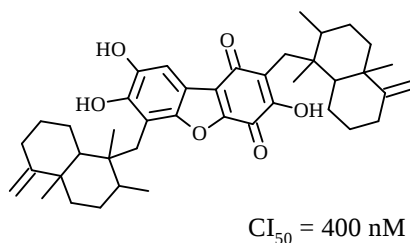


Figure 53 : Structure du popolophuanone **E**

2.5. Dibenzo[b,d]furanes comme antibactériens

La résistance bactérienne aux médicaments est un problème d'importance majeure dans le monde entier car cela pourrait avoir des conséquences dévastatrices sur la santé publique. La découverte de nouveaux agents antimicrobiens améliorés est donc l'un des besoins les plus urgents. Certains benzofuranes naturels ont de très bons effets antiviraux, par exemple : le composé responsable de cette activité était l'achyrofurane **1**, un dibenzofurane polyoxygéné prénylé, qui présentait une activité antibactérienne extraordinaire contre un ensemble de bactéries Gram positives cliniquement pertinentes, y compris le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) et le SAVI (*Staphylococcus aureus* intermédiaire vancomycine) avec une valeur CMI de 0,1 μM .²⁴⁵ D'autres dibenzofuranes naturels, tels que les composés **2** et **3** ont également montré une activité antibactérienne avec des CMI_{50} submicromolaires (Figure 54).²⁴⁶

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

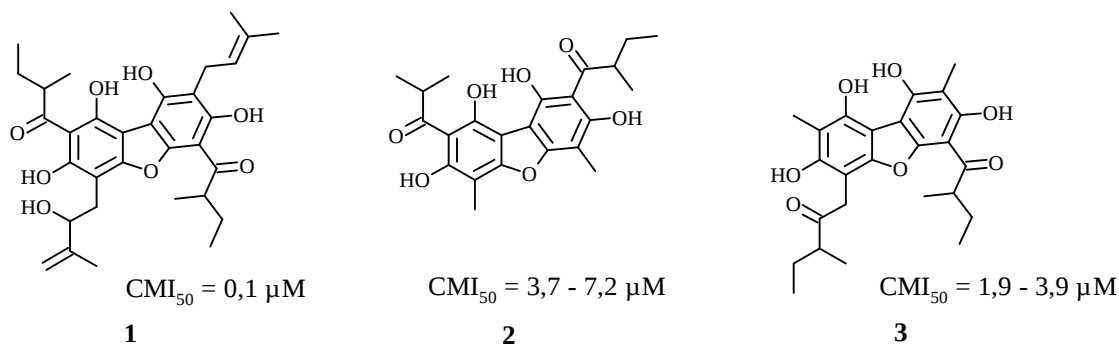


Figure 54 : Structures de dibenzofuranes naturels antibactériens

D'après les travaux réalisés par Oramas-Royo et *al.*, le dibenzofuranne **28** avec des chaînes propyle en C-2 et C-8 présentait une activité antibactérienne avec des valeurs comparables à celles du dibenzofurane-achyrofurane naturel (Figure 55).¹⁸³

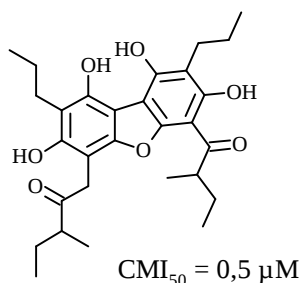


Figure 55 : Structure du composé dibenzofurane **28**

2.6. Dibenzo[b,d]furanes comme agents antituberculeux

La tuberculose reste une maladie infectieuse grave et hautement contagieuse, qui représente actuellement la deuxième cause de décès dans le monde. Le 3,3-diméthyl-3H:benzofuro[3,2-*f*][1]benzopyrane **1** et le 1,2-dihydro-3,3-diméthyl-3H:benzofuro[3,2-*f*][1]benzopyrane **2** (Figure 56) présentent une activité spécifique contre les stéroïdes de la paroi cellulaire de *Mycobacterium* et *Nocardia* avec des CMI_{99} dans la gamme de 1-10 $\mu\text{g/mL}$, suggérant que leur activité devrait résider dans la perturbation de la biosynthèse des acides mycoliques présents dans les parois cellulaires des deux microorganismes.^{247,248}

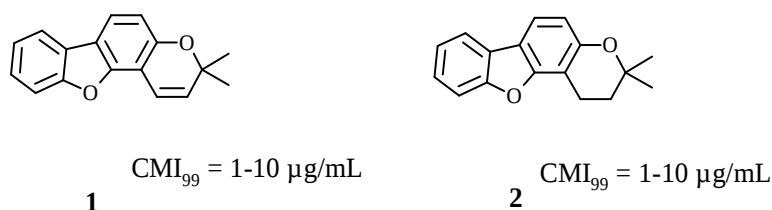


Figure 56 : Structure chimique du composé **1** et de son analogue réduit **2**

Les composés **1** et **2** ont également démontré de bonnes activités contre les souches mycobactériennes pharmacorésistantes. Ces composés apparaissent comme des agents antituberculeux spécifiques prometteurs avec des valeurs de CMI_{99} de 10 $\mu\text{g/mL}$, car ils ne présentent pas de cytotoxicité significative contre les cellules mammifères, ni d'effet sur la croissance de diverses bactéries et champignons.²⁴⁷

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Poursuivre le développement de nouveaux agents antituberculeux, Surineni et *al.* ont effectué la synthèse et l'évaluation antimycobactérienne de nouveaux thiazolyl-1,2,3-triazolyl-acétamides liés au dibenzofurane. Dans leurs études, ils ont rapporté que trois composés **6j** (CMI = 1,56 $\mu\text{g/mL}$); **6a** et **6p** (CMI = 3,13 $\mu\text{g/mL}$) présentent une activité antimycobactérienne *in vitro* contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Figure 57).²⁴⁹

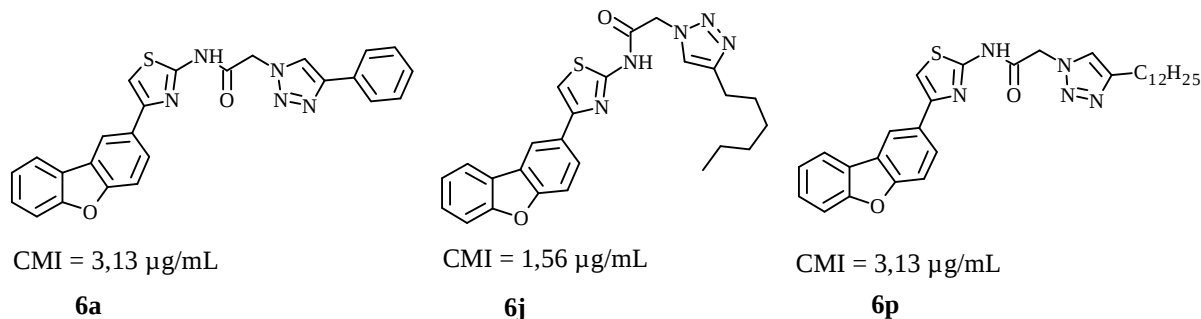


Figure 57 : Structure chimique des composés **6a**, **6j**, **6p**

Yempala et *al.* ont rapporté 10 composés pour l'activité anti-mycobactérienne *in vitro* contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, parmi les eux, le 2- (4-méthoxy-2-méthylphényl)-3H-benzofuro[3,2-e]benzofurane (**10c**) était plus actif avec une CMI de 3,12 $\mu\text{g/mL}$ et a montré une cytotoxicité plus faible avec un bon index thérapeutique (Figure 58).²⁵⁰

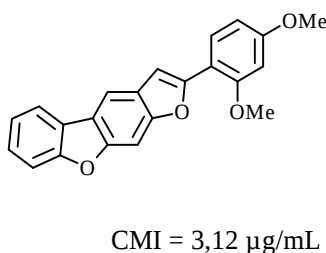


Figure 58 : Structure chimique du composé **10c**

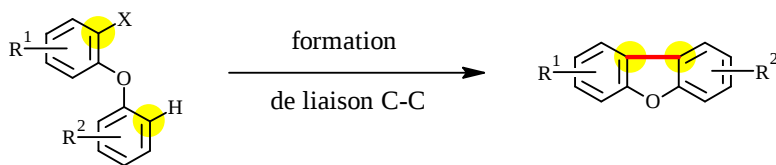
3. Synthèse des dérivés dibenzo[b,d]furanes

En raison de leur importance, notamment en termes d'applications biologiques, plusieurs méthodes pour la synthèse de dérivés dibenzofuraniques ont été développées à partir de nombreuses réactions inter- et intramoléculaires.

En général, il y a principalement deux méthodes pour construire l'hétérocycle dibenzofurane et quelques approches synthétiques diverses.

Une première voie d'accès implique la formation initiale de composés diaryléthers, suivie d'une fermeture de cycle par formation d'une liaison carbone-carbone. Ce processus intramoléculaire peut se faire par arylation directe métallo-catalysée à partir de dérivés halogénés, par une réaction de type Pschorr en présence de sels de diazonium ou de trifluoroborate, par C-H arylation décarboxylative ou par couplage diaryle oxydant pallado-catalysé de type Fagnou. Enfin, des réactions de photocyclisation de dérivés méthoxylés et de cyclisation pallado-catalysée d'esters trifliques sont également décrites dans la littérature (Schéma 75).

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes



X = Cl, I, N₂⁺, BF₃K, CO₂H, H, OCH₃, OTf

Schéma 75 : Voies d'accès aux dibenzofuranes substitués à partir de diaryléthers

La seconde approche implique la préparation initiale de dérivés 2-arylphénols *via* une réaction de Suzuki notamment, puis la formation d'une liaison éther intramoléculaire par substitution nucléophile aromatique à partir de dérivés halogénés, nitrés, de sels de diazonium, par réactions tandem pallado-catalysées d'activation C-H et de cyclisation C-O ou par déshydratation de biphénols (Schéma 76).

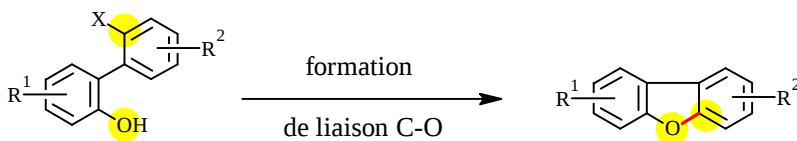

$$X = \text{F, Cl, Br, NO}_2, \text{N}_2^+, \text{H, OH}$$

Schéma 76 : Voies d'accès aux dibenzofuranes substitués à partir de 2-arylphénols

3.1. Formation de liaison C-C intramoléculaire à partir de diaryléthers

3.1.1. Synthèse de dibenzofuranes par cyclisation d'o-halogénodiaryléthers

En 2004, Liu et Larock ont décrit une voie efficace pour synthétiser des dibenzofuranes. Elle implique la réaction d'*o*-iodophénols avec des triflates de silylaryle en présence de CsF pour donner des diaryéthers iodés en position *ortho*.²⁵¹ Ces derniers sont ensuite cyclisés par une C-H arylation intramoléculaire en utilisant un catalyseur palladié avec de bons rendements. Cette chimie tolère une variété de groupes fonctionnels (Schéma 77). Le mécanisme réactionnel met en jeu un intermédiaire benzyne, obtenu *in situ* par désilylation initiale du composé **2** par les ions fluorures, qui subit ensuite l'attaque nucléophile du dérivé phénolique **1**.

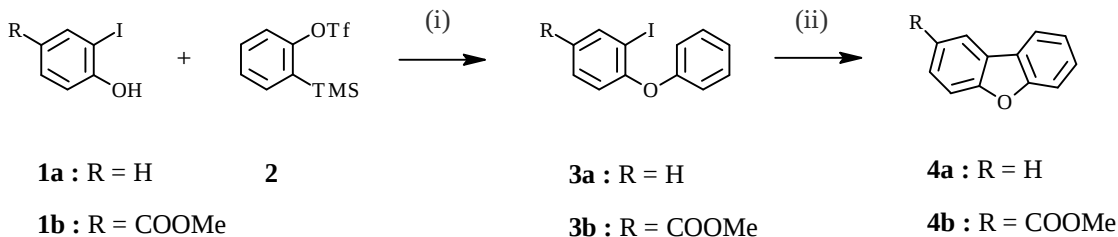


Schéma 77 : (i) CsF (3 éq), MeCN, t.a., 10 h ; (ii) Pd(OAc)₂, PCy₃, 100 °C, 24 h (**4a** = 70%, **4b** = 80%).

L'accès aux précurseurs *o*-iododiaryléthers est également décrit dans la littérature, avec des rendements de 40% à 98%, par réaction entre un réactif de l'iode hypervalent, le diacétate d'iodobenzène, et des dérivés phénoliques substitués généralement par des groupements électroattracteurs (Schéma 78).²⁵² La cyclisation intramoléculaire est ensuite réalisée en présence de Pd/C, d'acétate de sodium dans le *N,N*-diméthylacétamide (DMA) à 140 °C avec de très bons rendements.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

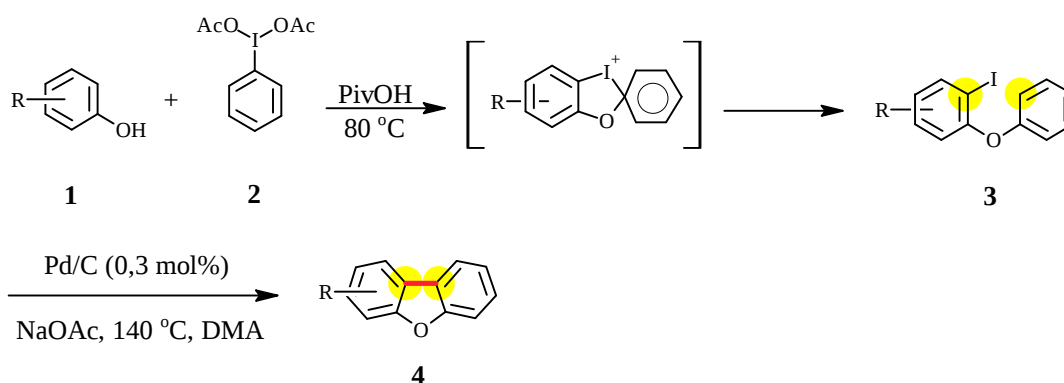


Schéma 78 : Voies d'accès aux dibenzofuranes substitués à partir d'o-iododiaryléthers.

De manière intéressante, la synthèse d'un dérivé dibenzofuranique substitué par un groupement donneur (OMe) a pu être réalisée à partir de l'o-chlorodiaryléther correspondant en présence d'acétate de palladium(II), d'un ligand et d'une base à 130 °C, à nouveau de le DMA, avec un rendement de 81% (Schéma 79).²⁵³

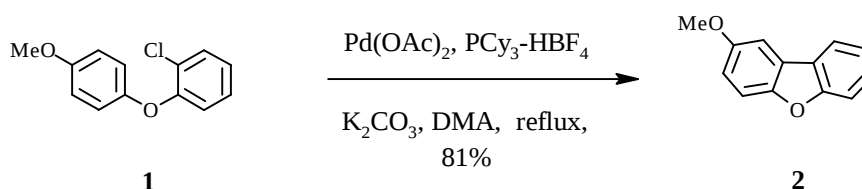


Schéma 79 : Voies d'accès au 2-méthoxydibenzo[b,d]furane à partir de l'o-chlorodiaryléther correspondant

3.1.2. Synthèse de dibenzofuranes par réactions tandem de dénitrification / activation C-H catalysées au palladium

Les sels de diazonium sont faciles à préparer et à manipuler et ils ont été largement utilisés comme substrats efficaces dans diverses transformations organiques. Les conditions de réaction pour la formation de dibenzofuranes à partir d'o-(aryloxy)anilines diazotées ont été examinées. Cette réaction a été découverte par Graebe et Ullmann en 1896.^{261,254} Plusieurs promoteurs de radicaux libres (hydroquinone, SnCl₂, NaI, CuSO₄, FeSO₄, etc.) ont été découverts; ceux-ci agissent comme des donneurs d'électrons et favorisent un mécanisme radicalaire.

En 2011, une méthode efficace et pratique a été développée pour la formation des dibenzofuranes à partir de sels d'ortho-(aryloxy)aryldiazonium par action de l'acétate de palladium(II).²⁵⁵ Le protocole utilise l'acétate de palladium comme catalyseur dans de l'éthanol en reflux en l'absence de base (Schéma 80).

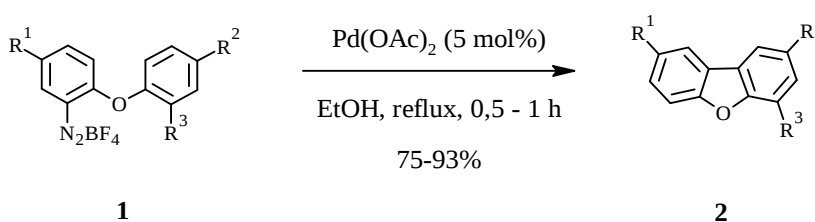


Schéma 80 : Cyclisation Pd(OAc)₂-catalysé à partir des tétrafluoroborates de 2-phénoxyaryldiazonium.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Une large gamme de tétrafluoroborates de 2-phénoxyaryldiazonium, comprenant des groupes chloro, bromo, fluoro et méthoxy, ont été mis à réagir selon ce protocole pour donner les dibenzofuranes correspondants avec des rendements élevés. Ni la nature électronique, ni l'encombrement stérique du substituant sur les cycles aromatiques n'ont eu d'influence nette sur la réactivité. Lorsque R_2 est modulé, il a été trouvé que les substituants électroneutres, riches en électrons et déficients en électrons étaient tous de bons substrats pour cette réaction. Pour les groupes R_3 donneurs d'électrons sont compatibles avec ce protocole.

Des cyclisations radicalaires utilisant des trifluoroborates ont également été mis en œuvre.²⁵⁶ Par exemple, un protocole réalisé dans l'eau, à l'air libre et employant du nitrate d'argent catalytique et du persulfate de potassium stoechiométrique a conduit à des rendements de cyclisation acceptables. Ces réactions de type Pschorr, impliquant des cascades de cyclisation/piégeage de radicaux en tandem, illustrent l'utilisation de conditions douces pour la génération du scaffold tricyclique (Schéma 81).²⁵⁷

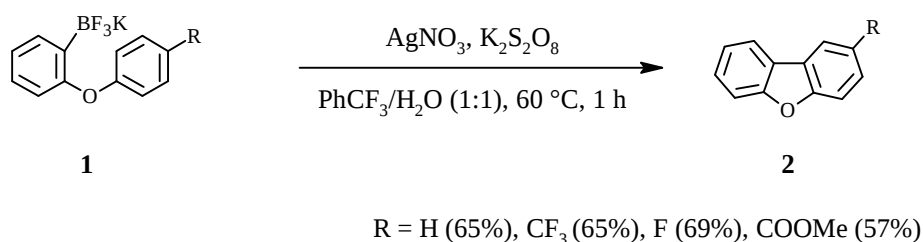


Schéma 81 : Cyclisation de type Pschorr utilisant des organotrifluoroborates comme précurseurs de radicaux

3.1.3. Arylation directe intramoléculaire pallado-catalysée d'acides benzoïques par décarboxylation en tandem/activation de C-H

L'utilisation d'acides carboxyliques comme source de carbone pour les réactions catalysées par des métaux de transition est une approche envisageable.

Un protocole pour l'arylation directe intramoléculaire catalysée par le palladium des acides benzoïques est décrit par Wang *et al.* en 2009. Il combine la décarboxylation et l'activation de C-H en un seul processus efficace. Avec le système catalytique optimisé du trifluoroacétate de palladium, du carbonate d'argent et du mélange de solvants appropriés (DMSO/dioxane), les dérivés du dibenzofurane se forment en même temps qu'un produit secondaire correspondant à la décarboxylation du composé de départ **1** (Schéma 82).²⁵⁸

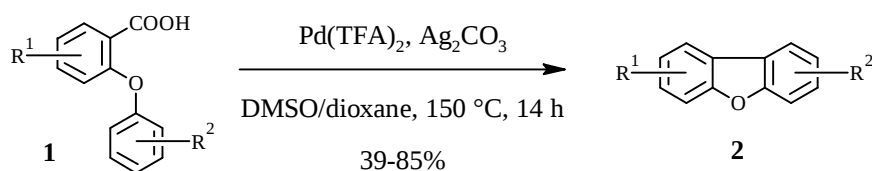


Schéma 82 : Arylation directe décarboxylative d'acides 2-aryloxybenzoïques catalysée au palladium

Une variété de dérivés du dibenzofurane **2** a pu être générée par cette méthode. Les acides 2-phénoxybenzoïques **1** ayant à la fois des substituants électrodonneurs et électroattracteurs ont donné les produits cyclisés correspondants avec des rendements isolés de moyens à bons (39-85%).

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

Il est important de noter que les groupes fluorure, chlorure et même bromure sont tolérés dans ce processus. Ces groupes fonctionnels d'intérêt permettent d'autres fonctionnalisations, fournissant ainsi un avantage distinct de cette méthode par rapport aux réactions d'arylation directe intramoléculaire utilisant des halogénures d'aryle.

Il est important de noter que toutes les réactions mentionnées ci-dessus se déroulent avec une excellente sélectivité par rapport aux réactions secondaires de proto-décarboxylation.

Maetani *et al.* présentent une approche utilisant des acides *ortho*-aryloxybenzoïques pour la synthèse de dibenzofuranes, reposant aussi sur une C-H-arylation décarboxylative catalysée au rhodium, et donnant le produit désiré avec un bon rendement (Schéma 83). La réaction est largement applicable à des substrats portant diverses fonctionnalités.²⁵⁹

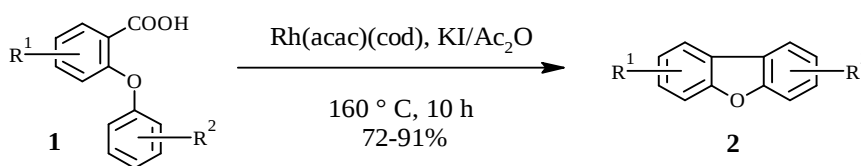


Schéma 83 : C-H-arylation décarboxylative d'acides 2-aryloxybenzoïques catalysée au rhodium

Les acides 2-phénylbenzoïques portant un Me ou un OMe à la position *para* du cycle phénoxy ont été convertis en dibenzofuranes désirés avec un bon rendement. Les substituants halogènes (F, Cl et Br) sur la position *para* du noyau phénoxy ont également été obtenus avec un bon rendement. La présence d'un substituant Me en position *ortho* du groupe phénoxy n'affecte pas la cyclisation. Des substituants halogènes, tels que F, Cl et Br, du côté de l'acide benzoïque sont aussi compatibles avec le procédé pour donner les dibenzofuranes correspondants avec de bons rendements.

Shen *et al.* ont aussi rapporté un protocole concis et efficace pour l'arylation intramoléculaire catalysée par le palladium d'acides arylcarboxyliques avec des halogénures d'aryle à travers une voie de couplage croisé décarboxylative (Schéma 84).²⁶⁰

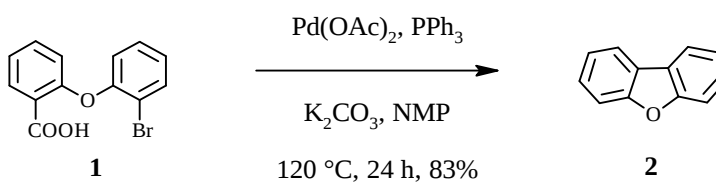
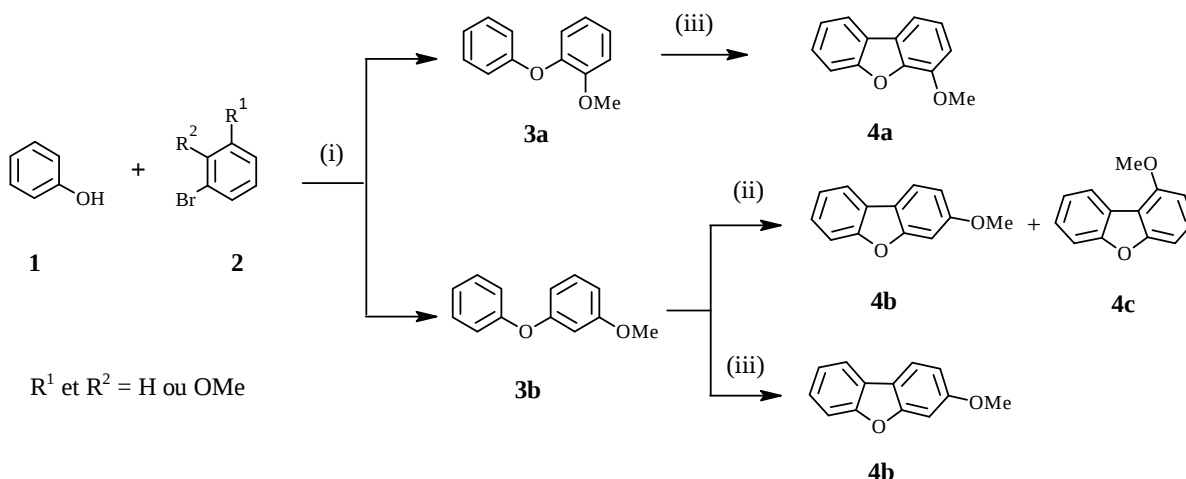


Schéma 84 : Synthèse du dibenzo[*b,d*]furane 2 par couplage décarboxylatif intramoléculaire

3.1.4. Synthèse de dibenzofuranes par couplage diaryle oxydant pallado-catalysé

Les travaux sur la synthèse d'analogues benzofuraniques du psoralène, furocoumarine intercalant de l'ADN, ont permis d'accéder à des 2-MeO, 3-MeO ou 4-MeOdibenzo[*b,d*]furanes par couplage oxydant en présence d'acétate de palladium(II) dans l'acide acétique ou trifluoroacétique ou par photolyse (Schéma 85).²⁶¹ Cependant les rendements de réaction sont restés très faibles, de l'ordre de 15 à 30%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes



Conditions : (i) K₂CO₃, Cu₂O, reflux ; (ii) C₆H₁₂, hv (150 W), I₂ ; (iii) AcOH ou CF₃COOH.

Schéma 85 : Synthèse de MeOdibenzo[b,d]furanes par couplage diaryle oxydant pallado-catalysé

Les travaux de l'équipe de Fagnou ont montré que l'ajout d'une petite quantité de carbonate de potassium en présence d'acide pivalique en tant que solvant réactionnel à l'air libre, au lieu de l'acide acétique, permet une plus grande reproductibilité, des rendements plus élevés et une plus grande variété de substrats. La réaction conduit à la conversion de diarylaminés et de diaryléthers riches et pauvres en électrons pour fournir respectivement les carbazoles et les dibenzofuranes correspondants (Schéma 86).²⁶²

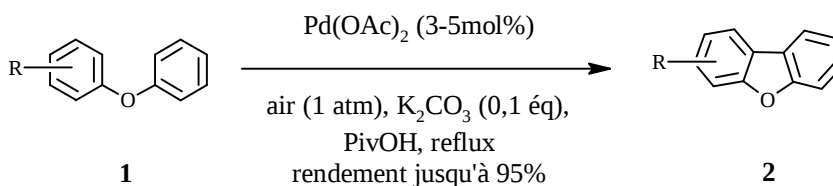


Schéma 86 : Synthèse biarylique oxydée par palladium(II) sous air

D'après les travaux réalisés par Bartholomäus *et al.*, la construction du dibenzofurane par une activation C-H dirigée en *ortho* est représentée sur le schéma 87. Un couplage de type Ullman du 1-bromo-3,5-diméthoxybenzène (1) avec le résorcinol (2) fournit le diaryléther correspondant qui a été converti en carbamate de diméthyle 3. Dans le processus d'hétérocyclisation, les conditions de Fagnou précédemment décrites sont appliquées mais en remplaçant l'air ambiant par de l'acétate d'argent (AgOAc) en quantité stoechiométrique comme oxydant final. Les deux isomères 4a et 4b ont été ainsi isolés avec de meilleurs rendements de 53% et 36%, respectivement, et avec un temps de réaction diminué.²⁶³

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

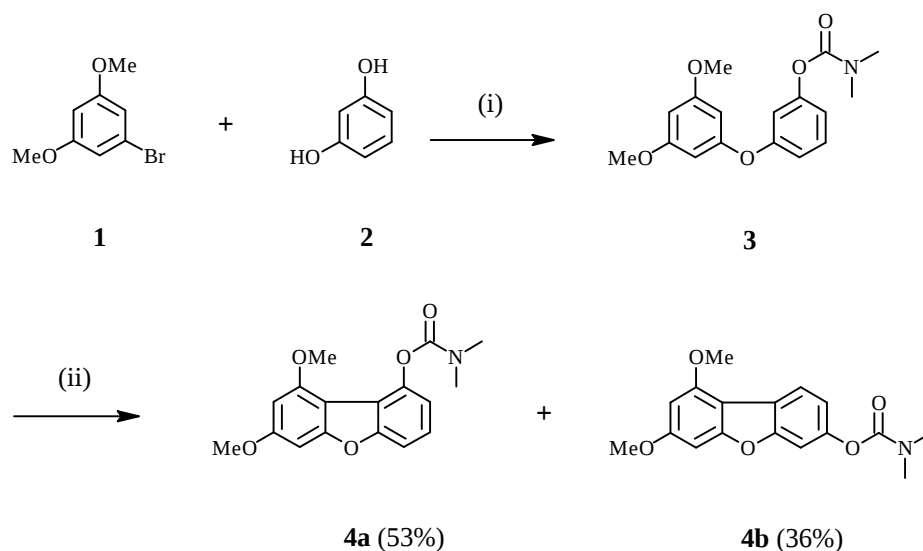


Schéma 87 : (i) 1) CuI, Cs₂CO₃, N,N-diméthylglycine, DMF, 135 °C ; 2) Me₂NCOCl, K₂CO₃, MeCN, 60 °C, 67% ; (ii) Pd(OAc)₂, AgOAc, PivOH, 130 °C, 89%.

3.1.5. Synthèse de dibenzofuranes par hétérocyclisation de diaryléthers méthoxylés en *ortho* ou comportant un groupement triflate

Des applications ponctuelles ont fait état de la possibilité d'accéder à des dibenzofuranes par photocyclisation des précurseurs 2-méthoxydiaryléthers (Schéma 88). Cependant les rendements restent très faibles.²⁶⁴

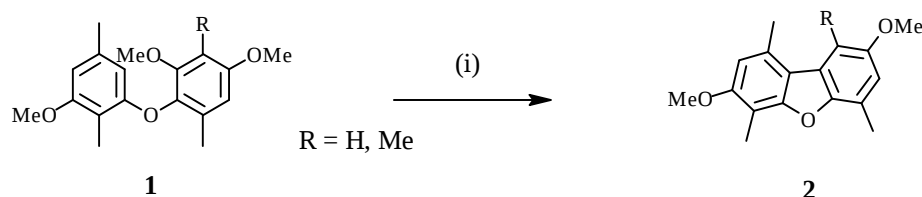


Schéma 88 : (i) Lampe à vapeur de mercure, EtOH, 35-36%.

Un autre exemple montre l'intérêt des esters trifliques pour l'obtention du dibenzo[*b,d*]furane par hétérocyclisation pallado-catalysée avec un rendement de 96% (Schéma 89).²⁶⁵

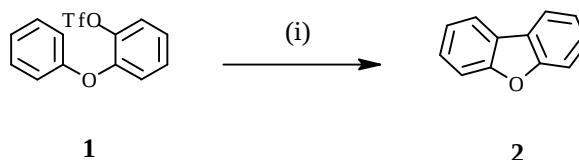


Schéma 89 : (i) Pd(PPh₃)₂Cl₂, LiCl, DBU, DMF, 145 °C, 96%.

3.2. Formation d'une liaison C-O intramoléculaire à partir 2-arylphénols

3.2.1. Synthèse de dibenzofuranes par S_NAr intramoléculaire de 2-arylphénols halogénés

D'après les travaux réalisés par Jepsen *et al.*, le bromure 1 et l'acide boronique 2 sont d'abord couplés par réaction de Suzuki-Miyaura pour donner le biphenyle 3 correspondant avec un rendement de 93% (Schéma 90).²¹⁴

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

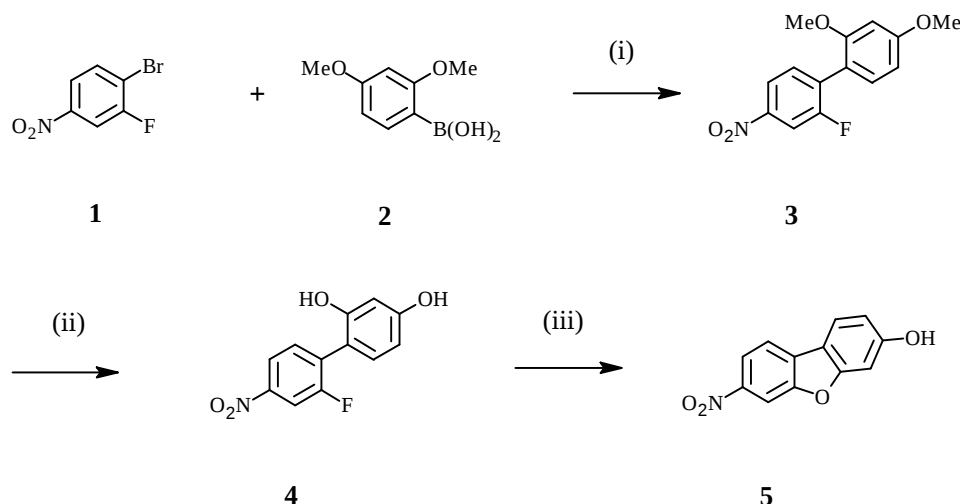


Schéma 90 : (i) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, K_2CO_3 , DMF, H_2O , 80 °C, 4 h, 93% ; (ii) Pyr.HCl, 200 °C, MO, 10 min, 91% ; (iii) Cs_2CO_3 , CH_3CN , 150 °C, MO, 30 min, 78%.

La déméthylation a été ensuite réalisée en présence de chlorure de pyridinium pour donner le biphenyl-2,4-diol **4** souhaité avec un rendement de 91%. En faisant réagir le composé **4**, fluoré en position 2', avec du carbonate de césium à 150 °C dans de l'acétonitrile pendant 30 min sous irradiation micro-ondes, le dibenzofurane **5** souhaité est obtenu par fermeture de cycle intramoléculaire, avec un rendement de 78%.²¹⁴

Dans le même type d'approche, le couplage chimio/régiosélectif de Suzuki entre des 1,2-dihalogénoarènes et l'acide 2-hydroxyphénylboronique conduit biaryl phénol **1**, qui subit ensuite une cyclisation intramoléculaire à base de cuivre(I) thiophène-2-carboxylate pour obtenir le composé **2** avec un bon rendement. Cette méthode a une large variabilité de substrat et permet l'assemblage facile d'une grande variété de dérivés dibenzofuranes (Schéma 91).¹⁷⁷

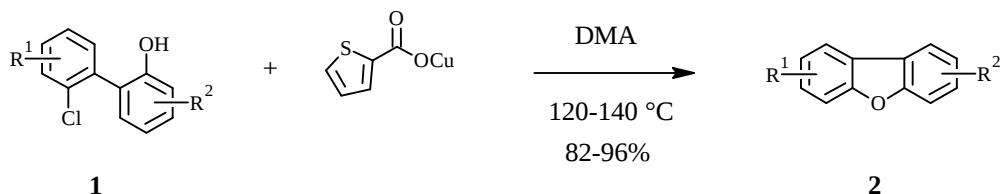


Schéma 91 : Synthèse de dérivés du dibenzofurane **2** à partir de 2-arylphénols chlorés

Termentzi *et al.* ont rapporté la synthèse de biphenyl-2,5-diols **3** chlorés en position 2' et obtenus par réduction des précurseurs arylbenzoquinones **2** (Schéma 92). La cyclisation été réalisée avec succès par substitution nucléophile aromatique intramoléculaire en présence de KOH et NaOAc à haute température dans un tube scellé. Dans certains cas, des améliorations significatives des rendements ont été obtenues sous irradiation par micro-ondes.²⁴⁸

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

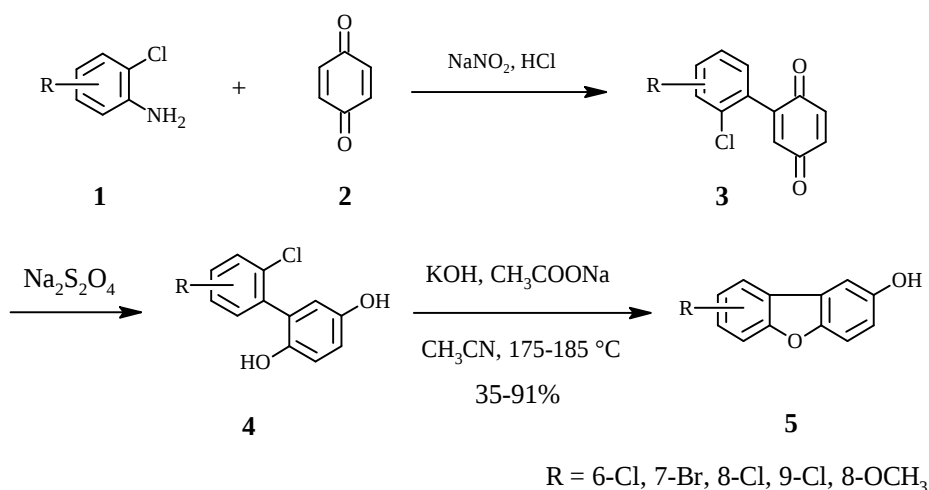


Schéma 92 : Synthèse de dérivés du dibenzofurane **5** à partir de biphenyl-2,5-diols chlorés **4**

Des travaux très récents ont décrit la synthèse de dérivés benzofuraniques trisubstitués à partir de 2'-chloro-(1,1'-biphenyl)-2-ol **2** par un mécanisme de substitution nucléophile radicalaire (SNR1) mettant en jeu une réaction en chaîne impliquant des intermédiaires radicalaires et anions radicalaires (Schéma 93).²⁶⁶ Cette réaction de photocyclisation procédant par transfert monoélectronique est également décrite « en un pot » à partir des précurseurs phénols **4** et dihalogénophényles **5** (Schéma 94).

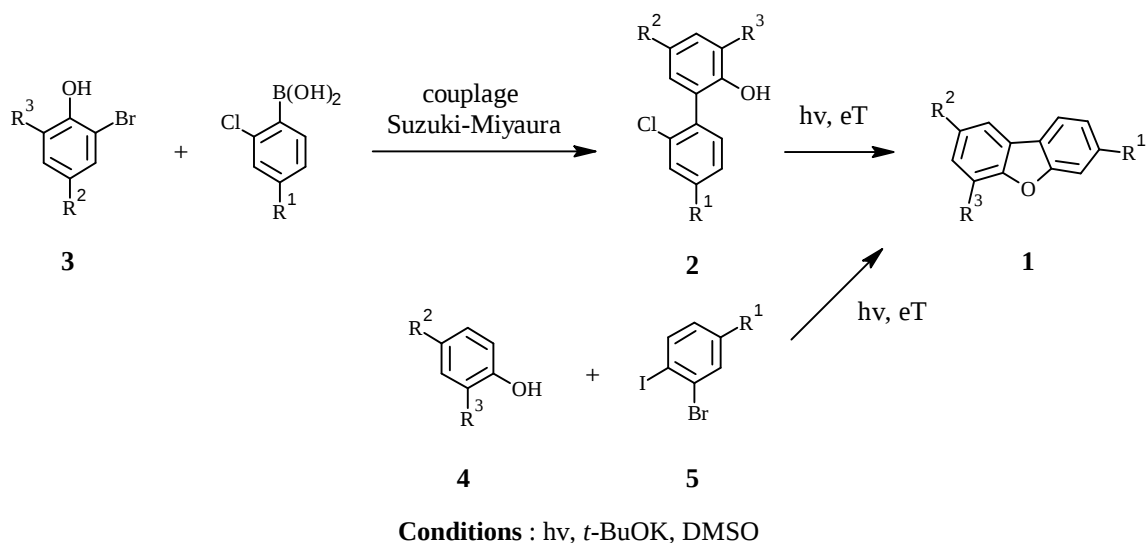


Schéma 93 : Synthèse de dérivés du dibenzofuranes **1** par photocyclisation

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

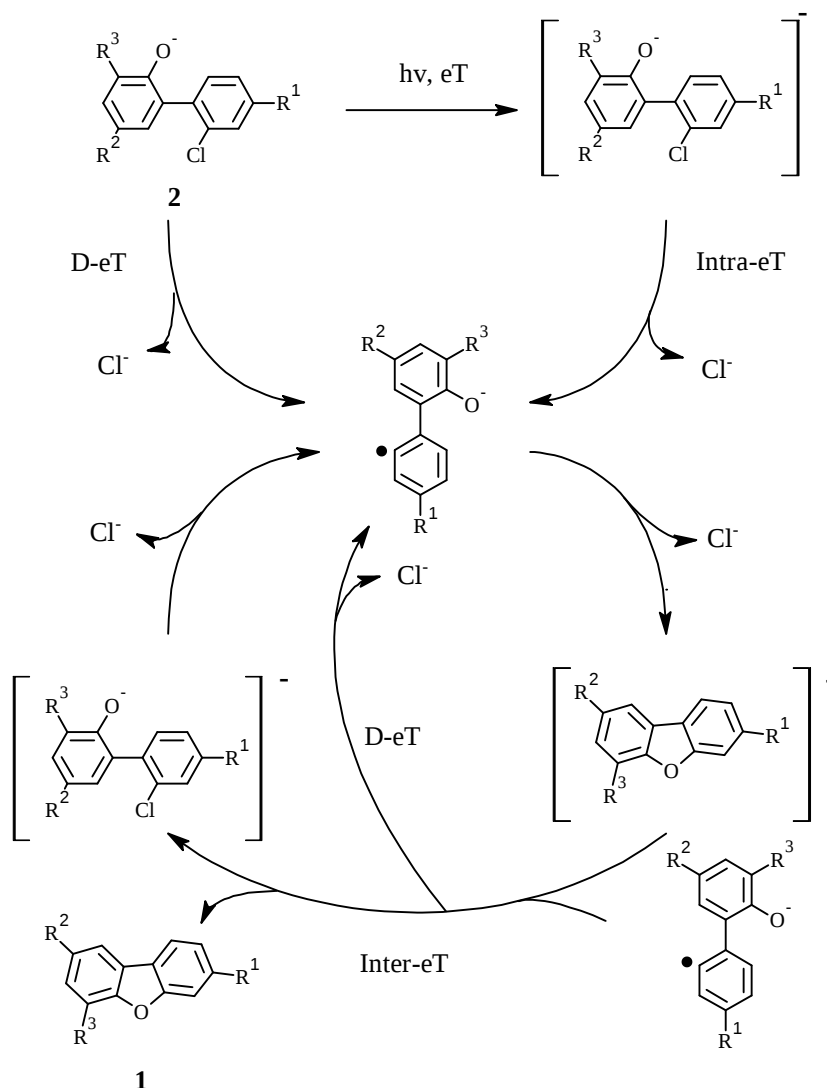
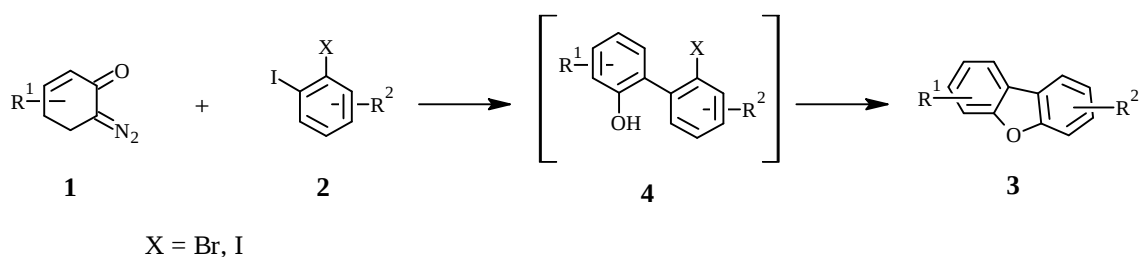


Schéma 94 : Mécanisme proposé pour la synthèse du dibenzofurane **1** par une réaction intramoléculaire SRN1 photoinduite²⁶⁶

Cette réaction supporte des substituants variés sur les entités de départ et conduit à des rendements bons à très bons.

Une méthode originale d'accès à des dérivés benzofuraniques mono-, di- ou trisubstitués a été envisagée par réaction entre des 6-diazo-2-cyclohexénones **1** et des *ortho*-iodobenzènes **2** via un 2'-halo-(1,1'-biphenyl)-2-ol non isolé (Schéma 95).²⁶⁷



Conditions : Pd(PPh₃)₂, K₃PO₄, 1,4-dioxane, 70 °C puis Cu₂O

Schéma 95 : Synthèse de dibenzofuranes à partir de 6-diazo-2-cyclohexénones et d'*ortho*-iodobenzènes

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Le procédé implique une réaction *tandem* de couplage croisé pallado-catalysé/aromatisation suivi d'un couplage d'Ullmann catalysé par le cuivre de l'intermédiaire 2-(2'-haloaryl)phénol formé. Les rendements varient de 61% à 92% pour des substituants, principalement donneurs, de types méthyle ou méthoxy.

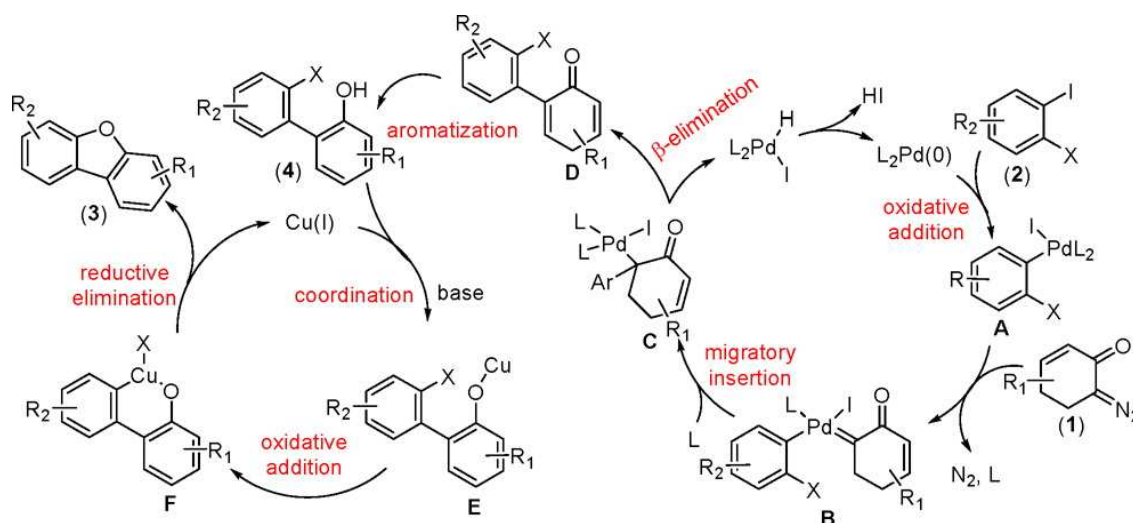


Schéma 96 : Mécanisme proposé²⁶⁸

Un mécanisme est proposé par Cheng Peng et *al.*²⁶⁸ pour le protocole ci-dessus (Schéma 96). Initialement, l'addition oxydante d'iodure d'aryle **2** au catalyseur Pd(0) génère le complexe Pd(II) **A** qui réagit avec le composé diazoïque **1** par la dediazonation et forme le complexe palladium-carbénioïde **B**. Par la suite, l'insertion migratoire du groupe aryle donnerait l'intermédiaire **C**, suivi de l'élimination pour délivrer **D** et pour régénérer le catalyseur Pd(0). Ensuite, l'aromatisation de l'intermédiaire **D** donne du 2-arylphénol **4** dont l'oxygène est coordonné à Cu(I) en présence d'une base pour donner **E**. L'addition oxydante intramoléculaire de **E** produit le complexe Cu(III) **F** qui subit une élimination réductrice pour délivrer le produit final **3** et régénérer le catalyseur Cu(I).

3.2.2. Synthèse des dibenzofuranes à partir de 2-(2'-nitroaryl)phénols

Les travaux de Kumar *et al.* décrivent la synthèse des 2'-nitro-(1,1'-biphenyl)-2-ols **3** et leur transformation en benzofuranes **4** correspondants en utilisant une base (NaH) dans l'HMPA à 80 °C (Schéma 97).²⁶⁹

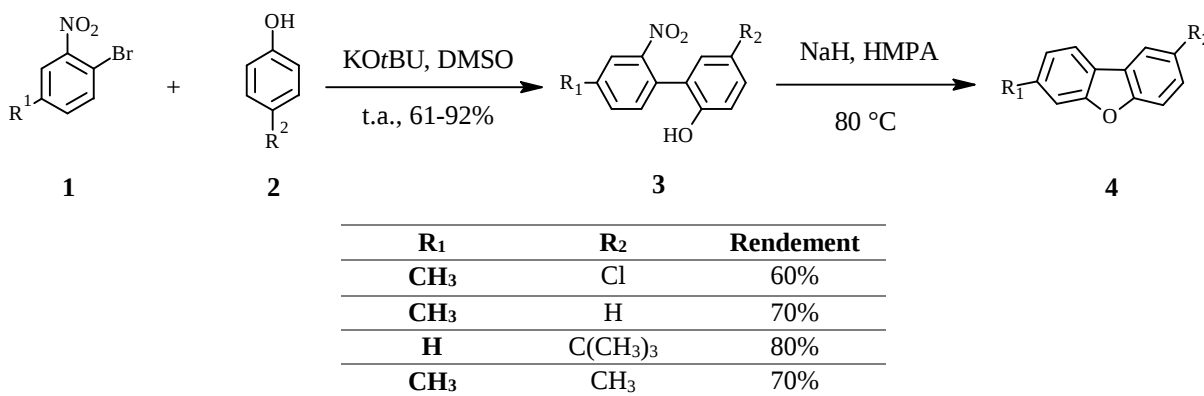


Schéma 97 : Synthèse des dérivés du dibenzofurane **4** à partir de 2-(2'-nitroaryl)phénols

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

De manière intéressante une réaction de CH arylation en position *ortho* du phénol est observée dans la première étape. Ici, la réaction de la base (KOtBu) sur le phénol **2** génère un ion phénate qui se transforme ensuite en carbanion par résonance. L'addition du carbanion sur le bromonitrobenzène **1**, via un mécanisme de S_NA_r favorisé par le nitro attracteur en position *ortho* du brome, suivie de l'extraction du proton et de la réaromatisation conduit aux 2-(2'-nitroaryl)phénols **3** souhaités avec parfois un mélange d'isomères *ortho/para* dû à la délocalisation du phénate et dont les proportions vont dépendre de la position des substituants sur les substrats de départ.

3.2.3. Synthèse des dibenzofuranes à partir du sel de diazonium de 2-(2'-aminoaryl)phénols

Récemment, Cho *et al.* ont rapporté une méthode de synthèse pratique du dibenzofurane utilisant des dérivés de 2-(2'-aminoaryl)phénol par diazotation *in situ* du groupement amino, suivie par une cyclisation C-O intramoléculaire dans des conditions douces par photocatalyse dans le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) (Schéma 98).²⁶⁴

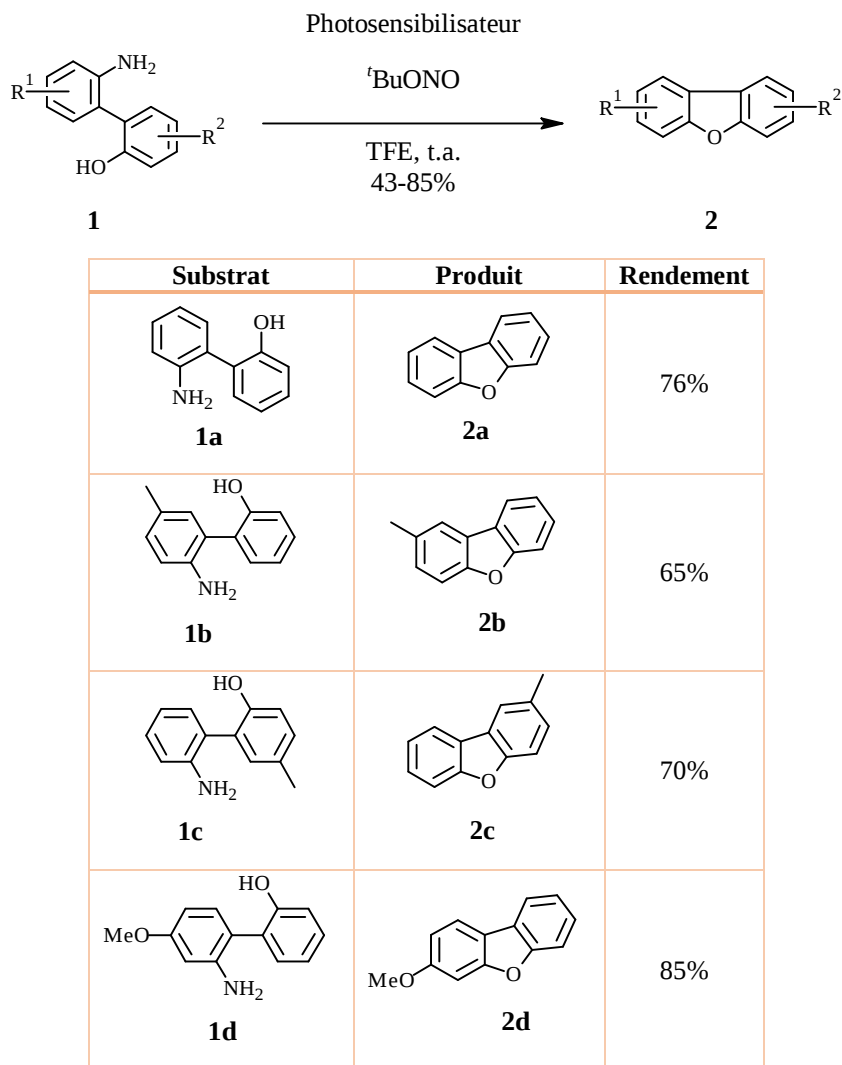


Schéma 98 : Synthèse des dérivés du dibenzofurane par photocatalyse

La transformation nécessite un agent diazotant (tBuONO) et est favorisée par l'utilisation d'un photosensibilisateur organique sous irradiations à la lumière visible.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Un mécanisme pour la cyclisation C-O intramoléculaire avec **1a** est montré dans le schéma 99.

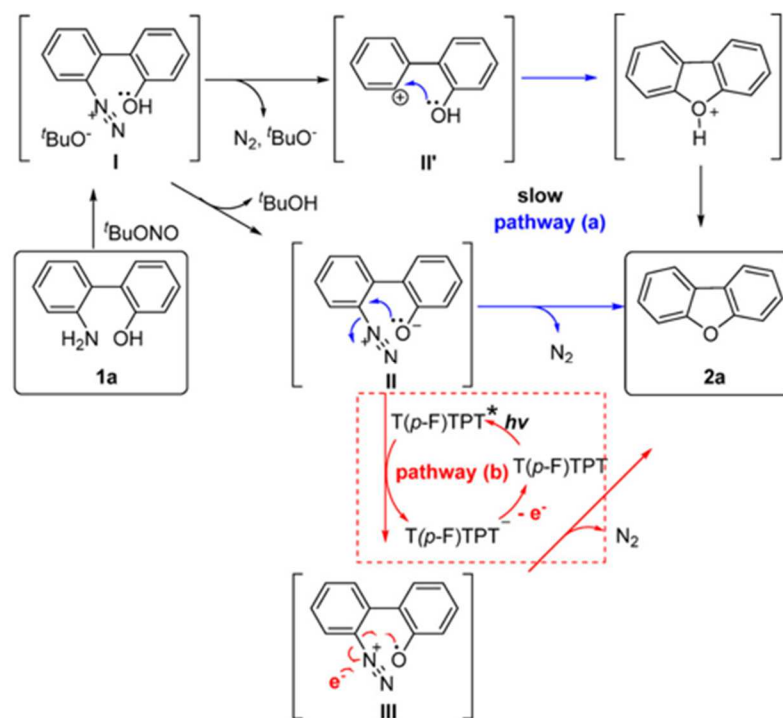


Schéma 99 : Mécanisme de réaction proposé²⁶⁴

La diazotation *in situ* de **1a** par $t\text{BuONO}$ produit le sel de diazonium correspondant **I**. Le produit désiré **2a** peut être synthétisé simplement par substitution nucléophile par l'intermédiaire de la voie **II** ou **II'** (pathway a) où la force motrice du processus est la formation d'azote gazeux stable, ainsi que l'hétérocycle tricyclique, le dibenzofurane. L'utilisation de $\text{T}(p\text{-F})\text{PPT}$ comme photosensibilisateur sous irradiation à la lumière visible a été trouvée ici pour augmenter l'efficacité de la réaction, indiquant l'implication d'un autre processus photocatalytique.²⁷⁰ L'état photoexcité de $\text{T}(p\text{-F})\text{PPT}$ a un potentiel oxydant suffisamment élevé pour oxyder le phénolate de l'intermédiaire **II** avec une force motrice hautement positive par un processus de transfert d'électrons uniques sous irradiation à la lumière visible, fournissant l'intermédiaire oxyradical **III** (pathway b). De plus, dans la voie b, la formation du radical aryle à partir du fragment de sel de diazonium peut être facilitée par la réduction à un seul électron à partir de $\text{T}(p\text{-F})\text{PPT}^-$, régénérant $\text{T}(p\text{-F})\text{PPT}$ dans le cycle photocatalytique. La cyclisation intramoléculaire C-O subséquente pour donner le produit souhaité **2a**.

3.2.4. Cyclisation oxydative des 2-arylphénols en dibenzofuranes

D'après les études de Yoshikai *et al.*, les 2-arylphénols peuvent subir une réaction d'activation de la liaison C-H / formation de la liaison C-O intramoléculaire pour donner des dérivés du dibenzofurane sous catalyse au palladium, en présence de peroxybenzoate de *tert*-butyle en tant qu'oxydant et de 3-nitropyridine comme ligand dans un mélange de solvant aromatique, hexafluorobenzène, et de *N,N'*-diméthylimidazolidinone (Schéma 100).²⁷¹

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

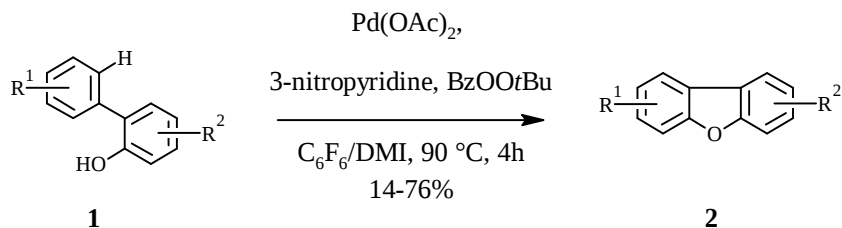


Schéma 100 : Synthèse de dibenzofuranes à partir de dérivés 2-arylphénols

Les auteurs ont exploré la modulation des dérivés 2-arylphénols **1** pour la synthèse de divers dibenzofuranes. Les 2-arylphénols portant des substituants neutres ou donneurs d'électrons ($R^1 = \text{Ph, Me, OMe, SiMe}_3$) sur les positions 3' ou 4' du cycle aryle ont donné les dibenzofuranes **2** correspondants avec un rendement de 49 à 76%. Lorsque la substitution est en position 3', la cyclisation se fait sur le carbone le moins encombré et en position 2' les rendements diminuent. La réaction est compatible avec les substituants halogénés (F, Cl, Br) même si les rendements sont plus bas (34-46%).

Selon la même approche publiée par Xiao *et al.* en 2011, une réaction pallado-catalysée a été développée en présence du ligand IPr, de 2,4,6-triméthylbenzoate de sodium (MesCOONa), de K_2CO_3 , d'un second ligand (4,5-diazafluoren-9-one) nécessaire pour le cycle catalytique dans le mésitylène à 120 °C et en utilisant de l'air comme oxydant. L'étape de limitation du renouvellement du processus peut être une élimination réductrice de C-O au lieu de l'activation de C-H (Schéma 101).²⁷²

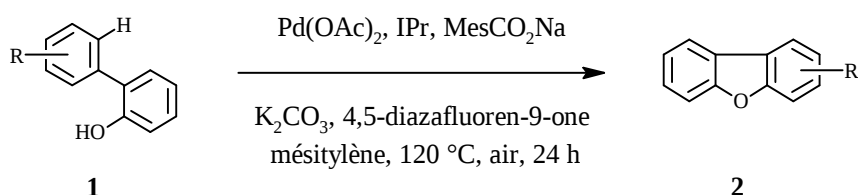


Schéma 101 : Synthèse de dibenzofuranes à partir de dérivés 2-arylphénols

Avec un ensemble optimisé des conditions de réaction, les auteurs ont montré qu'une variété de 2-arylphénols **1** peut être convertie en produit désiré **2** avec des rendements modestes à bons (41-91%). Le noyau aryle tolère différents substituants en R : des groupements donneurs d'électrons tels que céta, silyl, éther ou amine, et des groupements électroattracteurs tels que cyano, cétone, nitro, amide, ester ou sulfonamide.

3.2.5. Conversion des biaryles hydroxylés en dibenzofurane par déshydratation

Au regard des conditions de Arienti *et al.*, la zéolite HSZ-360 (catalyseur) favorise la conversion des biaryles dihydroxylés **1** en dérivés du dibenzofurane **2** avec des rendements moyens par déshydratation (Schéma 102).²⁷³

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

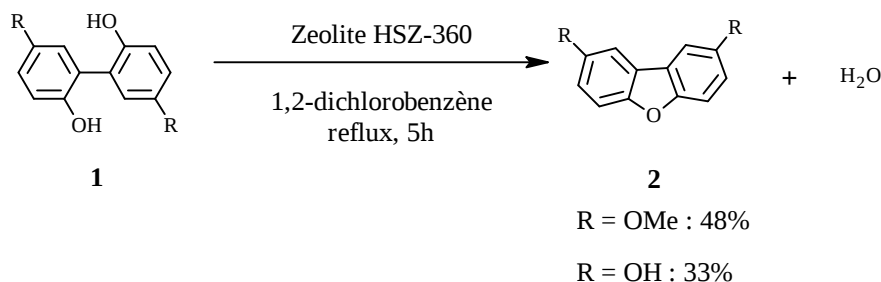


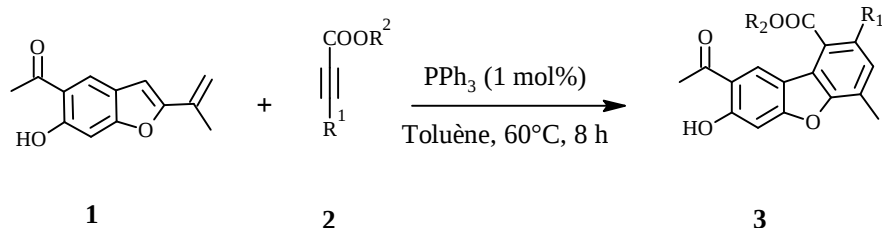
Schéma 102 : Synthèse de dérivés du dibenzofurane **2** à partir de biaryles hydroxylés **1**

Une synthèse équivalente est également décrite dans la littérature en présence de superacide de type résine Nafion-H comme catalyseur de déshydratation, sur le même type de composés, et au reflux de l'*o*-xylène avec des rendements variables de 40 à 90%.²⁷⁴

3.3. Synthèse de nouveaux dérivés du dibenzofurane par réaction de Diels-Alder

Dastoorani *et al.* ont synthétisé de nouveaux dérivés du dibenzofurane par réaction de Diels-Alder de l'euparine avec des esters acétyléniques activés.²⁷⁵ La réaction est réalisée en présence de triphénylphosphine comme catalyseur dans le toluène avec d'excellents rendements (Schéma 103).

La réaction de Diels-Alder est l'une des plus importantes réactions de formation de liaisons C-C en synthèse organique pour l'obtention de systèmes cycliques, avec de nombreuses possibilités pour le contrôle de la stéréochimie et l'introduction de groupes fonctionnels.²⁷⁶



R ¹	R ²	Rendement (%)
COOMe	Me	97
COOEt	Et	98
H	Me	92
H	Et	96

Schéma 103 : Synthèse des dérivés du dibenzofurane **3** par réaction de Diels-Alder

En utilisant ces conditions expérimentales optimisées, l'ester acétylénique acétylènedicarboxylate de méthyle, ainsi que le propiolate de méthyle et/ou d'éthyle, a également été examiné dans la réaction de Diels-Alder en pot avec l'euparine pour obtenir les dérivés de dibenzofurane correspondants, avec de bons rendements.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Ce schéma réactionnel a aussi été appliqué pour accéder au ruscodibenzofurane (Figure 59), un composé d'origine naturelle extrait des racines de *Ruscus aculeatus* L. (Liliaceae), une plante à feuilles persistantes, pour laquelle une variété d'extraits a présenté différentes activités biologiques.²⁷⁷

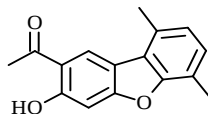


Figure 59 : Structure du ruscodibenzofurane

Della Rosa *et al.* ont également rapporté une procédure en une étape simple, économique et efficace pour synthétiser le système cyclique de type dibenzofurane avec un bon rendement par la réaction Diels-Alder du 2- et du 3-nitrobenzofurane (**1a**, **1b**) et de 1-triméthylsilyloxy-1,3-butadiène (**2**). Un groupement accepteur d'électrons très fort, tel que le groupement nitro, favorise le caractère diénophile de ces composés hétérocycliques. Puisque ce substituant est facilement extrudé dans des conditions thermiques, cette séquence réactionnelle devient une méthode simple pour la préparation de dibenzofuranes (Schéma 104).²⁷⁸

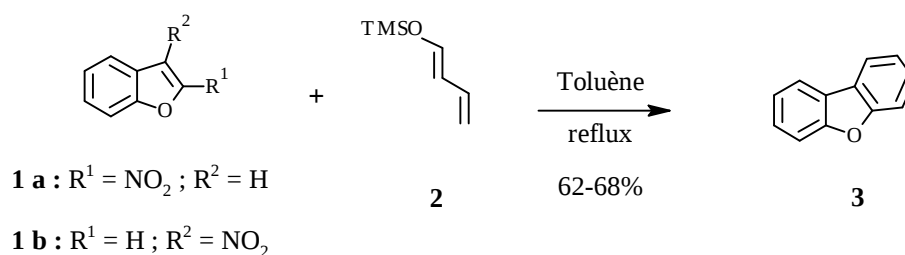


Schéma 104 : Synthèse du dibenzo[b,d]furane **3** par réaction de Diels-Alder

II. Partie théorique : Travaux réalisés

La deuxième démarche de notre travail a consisté à déterminer les différentes voies d'accès envisageables pour la synthèse des dérivés dibenzofuranes analogues du cercosporamide. La structure générale et 4 composés cibles sont représentés sur la figure 60.

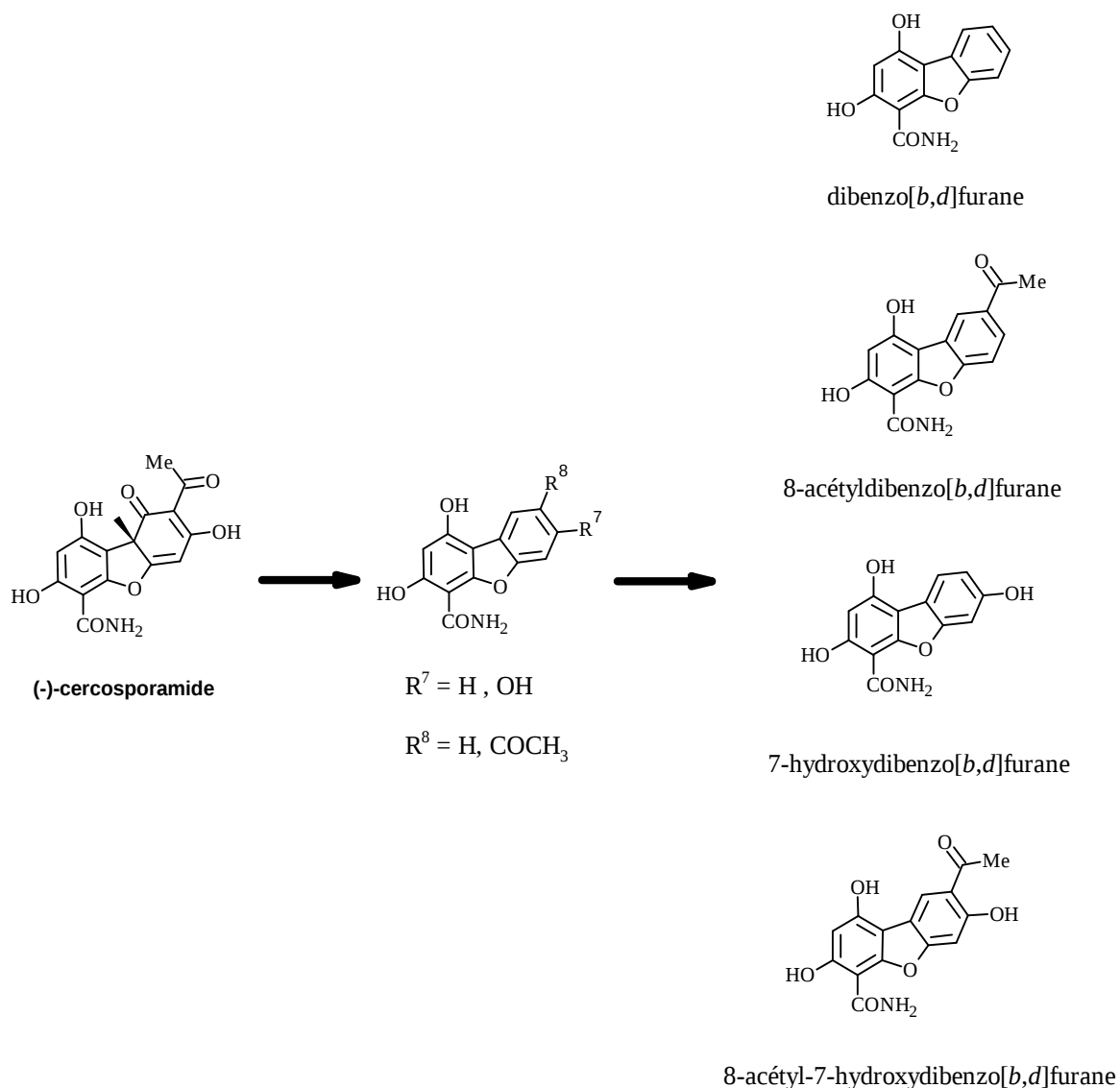


Figure 60 : Analogues envisagés

Les dérivés dibenzo[*b,d*]furanes seront substitués ou non en position 7 par un groupement hydroxyle et en position 8 par un groupement acétyle, tout en conservant la partie dihydroxybenzofurane-carboxamide du cercosporamide.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

1. Synthèse du 1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Les travaux de synthèse ont d'abord été mis en œuvre pour accéder au dérivé dibenzofurane non substitué sur l'un des cycles benzéniques afin de valider le choix de la méthode de synthèse la plus appropriée pour cette série. La structure du composé final est représentée sur la figure 61.

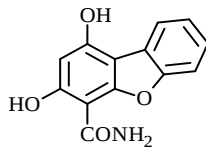


Figure 61 : Structure du composé envisagé

Pour synthétiser l'hétérocycle dibenzofurane, plusieurs démarches peuvent être abordées dont les 3 voies de synthèse proposées sur le schéma suivant (Schéma 105) :

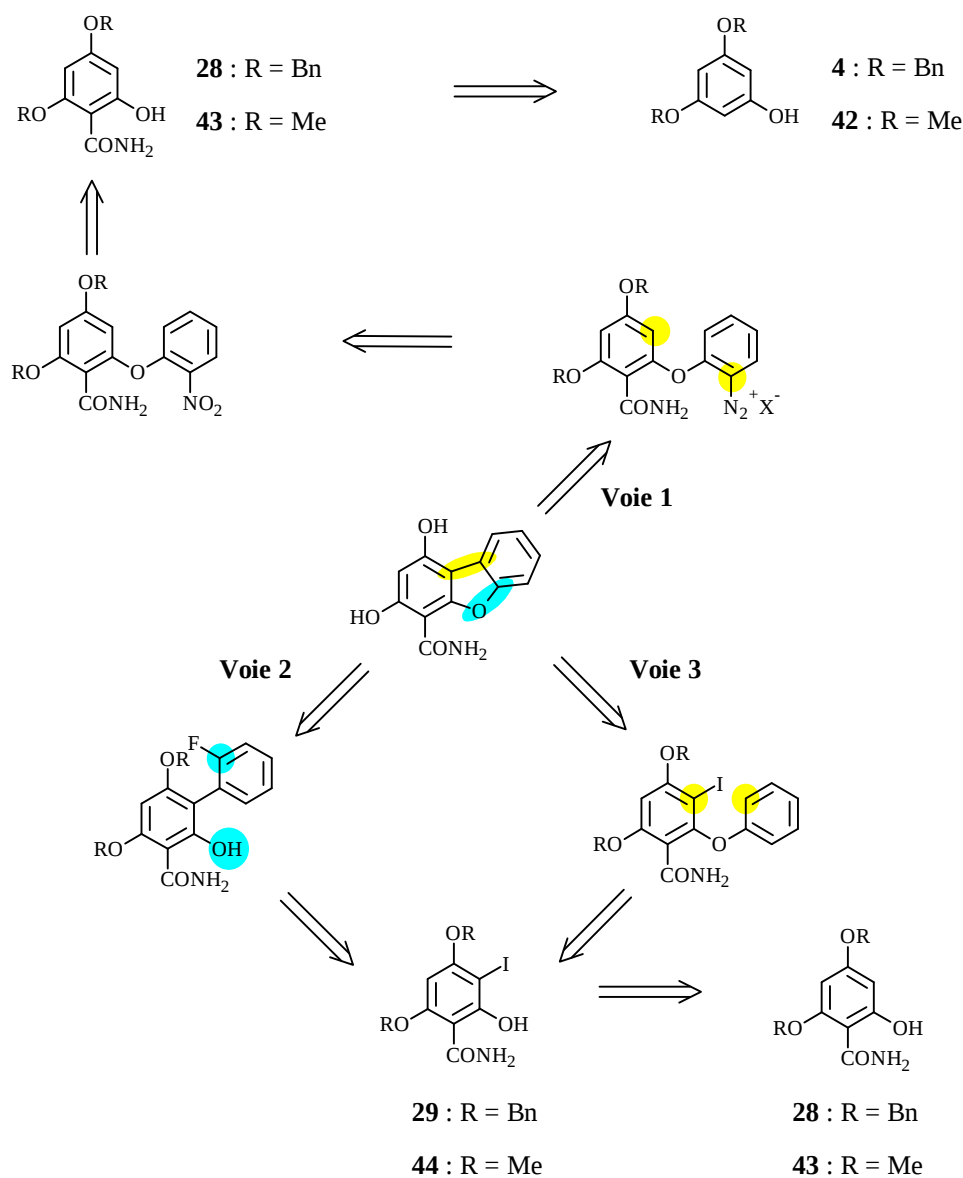


Schéma 105 : Voies d'accès au 1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

Différentes méthodes de synthèse en série dibenzo[*b,d*]furane ont été décrites dans la littérature et trois d'entre-elles nous ont semblé intéressantes à partir des précurseurs **28** et **43** déjà synthétisés pour la série précédente.

La première méthode fait appel à des sels *ortho*-(aryloxy)aryldiazonium intermédiaires pour la formation d'une liaison C-C intramoléculaire (**voie 1**). L'avantage de cette approche est que la fonction nitro, nécessaire pour obtenir les sels de diazonium, permet de favoriser l'accès aux diaryléthers lors de la S_NAr initiale à partir du 1-iodo-2-nitrobenzène et des dérivés phénoliques **28** et **43**. La seconde méthode fait intervenir la formation d'une liaison C-O intramoléculaire à partir de 2-(2'-fluoroaryl)phénols (**voie 2**) obtenus par couplage de Suzuki des précurseurs iodobenzamides **29** et **44**. Enfin, la dernière approche envisage la cyclisation d'*o*-iododiaryléthers obtenus également à partir des iodobenzamides **29** et **44** (**voie 3**).

1.1. Formation du noyau dibenzofurane à partir des sels *ortho*-(aryloxy)aryldiazonium

La synthèse du composé final comporte deux étapes principales :

- La réaction de cyclisation.
- La réaction de préparation des diaryléthers.

Deux voies de synthèse peuvent être envisagées avec introduction de la fonction carboxamide avant ou après cyclisation, respectivement : la première commence à partir des précurseurs benzamides et la deuxième débute par la préparation des dérivés phénoliques (Schéma 106).

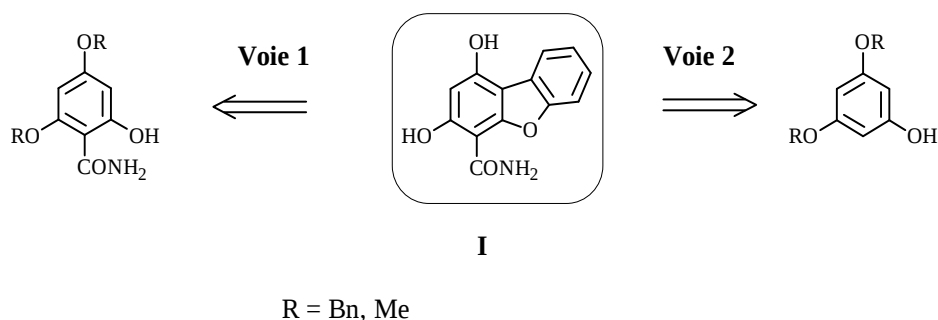


Schéma 106 : Accès au composé cible par deux types de précurseurs

1.1.1. Voie 1 : à partir des précurseurs benzamides

1.1.1.1. Stratégie de synthèse

Le 1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furane-4-carboxamide **I** peut être obtenu en 4 étapes à partir des benzamides **28** et **43** suivant le schéma rétrosynthétique (Schéma 107) :

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

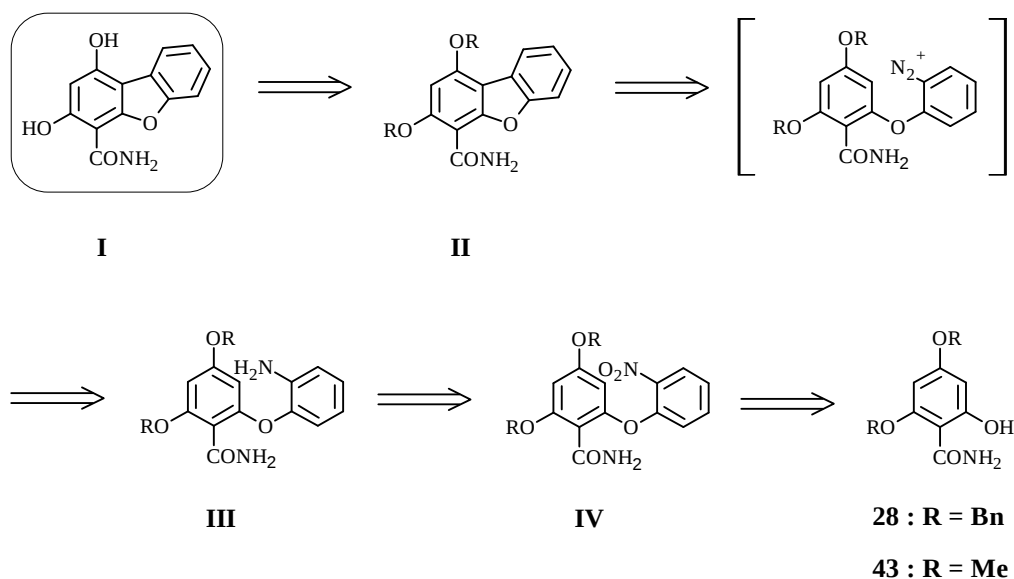


Schéma 107 : Accès au composé cible

Le composé cible **I** sera obtenu après la déprotection du composé **II**. La cyclisation intramoléculaire de sels d'*o*-(aryloxy)aryldiazonium fournira les dibenzofuranes **II**. Le précurseur de type amine aromatique **III** sera obtenu après la réduction du groupe nitro correspondant sur le composé **IV**. Une réaction de couplage catalysée par un métal de transition entre des halogénures d'aryle et les hydroxybenzamides **28** et **43** est la méthode la plus simple pour la préparation des diaryléthers **IV**.

1.1.1.2. Travaux réalisés

a. A partir du 2,4-bis(benzyloxy)-6-hydroxybenzamide (**28**)

Il convient dans un premier temps d'accéder au composé intermédiaire diaryléther. Le composé **28** réagit avec le 1-iodo-2-nitrobenzène en présence d'une base comme agent de déprotonation dans le DMF pour donner l'intermédiaire nitrodiaryléther **49** (Schéma 108).²⁶³

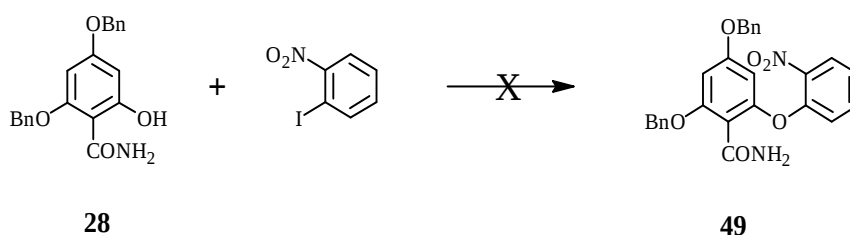


Schéma 108 : Synthèse de l'éther diarylique **49**

Afin d'effectuer la synthèse de l'intermédiaire éther diarylique, différentes conditions ont été testées (Tableau 21), selon les réactions décrites dans la littérature.^{261,280} Différents bases ont alors été testées, un ligand (*N,N*-diméthylglycine) a également été utilisé.²⁶³

Malheureusement, l'analyse du produit brut après traitement montre que l'éther de nitrodiaryle désiré n'a pas été formé. Le produit **28** est entièrement retrouvé dans le mélange réactionnel. La matière de départ a été récupérée.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Tableau 21 : Conditions utilisées pour l'obtention de l'éther diarylique 49

Essai	[Cu]	Base	Ligand	Solvant	Conditions	Résultats
1	Cu	K ₂ CO ₃	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
2	Cu	K ₃ PO ₄	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
3	Cu	CS ₂ CO ₃	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
4	Cu	NaH	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
5	Cu	KOH	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
6	CuI	CS ₂ CO ₃	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
7	CuI	NaH	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
8	CuI	KOH	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ

Du fait des problèmes rencontrés lors de cette étape, nous avons décidé de changer le groupe protecteur benzyle par le groupe protecteur méthyle pour protéger les fonctions phénoliques car l'échec pourrait être expliqué par le fait que le groupement benzyle est trop encombrant lors de la réaction de substitution nucléophile aromatique.

b. A partir du 2-hydroxy-4,6-diméthoxybenzamide (43)

Les mêmes conditions réactionnelles que précédemment sont appliquées pour la synthèse du diaryléther **50** à partir du composé **43** qui a réagit avec le 1-iodo-2-nitrobenzène en milieu basique (Schéma 109).

Etant donné qu'il semble difficile de former le diaryléther, plusieurs essais ont été mis en œuvre afin d'améliorer la conversion du dérivé **43** et les résultats sont présentés dans le tableau 22 suivant :

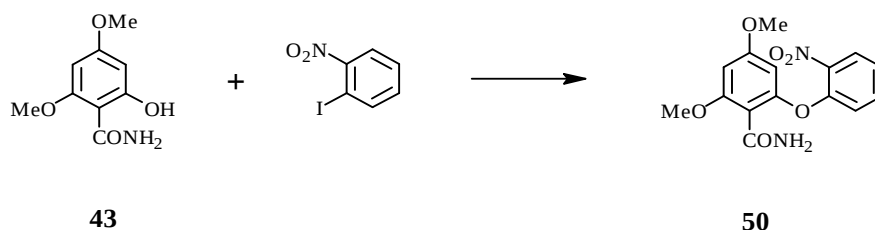


Schéma 109 : Synthèse de l'éther diarylique 50

Tableau 22 : Conditions utilisées pour l'obtention de l'éther diarylique 50

Essais	[Cu]	Base	Ligand	Solvant	Conditions	Résultats
1	Cu	CS ₂ CO ₃	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
2	Cu	NaH	-	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
3	Cu	KOH	-	DMF	24 h, 170 °C	15%
4	CuI	CS ₂ CO ₃	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
5	CuI	NaH	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	Produit de départ
6	CuI	KOH	<i>N,N</i> -diméthylglycine	DMF	24 h, 170 °C	11%

Les essais 1 et 2 n'ont pas fonctionné, seul le produit de départ était retrouvé en fin de réaction.²⁸¹

L'essai 3 a abouti, cependant le produit souhaité est obtenu avec un rendement très faible de 15%.²⁸⁰

Afin d'améliorer le rendement de la réaction, nous avons décidé d'ajouter un ligand (*N,N*-diméthylglycine) (essais 4, 5).²⁶³ Malheureusement ces essais se sont révélés être sans succès. L'essai 6 a permis d'obtenir, en présence de KOH, le produit attendu, mais avec un rendement trop faible de 11%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Dans tous les cas, la conversion du produit de départ n'est pas totale au bout de 24 h et on observe une dégradation du milieu réactionnel. Cependant, comparé aux résultats obtenus pour la synthèse de l'intermédiaire nitrodiaryléther **49**, la présence du groupement méthyle améliore très légèrement la réactivité du dérivé phénolique **43** utilisé.

Le faible rendement pourrait être expliqué par le fait que la fonction carboxamide empêcherait la réaction en diminuant la nucléophilie du phénate formé à cause de son effet attracteur d'électrons. Ainsi, pour faciliter les étapes de synthèse, la fonction amide pourrait être introduite après la cyclisation.

1.1.2. Voie 2 : à partir des dérivés phénoliques

1.1.2.1. Stratégie de synthèse

Le composé cible **I** peut être obtenu en 5 étapes. Le schéma rétrosynthétique mis en place est décrit sur le schéma 110.

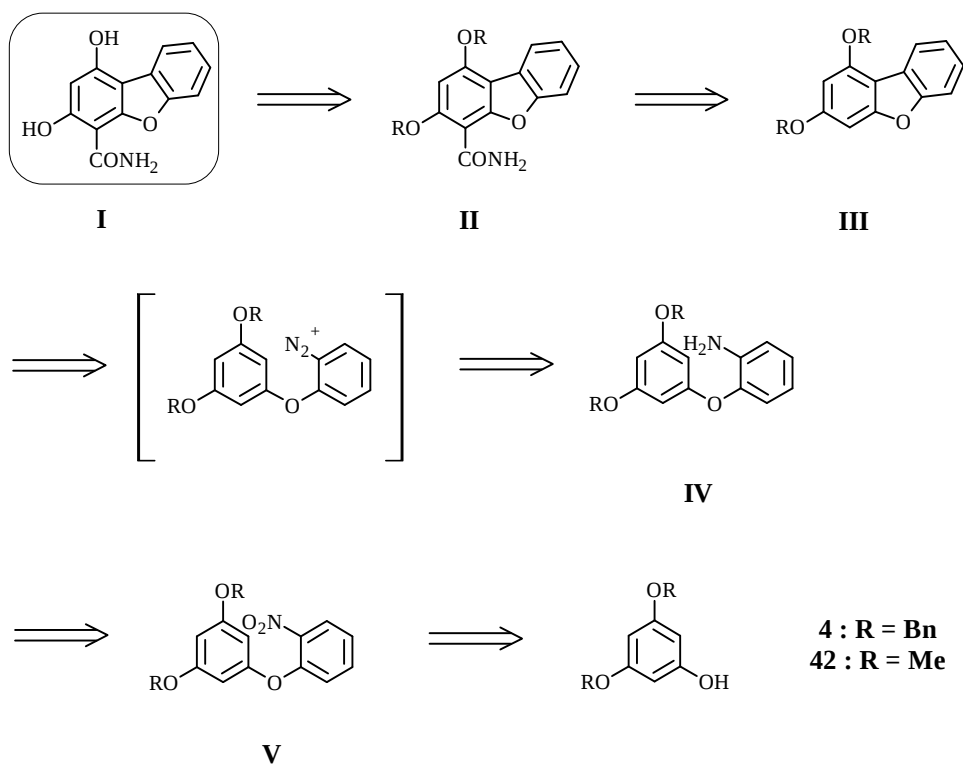


Schéma 110 : Rétrosynthèse envisagée

La même séquence réactionnelle que précédemment sera appliquée pour obtenir le composé cible **I**. Le groupe carboxamide du composé **II** pourra cependant être incorporé directement par substitution électrophile aromatique avec l'isocyanate de chlorosulfonyle sur le dérivé dibenzofuranique **III**.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

1.1.2.2. Travaux effectués

a. A partir du 3,5-dibenzyloxyphénol (4)

Pour la première étape, nous avons synthétisé le 1,3-dibenzyloxy-5-(2-nitrophénoxy)benzène (**51**) à partir du 3,5-dibenzyloxyphénol (**4**) et du 1-iodo-2-nitrobenzène dans des conditions basiques (Schéma 111).²⁸⁰ Le produit désiré est isolé avec un bon rendement de 73%.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus précédemment, on note que la présence de la fonction amide empêche la réaction aboutissant à la formation du composé intermédiaire nitrodiaryléther.

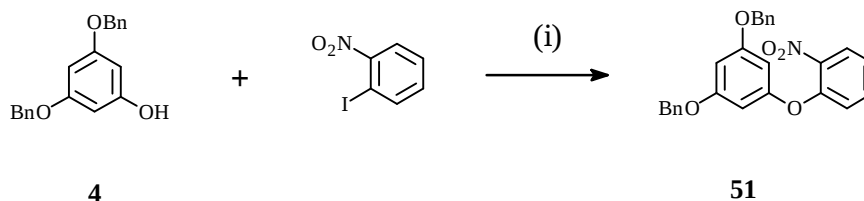


Schéma 111 : (i) 1) KOH, DMF, 120 °C, 30 min ; 2) 1-iodo-2-nitrobenzene, Cu, 170 °C, 2 h, 73%.

Le composé nitré **51** a ensuite été réduit pour donner l'amine aromatique **52** correspondante. Plusieurs conditions ont été testées avant d'optimiser cette synthèse. (Schéma 112 ; Tableau 23).

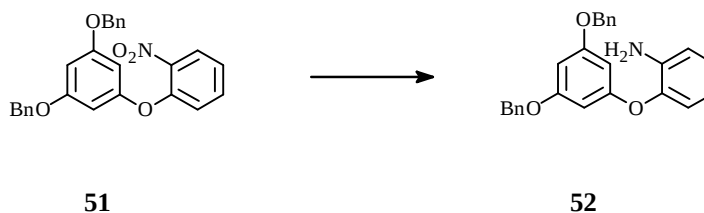


Schéma 112 : Réaction de réduction composé nitré **51**

Tableau 23 : Mise au point de la réduction de la fonction nitro

Essai	Réactifs	Solvant	Temps	Température	Résultats
1	SnCl ₂	MeOH	24 h	80 °C	Aucune réaction
2	SnCl ₂ , HCl	MeOH	24 h	80 °C	65%
3	Zn, NH ₄ Cl	MeOH	2 h	80 °C	92%

L'essai 1 est effectué par réduction chimique en présence de chlorure d'étain dans le MeOH, sans succès, et le composé de départ est récupéré.²⁸²

Le groupement nitro est finalement réduit par du chlorure d'étain dans l'acide chlorhydrique concentré pendant 24 h (essai 2).²⁸² Le composé aminé **52** est obtenu avec un rendement de 65%.

De la même manière, la fonction nitro a été réduite par de la poudre de zinc avec du chlorure d'ammonium pendant 2 h et cela a permis d'obtenir le composé aminé **52** avec un bon rendement de 92%.²⁸³

La cyclisation du composé **52** a lieu après la transformation de la fonction amine primaire aromatique en un sel de diazonium, qui est ensuite chauffé avec de la poudre de cuivre²⁸⁴ ou de l'oxyde de cuivre(I)²⁸⁰ pour former le composé désiré **53**. Malheureusement, seulement 8% de formation du composé **53** a été observée en UPLC-MS, une réaction de

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

dénitration sans cyclisation conduit à un produit secondaire diaryléther très majoritaire au bout de 30 min (Schéma 113).

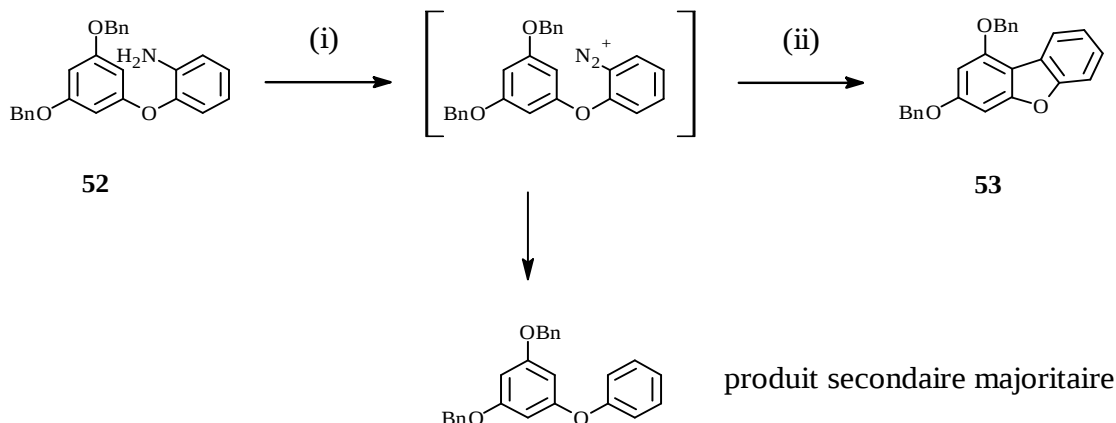


Schéma 113 : (i) NaNO_2 , H_2SO_4 25%, 0 °C, 45 min ; (ii) Cu, 60 °C, 24 h, 6%; ou Cu_2O , 70 °C, 24 h, 8%.

Des problèmes de synthèse sont rencontrés dès l'étape de cyclisation du composé **52**, bloquant de ce fait toute la suite de la synthèse pour l'obtention du composé cible. Ainsi, comme dans l'approche précédente, l'analogue diméthylé du dérivé phénolique **4** a été envisagé comme produit de départ.

b. A partir du 3,5-diméthoxyphénol (**42**)

La même séquence réactionnelle adoptée dans la série précédente sera appliquée pour obtenir le dibenzofurane **I** (Schéma 111 cf. p 126). Dans cette stratégie, les groupes hydroxyles sont protégés par des groupements méthyles dans le but d'améliorer l'étape de cyclisation.

En suivant le mode opératoire décrit précédemment, l'hydroxyde de potassium est utilisé pour déprotoner le 3,5-diméthoxyphénol (**42**) afin de former du phénolate de potassium que l'on fait réagir avec le 1-iodo-2-nitrobenzène pour obtenir l'intermédiaire nitrodiaryléther **54** avec un rendement de 78% (Schéma 114).²⁸⁰ A noter également que sans la fonction carboxamide, la réaction de synthèse de l'intermédiaire diaryléther se déroule facilement.

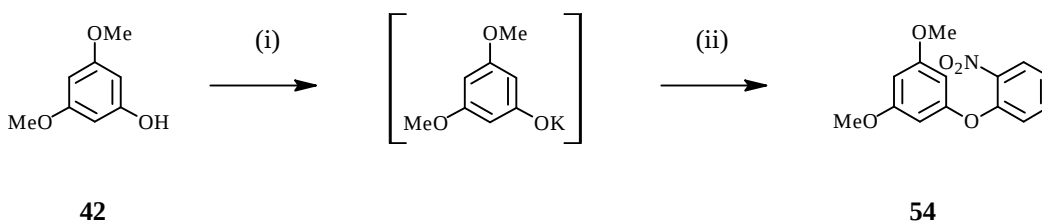


Schéma 114 : (i) KOH, DMF, 120 °C, 30 min ; (ii) 1-iodo-2-nitrobenzène, Cu, 170 °C, 2 h, 78%.

La fonction nitro a été réduite par de la poudre de zinc avec du chlorure d'ammonium formant le produit aminé **55** avec un bon rendement de 92% pour un temps réactionnel de 2 h (Schéma 115).²⁸³

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

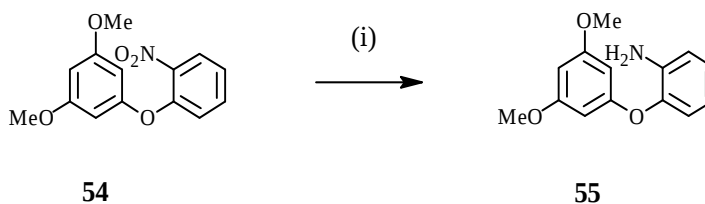


Schéma 115 : (i) Zn, NH₄Cl sat, CH₃OH, 80 °C, 2 h, 92%.

La cyclisation du composé **55**, en suivant la méthode précédente, s'est déroulée après la réaction de la fonction amino avec le nitrite de sodium pour former le sel de diazonium qui est ensuite chauffé avec du cuivre²⁸⁴ ou de l'oxyde de cuivre(I)²⁸⁰ pour former le composé désiré **56** (Schéma 116).

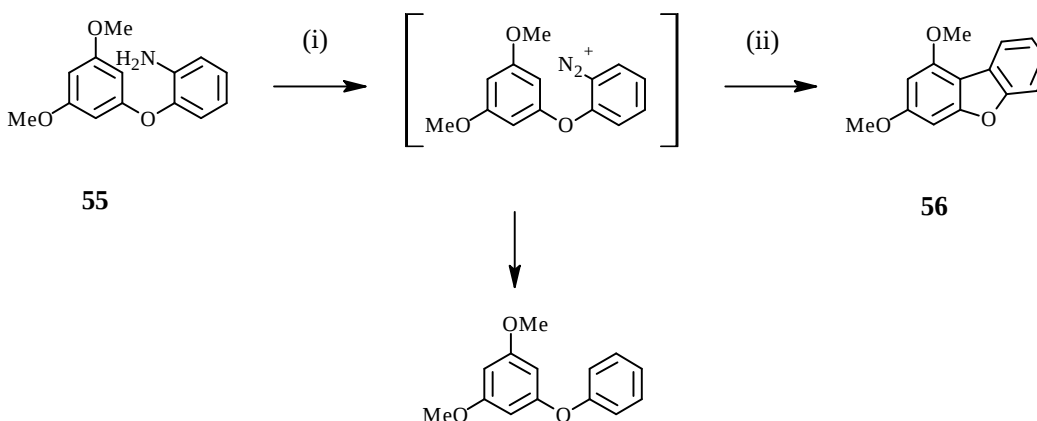


Schéma 116 : (i) NaNO₂, H₂SO₄ 25%, 0 °C, 45 min ; (ii) Cu, 60 °C, 24 h, 11% ; ou Cu₂O, 70 °C, 24 h, 28%.

Cependant, seulement 28% de formation à partir du composé **55** a été observée en UPLC-MS après 24 h. L'augmentation du temps de réaction jusqu'à 48 h et l'augmentation de la température jusqu'à 90 °C ne permet pas d'augmenter de façon significative la cyclisation, celle-ci n'excédant pas 30%. On a noté qu'un mélange du produit cyclisé et non cyclisé (diaryléther non aminé) est obtenu. Lorsque le temps réactionnel est plus long, une dégradation du milieu réactionnel est observée.

Cette voie de synthèse a été abandonnée car elle n'a pas donné de meilleurs résultats.

En conclusion, les conditions de réaction pour la formation de dibenzofuranes à partir d'*o*-(aryloxy)anilines diazotées sont restées sans succès. Le composé final initialement souhaité pour cette stratégie n'a pu être synthétisé. Toutefois, cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir un composé intermédiaire **54** intéressant pour la suite de nos travaux.

En effet, compte tenu des résultats de la littérature, un couplage CH/CH diaryle oxydant dans les conditions de Fagnou²⁶² nous permettrait d'accéder à un nitrodibenzofurane **I** (Schéma 117) dont la fonction nitro est facilement remplacée par un hydrogène *via* la réduction du sel de diazonium correspondant. D'autre part, cette approche a aussi l'avantage de fonctionnaliser le bicycle avec une fonction nitro susceptible d'apporter de la diversité fonctionnelle notamment après réduction en amine.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

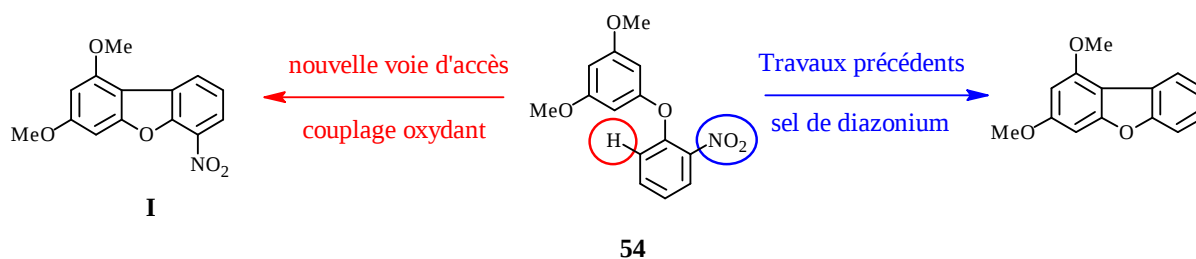


Schéma 117 : Réactivité du composé 54

1.2. Synthèse de dibenzofuranes par couplage diaryle oxydant pallado-catalysé

Il conviendra donc d'étudier les conditions de cyclisation du composé diaryléther **54** en s'inspirant des travaux effectués en 2008 par Liégault *et al.*. Selon les auteurs, la formation oxydative de liaison carbone-carbone intramoléculaire catalysée par le palladium(II) dans l'acide pivalique comme solvant, à la place de l'acide acétique, conduit à une plus grande reproductibilité, des rendements plus élevés et une plus large diversité du substrat.²⁶²

1.2.1. A partir du 1,3-diméthoxy-5-(2-nitrophénoxy)benzène (**54**)

1.2.1.1. Stratégie de synthèse

La rétrosynthèse envisagée pour atteindre le composé cible **I** est donc la suivante (Schéma 118) :

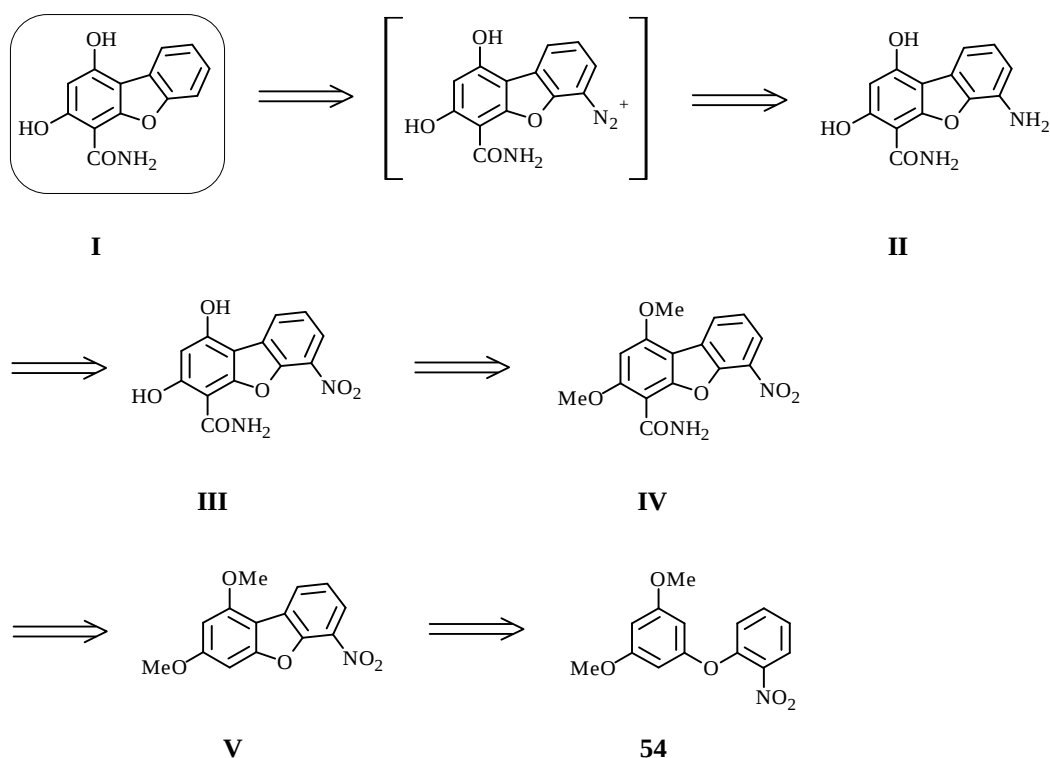


Schéma 118 : Accès au composé cible I

Le composé dibenzofurane cible **I** peut être obtenu en 5 étapes suivant les procédures précédemment décrites.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

La désamination du groupe amino du composé **II** permettra d'obtenir le composé cible **I**. Le composé **II** sera isolé après la réduction de la fonction nitro du composé **III** issu de la déméthylation des groupes méthoxy du composé **IV**. Une aminocarbonylation directe en C-4 du dérivé dibenzofurane **V** sera réalisée, ce dernier étant obtenu par formation d'une liaison C-C à partir du précurseur **54**.

1.2.1.2. Travaux effectués

Pour la première étape, la cyclisation en dibenzofurane par une activation C-H *ortho*-dirigée était appropriée pour la fermeture du cycle médiée par le palladium. Les temps de réaction ont été significativement raccourcis et de meilleurs rendements ont été obtenus lorsque de l'acétate d'argent (AcOAg) a été utilisé à la place du carbonate de potassium. Le composé **57** est isolé avec un rendement de 72% pour un temps réactionnel de 4 h (Schéma 119 et Tableau 24).²⁶²

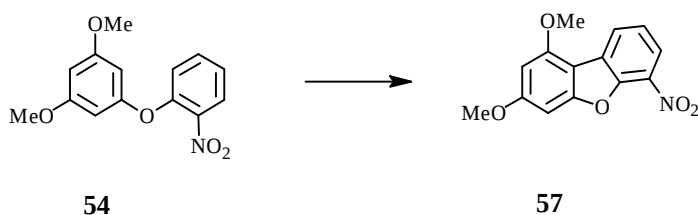


Schéma 119 : Cyclisation du diaryléther 54

Tableau 24 : Mise au point de la cyclisation du diaryléther 54

Essai	Réactif	Solvant	Température	Temps	Résultats
1	K ₂ CO ₃	PivOH	130 °C	24 h	6% de conversion
2	AcOAg	PivOH	130 °C	4 h	72%

Afin d'améliorer les conditions expérimentales, un essai non optimisé d'irradiation micro-ondes a été effectué permettant de diminuer le temps de réaction à 30 min et d'isoler le composé **57** avec un rendement de 45%. Lorsque la réaction est effectuée en tube scellé et sous irradiation micro-ondes, le rendement n'est pas meilleur par rapport au chauffage classique.

Dans la seconde étape, une aminocarbonylation directe en C-4 du dérivé dibenzofurane **57**, en utilisant du chlorosulfonyl d'isocyanate comme réactif électrophile, conduit au composé **58** après hydrolyse acide de l'intermédiaire *N*-chlorosulfonylcarboxamide correspondant (Schéma 120). Le composé **58** est obtenu avec un rendement de 53%.¹²⁸ A noter que la régiosélectivité de l'attaque électrophile a été confirmée par comparaison des données spectrales de RMN ¹H du composé **61** obtenu ultérieurement par une autre voie à partir du précurseur **64** (cf. p 140) pour lequel le CONH₂ est installé avant C-O cyclisation.

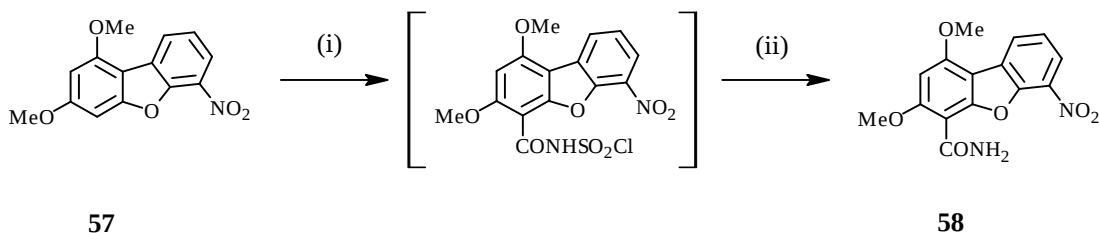


Schéma 120 : (i) CSI, CH₃CN, t.a., 6 h ; (ii) HCl 5M, t.a., 6 h, 53%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Le rendement de cette réaction étant plutôt modeste, nous avons essayé de prolonger le temps réactionnel jusqu'à 12 h (étape 1), 24 h (étape 2) en chauffant le milieu réactionnel à 80 °C. Malheureusement, aucun de ces changements de conditions expérimentales n'a amélioré la réaction développée initialement.

Ensuite, la déméthylation du groupe méthoxy a été effectuée. Deux essais de déméthylation sont réalisés avec deux types de réactifs spécifiques de la déprotection d'éthers méthyliques en série aromatique que sont l'acide de Lewis tribromure de bore^{280,285,286} et le chlorhydrate de pyridinium²¹⁴.

La déméthylation par trois équivalents de tribromure de bore dans le dichlorométhane à la température ambiante ou par dix équivalents de chlorhydrate de pyridinium pure à 200 °C dans un four à micro-ondes conduit au dérivé dihydroxylé correspondant (Schéma 121 et tableau 25).

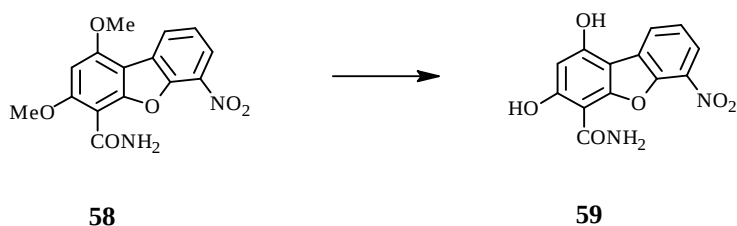


Schéma 121 : Déméthylation des méthoxy

Tableau 25 : Mise au point de la déméthylation

Essai	Réactif	Solvant	Conditions	Résultats
1	BBr ₃ (3 éq)	CH ₂ Cl ₂	t.a., 2 h	46%
2	Pyridine.HCl	-	200 °C, MO, 15 min	72%

La conversion du produit de départ est totale dans chaque cas, mais il y a des problèmes de purification. Dans ces deux cas, le produit voulu a pu être isolé. Le composé **59** est obtenu avec un rendement satisfaisant de 72% avec la seconde méthode qui est donc retenue.

En suivant le protocole publié par Kelly *et al.*, la fonction nitro a été réduite en utilisant du zinc et du chlorure d'ammonium pour former le composé **60** avec un rendement de 62% (Schéma 122).²⁸³

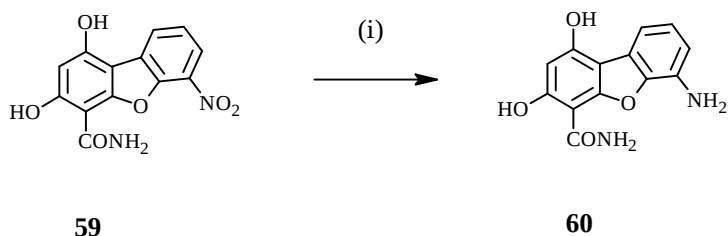


Schéma 122 : (i) Zn, NH₄Cl sat, CH₃OH, 80 °C, 2 h, 62%.

Afin d'améliorer les conditions expérimentales, le milieu réactionnel a été chauffé à 110 °C permettant de diminuer le temps de réaction à 30 min, mais il ne permet pas d'augmenter le rendement de cette synthèse.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Finalement, la désamination du groupe amino du composé **60** a été effectuée selon la procédure précédemment décrite, par chauffage *via* le sel de diazonium, pour fournir le composé cible **61** avec un rendement de 52% (Schéma 123).²⁸⁰

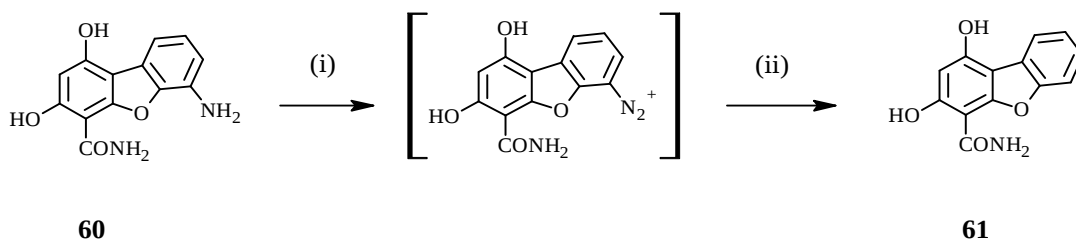


Schéma 123 : (i) H₂SO₄ 25%, NaNO₂, EtOH, 0 °C ; (ii) 80 °C, 45 min, 52%.

Dans le but de juger du rôle de la fonction carboxamide sur l'activité biologique, nous avons décidé de synthétiser le dérivé dihydroxydibenzofurane **62**. Dans ce cas, la déméthylation des groupements méthoxy du composé **57** a également été réalisée par chauffage dans du chlorhydrate de pyridinium pure avec un rendement de 66% (Schéma 124).²¹⁴

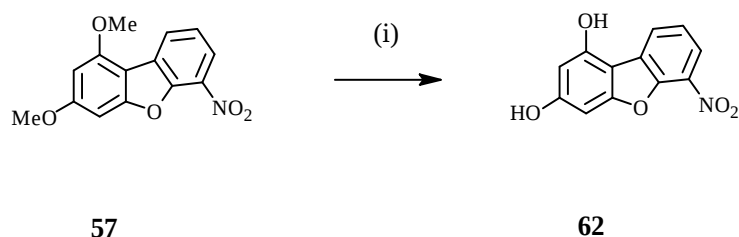


Schéma 124 : (i) Pyridine.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 66%.

En conclusion, le composé cible est obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 8,8% à partir du diéthyléther **54**. Dans cette voie, cinq composés (**58**, **59**, **60**, **61**, **62**) seront testés en biologie.

Le rendement global obtenu pour cette synthèse est faible. Ainsi, dans le but de l'améliorer, nous avons décidé de développer un schéma réactionnel en réalisant l'étape de déprotection des méthoxy en fin de synthèse, après suppression du groupement nitro. Pour rappel dans l'approche précédente, les méthoxy sont déprotégés avant l'étape de désamination.

1.2.2. Modification de la voie de synthèse pour obtenir le composé 61

De la même manière que précédemment décrit pour l'obtention du composé **61**, la fonction nitro a été réduite en utilisant du zinc et du chlorure d'ammonium pour former le composé **63** (Schéma 125).²⁸³

Le composé **63** est obtenu avec un rendement de 49%. Le rendement est faible bien que la conversion du produit de départ soit totale, sans doute à cause d'une purification non optimale. Nous avons tenté d'améliorer le rendement de cette réaction en utilisant la méthode publiée par Blanchard *et al.*²⁸² Le groupe nitro est réduit par du SnCl₂ dans l'acide chlorhydrique concentré pendant 24 h, cependant cela ne permet pas d'obtenir le composé **63**, et on observe une dégradation du milieu réactionnel.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

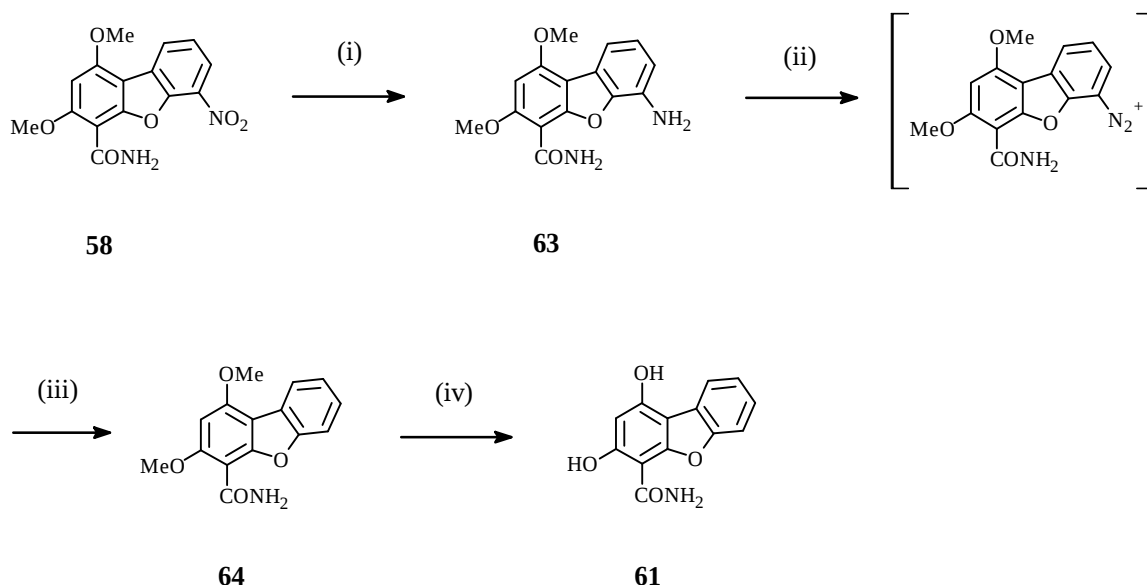


Schéma 125 : (i) Zn, NH₄Cl sat, CH₃OH, 80 °C, 2 h, 49% ; (ii) H₂SO₄ 25%, NaNO₂, EtOH, 0 °C ; (iii) 80 °C, 45 min, 46% ; (iv) Pyr.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 48%.

Ensuite, la désamination du composé **63** s'est déroulée après la réaction de la fonction amino avec le nitrite de sodium, *via* la décomposition thermique du sel de diazonium pour installer un hydrogène après départ de diazote et fournissant le composé **64** avec un rendement de 46%.²⁸⁰ Le rendement est faible à cause de la dégradation du milieu réactionnel.

Finalement, la déméthylation des groupes méthoxy a été réalisée par chauffage dans le chlorhydrate de pyridinium pur à 200 °C sous irradiation micro-ondes, ce qui a conduit à une conversion complète de **64** pour fournir le composé cible **61** avec un rendement de 48%.²¹⁴ Le faible rendement est essentiellement dû à des problèmes d'extraction lors du traitement et de purification.

En conclusion, cette stratégie a conduit à la production du composé final avec, une fois encore, un rendement global faible de 4,1% à partir du diaryléther **54**. Ce rendement est divisé par 2 par rapport à l'approche précédente et donc il convient dans ce schéma de déprotéger les méthoxy avant la réaction de désamination du noyau dibenzofurane. Nous avons naturellement choisi de développer une autre stratégie afin d'améliorer le rendement global et d'optimiser le protocole général qui sera employé dans la pharmacomodulation ultérieure.

Dans cette voie, deux composés (**63**, **64**) seront testés en biologie.

1.2.3. Obtention du composé 61 à partir du 3,5-diméthoxyphénol (42)

Tout d'abord, outre l'intérêt en termes de modulation et de diversité fonctionnelle, il convenait de vérifier l'apport du groupement nitro dans le schéma réactionnel. Ainsi, la voie d'accès a été reprise suivant la méthodologie précédente sans le groupement nitro sur le produit de départ permettant ainsi de s'affranchir des étapes de réduction du nitro et de désamination pour accéder au composé **61**.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

La même séquence réactionnelle que précédemment est ensuite utilisée et le composé **65** a été cyclisé en présence d'acétate de palladium et d'acétate d'argent dans l'acide pivalique à 120 °C pendant 2 h. Le composé **56** est isolé avec un bon rendement de 73% (Schéma 128).²⁶²

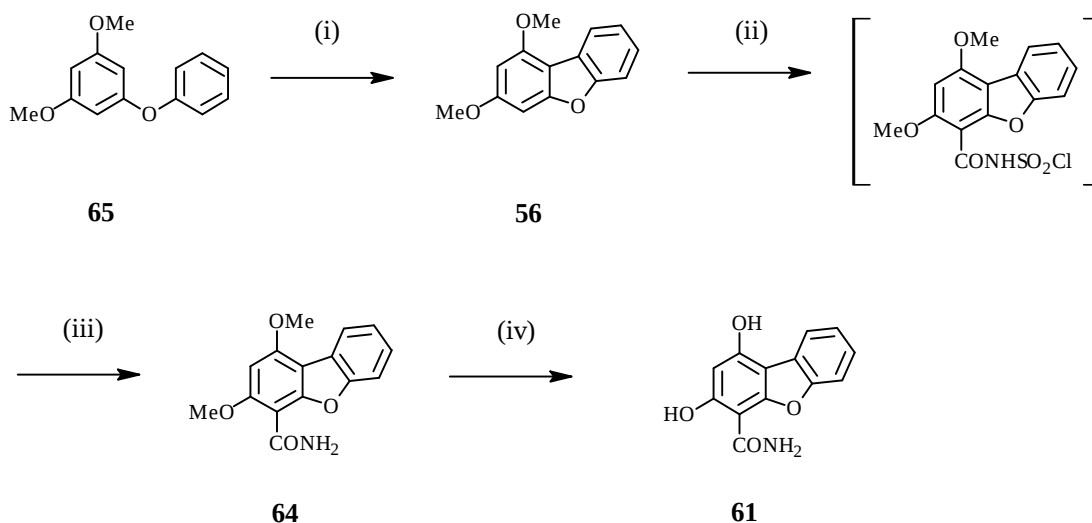


Schéma 128 : (i) Pd(OAc)₂, AgOAc, PivOH, 130 °C, 2 h, 73% ; (ii) CSI, CH₃CN, 0 °C, 12 h ; (iii) HCl 5M, t.a., 12 h, 36% ; (iv) Pyr.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 46%.

Une aminocarbonylation directe en C-4 du dérivé de dibenzofurane **56**, en utilisant du chlorosulfonylisocyanate, conduit au composé **64** après hydrolyse acide de l'intermédiaire *N*-chlorosulfonylcarboxamide correspondant. Le composé souhaité est isolé avec un rendement de 36%.^{290,285} Le faible rendement de cette étape semble essentiellement dû à des problèmes d'extraction lors du traitement et de la purification. Cependant, l'absence du nitro peut modifier la régiosélectivité de la SEAr en faveur de cycle benzénique non substitué pour donner des produits secondaires (rendement de 53% sur l'analogue nitré), même si le nitro devrait diminuer la réactivité en SEAr.

Enfin, la déméthylation des groupements méthoxy a été réalisée par chauffage dans du chlorhydrate de pyridinium suivant la méthode utilisée par Jepsen *et al.* qui permet d'obtenir le composé attendu **61**.²¹⁴

En conclusion, le rendement global de la réaction est encore une fois très faible (4,7% pour 4 étapes à partir du 3,5-diméthoxyphénol **42**). Lorsqu'on le compare avec celui de la série nitro qui est de 8,1% à partir de **42** sur 6 étapes, il convient de noter que malgré les 2 étapes supplémentaires de réduction du nitro et de désamination, la présence du nitro améliore le processus réactionnel, même si le rendement reste très faible.

Finalement, il est possible de conclure sur le double intérêt du nitro pour la réactivité en synthèse et pour la pharmacomodulation.

1.3. Formation d'une liaison C-O intramoléculaire à partir 2-arylphénols

1.3.1. Stratégie de synthèse

La seconde voie de synthèse des dibenzofuranes implique la préparation initiale de dérivés 2-arylphénols par la réaction de Suzuki notamment, puis la formation d'une liaison éther intramoléculaire par réaction d'hétérocyclisation (Schéma 129).

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

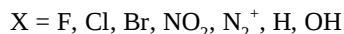
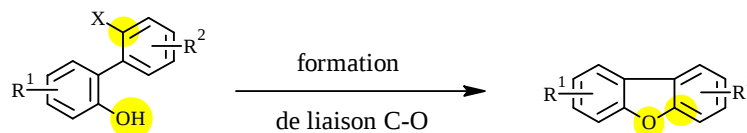


Schéma 129 : Voies d'accès aux dibenzofuranes substitués à partir de 2-arylpénols

Les couplages croisés induits par les métaux de transition ont ouvert une nouvelle voie aux chercheurs afin de former de nombreux composés organiques à travers une variété de réactions chimiques. Le palladium est le métal de transition le plus largement utilisé pour les réactions de couplage croisé grâce à ses capacités de catalyseur. Le rendement de la réaction est souvent lié aux substrats et au couple ligand/base utilisé.

Couplage de Suzuki : Le couplage de Suzuki²⁸⁷ permet la formation d'une liaison carbone-carbone. L'intérêt de cette réaction réside dans l'utilisation d'esters ou d'acides boroniques, composés stables et peu toxiques. De plus, un grand nombre de ces produits sont disponibles commercialement. Cette réaction tolère aussi la présence d'une large variété de groupes fonctionnels et conduit généralement à de bons rendements avec une bonne sélectivité. Les autres avantages de ce couplage sont la faible quantité de catalyseur requise et l'utilisation possible de nombreux solvants à différentes températures.²⁸⁸ Le cycle catalytique proposé pour cette réaction de couplage catalysée par le palladium s'effectuant entre un dérivé halogéné ou un triflate et un composé organométallique est décrit sur le schéma 130.²⁸⁷

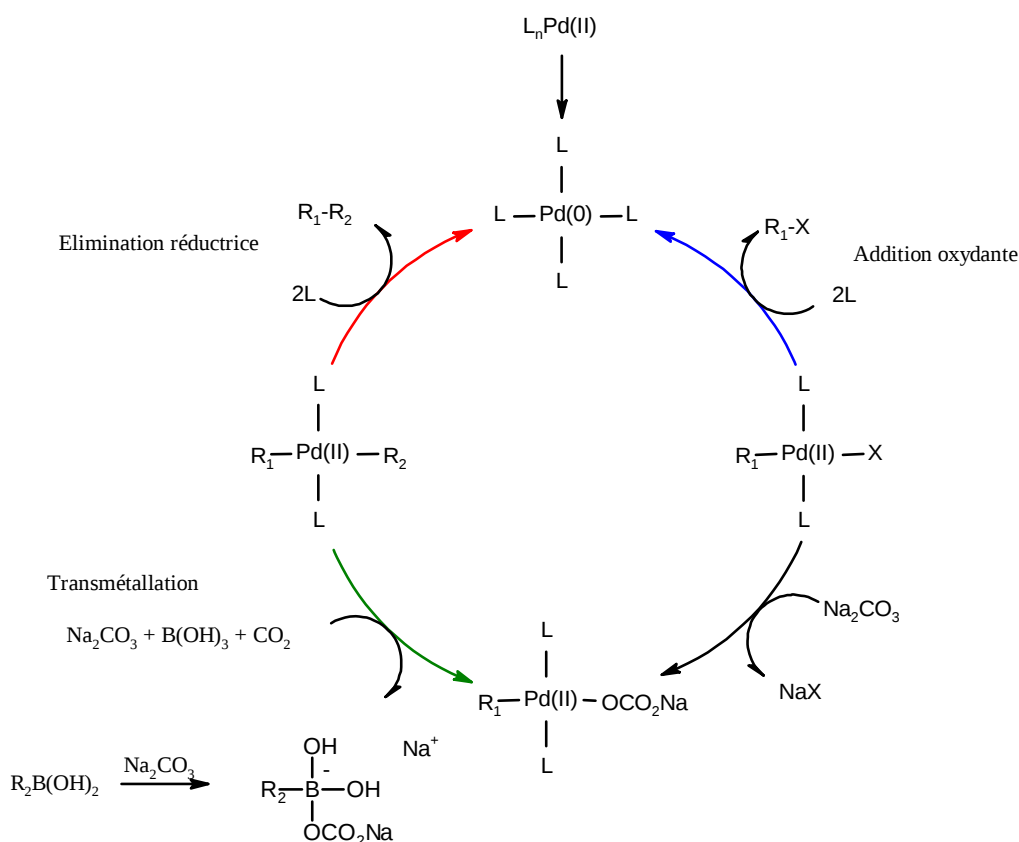


Schéma 130 : Cycle catalytique du couplage de Suzuki

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Ce couplage implique des catalyseurs au palladium(0) (par exemple $\text{Pd(PPh}_3)_4$) commerciaux ou alors générés *in situ* à partir d'un sel de palladium(II) (par exemple PdCl_2 ou Pd(OAc)_2) facilement réduit en complexe Pd(0) actif.

Le cycle est initié par l'addition oxydante du dérivé halogéné (ou de son analogue) sur le métal pour former un complexe de palladium(II). Cette étape s'effectue concomitamment avec un échange de deux ligands autour de la sphère de coordination du complexe de palladium. La vitesse de l'addition oxydante va dépendre de la nature du groupement partant sur l'aromatique : $\text{I} > \text{OTf} > \text{Br} \gg \text{Cl}$. L'encombrement stérique de l'halogénure d'aryle n'est pas un facteur déterminant. Par contre, les aryles substitués par un groupement électroattracteur seront plus réactifs que ceux possédant un groupement électrodonneur. De plus, l'addition oxydante est également influencée par la nature des phosphines entourant le complexe de palladium.

La base joue ensuite un rôle important : elle active le complexe palladié en formant, par substitution de l'halogénure, un complexe $\text{R}_1\text{-Pd(II)-OH}$ qui facilite la réaction de transmétallation. La base permet aussi la formation d'un « ate » complexe par association avec l'acide boronique. La nucléophilie du groupe porté par le bore est ainsi augmentée.

Lors de l'étape de transmétallation, l'atome d'halogène est remplacé par un résidu organique au sein du complexe *trans* $\text{R}_1\text{Pd(II)X}$. Elle s'accompagne d'une libération d'acide borique et de base.

Enfin, le cycle catalytique se termine par une double élimination réductrice. Cette étape permet la formation de la liaison $\text{R}_1\text{-R}_2$ et régénère le catalyseur palladié. L'élimination ne peut s'opérer que si les résidus R_1 et R_2 sont en position *cis* dans le complexe plan carré. Cette isomérisation s'effectue juste avant la formation de la liaison carbone-carbone.

Depuis la publication des travaux de Suzuki et Miyaura en 1981, de nombreuses applications et variantes de cette réaction ont été développées pour conduire à différents produits de couplage. Ainsi différents systèmes de catalyseurs ont été développés. Nous citerons par exemple $\text{Pd(PPh}_3)_4$, $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$, $(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{PdCl}_2$, $(\text{dppf})\text{PdCl}_2$, Pd(dba)_2 , Pd(OAc)_2 , $\text{Pd(OAc)}_2/\text{dppf}$, Pd/C , le palladium supporté, ou encore des catalyseurs au nickel comme $(\text{PPh}_3)_2\text{NiCl}_2$ ou $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Les trialkyles phosphines moins onéreuses sont aussi utilisées lors de certains couplages. Une autre alternative aux ligands phosphines (sensibles à l'air) est l'emploi de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, une amine tertiaire stable et peu chère.^{237,289,251}

De même, lors de ce couplage plusieurs bases peuvent être employées suivant les conditions opératoires mises en place (Na_2CO_3 , K_2CO_3 , NaOH , *t*-BuOK, K_3PO_4 , Cs_2CO_3 ...).

Ce couplage peut aussi se réaliser à partir de sels de bore. Ainsi, Darses et Genêt ont décrit le couplage d'acides arylboroniques avec des sels de diazonium tétrafluoroborates aromatiques.²⁹⁰ De même, par la suite le couplage de sels de potassium trifluoroborates d'aryles ou d'hétéroaryles avec des halogénures d'aryles ou d'hétéroaryles est rapporté par Molander.²⁹¹ En général, les sels de trifluoroborates sont plus nucléophiles que les analogues acides boroniques, et plus stables lors de leur stockage.

1.3.2. Synthèse du 1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furan-4-carboxamide (61)

Pour synthétiser le composé cible **61**, la voie de synthèse envisagée à partir des dérivés benzamides **29** et **44**, préalablement obtenus, est représentée sur le schéma 131.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

L'analyse rétrosynthétique prévoit l'obtention du produit final **61** par déprotection des hydroxy après fermeture de cycle sur les composés 2-arylphénols **II** obtenus par couplage de Suzuki.

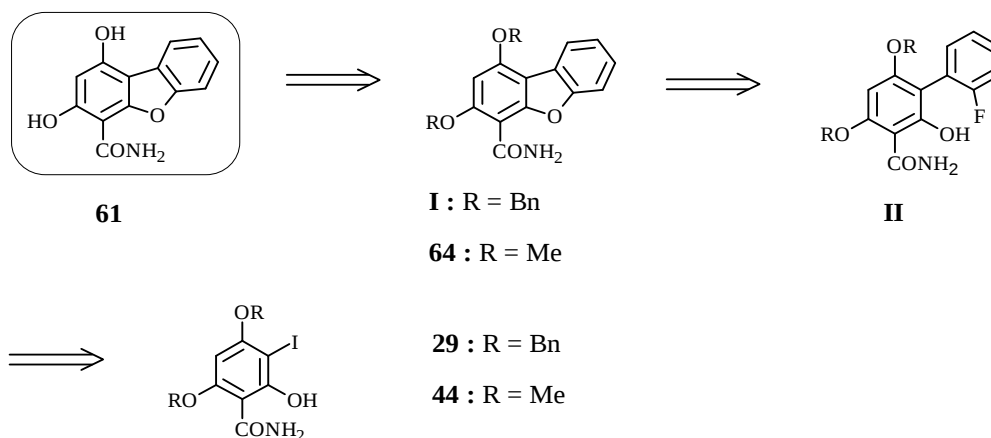


Schéma 131 : Voie d'accès au composé cible **61** à partir des dérivés benzamides **29** et **44**

Nous avons sélectionné l'acide 2-fluorophénylboronique pour synthétiser le dérivé biphényle à partir du composé **29**. Dans le détail, le dérivé iodoaryle **29** a été traité avec l'acide phénylboronique choisi selon les conditions décrites dans la littérature.^{292,177,214} Les deux conditions utilisées (Schéma 132 - Tableau 26) n'ont pas permis d'obtenir le composé biaryle attendu **66**. La dégradation du milieu réactionnel est observée après 2 h.

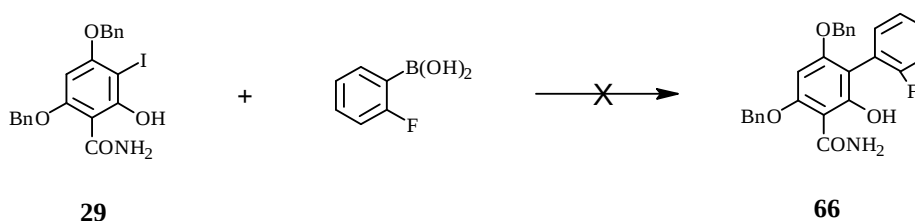


Schéma 132 : Arylation du dérivé iodoaryle **29**

Tableau 26 : Mise au point de l'arylation du dérivé iodoaryle **29**

Essai	Réactifs	Solvants	Conditions	Résultats
1	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ , K ₂ CO ₃	DMF/H ₂ O	90 °C, MO, 2 h	Dégradation
2	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , K ₃ PO ₄	CH ₃ CN/H ₂ O	90 °C, MO, 2 h	Dégradation

Ces résultats nous ont conduits à considérer la protection du groupe hydroxyle. Nous avons choisi le méthoxyméthyl (MOM) comme groupement protecteur. Celui-ci est largement répandu dans la protection des alcools. Il peut être introduit facilement, reste stable vis-à-vis des conditions de déprotection d'autres groupements protecteurs tels que : le silyle, l'alkoxyacyle ou les dérivés benzyliques et aussi bien dans les conditions fortement basiques ou légèrement acides.^{294,203} Diverses méthodes ont été décrites pour la déprotection du MOM éther, utilisant des acides de Bronsted et des acides de Lewis.^{295,296}

Nous avons utilisé le chlorométhyléther (MOMCl) en milieu basique. La mono-protection de l'hydroxyle nécessite une base forte telle que NaH pour donner le composé **67** avec un rendement de 93% (Schéma 133).²⁹⁷

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

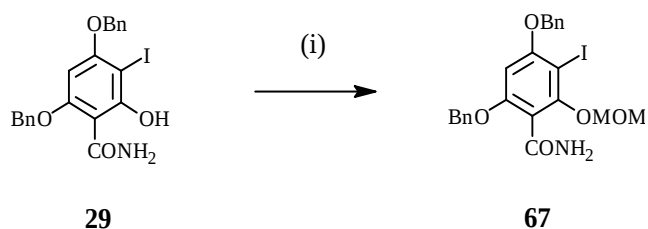


Schéma 133 : (i) $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$, NaH, DMF, t.a., 3 h, 93%.

Un second essai de couplage de Suzuki a été réalisé dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. L'analyse par UPLC-MS a montré une conversion de seulement 12% pour l'essai 2 (Schéma 134 et Tableau 27).

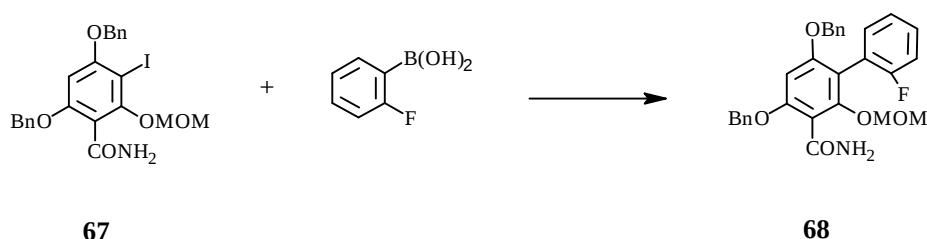


Schéma 134 : Arylation du dérivé iodoaryle protégé **67**

Tableau 27 : Mise au point de l'arylation du dérivé iodoaryle protégé **67**

Essai	Réactifs	Solvants	Conditions	Résultats
1	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, K_2CO_3	DMF/ H_2O	90 °C, MO, 2 h	Aucune réaction
2	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , K_3PO_4	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$	90 °C, MO, 2 h	12% de conversion

Nous suggérons que les groupes protecteurs benzyles empêcheraient la réaction. Dans le but d'améliorer les rendements, nous avons décidé d'appliquer la stratégie à partir de l'analogue méthoxylé **44** moins encombré.

Nous nous sommes concentrés sur la réaction de couplage, catalysée par le palladium (II), de l'acide 2-fluorophénylboronique avec le composé **44** en présence d'acétate de palladium, de triphénylphosphine et de phosphate de potassium comme base pour former le composé **69** (Schéma 135).¹⁷⁷ Malheureusement, le composé attendu **69** n'est présent qu'avec un faible rendement de 26%.

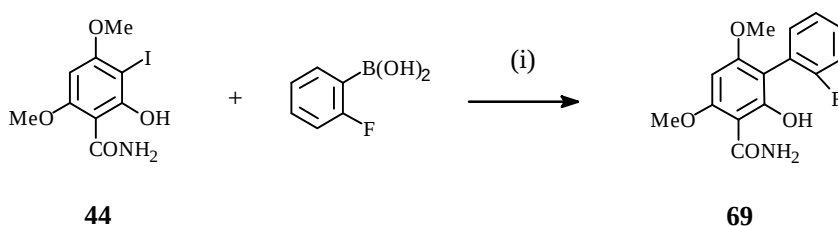


Schéma 135 : (i) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , K_3PO_4 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4/1), 90 °C, MO, 2 h, 26%.

L'augmentation du temps de réaction jusqu'à 4 h et l'augmentation de la température jusqu'à 120 °C ne permettent pas d'augmenter de façon significative le rendement de la réaction puisque celui-ci n'excède pas 26%. Une dégradation du milieu réactionnelle est observée après 4 h à 120 °C.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Ensuite, la réaction de cyclisation du composé **69** a été réalisée selon deux méthodes qui sont résumées dans le tableau 28 et dans le schéma 136.

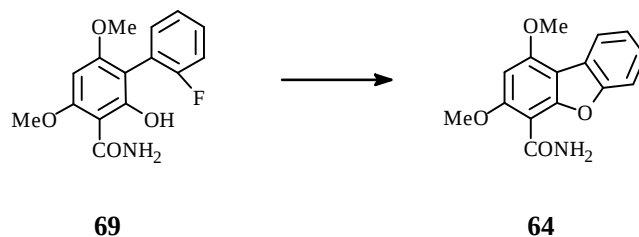


Schéma 136 : Cyclisation du composé 69

Tableau 28 : Mise au point de la cyclisation du composé 69

Essais	Réactif	Solvant	Conditions	Résultats
1	CuTC	DMA	140 °C, MO, 2 h	Aucune réaction
2	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	150 °C, MO, 1 h	61%

Le diarylphénol **69** et du thiophene-2-carboxylate de cuivre(I) ont été ajoutés au solvant DMA (*N,N*-diméthylacétamide) dégazé, sous irradiation micro-ondes, sans toutefois réussir à former le composé **64**.¹⁷⁷

Cependant, la réaction du biaryle **69** avec du carbonate de césium à 150 °C dans de l'acétonitrile sous irradiation micro-ondes a donné le composé **64** avec un rendement de 61%.²¹⁴

La déméthylation ultérieure a été réalisée comme décrite précédemment pour donner le composé cible **61** avec un rendement de 48% (Schéma 125 *cf.* p 133)

En résumé, le rendement global de cette stratégie est extrêmement faible (2% pour 5 étapes à partir du 3,5-diméthoxyphénol **42** avec notamment une étape d'arylation de Suzuki qui pose problème et qui reste à améliorer. Pour rappel les stratégies précédentes, c'est-à-dire de couplage oxydant pallado-catalysé de précurseurs diaryléthers issus du iodobenzène et du 1-iodo-2-nitrobenzène, avaient conduit à des rendements de 4,7% (4 étapes) et 8,1% (6 étapes), respectivement, à partir du 3,5-diméthoxyphénol **42**.

1.4. Synthèse de dibenzofuranes par cyclisation pallado-catalysée d'*o*-iododiaryléthers

Liu *et al.* ont présenté une voie efficace pour synthétiser une variété de dibenzofuranes.²⁵¹ Nous avons essayé de synthétiser les systèmes tricycliques, en deux étapes, par le couplage croisé d'*o*-iodophénols avec les triflates de silylaryle, suivie d'une cyclisation intramoléculaire catalysée par le palladium.

La synthèse du 1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furan-4-carboxamide **61** a commencé à partir du 4,6-bis(benzyloxy)-2-hydroxy-3-iodobenzamide (**29**). Le triflate de silylaryle et le CsF ont été ajoutés à la solution de composé **29** dans l'acétonitrile (Schéma 137). La solution a été laissée sous agitation à température ambiante pendant 24 h pour donner le temps au dérivé phénolique de s'ajouter sur le benzyne formé intermédiairement. Le ballon a ensuite été purgé avec de l'argon et, le catalyseur Pd(OAc)₂ et le ligand PCy₃ ont été ajoutés à la réaction qui a été chauffée à 100 °C pendant 24 h. Malheureusement, la réaction aboutit à un mélange de composés dont celui désiré qui se retrouve en quantité négligeable.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

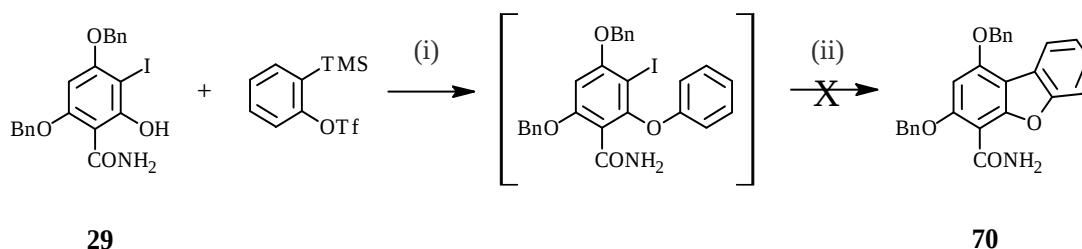


Schéma 137 : (i) CsF (3 éq), MeCN, 25 °C, 24 h ; (ii) Pd(OAc)₂, PCy₃, 100 °C, 24 h.

Etant donné les difficultés à synthétiser le dérivé dibenzofurane à partir du composé **29**, nous avons décidé de poursuivre cette voie de synthèse à partir du 2-hydroxy-3-iodo-4,6-diméthoxybenzamide (**44**) en suivant les mêmes conditions précédemment décrites.

Le composé **44** réagit d'abord avec le triflate de silylaryle pour donner l'intermédiaire *o*-iododiaryléther qui subit ensuite une tentative d'arylation intramoléculaire catalysée par le palladium 'en un pot' pendant 24 h à 100 °C, sans succès (Schéma 138).

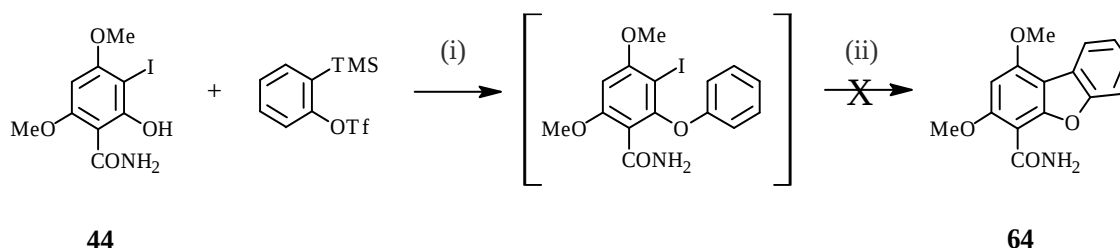


Schéma 138 : (i) CsF (3 éq), MeCN, 25 °C, 24 h ; (ii) Pd(OAc)₂, PCy₃, 100 °C, 24 h.

En se basant sur ce qui a été décrit dans la littérature, nous avons donc adapté cette méthode à nos molécules sans parvenir à synthétiser le produit souhaité. Cependant, nous avons observé la formation du produit intermédiaire par suivi UPLC-MS, ce qui nous permet de conclure sur le fait que c'est l'étape de cyclisation intramoléculaire qui est limitante dans cette voie d'accès.

2. Synthèse du 8-acétyl-1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Le choix des voies d'accès aux autres composés cibles va tenir compte des remarques qui ont été faites lors des différentes stratégies envisagées précédemment par accéder au composé **61**, non substitué sur l'un des deux benzènes de l'hétérocycle dibenzofuranique.

Pour la formation de l'hétérocycle, parmi les différentes méthodes développées, le couplage oxydant pallado-catalysé de diaryléthers convenablement substitués a été retenu. Il conviendra aussi d'introduire le groupement carboxamide après cyclisation et de réaliser la déprotection sur les dérivés diméthoxylés dans l'étape finale de la synthèse.

Dans cette partie, nous décrirons les travaux de synthèse mis en œuvre pour produire le composé 8-acétyl-1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furan-4-carboxamide dont la structure est indiquée ci-dessous (Figure 62) :

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

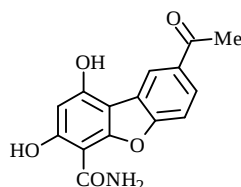


Figure 62 : Structure du 8-acétyl-1,3-dihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Deux voies d'accès vont être exploitées afin de synthétiser le composé cible (Schéma 139).

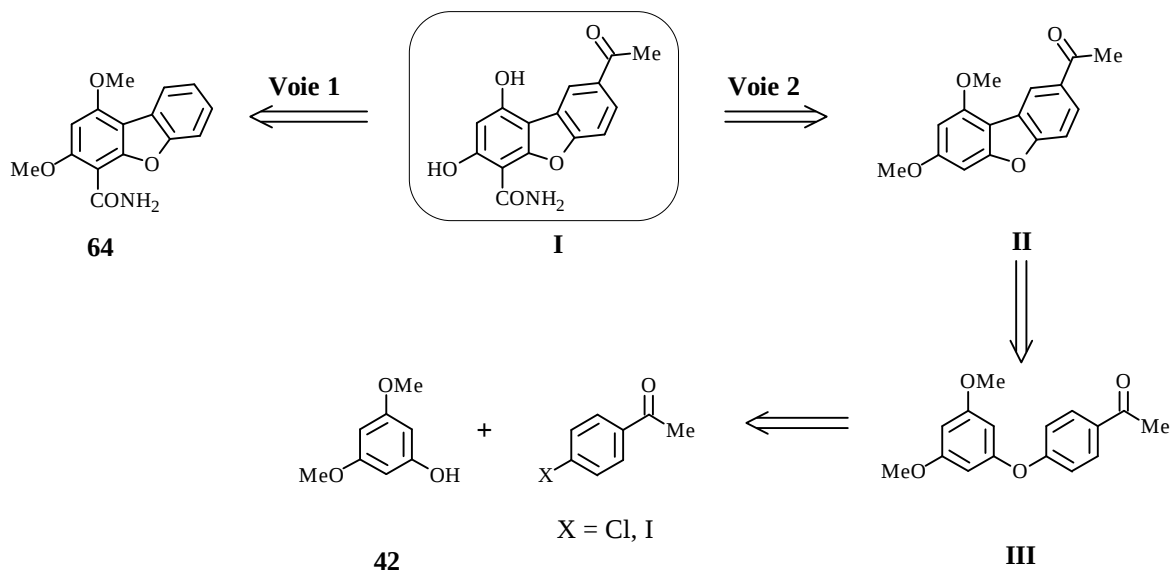


Schéma 139 : Voies d'accès au composé cible **64**

Une première voie est envisagée par acylation régiosélective en C-8 du composé **64** disponible, avant déprotection des méthoxy. La seconde approche consiste à réaliser les étapes d'aminocarbonylation et de déprotection sur le composé **II** possédant l'acétyle déjà installé en position C-8 grâce à la cyclisation intramoléculaire du diaryléther **III** convenablement substitué. Ce dernier sera issu de la réaction de S_NAr entre le composé **42** et des 4-halogénoacétophénone.

2.1. A partir du 1,3-diméthoxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide **64** (Voie 1)

2.1.1. Travaux réalisés

L'acylation de Friedel-Crafts est classiquement réalisée en présence d'un acide de Lewis tel qu' $AlCl_3$ ou BF_3 et le chlorure d'acétyle.²⁹⁸ Pour l'optimisation de l'acylation de Friedel-Crafts sur le composé **64**, les essais sont réalisés en présence de chlorure d'acétyle et de trichlorure d'aluminium (en faisant varier le nombre d'équivalents) dans différents solvants classiquement utilisés (dichlorométhane,²⁹⁹ 1,2-dichloroéthane, chloroforme,³⁰⁰ ou disulfure de carbone³⁰¹).³⁰² Malgré la présence des méthoxy qui activent les réactions de $SEAr$, la présence du carboxamide désactivant et l'encombrement stérique permettent d'envisager la fonctionnalisation classique en « para » de l'oxygène sur l'hétérocycle dibenzofurane (Schéma 140 et Tableau 29).

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

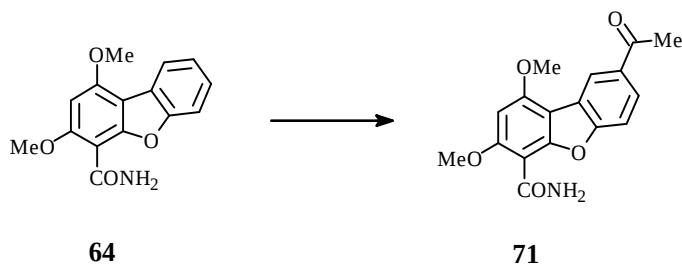


Schéma 140 : Essai de la réaction d'acylation sur le composé **64**

Tableau 29 : Mise au point de la réaction de Friedel-Crafts

Essai	Réactifs	Solvant	Conditions	Résultats
1	CH ₃ COCl (3 éq), AlCl ₃ (6 éq)	CH ₂ Cl ₂	reflux, 24 h	Produit de départ
2	CH ₃ COCl (3 éq), AlCl ₃ (6 éq)	C ₂ H ₄ Cl ₂	reflux, 24 h	Produit de départ
3	CH ₃ COCl (3 éq), AlCl ₃ (6 éq)	CHCl ₃	reflux, 24 h	Produit de départ
4	CH ₃ COCl (3 éq), AlCl ₃ (6 éq)	CS ₂	reflux, 24 h	Dégradation

Malheureusement, l'analyse du produit brut de notre essai a montré que le produit désiré n'avait pas été formé. Dans le dichlorométhane, le 1,2-dichloroéthane et le chloroforme, seule la matière de départ a été récupérée et dans le disulfure de carbone un mélange de produits inséparables est obtenu.

2.2. A partir du 3,5-diméthoxyphénol **42** (Voie 2)

Face aux difficultés rencontrées lors des tentatives d'introduction de l'acétyle sur la position 8 du noyau dibenzofurane, nous avons décidé d'exploiter un intermédiaire diaryléther obtenu à partir du 3,5-diméthoxyphénol **42** et des 4-halogénoacétophénonnes commerciales.

2.2.1. Travaux réalisés

Dans une première étape, la réaction catalysée par le Cu(I) du 3,5-diméthoxyphénol **42** avec la 4-chloroacétophénone dans le DMF à 120 °C en utilisant du carbonate de césium comme base produit l'intermédiaire diaryléther **72** avec un rendement de seulement 34% (Schéma 141).²⁶³

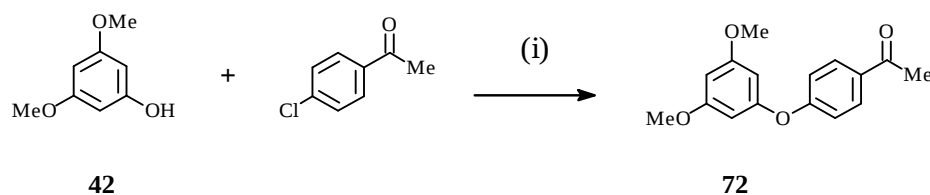


Schéma 141 : (i) Cs₂CO₃, CuI, DMF, 120 °C, MO, 2 h, 34%

Nous avons tenté d'améliorer le rendement par ajout d'iodure de potassium, dans le mélange réactionnel constitué d'une solution aqueuse saturée de carbonate de césium et de DMF, qui permet normalement de favoriser la O-alkylation par un échange chlore/iodo. Néanmoins, le rendement obtenu pour cette méthode reste faible. Lorsqu'on augmente le temps de réaction jusqu'à 4 h, on observe une dégradation du milieu réactionnel. L'ajout d'un ligand (*N,N*-diméthylglycine) ne permet pas d'augmenter le rendement de la réaction, celui-ci n'excède pas 34%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

Par ailleurs, de la même manière, l'intermédiaire diaryléther **72** a été obtenu en présence de 4-iodoacétophénone avec un bon rendement de 71% (Schéma 142).

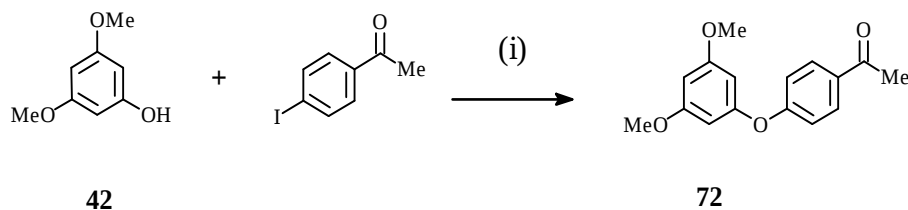


Schéma 142 : (i) Cs_2CO_3 , CuI, DMF, 90 °C, MO, 2 h, 71%.

La cyclisation du composé **72** a été réalisée en utilisant l'acétate de palladium et l'acétate d'argent dans l'acide pivalique à 130 °C pendant 12 h pour donner le dérivé de dibenzofurane **73** avec un rendement de 83% (Schéma 143).²⁶²

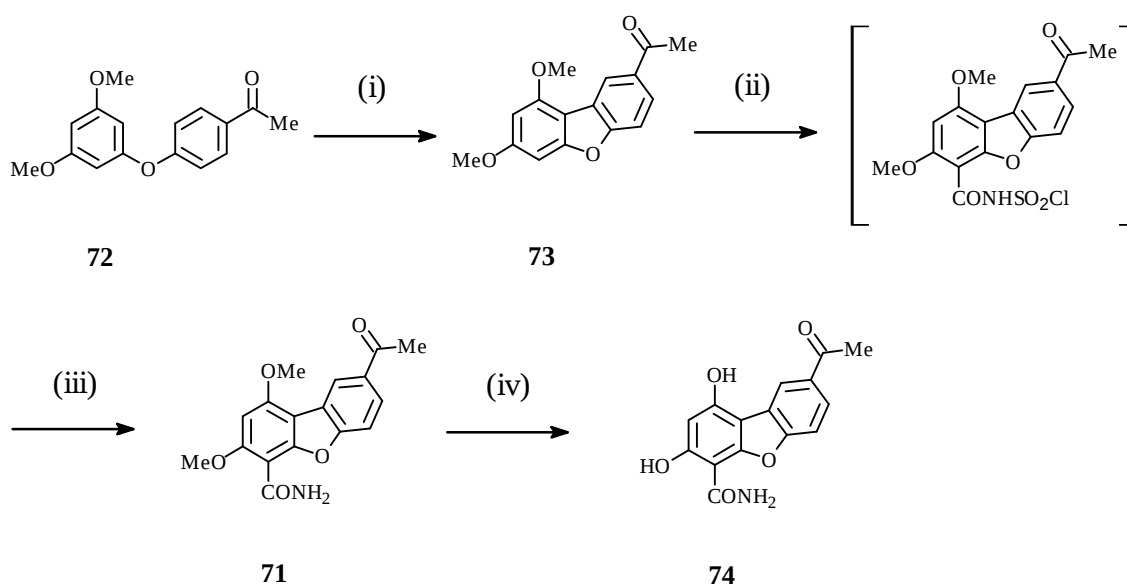


Schéma 143 : (i) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AgOAc , PivOH, 130 °C, 12 h, 83% ; (ii) CSI, CH_3CN , 0 °C, 12 h ; (iii) HCl 5M, t.a., 12 h, 32% ; (iv) Pyridine.HCl, 200 °C, MO, 30 min, 26%.

Une aminocarbonylation directe en C-4 du composé **73**, en utilisant de l'isocyanate de chlorosulfonyl, conduit au composé **71** après hydrolyse acide.^{290,128} Le composé **71** est isolé avec un rendement de 32%. Ce rendement est faible à cause de la potentielle désactivation de l'hétérocycle par l'acétyle et aussi quelques problèmes de purification. La régiosélectivité en C-4 a été confirmée précédemment sur le dérivé dibenzofurane **61** et est validée par les données de RMN du proton. En effet, l'effet électro-attracteur du carbonyl de la fonction acétyle favorise la SEAr sur la partie benzénique diméthoxylée.

Finalement, la déméthylation du groupe méthoxy a été effectuée par chauffage dans du chlorhydrate de pyridinium, ce qui a conduit au composé attendu **74** avec un rendement de 26% malgré une conversion totale de produit de départ.²¹⁴ Ce faible rendement est essentiellement dû à des problèmes d'extraction lors du traitement et de purification.

Le rendement obtenu est faible, un essai de déméthylation par le tribromure de bore est réalisé pour donner le produit attendu mais le rendement obtenu est encore faible (16%) et la purification a été difficile (Schéma 144).²⁸⁶

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

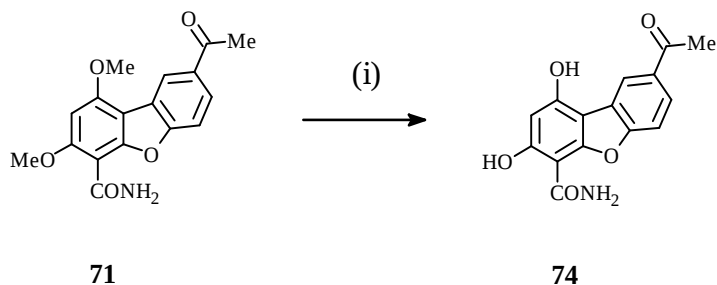


Schéma 144 : (i) BBr₃ (3 éq), CH₂Cl₂, t.a., 2 h, 16%.

La déméthylation du groupe méthoxy du composé **73** sans carboxamide a été effectuée par chauffage dans du chlorhydrate de pyridinium ce qui a conduit au composé attendu **75** avec un rendement de 57% (Schéma 145).²¹⁴ Il semble donc que la présence du carboxamide ne facilite pas cette dernière étape.

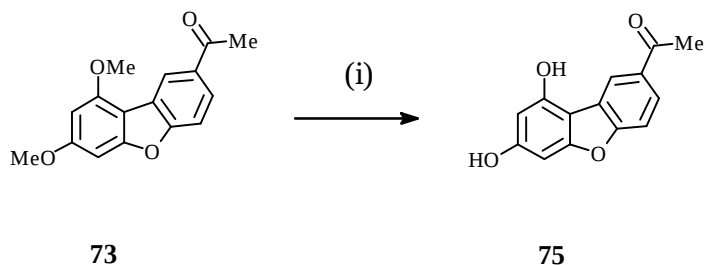


Schéma 145 : (i) Pyr.HCl, 200 °C, MO, 30 min, 57%.

En conclusion, le composé cible est obtenu. Dans cette voie, trois composés (**71**, **74**, **75**) seront testés en biologie.

Cette synthèse souffre globalement de rendements faibles (4,9%) après 4 étapes à partir du composé 3,5-diméthoxyphénol (**42**) commercial.

3. Synthèse du 1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Comme cela a été décidé initialement, un nouveau composé final sera synthétisé. La structure du 1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide est présentée ci-dessous :

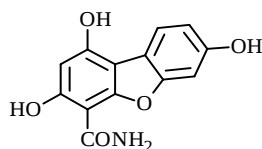


Figure 63 : Structure de 1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

3.1. Schéma rétrosynthétique

Dans cette voie, le composé final **I** est obtenu comme précédemment suivant la séquence rétrosynthétique de déméthylation de **II**, C-4 aminocarbonylation de **III** et couplage diaryle oxydant intramoléculaire de **IV**. Ce dernier étant issu de la condensation du phénol **42** disponible avec le 3-iodophénol **V** préalable O-méthylé (Schéma 146).

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

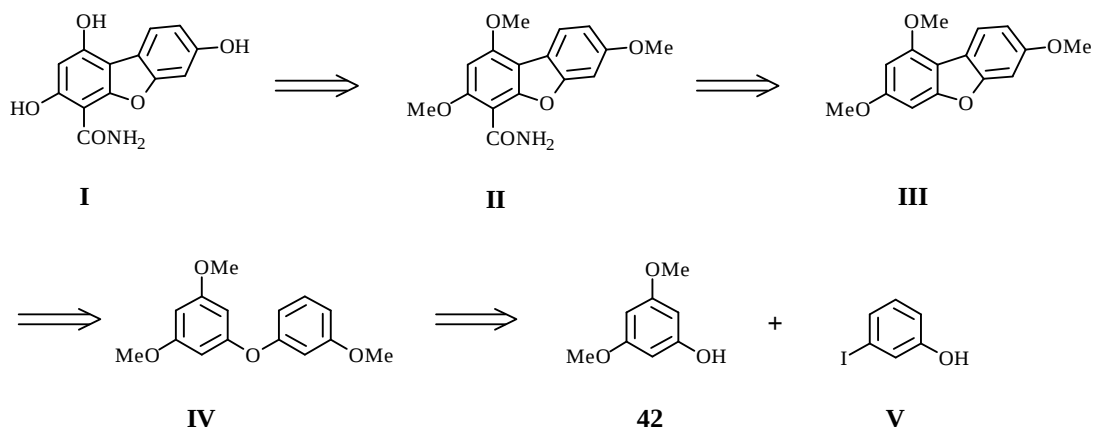


Schéma 146 : Rétrosynthèse envisagée

3.2. Travaux réalisés

Initialement, une protection du groupe hydroxyle du 3-iodophénol (**76**) est nécessaire afin d'éviter toute réaction secondaire de substitution sur le groupe hydroxyle. La première étape consiste à méthyler en utilisant l'iodométhane afin de former le 3-iodoanisole **77**. Celui-ci est obtenu avec un bon rendement de 89% (Schéma 147).³⁰³

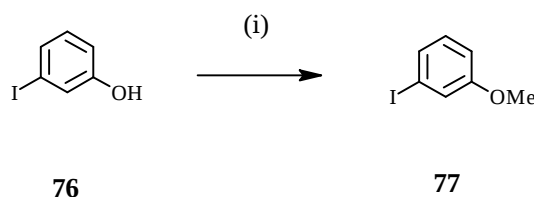


Schéma 147 : (i) CH_3I , Cs_2CO_3 , CH_3CN , 70 °C, 12 h, 89%.

Ensuite, un mélange de 3,5-diméthoxyphénol **42**, de carbonate de césium et d'iodoaryle **77** dans le DMF a été irradié dans un four micro-ondes à 110 °C pendant 2 h pour former l'intermédiaire diaryléther **78** (Schéma 148).²⁶³

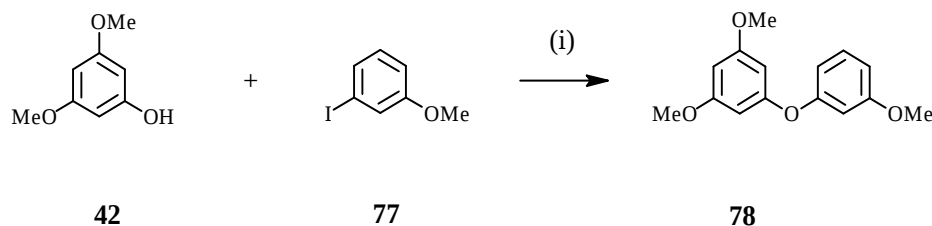


Schéma 148 : (i) Cs_2CO_3 , CuI , DMF, 110 °C, MO, 2 h, 30%.

Cependant, le composé **78** n'est obtenu qu'avec un rendement de 30%. L'augmentation du temps de réaction jusqu'à 4 h et l'augmentation de la température jusqu'à 120 °C ne permettent pas d'augmenter le rendement de la réaction.

La cyclisation du composé **78** a été réalisée en utilisant de l'acétate de palladium et de l'acétate d'argent dans l'acide pivalique pour donner le dérivé de dibenzofurane **79** (Schéma 149). Le rendement de 91% obtenu pour cette étape est très bon mais demande un temps réactionnel de 12 h.²⁶²

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

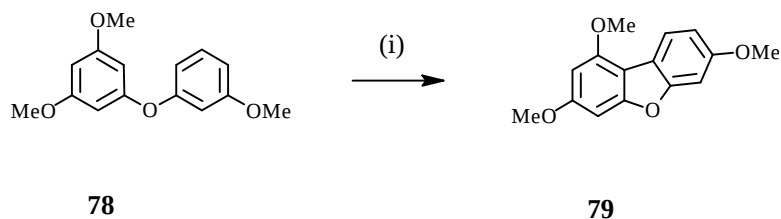


Schéma 149 : (i) Pd(OAc)₂, AgOAc, PivOH, 130 °C, 12 h, 91%.

Par la suite, l'introduction de la fonction amide en position 4 de l'hétérocycle dibenzofuranique se fait en deux étapes à partir du dérivé **79** (Schéma 150) en suivant le mode opératoire décrit précédemment. Le composé **80** est isolé avec un rendement moyen de 44%.¹²⁸ Pour ce composé triméthoxylé pour lequel le problème de régiosélectivité de la réaction se pose, les données de RMN du proton, et notamment les multiplicités des massifs et les valeurs des constantes de couplage, montrent bien que l'attaque électrophile a lieu sur le noyau benzénique diméthoxylé.

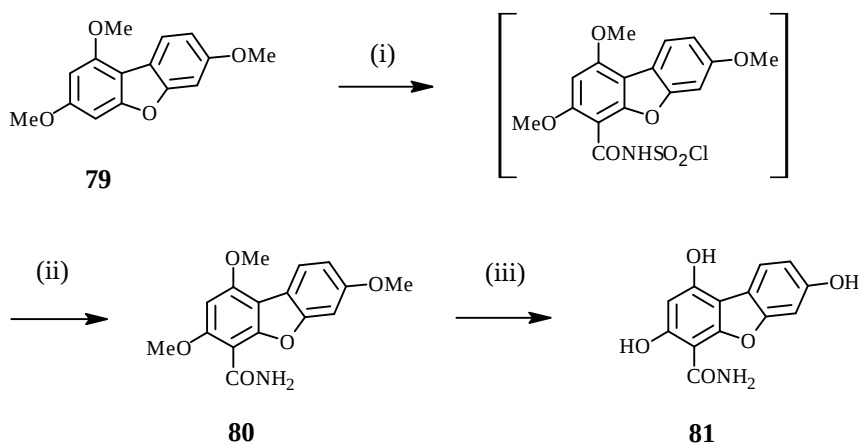


Schéma 150 : (i) CSI, CH₃CN, 0 °C, 2 h ; (ii) HCl 5M, t.a., 4 h, 44% ; (iii) Pyridine.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 38%.

Finalement, la déméthylation des groupes méthoxy a été effectuée par chauffage dans le chlorhydrate de pyridinium pour fournir le composé **81** souhaité avec un rendement moyen de 38% (Schéma 151).²¹⁴

Le rendement obtenu est faible lors de l'étape de déméthylation, aussi une méthode alternative de déméthylation par le tribromure de bore donne des traces du produit attendu avec une dégradation du milieu réactionnel.²⁸⁶

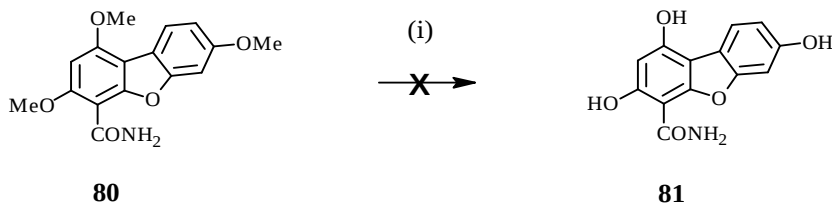


Schéma 151 : (i) BBr₃ (3 éq), CH₂Cl₂, t.a., 2 h.

En conclusion, cette voie convergente est constituée de quatre étapes avec un rendement global très faible (4,6% à partir du 3,5-diméthoxyphénol **42**) qui peut-être la

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

conséquence de problèmes de régiosélectivité des réactions sur les deux noyaux benzéniques de réactivité proche, en plus de l'extraction et de la purification. Le composé cible est obtenu et deux composés (**80**, **81**) feront l'objet de tests biologiques.

4. Synthèse du 8-acétyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Dans cette partie, nous décrivons les travaux de synthèse mis en œuvre pour l'obtention du composé 8-acétyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide dont la structure est décrite ci-dessous :

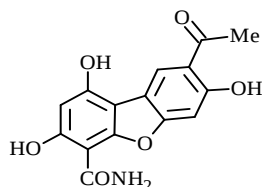


Figure 64 : Structure du 8-acétyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[b,d]furane-4-carboxamide

Pour synthétiser ce composé substitué en position 7 par un groupe hydroxyle et en position 8 par un groupe acétyle, deux voies de synthèse peuvent être appliquées afin d'accéder au composé cible **I**, l'introduction de l'acétyle pouvant être envisagée après ou avant l'étape de cyclisation (Schéma 152). Ainsi, le composé souhaité peut être classiquement synthétisé selon une réaction d'acylation de Friedel-Crafts à partir du composé **80** disponible préalablement, avant déméthylation (voie 1). L'autre option (voie 2) est d'accéder au composé final par déméthylation et C-4 aminocarbonylation de **II** issu du couplage diaryle oxydant intramoléculaire de **III**. Le diaryléther **III** résultera de la condensation du phénol **42** disponible avec la 4-iodo-2-méthoxyacétophénone **IV**.

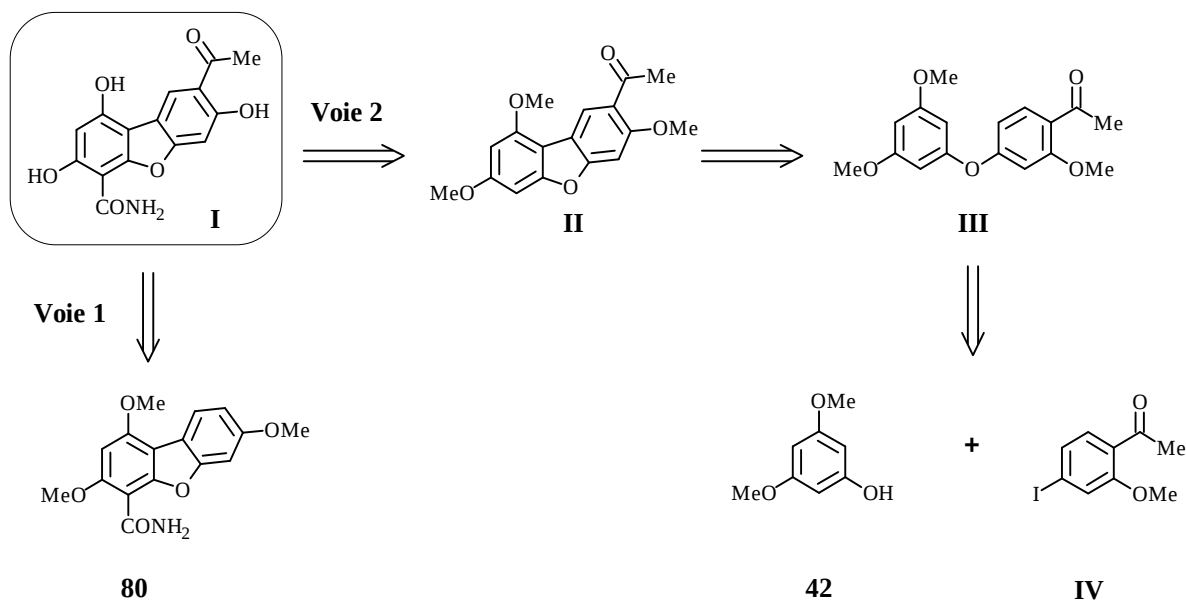


Schéma 152 : Rétrosynthèses envisagées

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

4.1. Voie 1 : acétylation du précurseur dibenzofurane **80**

4.1.2. Travaux réalisés

L'acétylation de Friedel-Crafts a été effectuée sur le composé **80** en présence de chlorure d'acétyle et de trichlorure d'aluminium dans le 1,2-dichloroéthane. Le composé **82** est isolé avec un bon rendement de 74% (Schéma 153).³⁰⁴ Les données de RMN du proton permettent de valider la SEAr régiosélective en position 8 de l'hétérocycle.

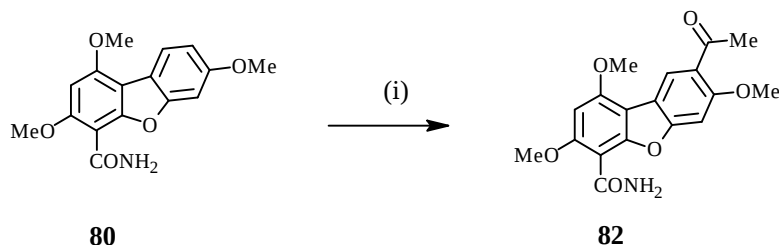


Schéma 153 : (i) AcCl, AlCl₃, 1,2-dichloroéthane, t.a., 1 h, 74%.

Finalement, la déméthylation du groupe méthoxy a été effectuée par chauffage dans le chlorhydrate de pyridinium, ce qui a conduit au composé attendu **83** avec un rendement de l'ordre de 39% (Schéma 154).²¹⁴

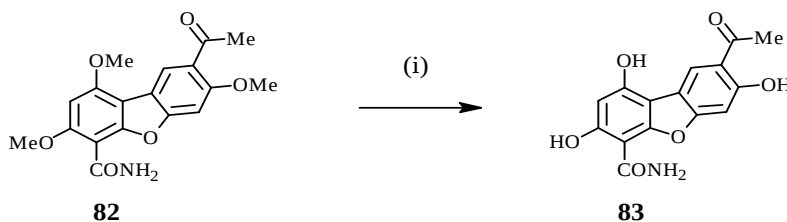


Schéma 154 : (i) Pyridine.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 39%.

En conclusion, cette voie d'accès permet donc, en deux étapes et à partir du composé **80**, d'aboutir au composé final attendu avec un rendement global moyen (28,9%). Deux composés (**82**, **83**) seront testés biologiquement.

4.2. Voie 2 : couplage diaryle oxydant intramoléculaire

Ainsi, l'acylation de Friedel-Crafts sur l'anisole **77** conduit au mélange des deux isomères comme on pouvait le prévoir avec le OMe *o/p* directeur en SEAr (Schéma 155).³⁰⁴

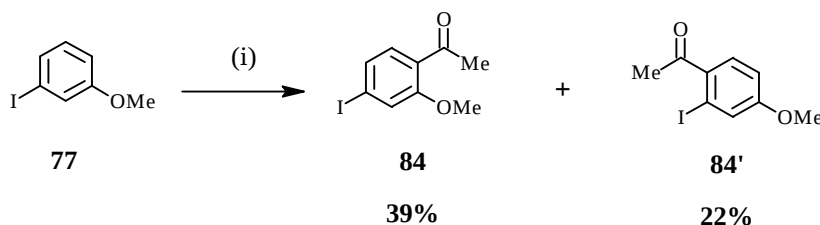


Schéma 155 : (i) AcCl, AlCl₃, 1,2-dichloroéthane, t.a., 1 h.

Le composé **84** est isolé avec un rendement de 39% et l'isomère **84'** est isolé avec un rendement de 22%. Les deux composés sont facilement séparables par chromatographie sur

Partie A : Synthèse des dibenzo[b,d]furanes

gel de silice et ont été identifiés en tenant compte des déplacements chimiques et des multiplicités en RMN du proton.

Pour résoudre ce problème de régiosélectivité, nous avons envisagé de réaliser une SEAr intramoléculaire par réarrangement de Fries de l'acétate de phényle correspondant.^{305,306} Ce dernier (composé **85**) a été synthétisé avec un bon rendement de 90% à partir du 3-iodophénol **76** et de l'anhydride acétique dans la pyridine (Schéma 156).¹²⁸

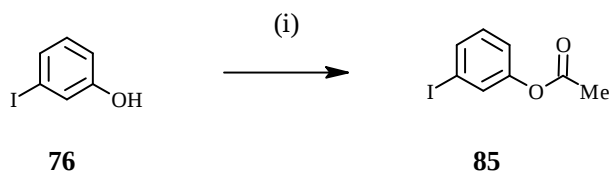


Schéma 156 : (i) Ac₂O, Pyridine, 130 °C, 2 h, 90%.

Le composé **85** est alors engagé dans une réaction de transposition de Fries (Schéma 157). Deux essais ont été tentés.

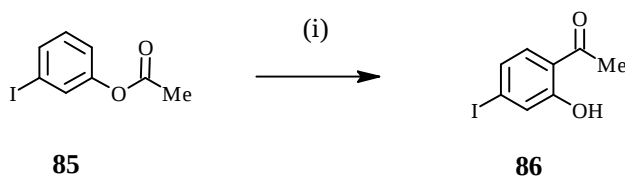


Schéma 157 : Le réarrangement de Fries sur le composé **85**

Tableau 30 : Mise au point de la réaction de réarrangement de Fries

Essai	Réactif	Solvant	Conditions	Rendement
1	AlCl ₃ (6 éq)	chlorobenzène	140 °C, 90 h	23%
2	BF ₃ .2CH ₃ COOH (6 éq)	-	180 °C, 12 h	88%

Le réarrangement de Fries sur le composé **85** a été réalisé en présence de trichlorure d'aluminium dans le chlorobenzène.³⁰⁵ Le composé **86** est isolé avec un rendement faible de 23% (Tableau 30). L'autre isomère n'est pas détecté.

Le rendement n'étant pas satisfaisant, nous avons décidé de mettre en place une autre méthode. Le composé **85**, engagé dans une réaction de transposition de Fries en présence du complexe trifluorure de bore-acide acétique (BF₃.2CH₃COOH), conduit au composé **86** avec un bon rendement de 88% sans formation de l'analogue *para*-substitué (Schéma 157).³⁰⁶ Cette méthode offre un meilleur rendement que la méthode précédente et raccourcit grandement le temps nécessaire à la synthèse.

Ensuite, la protection du groupe hydroxyle est réalisée sur le composé **86** en utilisant l'iodométhane en présence d'une base afin d'obtenir le composé méthoxylé **84**. Cette réaction offre un bon rendement de 91% (Schéma 158).³⁰³

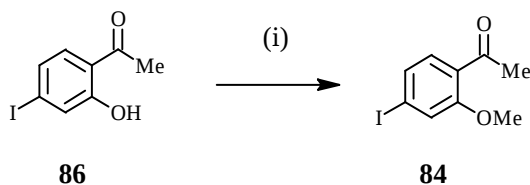


Schéma 158 : (i) CH₃I, Cs₂CO₃, CH₃CN, 70 °C, 12 h, 91%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

Comparativement à la voie de synthèse débutant par le composé **77** (35% en 2 étapes à partir de **76**), cette voie de synthèse nous permet d'obtenir le composé **84** sans former l'isomère **84'** et avec un rendement de 72% en 3 étapes à partir du 3-iodophénol **76**.

La suite de la synthèse est la même que celle effectuée précédemment et le diaryléther **87** est alors isolé avec un rendement relativement faible de 31% (Schéma 159).²⁶³

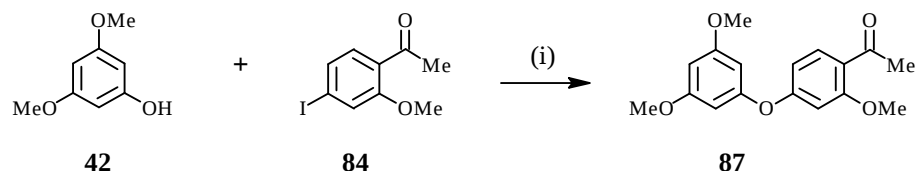


Schéma 159 : (i) Cs_2CO_3 , CuI , DMF, 120 °C, MO, 2 h, 31%.

Il convient de noter que la présence du méthoxy en position 2 sur l'acétophénone **84** a un effet délétère pour la réaction si on compare au rendement de 71% pour l'analogue **73** non méthoxylé (Schéma 142 *cf.* p 144). Ce groupement OMe qui enrichit le cycle benzénique en électrons diminue la réactivité du substrat pour la S_NAr. Le même rendement de 30% était obtenu pour la synthèse du diaryléther **78** à partir du 3-iodoanisole **77** (Schéma 148 *cf.* p146).

La cyclisation du composé **87** a été réalisée en utilisant l'acétate de palladium, l'acétate d'argent dans l'acide pivalique à 130 °C pendant 12 h pour donner le dérivé dibenzofuranique **88** avec un rendement correct (Schéma 160).²⁶²

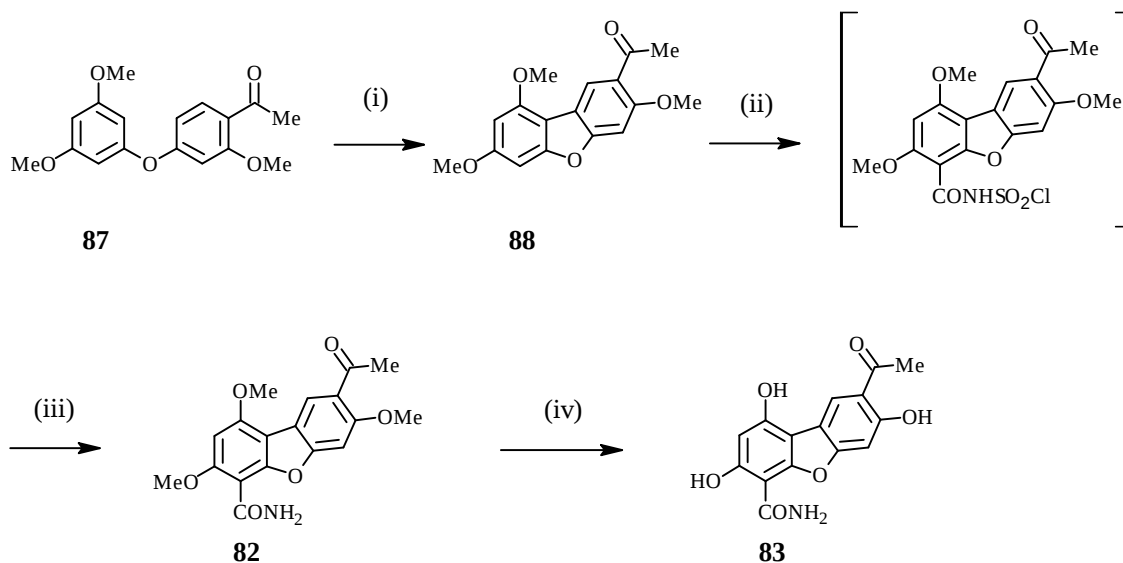


Schéma 160 : (i) Pd(OAc)₂, AgOAc, PivOH, 130 °C, 12 h, 71% ; (ii) CSI, CH₃CN, 0 °C, 12 h ; (iii) HCl 5M, t.a., 12 h, 55% ; (iv) Pyr.HCl, 200 °C, MO, 15 min, 39%.

Partie A : Synthèse des dibenzo[*b,d*]furanes

L'introduction du groupement carboxamide en position 4 se fait en deux étapes à partir du dérivé **88** en suivant le mode opératoire décrit précédemment. Le composé **82** est isolé avec un rendement de 55% et les données spectrales sont parfaitement en accord avec ce même composé obtenu par la méthode précédente d'acylation du dérivé dibenzofuranique **80** (Schéma 153 *cf.* p 149). Le rendement de déméthylation finale reste modèstement de l'ordre de 35-40% pour conduire au composé souhaité **83**. La polyhydroxylation de la molécule ne facilite pas le traitement et la purification.

En résumé, la **voie 1** d'acétylation après cyclisation conduit au 8-acétyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[*b,d*]furane-4-carboxamide **83** en 6 étapes à partir du 3-iodophénol **76**. Le même composé est obtenu suivant la **voie 2**, en réalisant l'acétylation avant cyclisation à partir du 3-iodophénol **76**, en 7 étapes avec un rendement équivalent de 3,4%.

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

I. Evaluation de l'activité antifongique

Lors de la synthèse des molécules de la famille des dibenzo[b,d]furanes, 14 molécules obtenues ont été retenues pour effectuer le même panel de tests biologiques *in vitro* que pour les 3 molécules cibles de la famille des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines. L'objectif étant là encore de vérifier leur efficacité au niveau de :

- l'activité antifongique contre *C. albicans*,
- la restauration de la sensibilité aux azolés de souches résistantes de *C. albicans*,
- l'inhibition de la formation de biofilm,
- l'inhibition de l'activité PKC *in vitro*.

Des tests de cytotoxicité sur cellules HeLa ont aussi été faits afin de vérifier que ces molécules étaient moins toxiques pour l'homme que pour le pathogène.

Les principes de chacune des techniques utilisées ayant été développés dans la partie Evaluation biologique du chapitre I, ils ne seront pas détaillés à nouveau de ce chapitre. Seuls les résultats obtenus seront décrits et commentés.

Le cercosporamide, obtenu par extraction à partir de *Mycosphaerella henningsii* au laboratoire MMS de l'Université de Nantes, a été utilisé dans l'ensemble des tests comme molécule de référence. Tous les résultats obtenus lors des tests biologiques ont été analysés par comparaison aux résultats obtenus pour le cercosporamide.

1. Souches utilisées pour les tests *in vitro*

Les souches utilisées lors de cette étude sont les mêmes que celles utilisées dans le chapitre I. 6 isolats cliniques de *C. albicans* ont été choisis pour des tests de sensibilité *in vitro* et de co-administration : 2 sensibles au fluconazole (CAAL93 et CAAL97) et 4 résistantes au fluconazole (CAAL2, CAAL28, CAAL111 et CAAL117). 4 isolats cliniques de *C. albicans* ont été sélectionnés en raison de leur capacité à former un biofilm (CAAL121, CAAL123, CAAL124 et CAAL146).

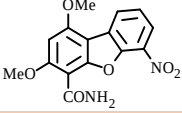
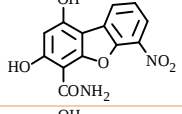
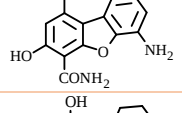
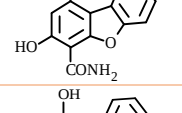
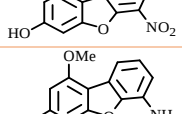
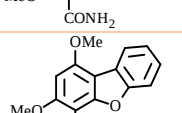
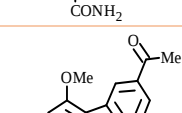
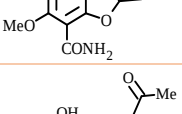
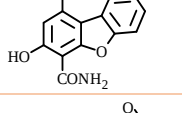
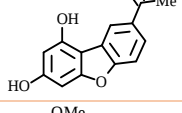
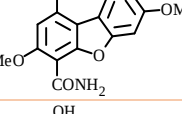
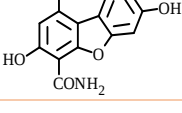
Les souches sont conservées à -80 °C pour un stockage prolongé et mises en culture sur de la gélose Sabouraud dextrose à 37 °C pendant 24 h avant les expériences.

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

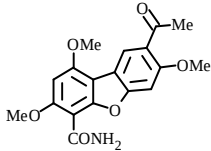
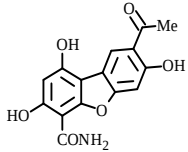
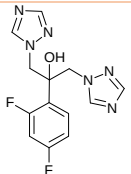
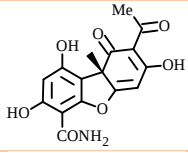
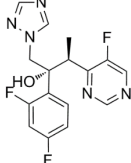
2. Test de l'activité antifongique contre *C. albicans*

Les 14 composés de la série dibenzo[b,d]furane, le cercosporamide, le fluconazole et le voriconazole ont été évalués sur 6 souches de *C. albicans* (sensibles et résistantes au fluconazole). L'ensemble des résultats obtenus sont résumés dans le tableau 31 ci-dessous :

Tableau 31 : Activité des 14 composés, du CERCO, du FLU et VORI sur 6 isolats cliniques de *C. albicans*

Composé	Structure	CMI (µM)					
		CAAL93	CAAL97	CAAL2	CAAL28	CAAL111	CAAL117
58		>300	>300	>300	>300	>300	>300
59		>300	>300	>300	>300	>300	>300
60		>300	>300	>300	>300	>300	>300
61		>300	>300	>300	>300	>300	>300
62		142±50	>300	101±23	68,3±9,8	>300	>300
63		>300	>300	>300	>300	>300	>300
64		>300	>300	163±38	>300	>300	>300
71		110±43	159±8	>300	>300	>300	>300
74		>300	>300	>300	>300	>300	>300
75		>300	>300	>300	104,6±3,4	>300	>300
80		>300	>300	>300	>300	>300	>300
81		>300	>300	>300	>300	>300	>300

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

82		>300	>300	>300	>300	>300	>300
83		>300	>300	>300	>300	>300	>300
FLU		0,23±0,09	0,20±0,1	>100	>100	>100	>100
CERCO		103±0,22	93±22	90±11,25	>300	>300	>300
VORI		-	-	> 10	2,54±0,56	0,60±0,46	4,7±1,1

Les valeurs de CMI obtenues pour le fluconazole sont en adéquation avec le comportement attendu des souches vis-à-vis d'un traitement au fluconazole : environ 0,2 μ M (0,06 mg/mL) pour les souches sensibles et >100 μ M (>30 mg/mL) pour les souches résistantes. De même les valeurs de CMI obtenues pour le voriconazole pour les souches résistantes sont en accord avec les résultats obtenus habituellement au laboratoire.

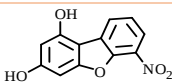
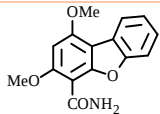
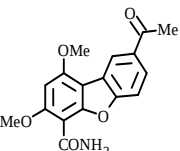
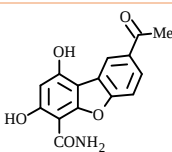
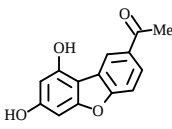
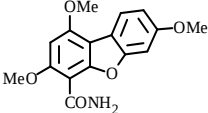
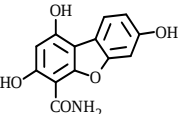
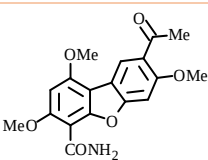
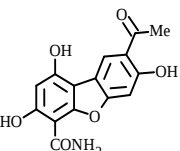
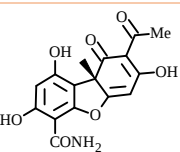
Sur les 14 composés testés, 3 composés ont montré des légers effets antifongiques sur certaines souches, avec des CMI de l'ordre de 100 μ M. Ainsi le composé **71** présente une CMI sur les deux souches sensibles, d'environ 100 μ M, le composé **62**, quant à lui ne présente une CMI que sur une des deux souches sensibles (CAAL93) et sur deux souches résistantes (CAAL2 et CAAL28). Le composé **75** a une CMI d'environ 100 μ M sur la souche CAAL28. Ces valeurs de CMI assez élevées sont en adéquation avec celles obtenues pour le cercosporamide, notre molécule de référence.

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[*b,d*]furanes

3. Etude de la restauration de la sensibilité au fluconazole sur des souches de *C. albicans*

Les tests de restauration de la sensibilité au fluconazole ont été faits avec 9 composés de la famille des dibenzo[*b,d*]furanes sur les 4 souches résistantes au fluconazole. Les résultats sont résumés dans les tableaux 32 et 33 ci-dessous :

Tableau 32 : Détermination des FICI des 9 composés de la famille des dibenzo[*b,d*]furanes en co-administration avec le fluconazole sur CAAL2

Composé	Structure	CAAL2		
		[composé] ^a	[FLU]/[composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b
FLU	-	>100	-	-
62		100	1,2/10	0,11
64		300	2,4/100	0,35
71		>300	>100/>300	2
74		>300	>100 />300	2
75		>300	1,2/30	0,11
80		>300	1,2/30	0,11
81		>300	1,2/30	0,11
82		>300	>100/>300	2
83		>300	>100/>300	2
CERCO		100	0,5/50	0,50

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

Tableau 33 : Détermination des FICI des 9 composés de la famille des dibenzo[b,d]furanes en co-administration avec le **fluconazole** sur CAAL28, CAAL111 et CAAL117

Composé	CAAL28			CAAL111			CAAL117		
	[composé] ^a	[FLU]/ [composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b	[composé] ^a	[FLU]/ [composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b	[composé] ^a	[FLU]/ [composé] ^a	FICI _[FLU] / [composé] ^b
62	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
64	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
71	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
74	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
75	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
80	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
81	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
82	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2
83	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2	>300	>100 />300	2

^a FICI est la somme des FICs de chacun des composés, qui à son tour est définie comme la CMI de chaque composé lorsqu'il est utilisé en combinaison divisée par la CMI du composé lorsqu'il est utilisé seul. La valeur FICI la plus élevée ne peut pas être supérieure à 2,0 en raison des concentrations les plus élevées testées pour chaque composé.

^b CMI en combinaison exprimée en [FLU]/[composé]

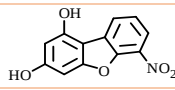
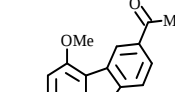
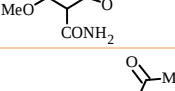
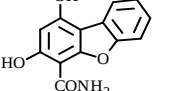
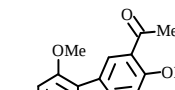
Un effet synergique a été observé pour 5 composés (**62**, **64**, **75**, **80** et **81**) sur la souche CAAL2. Il sera intéressant de comprendre pourquoi CAAL2 est la seule souche pour laquelle on obtient une restauration de la sensibilité au fluconazole. Dans la mesure où il s'agit d'une résistance liée à une mutation sur le gène *Erg3*, il faudrait d'abord comprendre quelles sont les voies de signalisation impliquées (MAPK ou autre) pour identifier la cible des molécules synthétisées ici (PKC ou autre kinase ?).

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

4. Test d'inhibition de biofilm

Les tests d'inhibition de croissance sur biofilm mature ont été faits pour 5 molécules (**62**, **71**, **74**, **82**, **83**) sur les 4 souches sélectionnées pour leur capacité à former du biofilm. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 34 ci-dessous :

Tableau 34 : Test d'inhibition de biofilm pour 5 molécules sur CAAL121, CAAL123, CAAL124, CAAL146

Composé	Structure	CAAL121			CAAL123			CAAL124			CAAL146		
		CMI (μM)	SD	SEM	CMI (μM)	SD	SEM	CMI (μM)	SD	SEM	CMI (μM)	SD	SEM
62		99,74	18,08	17,05	80,59	8,92	8,37	60,47	8,16	7,69	117,93	7,86	7,17
71		>300	-	-	45,57	17,44	16,32	>300	-	-	>300	-	-
74		>300	-	-	>300	-	-	>300	-	-	>300	-	-
82		>300	-	-	43,70	19,32	16,30	15,22	0,18	0,18	>300	-	-
83		>300	-	-	>300	-	-	>300	-	-	>300	-	-
AmB	-	<			<			0,12	0	0	0,35	0,10	0,10

On observe que le composé **62** permet une inhibition de la croissance du biofilm mature pour l'ensemble des 4 souches testées, avec une CMI comprise entre 60 et 120 μM. Le composé **82** a quant à elle une activité inhibitrice sur deux souches CAAL124 et CAAL123 avec des CMI de 15 μM et 44 μM respectivement. Enfin le composé **71** a une activité inhibitrice uniquement sur la souche CAAL123, avec une CMI de 46 μM.

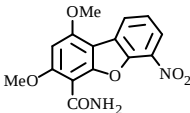
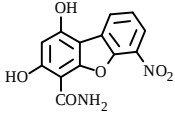
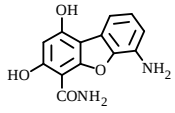
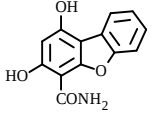
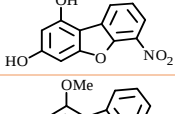
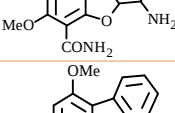
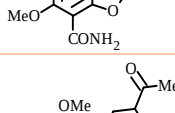
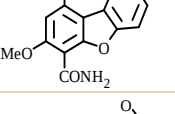
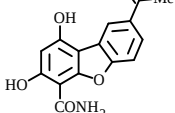
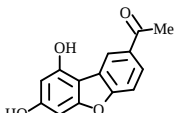
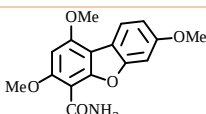
Aucune activité inhibitrice n'est observée pour 2 composés (**74**, **83**) sur les 4 souches sélectionnées (CAAL121, CAAL123, CAAL124, CAAL146).

Dans la mesure où certaines molécules ont montré des propriétés de restauration de la sensibilité au fluconazole dans certaines conditions et/ou des propriétés d'inhibition de la croissance du biofilm dans certaines conditions aussi, il est absolument nécessaire de vérifier la cytotoxicité de ces molécules sur cellules HeLa.

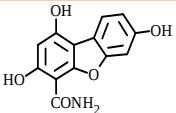
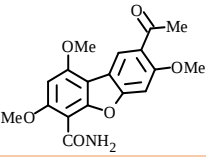
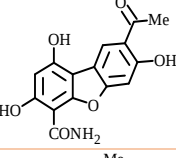
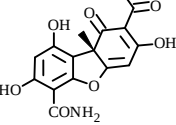
II. Cytotoxicité

La cytotoxicité sur la lignée cellulaire HeLa a été évaluée pour les composés de la famille des dibenzo[*b,d*]furanes, comme décrit dans le chapitre I. Les résultats de cytotoxicité obtenus sont résumés dans le tableau 35 ci-dessous :

Tableau 35 : Valeurs de la CMI des composés cibles sur les cellules HeLa

Composé	Structure	HeLa
		CMI (μ M)
58		>100
59		24,7 $\pm$ 6,7
60		14,6 $\pm$ 7,2
61		9,54 $\pm$ 4,1
62		49,29 $\pm$ 0,6
63		7,14 $\pm$ 0,22
64		< 3
71		>100
74		59,6 $\pm$ 7,6
75		>100
80		>100

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

81		$10,25 \pm 1,16$
82		>100
83		$57,05 \pm 7,6$
CERCO		$7,51 \pm 6,14$

Les composés de la famille des dibenzo[b,d]furanes synthétisées et testées ici peuvent être classées en 4 catégories :

- Pas de cytotoxicité (CMI $>100\mu\text{M}$) : **58, 71, 75, 80** et **82**.
- Cytotoxicité faible (CMI environ $50\mu\text{M}$) : **62, 74, 83**.
- Cytotoxicité moyenne (CMI environ 10 - 20 μM , c'est à dire de l'ordre de grandeur de celle du cercosporamide) : **59, 60, 61, 63, 81**.
- Cytotoxicité élevée : **64**.

Aux vues de sa cytotoxicité élevée, il ne paraît pas intéressant de continuer à étudier la molécule **64** dans un contexte de propriétés antifongiques.

Par contre, il est intéressant de chercher à comprendre le mode d'action des molécules qui montrent une activité antifongique au niveau de la restauration de la sensibilité au fluconazole comparable à celles du cercosporamide et une cytotoxicité beaucoup plus faible.

III. Activités inhibitrices de kinases

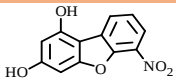
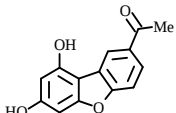
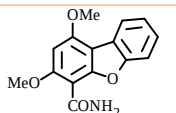
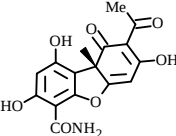
1. Inhibition de l'activité kinase de la *CaPkc1*

Pour essayer de comprendre le mécanisme d'action, l'inhibition de l'activité PKC de *C. albicans* par les composés de la série dibenzo[*b,d*]furane a été mesurée.

Les conditions opératoires ont été choisies de manière à ce que le pourcentage d'inhibition de l'activité kinase du cercosporamide soit compris en 35% (CAAL2) et 40% (CAAL93 et PKC humaine). Pour ce faire, la concentration en molécule et en cercosporamide a été fixée à 100 μ M. Ce choix a été justifié plus en détails dans le chapitre I.

Nous avons choisi de tester l'inhibition de l'activité kinase de la *CaPkc1*, uniquement pour les molécules qui montrent une propriété de restauration de la sensibilité au fluconazole. Pour l'instant seules 3 molécules ont été testées (**62**, **64** et **75**) et elles ne montrent pas ou peu d'activité d'inhibition sur l'extrait protéique de CAAL2 et seule **62** montre un effet d'inhibition sur l'extrait protéique de CAAL93. Ces résultats sont résumés dans le tableau 36 ci-dessous.

Tableau 36 : Inhibition de l'activité kinase de la PKC humaine et des extraits protéiques totaux de CAAL2, CAAL93 par le cercosporamide et les composés **62**, **64** et **75**

Composé	Structure	CAAL2	PKC	CAAL93
62		16%	50%	52%
75		0%	94%	nd
64		0%	17%	0%
CERCO		43%	40%	nd

Ces résultats ne permettent pas de valider les molécules synthétisées comme étant de meilleurs inhibiteurs de *CaPkc1* que le cercosporamide, ou même comme étant des inhibiteurs de *CaPkc1*.

Cependant pourrait être intéressant d'essayer de comprendre pourquoi la molécule **75** inhibe très fortement l'activité kinase de la PKC humaine et pas du tout celle d'extraits protéiques totaux de *C. albicans*.

Enfin nous n'avons pas eu le temps de réaliser les tests d'inhibition de l'activité kinase de PKC par les composés **80** et **81**. Ces tests restent donc à réaliser afin de comprendre le mode d'action de ces deux composés.

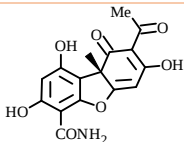
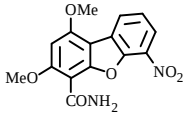
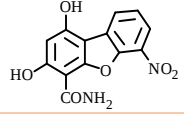
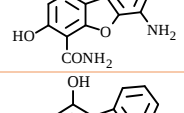
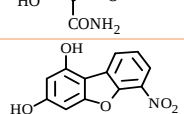
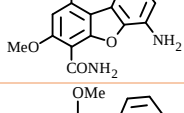
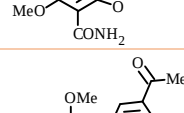
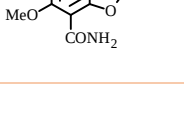
Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

2. Evaluation d'inhibition sur les kinases humaines

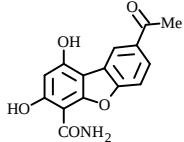
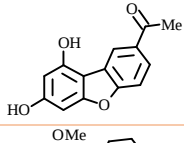
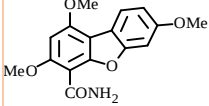
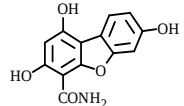
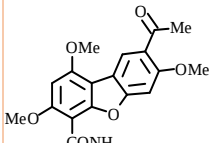
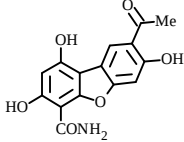
Ce travail a été fait par la plateforme KISSf à Roscoff. Les évaluations ont été faites sur un panel de 8 kinases. Les tests, réalisés en triplicate avec le même mode opératoire que précédemment, mesure le taux de phosphorylation des protéines substrats associées aux différentes kinases. Les kinases testées ici sont *MmCLK1*, *SscGSK3 α/β* , *HsPIM1*, *HsCDK9/CyclineT*, *HsCDK5/p25*, *RnDYRK1A*, *HsHaspin* et *HsCK1 δ/ϵ* .

Le tableau 37 présente les résultats obtenus de 14 molécules testées dans la série dibenzo[b,d]furane sur 8 protéines kinases.

Tableau 37 : Détermination les IC₅₀ des molécules de la famille des dibenzo[b,d]furanes synthétisées contre un panel de 8 protéines kinases

Composé	Structure	IC ₅₀ (μM)							
		CLK1	GSK3	PIM1	CDK9	CDK5	DYRK1A	Haspine	CK1
CERCO		>10	>10	8,10	0,22	5,60	>10	>10	>10
58		>10	>10	3,21	>10	>10	>10	>10	>10
59		1,22	>10	0,18	>10	>10	>10	>10	>10
60		0,45	>10	0,13	>10	>10	>10	>10	>10
61		0,26	>10	0,23	>10	>10	>10	>10	>10
62		0,81	>10	1,35	>10	>10	>10	>10	>10
63		>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
64		0,75	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
71		>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Partie B : Evaluation biologique des dibenzo[b,d]furanes

74		0,14	>10	0,28	>10	>10	>10	>10	>10
75		0,44	>10	0,97	>10	>10	>10	>10	>10
80		>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
81		0,026	>10	0,06	>10	>10	>10	>10	0,35
82		>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
83		0,29	>10	0,82	>10	>10	>10	>10	>10

Neuf des composés testés (**59**, **60**, **61**, **62**, **64**, **74**, **75**, **81** et **83**) ont des IC₅₀ submicromolaires, sur deux kinases : *Mm*CLK1 et *Hs*PIM1 ce qui en fait des cibles potentielles pour ces composés. Parmi ces composés, la molécule **81** possède des activités inhibitrices très prometteuses sur 2 kinases *Mm*CLK1 et *Hs*PIM1 avec des CI₅₀ de 26 nM et 60 nM respectivement.

Sur les 5 composés qui restaurent la sensibilité d'une souche résistante aux azolés, 4 d'entre eux montrent une activité inhibitrice importante sur *Mm*CLK1 et *Hs*PIM1. Comme nous l'avons expliqué précédemment, le domaine kinase de Fun31p, une sérine/thréonine kinase, présente une similitude de 51% avec le domaine kinase de PIM1 humain. Cette kinase fongique impliquée dans la régulation des dommages de la paroi cellulaire chez *C. albicans* pourrait être une cible potentielle pour les composés **62**, **64**, **75** et **81**. Des études complémentaires restent à faire pour le vérifier.

Un seul composé, le **81**, possède une activité inhibitrice simultanée sur les 3 kinases *Mm*CLK1, *Hs*PIM1 et *Hs*CKIδ/ε, avec des CI₅₀ de 0,026 ; 0,06 et 0,35 μM respectivement. Cette molécule pourrait présenter un intérêt particulier en raison de son action sur plusieurs cibles, notamment en cancérologie.

Il est, de plus, important de noter que la molécule **80**, qui permet de restaurer la sensibilité de la souche CAAL2 au fluconazole, ne démontre aucune propriété d'inhibition des kinases. Le mécanisme d'action de cette molécule reste donc à élucider et il est sûr que l'hypothèse d'inhibition de l'activité kinase n'est pas valable.

IV. Conclusion sur l'activité biologique de la famille des dibenzo[b,d]furanes

Tout d'abord, l'activité antifongique contre 6 souches de *C. albicans* (sensibles et résistantes au fluconazole) a été mesurée *in vitro* pour les 14 composés. Le composé **71** présente une inhibition de la croissance des deux souches sensibles avec une CMI de l'ordre de 150 μ M. Le composé **62**, quant à lui présente une CMI d'environ 150 μ M sur la souche sensible (CAAL93) et d'environ 100 μ M sur deux souches résistantes (CAAL2 et CAAL28). Le composé **75** a une CMI d'environ 100 μ M sur la souche résistante CAAL28. Ces valeurs de CMI sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour le cercosporamide dans nos conditions d'étude.

Les tests de restauration de la sensibilité au fluconazole *in vitro* ont permis d'obtenir de très bon résultats. Un effet synergique avec le fluconazole a été observé pour 5 composés (**62**, **64**, **75**, **80** et **81**) sur la souche CAAL2, seule souche pour laquelle le cercosporamide permet de restaurer la sensibilité au fluconazole.

Ensuite, les tests d'inhibition de croissance sur biofilm mature pour 5 molécules (**62**, **71**, **74**, **82** et **83**) sur les 4 souches ont permis de voir émerger des résultats encourageants. La molécule **62** permet une inhibition de la croissance du biofilm mature pour l'ensemble des 4 souches testées avec des CMI allant de 60 à 100 μ M. La molécule **82** a montré une activité inhibitrice sur deux des souches avec des CMI plus faibles (de 15 μ M et 45 μ M). La molécule **71** a une activité inhibitrice sur une seule souche avec une CMI de 45 μ M. Ces valeurs de CMI sont cependant trop élevées pour pouvoir présenter ces molécules comme des inhibiteurs efficaces de croissance du biofilm mature et des pharmacomodulations restent à faire pour améliorer ces résultats.

Une vérification de la cytotoxicité de ces composés a été faite, sur cellules HeLa. Il s'avère que 8 composés ne présentent aucune cytotoxicité ou une cytotoxicité faible (**58**, **62**, **71**, **74**, **75**, **80**, **82** et **83**), alors que les cinq composés ont une cytotoxicité moyenne (**59**, **60**, **61**, **63** et **81**) et qu'un des composés est très cytotoxique (**64**). Nous en avons donc conclu qu'il ne fallait pas continuer à étudier le composé **64** dans un contexte de propriétés antifongiques alors qu'il serait intéressant de comprendre le mode d'action des composés montrant une cytotoxicité faible.

Les tests d'inhibition de l'activité kinase, *in vitro*, n'ont été effectués pour l'instant que sur trois des composés qui restaurent la sensibilité de souches résistantes au fluconazole (**62**, **64** et **75**). Ces trois composés n'ont pas démontré d'inhibition de l'activité kinase de la *CaPkc1* plus importante que celle du cercosporamide. Par contre le composé **75** semble être un très bon inhibiteur de l'activité kinase de la PKC humaine. Ces résultats ne permettent pas de valider ces composés comme étant des inhibiteurs de *CaPkc1*.

Afin d'établir un profil de sélectivité, l'activité inhibitrice des 14 composés synthétisés a été évaluée sur les kinases humaines. 9 des composés (**59**, **60**, **61**, **62**, **64**, **74**, **75**, **81** et **83**) possèdent une activité inhibitrice sur 2 kinases *MmCLK1* et *HsPIM1*. Le composé **81** possède une activité inhibitrice sur 3 kinases *MmCLK1*, *HsPIM1* et *HsCKI δ / ϵ* . Ces essais permettent de proposer de nouvelles cibles intéressantes pour les composés. Des tests d'activité antiproliférative sur des lignées cellulaires tumorales, surexprimant notamment *PIM1*, vont être réalisés afin de vérifier le potentiel antitumoral de la série.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'objectif de ces travaux de recherche consistait à concevoir de nouveaux composés hétérocycliques analogues de cercosporamide, inhibiteurs spécifiques de *CaPkc1*, puis à évaluer leur potentiel antifongique intrinsèque ou leur propriété de contournement de la résistance aux azolés.

Grâce à la connaissance des caractéristiques essentielles du site de fixation de l'ATP des kinases et à l'étude du cercosporamide comme un inhibiteur de *CaPkc1*, nous avons pu mettre en évidence les principales interactions du cercosporamide dans le site ATP de l'enzyme, par modélisation moléculaire. En effet, il agit en compétition avec l'ATP au sein de son site de liaison, ciblant les acides aminés Glu104 et Ile106 (1^{ère} hypothèse) et les acides aminés Ile106, Asp166/Asn153, et Asp152 (2^{ème} hypothèse) en occupant la profonde cavité hydrophobe. Cette étude nous a permis de synthétiser des analogues hétérocycliques simplifiés en s'affranchissant de la présence d'un carbone asymétrique, à structures benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine et dibenzo[*b,d*]furane, reprenant les caractéristiques structurales essentielles du cercosporamide.

Les différentes approches menées lors de ces travaux ont permis la synthèse et l'évaluation biologique de **17** composés. Parmi ces derniers, **3** composés d'intérêt en série benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine et **7** composés d'intérêt en série dibenzo[*b,d*]furane ont donné de résultats biologiques intéressants. Le travail sur la série benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine a été publié, il en sera de même pour la série dibenzo[*b,d*]furane.

Série benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine :

Les voies d'accès à des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines nous ont permis d'obtenir 3 composés cibles avec des rendements globalement faibles, de l'ordre de 5 à 14%.

Nous n'avons pas pu démontrer d'effet antifongique direct, sur les différentes souches testées, des composés de la série des benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine. Par contre l'un des composés a permis pour la première fois de restaurer la sensibilité au fluconazole d'une souche résistante. Nous avons de plus montré que ces composés avaient une cytotoxicité faible, plus faible que le cercosporamide.

Les tests de mesure de l'activité kinase ont permis de valider l'activité inhibitrice de ces composés sur la *CaPkc* plus importante que celle du cercosporamide. Par contre, cette activité inhibitrice est aussi observée sur l'activité de la PKC humaine, ce qui peut entraîner des questions sur la sélectivité de ces composés. Ceci est confirmé par les essais faits sur un panel de kinases, qui ont permis de proposer de nouvelles cibles intéressantes pour au moins l'un de ces composés (composé **41**).

Certaines pharmacomodulations sont encore nécessaires pour améliorer les effets observés dans cette étude.

Conclusions et perspectives de recherche

Série dibenzo[*b,d*]furane :

Les travaux de synthèse nous ont permis d'obtenir **14** composés analogues du cercosporamide, dont **7** composés d'intérêt avec des rendements globalement faibles, de l'ordre de 4 à 7%.

Parmi les 7 composés d'intérêt, 3 d'entre eux ont démontré des activités antifongiques de l'ordre de grandeur de celles du cercosporamide sur certaines souches. Les valeurs de CMI sont élevées (>100µM), mais confirment l'intérêt du travail de pharmacomodulation fait sur cette série.

Lors des tests de restauration de la sensibilité au fluconazole, 5 des composés ont montré un effet synergique avec le fluconazole mais sur une souche particulière, celle dont le mécanisme de résistance passe par des mutations sur le gène *ERG3*. Il serait intéressant de comprendre par quels mécanismes d'action ces composés agissent sur cette souche en particulier.

L'ensemble des 14 composés analogues n'ont pas été testés pour leur activité inhibitrice de croissance de biofilm mature. Sur les 5 composés testés, 3 composés d'intérêt ont démontré des activités inhibitrices avec des CMI assez faibles. Là encore, la connaissance de la cible de ces composés permettrait de comprendre leur mode d'action sur la croissance du biofilm.

Parmi les 7 composés d'intérêt, deux catégories se dessinent au niveau de la cytotoxicité sur cellules HeLa. 6 composés ont des cytotoxicités faibles voir inexistantes et il sera intéressant de continuer à élucider leur mode d'action au niveau de leur activité antifongique (directe ou de restauration de sensibilité au fluconazole). Le dernier composé a une cytotoxicité submicromolaire ce qui le rend inintéressant de point de vue antifongique mais qui justifie de mener une étude sur son activité anticancéreuse.

La mesure de l'inhibition de l'activité PKC de *Candida* n'a pas permis de valider CaPkc1 comme cible potentielle pour les 3 composés testés. Des études complémentaires seront donc à mener pour le 4 autres composés d'intérêt.

Enfin lors de l'établissement d'un profil de sélectivité, des résultats d'inhibition de deux kinases humaines (*MmCLK1* et *HsPIM1*) ont été obtenus. Ces deux kinases ayant des homologues chez *Candida*, il serait pertinent d'investiguer ces kinases comme cibles potentielles des composés d'intérêt. Enfin, les résultats obtenus sur les kinases humaines testées laissent imaginer que les composés de la série dibenzo[*b,d*]furane pourraient avoir des propriétés anticancéreuses intéressantes. Des tests complémentaires sur cellules cancéreuses restent à faire pour valider cette hypothèse

Les bons résultats obtenus en série dibenzo[*b,d*]furane tant sur les propriétés antifongiques que sur les propriétés d'inhibition de kinases humaines doivent nous inciter à poursuivre les travaux de pharmacomodulation, pour l'amélioration des propriétés physico-chimiques (perméabilité membranaire) et des interactions avec la cible protéique. Notamment les données issues de la 2^{ème} hypothèse de docking suggèrent l'introduction d'une chaîne *N,N*-diméthylpropylamine sur le phénol en position 1 permettrait de cibler l'Asp152 dans une interaction ionique spécifique (Figure 65).

Conclusions et perspectives de recherche

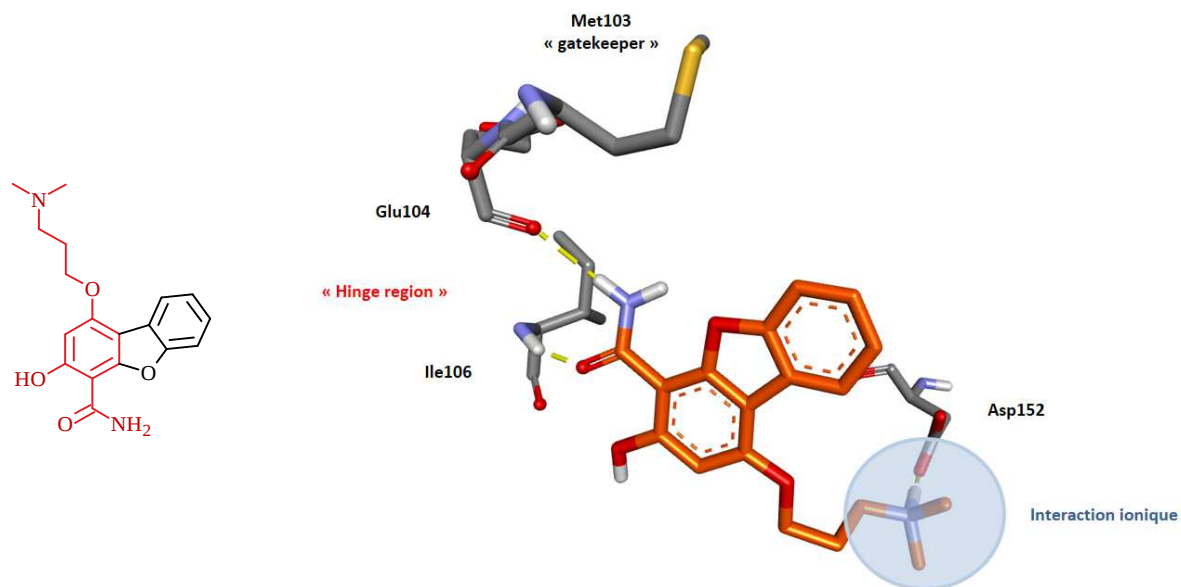


Figure 65 : Hypothèse de docking dans le site ATP du modèle *CaPkc1*

PARTIE EXPERIMENTALE

I. General chemistry

Solvents

The anhydrous solvents are distilled according to the following methods:

- Sodium/benzophenone for ethers (diethyl ether, tetrahydrofuran).
- Calcium chloride for chlorinated solvents (dichloromethane, 1,2-dichloroethane).

They are then stored under nitrogen.

Microwave synthesis

DiscoverTM CEM system, *Magnetron Frequency 2450 MHz, Power Output 300 Watts.*

Chromatography

Analytical chromatography

All reactions were monitored by TLC analysis using Merck silicagel 60F-254 thin-layer plates. The revelation is carried out under an ultraviolet lamp at 254 or 365 nm.

Preparative chromatography

Purifications by column chromatography are carried out in liquid phase on an open column. The stationary phase used is Merck 60 silica gel (70-230 mesh ASTM) (0.063-0.200 μm).

Physical measurements

Melting points were determined on an Electrothermal IA 9000 melting point apparatus and are uncorrected.

Spectrometric methods

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 spectrometer (^1H NMR at 400 MHz and ^{13}C NMR at 100 MHz), remanent signal of solvent was used like intern reference. Chemical shift (δ) values are expressed in parts per million (ppm) and coupling constants (J) values are given in Hz. The multiplicity of signals is indicated using the following abbreviations:

s = singulet	d = doublet	dd = doublet de doublet
t = triplet	q = quadruplet	m = multiplet
ddd = doublet de doublet de doublet		tt = triplet de triplet

Infrared spectrometry (IR)

Infrared spectra (IR) were recorded on a Shimadzu IRAffinity-1 IR-FT spectrophotometer equipped with a MIRacle 10 accessory ATR.

Mass Spectrometry (Mass)

Electrospray mass spectrometric analyses were performed on a Waters Acquity UPLC system ZQ 2000 single quadrupole spectrometer. Formic acid (0.1%) was added in diluent to improve ionization. The compounds are previously dissolved in methanol.

Elemental analyses

Elemental analyses were performed on a Thermo Scientific Elemental Analyser Flash EA 1112 and were found within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values.

II. Table of methods

Type of reaction	Method	Compounds	Conditions	Pages
Protection of hydroxyl group	A1	2 85	Pyridine, Ac ₂ O, 120 °C	174 247
		77 84	CH ₃ I, Cs ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, 70 °C	240 249
Synthesis of tribenzyl phloroglucinol ether	B	3	BnCl, NaH, DMF, H ₂ O, 0 °C - rt	175
Mono-deprotection of tribenzylated precursor	C	4	C ₆ H ₁₀ , Pd-C 10%, AcOEt/EtOH (3/1), 110 °C	176
Halogenation	D1	5	NBS, CH ₂ Cl ₂ , -78 °C	177
	D2	9 14	NIS, CH ₂ Cl ₂ , -78 °C	179 185
		29 44	NIS, CH ₂ Cl ₂ , 0 °C	198 214
Cyanation	E	7 16 23 32 45	CuCN, DMF, 160 °C	181 187 192 200 215
		6 10 15 30 31		178 180 186 199 201
		34	NaH, ethyl bromoacetate, DMF, rt	205
		38 46	NaH, 2-iodoacetamide, DMF, 60 °C	209 216
			Bromoacetonitrile, K ₂ CO ₃ , DMF, 80 °C	

Experimental section

Type of reaction	Method	Compounds	Conditions	Pages
Cyclisation	G1	11	NaH, DMF, 0 °C	182
		17		188
		18		202
		24		193
		39		210
		47		217
	G2	35	KOH, EtOH, 60 °C	206
Protection of amino group by a Boc group	H	13	Boc ₂ O, DMAP, THF, 80 °C	184
		27		196
Building of pyrimidine ring	I1	12	1) HC(OEt) ₃ , MW, 100W, 200 °C 2) NH ₃ /MeOH 7N, MW, 100W, 140 °C	183
		19		189
		20		203
		25		194
		40		211
		48		218
	I2	36	1) KOCN, CH ₃ COOH, 100 °C 2) KOH/EtOH, 90 °C	207
Deprotection of benzyl groups	J	21	H ₂ SO ₄ cc, rt	191
		22		190
		33		204
		37		208
		41		212
Demethylation of methoxy groups	K1	41	Pyridine.HCl, 200 °C, MW, 100W	212
		59		226
		61		228
		62		229
		74		238
		75		239
		81		244
		83		246
	K2	59	BBr ₃ , CH ₂ Cl ₂ , rt	226

Experimental section

Type of reaction	Method	Compounds	Conditions	Pages
Synthesis of NHS formate	L	26	Ac ₂ O, 0 °C-rt	195
Introduction of carboxamide function	M	28	1) CSI, CH ₃ CN, 0 °C 2) HCl 1M, rt	197
		43		213
		58		225
		64		231
		71		237
		80		243
		82		245
Synthesis of diaryl ether intermediate	N1	50	1) KOH, DMF, 120 °C	221
		51	2) 1-iodo-2-nitrobenzene, Cu,	219
		54	170 °C	222
	N2	65	Cs ₂ CO ₃ , CuI, DMF, 120 °C, MW, 80W	232
		72		235
		78		241
		87		250
Reduction of nitro group	O1	52	Zn, NH ₄ Cl sat, CH ₃ OH, 80 °C	220
		55		223
		60		227
		63		230
	O2	52	SnCl ₂ , HCl, CH ₃ OH, 80 °C	220
Deamination	P	61	H ₂ SO ₄ 25%, NaNO ₂ ,	228
		64	EtOH, 0 °C - 80 °C	231

Experimental section

Type of reaction	Method	Compounds	Conditions	Pages
Synthesis of dibenzofurans (cyclisation)	Q1	56	Pd(OAc) ₂ , AgOAc, PivOH, 130 °C	233
		57		224
		73		236
		79		242
		88		251
	Q2	64	Cs ₂ CO ₃ , CH ₃ CN, MW, 100W, 150 °C	231
Suzuki coupling	R	69	Pd(OAc) ₂ , PPh ₃ , K ₃ PO ₄ , CH ₃ CN/H ₂ O (4/1), 90 °C, MW, 80W	234
Friedel-Crafts acylation	S	82	AcCl, AlCl ₃ , 1,2-dichloroethane, rt	245
Fries rearrangement	T	86	BF ₃ .2CH ₃ COOH, 180 °C	248

Experimental section

Phloroglucinol triacetate (2)

White powder

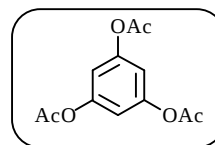
$C_{12}H_{12}O_6$

$M_r = 252.22 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.23$ (cyclohexane/ethyl acetate: 5/1)

$M_p = 106 - 107 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 87%



Method A1: To a solution of phloroglucinol **1** (10.00 g, 79.2 mmol) in pyridine (50 mL) was added acetic anhydride (30 ml, 317.2 mmol). The mixture was stirred and refluxed for 5 h. Pyridine was then removed under reduced pressure and the residue was washed with diisopropyl ether to give compound **2** as a white powder (17.30 g, 87% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 6.84 (s, 3H, $H_{2,4,6}$), 2.28 (s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 168.7 (3C=O), 151.2 (3C), 112.9 (3CH), 21.2 (3 CH_3).

IR (cm^{-1}): 3105, 1757, 1601, 1366, 1182, 1121, 1018, 914.

MS (ESI), m/z (%): 251.06 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Experimental section

Phloroglucinol tribenzyl ether (3)

White powder

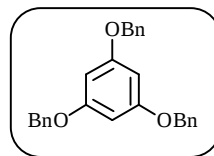
$C_{27}H_{24}O_3$

$M_r = 396.48 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.66$ (cyclohexane/ethylacetate: 8/2)

$M_p = 88-89 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 96%



Method B: A mixture of phloroglucinol triacetate **2** (20.00 g, 79.3 mmol), benzyl chloride (33.0 mL, 285.5 mmol) and sodium hydride 60% (22.80 g, 571.0 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (200 mL) was cooled to 0 °C and water (5 mL) was added dropwise over a period of 10 min. The reaction mixture was stirred for 10 h at room temperature then reaction was quenched with water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was recrystallized from methanol to give compound **3** as a white solid (30.00 g, 96% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.43-7.33 (m, 15H, H_{Ar}), 6.28 (s, 3H, $H_{2,4,6}$), 5.01 (s, 6H, 3CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 160.6 (3C), 136.8 (3C), 128.5 (6CH), 127.9 (3CH), 127.5 (6CH), 94.9 (3CH), 70.1 (3CH₂).

IR (cm⁻¹): 2922, 1593, 1449, 1377, 1155, 1063, 1026.

MS (ESI), m/z (%): 397.17 (100) [$M+H$]⁺.

Experimental section

3,5-Dibenzyloxyphenol (**4**)

White powder

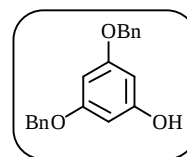
$C_{20}H_{18}O_3$

$M_r = 306.36 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.16$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 91\text{-}92 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 45%



Method C: A mixture of phloroglucinol tribenzyl ether **3** (10.00 g, 25.2 mmol), palladium on carbon 10% (0.80 g) and cyclohexene (1.3 mL, 12.6 mmol) in 80 mL of ethyl acetate/ethanol (3/1) mixture was refluxed at 110 $^\circ\text{C}$ for 2 h. Then the reaction mixture was filtered on Celite[®], concentrated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **4** as a white solid (3.47 g, 45% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.44 – 7.32 (m, 10H), 6.26 (t, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, H₄), 6.14 (d, $^4J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H₂), 6.12 (d, $^4J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H₆), 5.01 (s, 4H, 2CH₂), 4.78 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 160.8 (2C_{3,5}), 157.2 (C₁), 136.7 (2C), 128.5 (4CH), 128.0 (2CH), 127.5 (4CH), 95.3 (2CH_{2,6}), 94.9 (C₄), 70.1 (2CH₂).

IR (cm⁻¹): 3391, 3032, 2931, 1600, 1498, 1453, 1377, 1214, 1152, 1053.

MS (ESI), m/z (%): 307.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3,5-bis(Benzyloxy)-2-bromophenol (5)

Light beige powder

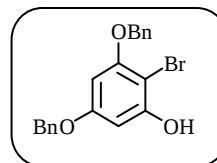
$C_{20}H_{17}BrO_3$

$M_r = 385.25 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.33$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/2)

$M_p = 71\text{-}72 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 95%



Method D1: A solution of 3,5-dibenzyloxyphenol **4** (300 mg, 0.98 mmol) in dichloromethane (5 mL) was cooled to $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. *N*-bromosuccinimide (174 mg, 0.98 mmol) was added and the reaction mixture was maintained at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min. The reaction was quenched at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ by the addition of 10% aqueous potassium carbonate solution (10 mL) and warmed to room temperature. The reaction was diluted with water (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **5** as a light beige solid (358 mg, 95% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.45 - 7.32 (m, 10H, H_{Ar}), 6.35 (d, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.24 (d, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 5.67 (s, 1H, OH), 5.09 (s, 2H, CH_2), 5.00 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 159.7 (C_1), 155.9 (C_5), 153.8 (C_3), 136.4 (C), 136.3 (C), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 128.1 (1CH), 127.9 (1CH), 127.5 (2CH), 127.0 (2CH), 94.7 (C_6H), 94.6 (C_4H), 92.0 (C_2), 70.8 (CH_2), 70.3 (CH_2).

IR (cm^{-1}): 3483, 2928, 1597, 1496, 1155, 1103, 1028, 972, 800, 734, 692.

MS (ESI), m/z (%): 383.1 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$; 383.1 (100) $[\text{M}-\text{H}+2]^-$; 386.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 387.1 (100) $[\text{M}+\text{H}+2]^+$.

Experimental section

Ethyl (2-bromo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (6)

Pale yellow powder

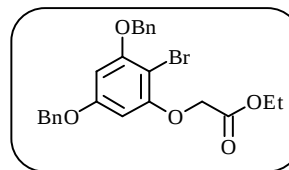
$C_{24}H_{23}BrO_5$

$M_r = 471.34 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.12$ (cyclohexane/ethyl acetate: 9/1)

$M_p = 92-93 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 83%



Method F1: To a solution of 3,5-bis(benzyloxy)-2-bromophenol **5** (200 mg, 0.5 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% (32 mg, 0.8 mmol) at room temperature. When no more gas evolved, ethyl bromoacetate (66 μL , 0.6 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **6** as a pale yellow solid (196 mg, 83% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.47 – 7.16 (m, 10H, H_{Ar}), 6.32 (d, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 6.16 (d, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 5.11 (s, 2H, CH_2), 4.98 (s, 2H, CH_2), 4.65 (s, 2H, CH_2CO), 4.25 (q, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, CH_2CH_3), 1.29 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 168.3 (C=O), 159.2 (C_3), 156.8 (C_5), 156.1 (C_1), 136.4 (C), 136.3 (C), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 128.2 (1CH), 127.9 (1CH), 127.5 (2CH), 126.9 (2CH), 95.4 (C_6H), 94.5 (C_4H), 94.2 (C_2), 71.0 (CH_2), 70.4 (CH_2), 66.5 (CH_2CO), 61.4 (CH_2CH_3), 14.1 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 1743, 1604, 1503, 1454, 1433, 1388, 1207, 1141, 1055, 1024, 798, 736, 698.

MS (ESI), m/z (%): 471.1 (100) [$\text{M}-\text{H}+2$] $^-$; 474.2(100) [$\text{M}+\text{H}+2$] $^+$.

Experimental section

3,5-bis(Benzyloxy)-2-iodophenol (9)

White powder

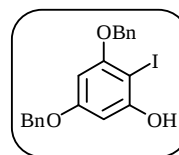
$C_{20}H_{17}IO_3$

$M_r = 432.25 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.17$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 75\text{-}76 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 76%



Method D2: A solution of 3,5-dibenzyloxyphenol **4** (2.00 g, 6.5 mmol) in dichloromethane (10 mL) was cooled to $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. *N*-iodosuccinimide (1.47 g, 6.5 mmol) was added and the reaction mixture was maintained at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min. The reaction was quenched at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ by the addition of 10% aqueous potassium carbonate solution (20 mL) and warmed to room temperature. The reaction was diluted with water (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **9** as a white solid (2.14 g, 76% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.52 – 7.35 (m, 10H, H_{Ar}), 6.43 (d, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.24 (d, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 5.58 (s, 1H, OH), 5.12 (s, 2H, CH_2), 5.04 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ : 161.3 (C_1), 158.1 (C_5), 156.5 (C_3), 136.4 (C), 136.3 (C), 128.6 (2CH), 128.6 (2CH), 128.1 (1CH), 127.9 (1CH), 127.5 (2CH), 127.0 (2CH), 94.2 (C_6H), 94.1 (C_4H), 70.9 (CH_2), 70.3 (CH_2), 68.2 (C_2).

IR (cm^{-1}): 2922, 1577, 1427, 1375, 1355, 1269, 1211, 1163, 1095, 1053, 1014.

MS (ESI), m/z (%): 433.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

Ethyl (2-iodo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**10**)

Beige powder

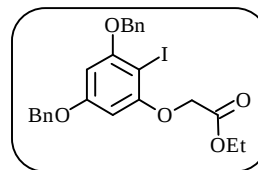
$C_{24}H_{23}IO_5$

$M_r = 518.34 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.32$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 84\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 96%



Method F1: To a solution of 3,5-bis(benzyloxy)-2-iodophenol **9** (1.20 g, 2.8 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was added sodium hydride (166 mg, 4.1 mmol) at room temperature. When no more gas evolved, ethyl bromoacetate (0.5 mL, 4.7 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **10** as a beige solid (1.38 g, 96% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.52 – 7.27 (m, 10H, H_{Ar}), 6.30 (d, $^4J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.14 (d, $^4J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 5.12 (s, 2H, CH_2), 5.01 (s, 2H, CH_2), 4.65 (s, 2H, COCH_2), 4.27 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2CH_3), 1.31 (t, 3H, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 168.2 (C=O), 160.9 (C_5), 159.0 (C_3), 158.4 (C_1), 136.3 (C), 136.2 (C), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 128.1 (1CH), 127.8 (1CH), 127.5 (2CH), 127.4 (2CH), 94.6 (C_6H), 93.8 (C_4H), 70.9 (CH_2), 70.3 (CH_2), 68.7 (C_2), 66.5 (CH_2CO), 61.3 (CH_2CH_3), 14.1 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 1745, 1598, 1597, 1431, 1386, 1336, 1265, 1205, 1159, 1139, 1055, 1018.

MS (ESI), m/z (%): 519.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

Ethyl (2-cyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**7**)

Pale green powder

$C_{25}H_{23}NO_5$

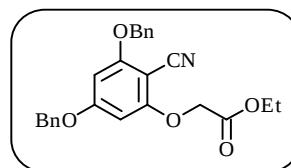
$M_r = 417.45 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.35$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 126\text{-}127^\circ\text{C}$

Yield = 19% (from compound **6**)

92% (from compound **10**)



Method E2: A mixture of ethyl (2-bromo-3,5-dibenzylphenoxy)acetate **6** (100 mg, 0.2 mmol) and copper(I) cyanide (29 mg, 0.3 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was heated at 160°C for 1 h. After cooling, the reaction mixture was poured into crushed ice and a precipitate was formed, which was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **7** as a pale green (17 mg, 19% yield).

(The compound **7** is prepared from ethyl (2-iodo-3,5-dibenzylphenoxy)acetate **10** (1.50 g, 2.9 mmol) according to the **method E2** with a yield of 92%.)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.51 – 7.39 (m, 10H, H_{Ar}), 6.65 (d, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.46 (d, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 5.30 (s, 2H, CH_2), 5.21 (s, 2H, CH_2), 5.02 (s, 2H, COCH_2), 4.19 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2CH_3), 1.24 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.0 (C=O), 164.2 (C_5), 162.3 (C_3), 161.8 (C_1), 136.2 (C), 136.1 (C), 128.8 (2CH), 128.7 (2CH), 128.6 (1CH), 128.3 (1CH), 128.2 (2CH), 128.3 (2CH), 114.2 (CN), 94.0 (C_6H), 93.1 (C_4H), 83.8 (C_2), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 65.3 (CH_2CO_2), 61.0 (CH_2CH_3), 14.1 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 2922, 2220, 1757, 1600, 1579, 1498, 1427, 1209, 1166, 1130, 1022, 817, 727.

MS (ESI), m/z (%): 418.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

Ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate (**11**)

White powder

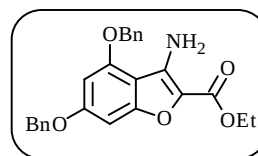
C₂₅H₂₃NO₅

M_r = 417.45 g.mol⁻¹

R_f = 0.21 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Mp = 114-115°C

Yield = 66%



Method G1: To a solution of ethyl (2-cyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate **7** (1.00 g, 2.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (3 mL) was added sodium hydride 60% in mineral oil (144 mg, 3.6 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **11** as a white solid (0.66 g, 66% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.56 – 7.35 (m, 10H, H_{Ar}), 6.80 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₇), 6.57 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₅), 5.72 (s, 2H, NH₂), 5.32 (s, 2H, CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 4.28 (q, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.32 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, 56).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 161.5 (C=O), 160.2 (C₆), 155.8 (C₄), 154.8 (C), 140.1 (C₃), 136.6 (2C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 128.2 (1CH), 128.0 (1CH), 127.9 (2CH), 127.7 (2CH), 122.3 (C₂), 105.2 (C), 95.8 (C₅H), 89.8 (C₇H), 70.1 (CH₂), 69.8 (CH₂), 59.8 (CH₂CH₃), 14.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3493, 3358, 1664, 1622, 1550, 1504, 1373, 1224, 1143, 1099, 1028, 812, 734.

MS (ESI), *m/z* (%): 418.1 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₂₅H₂₃NO₅: C 71.93, H 5.55, N 3.36. Found: C 72.15, H 5.56, N 3.37.

Experimental section

7,9-bis(Benzyloxy)[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (12)

White powder

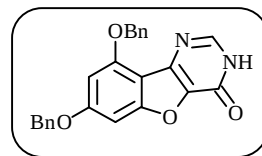
C₂₄H₁₈N₂O₄

M_r = 398.41 g.mol⁻¹

R_f = 0.48 (ethyl acetate)

Mp = 276-277 °C

Yield = 31%



Method 11: A mixture of ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxybenzofuran-2-carboxylate **11** (100 mg, 0.24 mmol) in triethyl orthoformate (1.5 mL) was irradiated in a microwave at 200 °C for 15 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7N (3 mL). The mixture was irradiated in a microwave at 140 °C for 15 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The residue was triturated with acetonitrile and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **12** as a white solid (30 mg, 31% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.78 (s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, H₂), 7.56 - 7.33 (m, 10H, H_{Ar}), 7.11 (s, 1H, H₆), 6.77 (s, 1H, H₈), 5.33 (s, 2H, CH₂), 5.21 (s, 2H, CH₂).

IR (cm⁻¹): 3062, 2926, 1693, 1622, 1429, 1328, 1230, 1147, 1082.

MS (ESI), *m/z* (%): 399.1 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₂₄H₁₈N₂O₄: C 72.35, H 4.55, N 7.03. Found: C 72.52, H 4.53, N 7.05.

Experimental section

Ethyl 3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate (**13**)

Beige powder

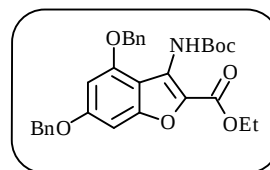
C₃₀H₃₁NO₇

M_r = 517.57 g.mol⁻¹

R_f = 0.54 (cyclohexane/ethylacetate: 6/4)

M_p = 82-83 °C (cyclohexane/ethylacetate)

Yield = 91%



Method H: Ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxybenzofuran-2-carboxylate **11** (50 mg, 0.12 mmol) was dissolved in dry tetrahydrofuran (4 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (156 mg, 0.72 mmol) and catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (2 mg) was added. The solution was heated at 80 °C for 2 h. After cooling and evaporated to dryness, the crude product was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give the compound **13** as a beige solid (56 mg, 91% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ ppm: 8.71 (s, 1H, NH-Boc), 7.56 - 7.36 (m, 10H, H_{Ar}), 6.99 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H₇), 6.63 (d, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H₅), 5.25 (s, 2H, CH₂), 5.19 (s, 2H, CH₂), 4.33 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.31 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO), δ ppm: 160.9 (C=O), 158.7 (C=O), 155.4 (C₆), 154.2 (C₄), 153.0 (C), 149.8 (C₃), 136.6 (2C), 128.4 (2CH), 128.2 (2CH), 128.1 (1CH), 128.0 (1CH), 127.9 (2CH), 127.7 (2CH), 109.7 (C), 97.5 (C₅), 89.8 (C₇), 82.6 (C), 79.0 (C), 70.1 (CH₂), 69.6 (CH₂), 60.5 (CH₂CH₃), 28.1 (2CH₃), 27.5 (CH₃), 14.2 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3490, 3352, 1668, 1620, 1546, 1504, 1375, 1274, 1145, 1096, 1025.

MS (ESI), m/z (%): 518.3 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3,5-bis(Benzyloxy)-2,6-diiodophenol (**14**)

Beige powder

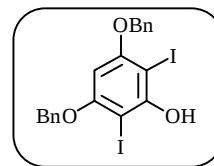
$C_{20}H_{16}I_2O_3$

$M_r = 558.15 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.34$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 122\text{-}123 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 83%



Method D2: A solution of 3,5-dibenzyloxyphenol **4** (500 mg, 1.6 mmol) in dichloromethane (20 mL) was cooled to $-78 \text{ }^\circ\text{C}$. *N*-iodosuccinimide (733 mg, 3.3 mmol) was added and the reaction was maintained at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min. The reaction was quenched at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ by the addition of 10% aqueous potassium carbonate solution (20 mL) and warmed to room temperature. The reaction was diluted with water (50 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **14** as a beige solid (750 mg, 83% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.37 - 7.23 (m, 10H, H_{Ar}), 6.05 (s, 1H, H_4), 5.94 (s, 1H, OH), 5.01 (s, 4H, 2CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 158.9 (2C_{3,5}), 155.0 (C₁), 136.0 (2C), 128.6 (4CH), 128.1 (2CH), 126.9 (4CH), 91.8 (C₄H), 71.3 (2CH₂), 65.9 (2C_{2,6}H).

IR (cm⁻¹): 3462, 1496, 1446, 1379, 1336, 1292, 1184, 1093, 1064, 1033, 804, 729, 692.

MS (ESI), m/z (%): 559.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl (2,6-diiodo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**15**)

White powder

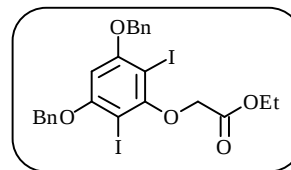
$C_{24}H_{22}I_2O_5$

$M_r = 644.24 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.27$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 114\text{-}115 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 91%



Method F1: To a solution of 3,5-bis(benzyloxy)-2,6-diiodophenol **14** (600 mg, 1.1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (3 mL) was added sodium hydride 60% (64 mg, 1.8 mmol) at room temperature. When no more gas evolved, ethyl bromoacetate (0.2 mL, 1.8 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **15** as a white solid (627 mg, 91% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.46 – 7.31 (m, 10H, H_{Ar}), 6.32 (s, 1H, H_4), 5.09 (s, 4H, 2CH₂), 4.61 (s, 2H, COCH₂), 4.36 (q, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, CH₂CH₃), 1.37 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 167.7 (C=O), 159.3 (2C_{3,5}), 158.2 (C₁), 135.8 (2C), 128.6 (4CH), 128.1 (2CH), 126.9 (4CH), 95.9 (C₄H), 73.6 (2C_{2,6}I), 71.4 (2CH₂), 68.7 (CH₂CO), 61.3 (CH₂CH₃), 14.2 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 1751, 1566, 1334, 1107, 738.

MS (ESI), m/z (%): 645.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl (2,6-dicyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**16**)

White powder

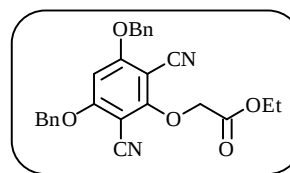
C₂₆H₂₂N₂O₅

M_r = 442.46 g.mol⁻¹

R_f = 0.60 (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

Mp = 75-75 °C

Yield = 87%



Method E2: A mixture of ethyl (2,6-diiodo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate **15** (650 mg, 1.0 mmol) and copper(I) cyanide (270 mg, 3.0 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (3 mL) was heated at 160 °C for 2 h. After cooling, the reaction mixture was poured into crushed ice and a precipitate was formed, which was extracted with ethyl acetate (2 x 30 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **16** as a white solid (390 mg, 87% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.39-7.34 (m, 10H, H_{Ar}), 6.26 (s, 1H, H₄), 5.15 (s, 4H, 2CH₂), 5.13 (s, 2H, COCH₂), 4.28 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 1.30 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 167.3 (C=O), 165.4 (2C_{3,5}), 164.4 (C₁), 134.2 (2C), 128.9 (2CH), 128.7 (2CH), 128.7 (1CH), 128.6 (1CH), 128.5 (2CH), 126.9 (2CH), 112.5 (2C≡N), 93.1 (C₄H), 88.7 (2C_{2,6}), 71.5 (2CH₂), 69.1 (CH₂CO), 61.9 (CH₂CH₃), 14.0 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 2924, 2222, 1755, 1597, 1498, 1381, 1176, 1122.

MS (ESI), *m/z* (%): 443.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl 3-amino-7-cyano-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate (**17**)

Beige powder

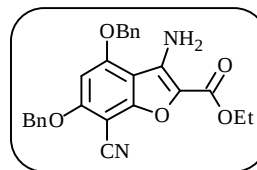
C₂₆H₂₂N₂O₅

M_r = 442.46 g.mol⁻¹

R_f = 0.71 (cyclohexane/ethyl acetate: 1/1)

Mp = 126-127 °C

Yield = 71%



Method G1: To a solution of ethyl (2,6-dicyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate **16** (3.00 g, 6.8 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was added sodium hydride 60% (0.54 g, 13.6 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **17** as a beige solid (2.12 g, 71% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ ppm: 7.58 - 7.39 (m, 10H, H_{Ar}), 6.98 (s, 1H, H₅), 5.90 (s, 2H, NH₂), 5.50 (s, 2H, CH₂), 5.41 (s, 2H, CH₂), 4.32 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 1.34 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO), δ ppm: 163.9 (C=O), 160.8 (C₆), 158.6 (C₄), 155.4 (C₃), 135.7 (C), 135.6 (C), 129.0 (2CH), 128.6 (2CH), 128.5 (1CH), 128.4 (1CH), 128.1 (2CH), 127.9 (2CH), 124.6 (C₂), 113.0 (CN), 106.3 (C), 92.0 (C₅H), 80.5 (C₇), 71.6 (CH₂), 71.3 (CH₂), 60.1 (CH₂CH₃), 53.4 (C), 14.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3504, 2223, 1614, 1554, 1508, 1454, 1338, 1305, 1103, 966, 700.

MS (ESI), *m/z* (%): 443.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

7,9-Dibenzyloxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carbonitrile (**19**)

White powder

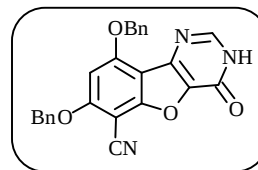
C₂₅H₁₇N₃O₄

M_r = 423.12 g.mol⁻¹

R_f = 0.65 (ethyl acetate)

Mp = 265-266 °C

Yield = 54%



Method I1: A mixture of ethyl 3-amino-7-cyano-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate **17** (500 mg, 1.1 mmol) in triethyl orthoformate (3 mL) was irradiated in a microwave at 200 °C for 15 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7M (3 mL). The mixture was irradiated in a microwave at 140 °C for 15 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The residue was triturated with acetonitrile and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **19** as a white solid (258 mg, 54% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.03 (d, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, NH), 8.27 (d, ³*J* = 3.7 Hz, 1H, H₂), 7.96 – 7.29 (m, 10H, H_{Ar}), 7.20 (s, 1H, H₈), 5.54 (s, 2H, CH₂), 5.50 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.1 (C=O), 159.3 (C₉), 157.8 (C₇), 151.7 (C), 147.6 (C₂H), 143.5 (C), 138.4 (C), 135.8 (C), 135.6 (C), 128.8 (2CH), 128.7 (2CH), 128.5 (1CH), 128.4 (1CH), 128.0 (2CH), 127.9 (2CH), 112.7 (C≡N), 106.7 (C), 95.2 (C₈H), 79.0 (C₆), 71.7 (CH₂), 71.0 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3182, 2222, 1685, 1598, 1487, 1433, 1366, 1116, 1093, 1022, 962, 692.

MS (ESI), *m/z* (%): 424.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

7,9-Dihydroxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carbonitrile (**22**)

Brown powder

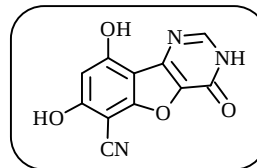
$C_{11}H_5N_3O_4$

$M_r = 243.16 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.37$ (dichloromethane)

$M_p = 335\text{-}336 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 61%



Method J: A mixture of 7,9-dibenzyloxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carbonitrile **19** (200 mg, 0.5 mmol) and concentrated sulfuric acid (2 mL) was stirred at room temperature for 15 min. Water (25 mL) was added to quench the reaction. The mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was triturated with acetonitrile and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **22** as a brown solid (70 mg, 61% yield).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 14.03 (s, 1H, OH), 12.91 (s, 1H, OH), 11.77 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, H_2), 6.57 (s, 1H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 169.8 (C_4), 166.4 (C_9), 164.4 (C_7), 159.0 (C), 151.6 (C), 147.1 (C_2H), 144.1 (C), 137.5 (C), 113.6 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 104.7 (C_6), 98.4 (C_8H).

IR (cm^{-1}): 3045, 2796, 2229, 1614, 1384, 1267, 1112, 1060.

MS (ESI), m/z (%): 244.1 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Experimental section

Ethyl 3-amino-7-cyano-4,6-dihydroxy-1-benzofuran-2-carboxylate (**21**)

Brown powder

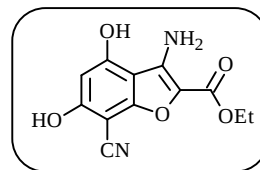
$C_{12}H_{10}N_2O_5$

$M_r = 262.06 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.35$ (ethyl acetate)

$M_p = 150\text{-}151 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 73%



Method J: A mixture of ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxy-7-cyanobenzofuran-2-carboxylate **17** (200 mg, 0.5 mmol), concentrated sulfuric acid (2 mL) was stirred at room temperature for 15 min. Water (25 mL) was added to quench the reaction. The mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography, eluting sequentially with 0% to 100% ethyl acetate in cyclohexane as eluent to give compound **21** as a brown solid (86 mg, 73% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.91 (s, 1H, OH), 11.82 (s, 1H, OH), 6.36 (s, 1H, H₅), 5.88 (s, 2H, NH₂), 4.30 (q, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 1.33 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C=O), 159.7 (C), 158.9 (2C_{4,6}), 156.1 (C₃), 122.2 (C₂), 113.0 (CN), 103.7 (C), 96.3 (C₅H), 74.9 (C₇), 59.1 (CH₂CH₃), 14.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3498, 3388, 2918, 2222, 1614, 1381, 1288, 1207, 1143, 1018.

MS (ESI), m/z (%): 263.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl (2-cyano-3,5-dibenzyloxy-6-iodophenoxy)acetate (**23**)

White powder

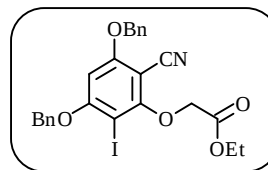
$C_{25}H_{22}INO_5$

$M_r = 543.35 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.46$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 74-75 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 86%



Method E2: A mixture of ethyl (2,6-diiodo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate **15** (1.00 g, 1.6 mmol) and copper(I) cyanide (0.14 g, 1.6 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was heated at 160 °C for 2 h. After cooling, the reaction mixture was poured into crushed ice and a precipitate was formed, which was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with water and brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **23** as a white solid (748 mg, 86% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.57 – 7.39 (m, 10H, H_{Ar}), 6.99 (s, 1H, H_4), 5.38 (s, 2H, CH_2), 5.37 (s, 2H, CH_2), 4.82 (s, 2H, CH_2), 4.24 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2CH_3), 1.27 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.3 (C=O), 162.8 (C_5), 162.7 (C_3), 160.9 (C_1), 135.9 (C), 135.7 (C), 128.8 (2CH), 128.7 (2CH), 128.4 (1CH), 128.2 (1CH), 127.8 (2CH), 127.5 (2CH), 113.6 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 95.5 (C_4H), 88.9 (C_2), 74.2 (C_6), 71.3 (CH_2), 71.0 (CH_2), 70.0 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 61.0 (CH_2CH_3), 14.1 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 2985, 2222, 1747, 1583, 1344, 1215, 1170, 1114, 1082, 958, 813, 736, 694.

MS (ESI), m/z (%): 544.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

Ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxy-7-iodo-1-benzofuran-2-carboxylate (**24**)

Brown powder

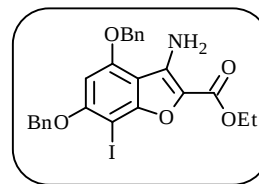
$C_{25}H_{22}INO_5$

$M_r = 543.35 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.44$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 160\text{-}161 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 76%



Method G1: To a solution of ethyl (2-cyano-3,5-dibenzyloxy-6-iodophenoxy)acetate **23** (200 mg, 0.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% (30 mg, 0.8 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 30 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **24** as a brown solid (152 mg, 76% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.53 – 7.34 (m, 10H, H_{Ar}), 6.84 (s, 1H, H_5), 5.74 (s, 2H, NH_2), 5.37 (s, 2H, CH_2), 5.28 (s, 2H, CH_2), 4.28 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, $\underline{CH}_2CH_3$), 1.30 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.9 (C=O), 159.4 (C_6), 155.4 (C_4), 155.3 (C), 140.2 (C_3), 136.4 (C), 136.1 (C), 128.8 (2CH), 128.6 (2CH), 128.3 (1CH), 128.1 (1CH), 128.0 (2CH), 127.3 (2CH), 122.2 (C_2), 105.8 (C), 94.0 (C_5H), 71.0 (CH_2), 70.0 (CH_2), 59.4 ($\underline{CH}_2CH_3$), 58.0 (C_7), 14.7 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 3485, 3334, 2926, 1658, 1620, 1550, 1371, 1327, 1300, 1222, 1145, 1101, 1028, 904, 744, 698.

MS (ESI), m/z (%): 544.1 (100) $[M+H]^+$.

Experimental section

6-Iodo-7,9-dibenzyloxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (25)

Brown powder

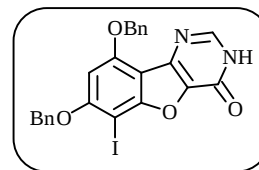
$C_{24}H_{17}IN_2O_4$

$M_r = 524.31 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.35$ (ethyl acetate)

$M_p = 233\text{-}234 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 33%



Method I1: A mixture of ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxy-7-iodo-1-benzofuran-2-carboxylate **24** (100 mg, 0.18 mmol) in triethyl orthoformate (1.0 mL) was irradiated in a microwave at 200 °C for 10 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7M (1.0 mL). The mixture was irradiated in a microwave at 140 °C for 10 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography, eluting sequentially with 0% to 100% ethyl acetate in cyclohexane as eluent to give compound **25** as a brown solid (31 mg, 33% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.91 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, H₂), 7.86 - 7.23 (m, 10H, H_{Ar}), 7.09 (s, 1H, H₈), 5.45 (s, 2H, CH₂), 5.39 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.2 (C₄), 160.0 (C₉), 158.1 (C₇), 155.4 (C), 151.9 (C₂H), 146.7 (C), 144.2 (C), 137.6 (C), 136.4 (C), 136.3 (C), 128.5 (2CH), 127.9 (2CH), 127.8 (1CH), 127.6 (1CH), 127.4 (2CH), 127.0 (2CH), 106.7 (C), 95.9 (C₈), 71.1 (CH₂), 70.3 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3109, 2922, 1672, 1614, 1454, 1321, 1226, 1095, 731.

MS (ESI), m/z (%): 525.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl formate **1** (**26**)

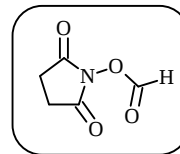
White powder

$C_5H_5NO_4$

$M_r = 143.09 \text{ g.mol}^{-1}$

$M_p = 114\text{--}115 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 99%



Method L: In a 250 mL flask, acetic anhydride (77 mL, 0.8 mol, 8.0 equiv) was cooled to 0 °C. Formic acid (38 mL, 1.0 mol, 10.0 equiv) was added slowly, and the solution was stirred at room temperature for 2 h. Then, 1-hydroxypyrrolidine-2,5-dione (11.7 g, 0.1 mol, 1.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred overnight and then evaporated to dryness and dried several hours *in vacuo* to afford the expected product **26** (14.2 g, 99% yield) as an odorless white solid. NHS formate **26** was stable enough to be stored for several weeks under inert atmosphere. However, it was observed that traces of formic acid can be formed over time. In that case, it was dried *in vacuo* prior to use.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ ppm: 8.18 (s, 1H), 2.86 (s, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ ppm: 168.4 ($2\text{C}_{2,5}$), 155.0 (CHO), 25.5 (2CH_2),

IR (cm^{-1}): 3000, 2952, 1694, 1208, 644.

Experimental section

Ethyl 3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-7-iodo-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate (27)

Brown powder

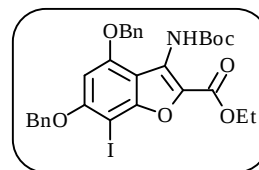
C₃₀H₃₀INO₇

M_r = 643.47 g.mol⁻¹

R_f = 0.54 (cyclohexane/ethylacetate: 6/4)

M_p = 67-68 °C

Yield = 92%



Method H: Ethyl 3-amino-4,6-dibenzyloxy-7-iodo-1-benzofuran-2-carboxylate **24** (50 mg, 0.09 mmol) was dissolved in dry tetrahydrofuran (2 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (120 mg, 0.55 mmol) and catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (2 mg) was added. The solution was heated at 80 °C for 2 h. After cooling and evaporated to dryness, the crude product was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give the compound **27** as a brown solid (54 mg, 92% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7.43 - 7.15 (m, 10H, H_{Ar}, 1H, NH), 6.40 (s, 1H, H₅), 5.51 (s, 4H, 2CH₂), 4.43 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.35 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ ppm: 159.7 (C=O), 159.2 (C=O), 155.6 (C₆), 155.0 (C₄), 152.8 (C), 136.1 (C), 136.0 (C), 133.3 (C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 128.3 (1CH), 128.0 (C₃), 127.1 (2CH), 126.9 (CH), 126.7 (2CH), 109.6 (C), 95.2 (C₅H), 80.9 (C₇), 72.0 (CH₂), 70.8 (CH₂), 61.0 (CH₂CH₃), 31.3 (C), 27.4 (3CH₃), 14.3 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3482, 3337, 2925, 1712, 1618, 1502, 1392, 1338, 1284, 1240, 1147, 1103, 1024.

MS (ESI), m/z (%): 644.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2,4-bis(Benzyloxy)-6-hydroxybenzamide (28)

White powder

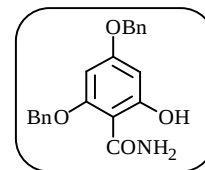
$C_{21}H_{19}NO_4$

$M_r = 349.38 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.48$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 151\text{-}152 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 53%



Method M: To a stirred suspension of 3,5-dibenzyloxyphenol **4** (500 mg, 1.6 mmol) in acetonitrile (5 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (0.62 mL, 6.4 mmol). The mixture was maintained at this temperature for 10 min then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 1N (10 mL). After 10 h at room temperature, the reaction was diluted with water (50 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **28** as a white solid (302 mg, 53% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.59 (s, 1H, OH), 7.97 - 7.34 (m, 12H, H_{Ar} , CONH₂), 6.28 (t, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 6.16 (t, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H₅), 5.27 (s, 2H, CH₂), 5.11 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.7 (C=O), 165.9 (C₆), 162.6 (C₄), 159.0 (C₂), 136.4 (C), 136.0 (C), 128.6 (2CH), 128.4 (2CH), 128.2 (1CH), 127.9 (1CH), 127.9 (2CH), 127.8 (2CH), 97.1 (C₁), 95.3 (C₅), 92.3 (C₃H), 70.4 (CH₂), 69.4 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3425, 2922, 1639, 1591, 1490, 1456, 1421, 1386, 1338, 1228, 1161, 1083, 1033.

MS (ESI), m/z (%): 350.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

4,6-bis(Benzyloxy)-2-hydroxy-3-iodobenzamide (29)

White powder

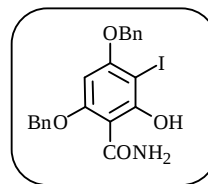
$C_{21}H_{18}INO_4$

$M_r = 475.28 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.42$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 170\text{-}171 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 80%



Method D3: A solution of 2,4-bis(benzyloxy)-6-hydroxybenzamide **28** (200 mg, 0.6 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C under argon was added *N*-iodosuccinimide (130 mg, 0.6 mmol) and the reaction mixture was maintained at this temperature for 10 min. The reaction was quenched by the addition of 10% aqueous potassium carbonate solution (20 mL) and warmed to room temperature. The reaction was diluted with water (30 mL) and extracted with dichloromethane (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **29** as a white solid (215 mg, 80% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 15.65 (s, 1H, OH), 8.22 - 7.38 (m, 12H, H_{Ar} , CONH₂), 6.61 (s, 1H, H₅), 5.40 (s, 2H, CH₂), 5.30 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.3 (C=O), 164.0 (C₂), 160.9 (C₄), 159.8 (C₆), 136.2 (C), 135.7 (C), 128.7 (2CH), 128.4 (2CH), 128.4 (1CH), 128.1 (1CH), 127.8 (2CH), 127.1 (2CH), 97.8 (C₁), 90.5 (C₅), 70.8 (CH₂), 70.2 (CH₂), 68.3 (C₃).

IR (cm⁻¹): 3439, 1647, 1597, 1226, 1143, 1101.

MS (ESI), m/z (%): 476.0 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl (2-carbamoyl-6-iodo-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**30**)

Beige powder

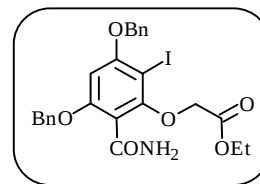
$C_{25}H_{24}INO_6$

$M_r = 561.37 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.16$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 65-66 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 86%



Method F1: To a solution of 4,6-bis(benzyloxy)-2-hydroxy-3-iodobenzamide **29** (200 mg, 0.42 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was added sodium hydride 60% (25 mg, 0.63 mmol) at room temperature. When no more gas evolved, ethyl bromoacetate (79 μL , 0.71 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **30** as a beige solid (203 mg, 86% yield).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.93 (s, 1H, CONH_2), 7.74 (s, 1H, CONH_2), 7.50 - 7.33 (m, 10H, H_{Ar}), 6.79 (s, 1H, H_4), 5.22 (s, 2H, CH_2), 5.14 (s, 2H, CH_2), 4.56 (s, 2H, COCH_2), 4.16 (q, 2H, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, CH_2CH_3), 1.22 (t, 3H, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 167.2 (2C=O), 162.8 (C_5), 162.7 (C_3), 160.9 (C_1), 135.9 (C), 135.7 (C), 128.7 (2CH), 128.7 (2CH), 128.4 (1CH), 128.2 (1CH), 127.8 (2CH), 127.5 (2CH), 113.6 (C_2), 95.5 (C_4), 74.2 (C_6), 71.3 (CH_2), 71.0 (CH_2), 70.0 (CH_2), 61.0 (CH_2), 14.1 (CH_3).

MS (ESI), m/z (%): 562.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

4,6-bis(Benzyloxy)-3-cyano-2-hydroxybenzamide (32)

Beige powder

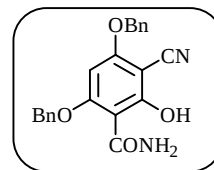
$C_{22}H_{18}N_2O_4$

$M_r = 374.39 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.30$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 211\text{-}212 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 73%



Method E: A mixture of 4,6-bis(benzyloxy)-2-hydroxy-3-iodobenzamide **29** (200 mg, 0.42 mmol) and copper(I) cyanide (50 mg, 0.5 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was heated at 160 °C for 6 h. After cooling, the reaction mixture was poured into crushed ice and a precipitate was formed, which was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **32** as a beige solid (115 mg, 73% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.06 (s, 1H, OH), 8.40 (s, 1H, CONH₂), 8.01 (s, 1H, CONH₂), 7.54-7.43 (m, 10H, H_{Ar}), 6.61 (s, 1H, H₅), 5.45 (s, 2H, CH₂), 5.32 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.0 (C=O), 168.3 (C₂), 164.2 (C₆), 162.9 (C₄), 135.4 (C), 135.2 (C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 128.5 (1CH), 128.2 (1CH), 128.1 (2CH), 127.6 (2CH), 113.6 (CN), 97.2 (C₁), 90.1 (C₅H), 83.6 (C₃), 71.2 (CH₂), 70.5 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3439, 3182, 2220, 1651, 1496, 1429, 1381, 1342, 1190, 1132, 1111.

MS (ESI), m/z (%): 375.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl (2-carbamoyl-6-cyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate (**31**)

White powder

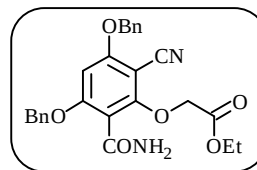
$C_{26}H_{24}N_2O_6$

$M_r = 460.48 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.57$ (ethyl acetate)

$M_p = 52\text{-}53 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 90%



Method F1: To a solution of 4,6-bis(benzyloxy)-3-cyano-2-hydroxybenzamide **32** (50 mg, 0.13 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% (8 mg, 0.2 mmol) at room temperature. When no more gas evolved, ethyl bromoacetate (25 μL , 0.23 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **31** as a white solid (54 mg, 90% yield).

(The compound **31** is prepared from the compound **30** according to the **method E** and obtained with a yield of 20%)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.84 (s, 1H, CONH₂), 7.74 - 7.22 (m, 10H, H_{Ar}, 1H, CONH₂), 6.90 (s, 1H, H₄), 5.34 (s, 2H, CH₂), 5.23 (s, 2H, CH₂), 4.82 (s, 2H, CH₂CO), 4.16 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH₂CH₃), 1.21 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 167.5 (C=O), 164.8 (C=O), 161.8 (C₅), 160.3 (C₃), 157.6 (C₁), 135.9 (C), 135.7 (C), 128.6 (2CH), 128.4 (2CH), 128.2 (1CH), 128.0 (1CH), 127.5 (2CH), 127.3 (2CH), 114.8 (CN), 113.6 (C₂), 94.6 (C₄H), 87.9 (C₆), 70.5 (CH₂), 70.3 (CH₂), 69.8 (CH₂C=O), 60.7 (CH₂CH₃), 13.9 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 2924, 2223, 1747, 1666, 1597, 1188, 1111.

MS (ESI), m/z (%): 461.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

Ethyl 3-amino-7-carbamoyl-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2-carboxylate (**18**)

White powder

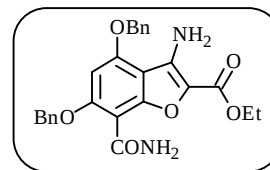
$C_{26}H_{24}N_2O_6$

$M_r = 460.48 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.34$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 182\text{-}183 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 67%



Method G1: To a solution of ethyl (2-carbamoyl-6-cyano-3,5-dibenzyloxyphenoxy)acetate **31** (200 mg, 0.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% in mineral oil (24 mg, 0.6 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **18** as a white solid (134 mg, 67% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.67 - 7.32 (m, 12H, H_{Ar} , $CONH_2$), 6.78 (s, 1H, H_5), 5.76 (s, 2H, NH_2), 5.38 (s, 2H, CH_2), 5.21 (s, 2H, CH_2), 4.26 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, $\underline{CH}_2CH_3$), 1.29 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C=O), 160.0 (C=O), 157.5 (2 $C_{6,4}$), 154.7 (C), 152.3 (C_3), 136.6 (C), 136.2 (C), 128.5 (2CH), 128.3 (2CH), 128.1 (1CH), 127.9 (1CH), 127.8 (2CH), 127.4 (2CH), 105.6 (C_2), 105.3 (C_7), 93.3 (C_5H), 70.7 (CH_2), 69.8 (CH_2), 59.1 ($\underline{CH}_2CH_3$), 54.8 (C), 14.5 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 3462, 3365, 2922, 1620, 1556, 1454, 1296, 1159, 1105, 1026.

MS (ESI), m/z (%): 461.2 (100) $[M+H]^+$.

Anal. calcd for $C_{26}H_{24}N_2O_6$: C 67.82, H 5.25, N 6.08. Found: C 68.03, H 5.24, N 6.06.

Experimental section

7,9-bis(Benzyloxy)-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**20**)

Brown powder

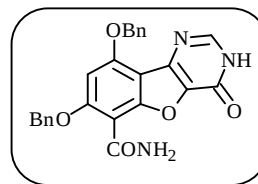
C₂₅H₁₉N₃O₅

M_r = 441.44 g.mol⁻¹

R_f = 0.40 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 254-255 °C (methanol)

Yield = 62%



Method 11: A mixture of ethyl 4,6-dibenzyloxy-7-carboxamide-3-aminobenzofuran-2-carboxylate **18** (50 mg, 0.1 mmol) in triethyl orthoformate (2 mL) was irradiated using microwave heating at 200 °C for 15 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7N (2 mL). The mixture was then irradiated using microwave heating at 140 °C for 15 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The residue was triturated with methanol and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **20** as a brown solid (30 mg, 62% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.13 (s, 1H, H₂), 7.88 (s, 1H, CONH₂), 7.78 (s, 1H, CONH₂), 7.60 - 7.34 (m, 10H, H_{Ar}), 6.93 (s, 1H, H₈), 5.44 (s, 2H, CH₂), 5.26 (s, 2H, CH₂). NH (not seen).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166.0 (C=O), 164.1 (C₄), 157.3 (2C_{7,9}), 154.6 (2C), 154.4 (C₂H), 143.3 (C), 136.6 (2C), 128.4 (2CH), 128.3 (2CH), 127.8 (1CH), 127.8 (1CH), 127.5 (2CH), 127.4 (2CH), 106.5 (C), 106.1 (C₆), 95.2 (C₈H), 70.7 (CH₂), 70.2 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 1600, 1581, 1454, 1417, 1315, 1109.

MS (ESI), *m/z* (%): 442.1 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₂₅H₁₉N₃O₅: C 68.02, H 4.34, N 9.52. Found: C 68.26, H 4.36, N 9.49.

Experimental section

7,9-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (33)

Brown powder

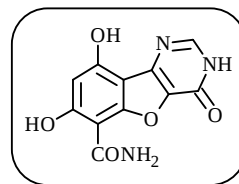
$C_{11}H_7N_3O_4$

$M_r = 261.19 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.44$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 396\text{-}397 \text{ }^\circ\text{C}$ (methanol)

Yield = 53%



Method J: A mixture of 7,9-bis(benzyloxy)-4-oxo-3,4-dihydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide **20** (50 mg, 0.11 mmol), concentrated sulfuric acid (1 mL) was stirred at room temperature for 15 min. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **33** as a brown solid (16 mg, 53% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 14.03 (s, 1H, OH), 12.89 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, OH), 8.40 (s, 1H, CONH₂), 8.21 (s, 1H, H₂), 7.44 (s, 1H, CONH₂), 6.36 (s, 1H, H₈).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.6 (C=O), 166.2 (C₄), 158.2 (C₇), 156.1 (C₉), 151.4 (C), 146.9 (C₂H), 144.0 (C), 136.8 (C), 104.0 (C), 99.1 (C₈H), 92.9 (C).

IR (cm⁻¹): 3464, 3072, 2883, 1604, 1402, 1269, 1195, 1120.

MS (ESI), *m/z* (%): 262.0 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for $C_{11}H_7N_3O_5$: C 50.58, H 2.70, N 16.09. Found: C 50.42, H 2.71, N 16.13.

Experimental section

2-(2-Amino-2-oxoethoxy)-3-cyano-4,6-dibenzyloxybenzamide (34)

Beige powder

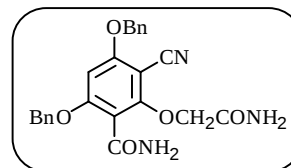
$C_{24}H_{21}N_3O_5$

$M_r = 431.44 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.48$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 153\text{-}154 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 69%



Method F2: A solution of 4,6-bis(benzyloxy)-3-cyano-2-hydroxybenzamide **32** (400 mg, 1.07 mmol), 2-iodoacetamide (790 mg, 4.27 mmol) and sodium hydride 60% (131 mg, 3.21 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) was heated at 60 °C for 12 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **34** as a beige solid (318 mg, 69% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.99 (s, 1H, CONH₂), 7.92 (s, 1H, CONH₂), 7.73 - 7.41 (m, 10H, H_{Ar}; 2H, CONH₂), 6.95 (s, 1H, H₅), 5.38 (s, 2H, CH₂), 5.28 (s, 2H, CH₂), 4.61 (s, 2H, CH₂CONH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.1 (C=O), 165.1 (C=O), 162.4 (C₆), 160.6 (C₄), 158.3 (C₂), 136.0 (C), 135.8 (C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 128.4 (1CH), 128.2 (1CH), 127.7 (2CH), 127.6 (2CH), 115.0 (CN), 114.1 (C₁), 94.9 (C₅H), 87.1 (C₁), 72.3 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 2223, 1656, 1597, 1388, 1344, 1192, 1112, 1010.

MS (ESI), m/z (%): 432.3 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Amino-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2,7-dicarboxamide (35)

Brown powder

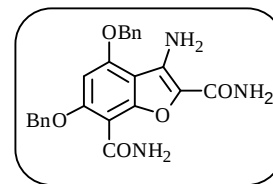
$C_{24}H_{21}N_3O_5$

$M_r = 431.44 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.71$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 152\text{-}153 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 60%



Method G2: To a suspension of 2-(2-amino-2-oxoethoxy)-3-cyano-4,6-dibenzyloxybenzamide **34** (300 mg, 0.70 mmol) in ethanol (10 mL) was added potassium hydroxide (150 mg, 2.68 mmol). The reaction mixture was heated at reflux for 30 min and was then condensed in *vacuo*. The remaining residue was diluted with hydrochloric acid 1N and then filtered. The filtered solids were washed with water and cold methanol. Drying the remaining material in a stream of air afforded compound **35**. Yield 180 mg (60%), brown solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.63 (s, 1H, CONH₂), 7.53-7.30 (m, 12H, 10H_{Ar} and 2H CONH₂), 6.94 (s, 1H, CONH₂), 6.77 (s, 1H, H₅), 5.52 (s, 2H, NH₂), 5.36 (s, 2H, CH₂), 5.20 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C=O), 162.5 (C=O), 157.1 (C₆), 154.4 (C₄), 151.0 (C), 136.8 (C₃), 136.3 (C), 136.0 (C), 128.5 (2CH), 128.3 (2CH), 128.0 (1CH), 127.8 (1CH), 127.7 (2CH), 127.3 (2CH), 125.4 (C₂), 105.6 (C₇), 105.4 (C), 93.6 (C₅H), 70.8 (CH₂), 69.7 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 1620, 1321, 1174, 1107, 729.

MS (ESI), m/z (%): 432.2 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for $C_{24}H_{21}N_3O_5$: C 66.81, H 4.91, N 9.74. Found: C 67.08, H 4.88, N 9.76.

Experimental section

7,9-Dibenzyloxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (36)

Pink powder

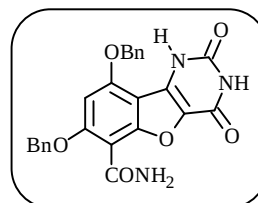
C₂₅H₁₉N₃O₆

M_r = 457.43 g.mol⁻¹

R_f = 0.62 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 238-239 °C

Yield = 56%



Method I2: To a suspension of 3-amino-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-2,7-dicarboxamide **35** (300 mg, 0.70 mmol) in acetic acid (10 mL) and water (5 mL) was added potassium cyanate (600 mg, 7.41 mmol). The reaction was stirred for 1 h at 100 °C, diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated in *vacuo*. The product was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give urea intermediate as a brown solid (220 mg, 67% yield). A suspension of urea intermediate (200 mg, 0.42 mmol) in ethanolic 2M KOH solution (20 mL) was heated to 90 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and acidified with hydrochloric acid 1N (50 mL). The precipitate was washed with a large quantity of water (50 mL) and dried to afford compound **36** (107 mg, 56%) as a pink solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.39 (s, 1H, NH), 11.28 (s, 1H, NH), 8.03 - 7.32 (m, 12H, H_{Ar} and CONH₂), 6.81 (s, 1H, H₈), 5.44 (s, 2H, CH₂), 5.20 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163.5 (C=O), 158.1 (C₂), 154.3 (C₄), 153.9 (C₉), 153.6 (C₇) 151.4 (C), 136.4 (C), 136.3 (C), 133.0 (C), 129.3 (C), 128.4 (2CH), 128.3 (2CH), 128.0 (1CH), 127.9 (1CH), 127.7 (2CH), 127.3 (2CH), 105.7 (C₆), 102.5 (C), 94.6 (C₈H), 70.7 (CH₂), 69.1 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 1693, 1666, 1068.

MS (ESI), *m/z* (%): 458.2 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₂₅H₁₉N₃O₆: C 65.64, H 4.19, N 9.19. Found: C 65.51, H 4.21, N 9.22.

Experimental section

7,9-Dihydroxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**37**)

Beige powder

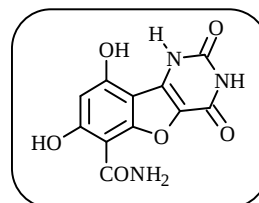
C₁₁H₇N₃O₆

M_r = 277.19 g.mol⁻¹

R_f = 0.13 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 174-175 °C (methanol)

Yield = 48%



Method J: A mixture of 7,9-dibenzyloxy-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide **36** (50 mg, 0.11 mmol) and concentrated sulfuric acid (1 mL) was stirred at room temperature for 5 min. Water (25 mL) was added to quench the reaction, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **37** as a beige solid (15 mg, 48% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.08 (s, 1H, OH), 11.81 (s, 1H, OH), 11.26 (s, 1H, NH), 11.20 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, CONH₂), 7.30 (s, 1H, CONH₂), 6.20 (s, 1H, H₈).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.4 (C=O), 166.7 (C₉), 157.4 (C₄), 155.5 (C₇), 153.6 (C), 151.2 (C₂), 133.7 (C), 128.7 (C), 100.5 (C₆), 98.9 (C₈), 92.81 (C).

IR (cm⁻¹): 1620, 1338, 1072.

MS (ESI), *m/z* (%): 278.1 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₁₁H₇N₃O₆: C 47.66, H 2.55, N 15.16. Found: C 47.81, H 2.54, N 15.11.

Experimental section

4,6-bis(Benzyloxy)-3-cyano-2-(cyanomethoxy)benzamide (38)

Brown powder

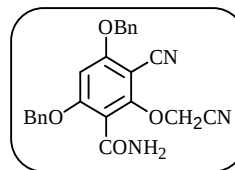
$C_{24}H_{19}N_3O_4$

$M_r = 413.43 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 169\text{-}170 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 72%



Method F3: A solution 4,6-bis(benzyloxy)-3-cyano-2-hydroxybenzamide **32** (300 mg, 0.80 mmol), bromoacetonitrile (72 μL , 0.96 mmol) and potassium carbonate (330 mg, 2.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **38** as a brown solid (238 mg, 72% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.91 (s, 1H, CONH₂), 7.71 (s, 1H, CONH₂), 7.50 - 7.36 (m, 10H, H_{Ar}), 7.02 (s, 1H, H₅), 5.37 (s, 2H, CH₂), 5.26 (s, 2H, CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂CN).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C=O), 161.8 (C₄), 160.4 (C₆), 156.5 (C₂), 135.7 (C), 135.5 (C), 128.6 (2CH), 128.4 (2CH), 128.2 (1CH), 128.0 (1CH), 127.6 (2CH), 127.4 (2CH), 116.2 (CN), 115.5 (C₁), 113.2 (CH₂CN), 96.1 (C₅H), 88.5 (C₃), 70.7 (CH₂), 70.5 (CH₂), 59.8 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3496, 3387, 2218, 1668, 1604, 1591, 1436, 1348, 1112.

MS (ESI), m/z (%): 414.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Amino-2-cyano-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-7-carboxamide (39)

Beige powder

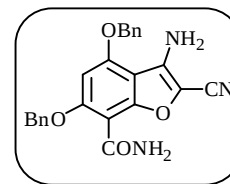
$C_{24}H_{19}N_3O_4$

$M_r = 413.43 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.28$ (cyclohexane/ethyl acetate: 4/6)

$M_p = 208\text{-}209 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 64%



Method G1: To a suspension of 4,6-bis(benzyloxy)-3-cyano-2-(cyanomethoxy)benzamide **38** (50 mg, 0.12 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% in mineral oil (8 mg, 0.18 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 5 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **39** as a beige solid (32 mg, 64% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.64 (s, 2H, NH_2), 7.64-7.32 (m, 12H, H_{Ar} and CONH_2), 6.79 (s, 1H, H_5), 5.37 (s, 2H, CH_2), 52.9 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.7 (C=O), 158.0 (C_6), 154.5 (C_4), 153.1 (C_2), 142.1 (C_3), 136.4 (C), 136.1 (C), 128.5 (2CH), 128.4 (2CH), 128.1(1CH), 127.9 (1CH), 127.8 (2CH), 127.4 (2CH), 114.3 (CN), 105.8 (C_7), 105.2 (C), 104.5 (C), 93.8 (C_5), 70.8 (CH_2), 69.8 (CH_2).

IR (cm^{-1}): 3468, 3331, 3188, 2200, 1643, 1614, 1498, 1413, 1321, 1161, 1124.

MS (ESI), m/z (%): 414.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Anal. calcd for $C_{24}H_{19}N_3O_4$: C 69.72, H 4.63, N 10.16. Found: C 69.96, H 4.65, N 10.19.

Experimental section

4-Amino-7,9-dibenzyloxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**40**)

Beige powder

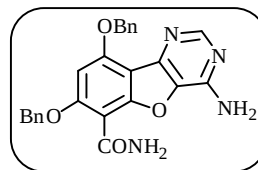
C₂₅H₂₀N₄O₄

M_r = 440.45 g.mol⁻¹

R_f = 0.23 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 255-256 °C (methanol)

Yield = 45%



Method I1: A mixture of 3-amino-2-cyano-4,6-dibenzyloxy-1-benzofuran-7-carboxamide **39** (50 mg, 0.12 mmol) in triethyl orthoformate (2 mL) was irradiated in a microwave at 200 °C for 15 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7M (2 mL). The mixture was irradiated in a microwave at 140 °C for 15 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The residue was triturated with methanol and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **40** as a beige solid (24 mg, 45% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.35 (s, 1H, H₂), 7.86 (s, 1H, CONH₂), 7.59 - 7.31 (m, 10H, H_{Ar}; 1H, CONH₂; 2H, NH₂), 6.98 (s, 1H, H₈), 5.46 (s, 2H, CH₂), 5.28 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.1(C=O), 157.9 (C₉), 154.7 (C₇), 154.5 (C), 153.5 (C₂), 149.0 (C₄), 145.3 (C), 136.6 (C), 136.6 (C), 133.3 (C), 128.4 (2CH), 128.3 (2CH), 127.8 (1CH), 127.4 (1CH), 127.4 (2CH), 127.3 (2CH), 106.3 (C₆), 105.8 (C), 95.2 (C₈), 70.7 (CH₂), 70.2 (CH₂).

IR (cm⁻¹): 3109, 3061, 1600, 1494, 1452, 1415, 1363, 1313, 1193, 1120, 1095.

MS (ESI), *m/z* (%): 441.2 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₂₅H₂₀N₄O₄: C 68.17, H 4.58, N 12.72. Found: C 68.40, H 4.56, N 12.68.

Experimental section

4-Amino-7,9-dihydroxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**41**)

Pink powder

C₁₁H₈N₄O₄

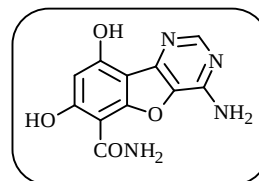
M_r = 260.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.41 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 298-299 °C (methanol)

Yield = 66% (**Method J**)

43% (**Method K1**)



Method J: A mixture of 4-amino-7,9-dibenzyloxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide **40** (20 mg, 0.045 mmol) and concentrated sulfuric acid (1 mL) was stirred at room temperature for 5 min. Water (25 mL) was added to quench the reaction, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **41** as a pink solid (7.7 mg, 66% yield).

Method K1: A mixture of 4-Amino-7,9-dimethoxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**48**) (50 mg, 0.17 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 10 min. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **41** as a yellow solid (19 mg, 43% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.74 (s, 1H, OH), 8.74 (s, 1H, OH), 8.54 - 8.50 (2s, 2H, CONH₂, H₂), 8.08 (s, 1H, CONH₂), 6.97 (s, 2H, NH₂), 6.35 (s, 1H, H₈).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.4 (C=O), 168.2 (C₉), 157.8 (C₇), 156.0 (C), 149.9 (C₄), 149.6 (C), 131.6 (C), 128.5 (C₂H), 128.2 (C), 99.2 (C₈H), 92.5 (C₆).

IR (cm⁻¹): 3199, 1693, 1620, 1404, 1354, 1296, 1240, 1201, 1120, 1074, 1033.

MS (ESI), *m/z* (%): 261.1 (100) [M+H]⁺.

Anal. calcd for C₁₁H₈N₄O₄: C 50.77, H 3.10, N 21.53. Found: C 50.62, H 3.11, N 21.60.

Experimental section

2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzamide (43)

White powder

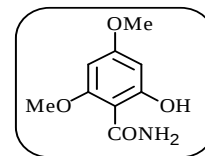
$C_9H_{11}NO_4$

$M_r = 197.19 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.46$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 154\text{-}155 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 45%



Method M: To a stirred suspension of 3,5-dimethoxyphenol **42** (1.00 g, 6.5 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (1.26 mL, 13 mmol). The mixture was maintained at this temperature for 10 min then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 10 h at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **43** as a white solid (576 mg, 45% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.69 (s, 1H, OH), 8.00 (s, 1H, CONH₂), 7.92 (s, 1H, CONH₂), 6.08 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H₅), 6.05 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 3.87 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.7 (C=O), 165.9 (C₂), 163.7 (C₆), 160.2 (C₄), 96.6 (C₁), 94.1 (C₃), 90.1 (C₅), 56.0 (CH₃), 55.3 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3429, 3209, 1620, 1587, 1492, 1415, 1355, 1315, 1294, 1217, 1199, 1159, 1109, 1041.

MS (ESI), m/z (%): 198.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2-Hydroxy-3-iodo-4,6-dimethoxybenzamide (**44**)

White powder

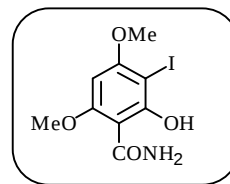
$C_9H_{10}INO_4$

$M_r = 323.08 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.21$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 270\text{-}271 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 60%



Method D3: A solution of 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzamide **43** (200 mg, 1.01 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C under argon was added *N*-iodosuccinimide (230 mg, 1.01 mmol) and the reaction mixture was maintained at this temperature for 10 min. The reaction was diluted with water (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **44** as a white solid (196 mg, 60% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 15.74 (s, 1H, OH), 8.13 (s, 1H, CONH₂), 8.13 (s, 1H, CONH₂), 6.30 (s, 1H, H₅), 3.97 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 171.3 (C=O), 163.9 (C₂), 162.1 (C₆), 161.2 (C₄), 97.1 (C₁), 87.5 (C₅), 67.1 (C₃), 56.5 (CH₃), 56.4 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3439, 1602, 1579, 1415, 1396, 1336, 1286, 1215, 1120, 1078.

MS (ESI), *m/z* (%): 324.0 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Cyano-2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzamide (45)

Beige powder

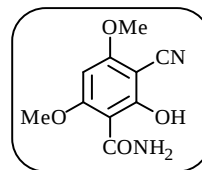
$C_{10}H_{10}N_2O_4$

$M_r = 222.20 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.82$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 300\text{-}301 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 38%



Method E: A mixture of 2-hydroxy-3-iodo-4,6-dimethoxybenzamide **44** (1.00 g, 4.3 mmol) and copper(I) cyanide (465 mg, 5.2 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL) was heated at 160 °C for 6 h. After cooling, the reaction mixture was poured into crushed ice and a precipitate was formed, which was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **45** as a beige solid (367 mg, 38% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 16.21 (s, 1H, OH), 8.34 (s, 1H, CONH₂), 8.18 (s, 1H, CONH₂), 6.32 (s, 1H, H₅), 4.03 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 171.0 (C=O), 168.4 (C₄), 165.4 (C₆), 164.3 (C₂), 113.8 (CN), 96.5 (C₁), 87.4 (C₅), 82.8 (C₃), 57.0 (CH₃), 56.7 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3477, 3367, 2220, 1651, 1583, 1483, 1450, 1427, 1344, 1209, 1126, 1070.

MS (ESI), m/z (%): 223.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Cyano-2-(cyanomethoxy)-4,6-dimethoxybenzamide (46)

Beige powder

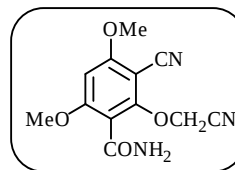
$C_{12}H_{11}N_3O_4$

$M_r = 261.23 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.72$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 185\text{-}186 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 62%



Method F3: A solution of 3-cyano-2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzamide **45** (300 mg, 1.35 mmol), bromoacetonitrile (152 μL , 2.03 mmol) and potassium carbonate (557 mg, 4.05 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **46** as a beige solid (218 mg, 62% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.82 (s, 1H, CONH₂), 7.66 (s, 1H, CONH₂), 6.73 (s, 1H, H₅), 5.11 (s, 2H, CH₂CN), 3.99 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 164.2 (C=O), 163.0 (C₄), 161.6 (C₆), 156.4 (C₂), 115.6 (CN), 115.5 (CH₂CN), 113.3 (C₁), 93.7 (C₅), 87.7 (C₃), 59.8 (CH₂CN), 57.0 (CH₃), 56.7 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3377, 3186, 2218, 1645, 1600, 1562, 1469, 1390, 1354, 1332, 1222, 1107, 1020.

MS (ESI), m/z (%): 262.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Amino-2-cyano-4,6-dimethoxy-1-benzofuran-7-carboxamide (47)

Beige powder

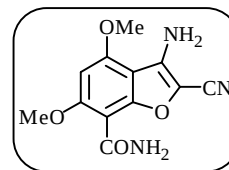
$C_{12}H_{11}N_3O_4$

$M_r = 261.23 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.68$ (dichloromethane/methanol: 9/1)

$M_p = 275\text{-}276 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 52%



Method G1: To a suspension of 3-cyano-2-(cyanomethoxy)-4,6-dimethoxybenzamide **46** (100 mg, 0.38 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL) was added sodium hydride 60% in mineral oil (23 mg, 0.57 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 5 min, quenched with water and extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane/methanol (9/1) as eluent to give compound **47** as a beige solid (52 mg, 52% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.57 (s, 1H, CONH₂), 7.44 (s, 1H, CONH₂), 6.54 (s, 1H, H₅), 6.22 (s, 2H, NH₂), 3.97 (s, 3H, CH₃), 3.91 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 163.8 (C=O), 159.4 (C₄), 156.0 (C₆), 153.3 (C₂), 142.2 (C₃), 114.5 (C_N), 105.5 (C₇), 104.0 (C), 103.9 (C), 90.7 (C₅), 56.7 (CH₃), 56.0 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3469, 3313, 2185, 1631, 1620, 1579, 1469, 1231, 1325, 1217, 1155, 1109.

MS (ESI), m/z (%): 262.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

4-Amino-7,9-dimethoxy[1]benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (**48**)

Beige powder

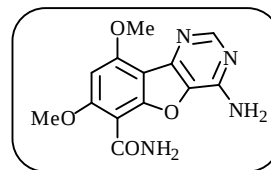
C₁₃H₁₂N₄O₄

M_r = 288.26 g.mol⁻¹

R_f = 0.21 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 292-293 °C (methanol)

Yield = 41%



Method I1: A mixture of 3-amino-2-cyano-4,6-dimethoxy-1-benzofuran-7-carboxamide **47** (200 mg, 0.77 mmol) in triethyl orthoformate (1 mL) was irradiated in a microwave at 200 °C for 15 min. The resultant yellow solution was evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of ammonia in methanol 7M (1 mL). The mixture was irradiated in a microwave at 140 °C for 15 min and the resultant precipitate was collected and evaporated to dryness. The residue was triturated with methanol and the solid was collected by filtration. The solids were combined to give compound **48** as a beige solid (95 mg, 41% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.31 (s, 1H, H₂), 7.76 (s, 1H, CONH₂), 7.52 (s, 1H, CONH₂), 7.28 (s, 2H, NH₂), 6.71 (s, 1H, H₈), 4.05 (s, 3H, CH₃), 3.95 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 164.0 (C=O), 159.2 (C₉), 156.0 (C₇), 154.6 (C), 153.3 (C₂), 148.9 (C), 145.3 (C₄), 133.1 (C), 105.1 (C), 105.0 (C₆), 91.9 (C₈), 56.6 (CH₃), 56.1 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3429, 3169, 1649, 1608, 1317, 1215, 1099, 1002.

MS (ESI), *m/z* (%): 289.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dibenzyloxy-5-(2'-nitrophenoxy)benzene (51)

Yellow powder

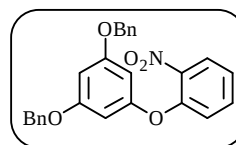
$C_{26}H_{21}NO_5$

$M_r = 427.45 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.76$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 148-149 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 73%



Method N1: A mixture of 3,5-dibenzyloxyphenol **4** (1.00 g, 3.26 mmol) and potassium hydroxide (0.18 g, 3.26 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) was heated at 120 °C and stirred for 0.5 h, and then 1-iodo-2-nitrobenzene (0.82 g, 3.26 mmol) and copper powder (0.4 g, 6.25 mmol) were added, respectively. The resulting mixture was stirred at 170 °C for 2 h then cooled down to room temperature. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **51** (1.02 g) in 73% yield as a yellow powder.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.80 (dd, $J = 8.1, 1.7 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.35 (ddd, $J = 8.5, 7.4, 1.7 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.34 – 7.15 (m, 10H, H_{Ar}), 7.12 (ddd, $J = 8.6, 7.4, 1.3 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6.93 (dd, $J = 8.4, 1.3 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{6'}$), 6.33 (t, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_2), 6.17 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.17 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 4.86 (s, 4H, 2CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 160.9 (2C_{1,3}), 157.7 (C₅), 150.0 (C_{1'}), 141.5 (C_{2'}), 136.4 (2C), 134.2 (C_{4'}), 128.6 (2C), 128.6 (2C), 128.1 (1C), 128.1 (1C), 127.6 (2C), 127.6 (2C), 125.7 (C_{4'}), 123.5 (C_{3'}), 121.3 (C_{6'}), 98.7 (2C_{4,6}), 98.2 (C₂), 70.3 (2CH₂).

IR (cm⁻¹): 1589, 1529, 1450, 1355, 1236, 1157, 1128.

MS (ESI), m/z (%): 428.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2-(3',5'-Dibenzyloxyphenoxy)aniline (52)

Brown powder

$C_{26}H_{23}NO_3$

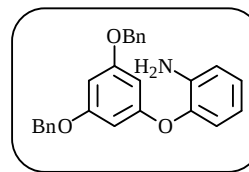
$M_r = 397.47 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.72$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

$M_p = 217\text{-}218 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 92% (**Method O1**)

65% (**Method O2**)



Method O1: To a solution of 1,3-dibenzyloxy-5-(2'-nitrophenoxy)benzene (**51**) (100 mg, 0.23 mmol) in methanol (10 mL) at room temperature, saturated aqueous ammonium chloride (5 mL) and zinc dust (75 mg, 1.15 mmol) were added sequentially. After stirring 30 min at room temperature, additional zinc was added (75 mg, 1.15 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 2 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **52** as a brown solid (84 mg, 92% yield).

Method O2: Compound **52** was obtained using tin(II) chloride and hydrochloric acid in methanol and heating at 80 °C for 24 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **52** as a brown solid (59 mg, 65% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.37 – 7.12 (m, 10H, H_{Ar}), 6.89 (td, $J = 7.6, 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_5), 6.80 (dd, $J = 8.0, 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6), 6.69 (dd, $J = 7.9, 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_3), 6.65 (td, $J = 7.6, 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_4), 6.24 (t, $J = 2.2 \text{ Hz}$, $H_{4'}$), 6.15 (d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, $H_{2'}$), 6.14 (d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, $H_{6'}$), 4.87 (s, 4H, 2CH₂).

^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ : 160.8 (2C_{3',5'}), 159.5 (C_{1'}), 142.4 (C₂), 138.9 (C₁), 136.6 (2C), 128.6 (4C), 128.0 (2C), 127.6 (4C), 125.3 (C₅), 120.9 (C₄), 118.8 (C₃), 116.6 (C₆), 96.7 (2C_{2',6'}), 96.4 (C_{4'}), 70.1 (2CH₂).

IR (cm⁻¹): 2819, 1597, 1492, 1450, 1379, 1253, 1157, 1126, 1060.

MS (ESI), m/z (%): 398.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2,4-Dimethoxy-6-(2'-nitrophenoxy)benzamide (50)

Brown powder

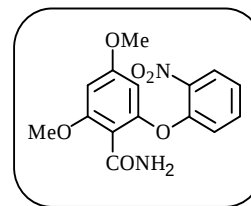
$C_{15}H_{14}N_2O_6$

$M_r = 318.28 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.45$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 209\text{-}210 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 15%



Method N1: A mixture of 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzamide (**43**) (0.50 g, 2.5 mmol) and potassium hydroxide (0.13 g, 2.5 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was heated at $120 \text{ }^\circ\text{C}$ and stirred for 2 h, and then 1-iodo-2-nitrobenzene (0.64 g, 2.5 mmol) and copper powder (0.20 g, 3.13 mmol) were added, respectively. The resulting mixture was stirred at $170 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h then cooled down to room temperature. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **50** (125 mg) in 15% yield as a brown solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.51 (s, 1H, CONH₂), 11.76 (s, 1H, CONH₂), 8.48 (dd, $J = 8.5, 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{3'}), 8.24 (dd, $J = 8.3, 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{6'}), 7.86 (ddd, $J = 8.7, 7.3, 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{4'}), 7.46 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{5'}), 6.31 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, H₅), 6.25 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, H₃), 4.10 (s, 3H, CH₃), 3.89 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 168.5 (C=O), 165.7 (C₄), 164.6 (C₂), 159.9 (C₆), 139.6 (C_{1'}), 134.8 (C_{4'}), 132.0 (C_{2'}), 125.4 (C_{5'}), 124.8 (C_{3'}), 124.8 (C_{6'}), 97.2 (C₁), 94.7 (C₅), 91.0 (C₃), 56.5 (CH₃), 55.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3284, 1639, 1575, 1502, 1390, 1346, 1276, 1249, 1157, 1047.

MS (ESI), m/z (%): 319.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dimethoxy-5-(2'-nitrophenoxy)benzene (54)

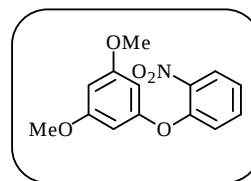
Yellow oil

$C_{14}H_{13}NO_5$

$M_r = 275.26 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.42$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 78%



Method N1: A mixture of 3,5-dimethoxyphenol (**42**) (1.00 g, 6.5 mmol) and potassium hydroxide (0.18 g, 6.5 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (5 mL) was heated at 120 °C and stirred for 0.5 h, and then 1-iodo-2-nitrobenzene (0.82 g, 6.5 mmol) and copper powder (1.00 g, 15.6 mmol) were added, respectively. The resulting mixture was stirred at 170 °C for 2 h then cooled down to room temperature. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **54** (1.34 g) in 78% yield as a yellow oil.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.07 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.77 – 7.63 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.38 (t, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.21 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{6'}$), 6.38 (t, $^4J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_2), 6.25 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, H_4), 6.24 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, H_4), 3.74 (s, 6H, 2CH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 161.4 (2C_{1,3}), 157.2 (C₅), 148.8 (C_{1'}), 141.0 (C_{2'}), 134.9 (C_{4'}), 125.5 (C_{5'}), 124.2 (C_{3'}), 120.9 (C_{6'}), 97.1 (2C_{4,6}), 96.4 (C₂), 55.4 (2CH₃).

IR (cm⁻¹): 1585, 1523, 1471, 1346, 1234, 1203, 1149, 1126, 1049.

MS (ESI), m/z (%): 276.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2-(3',5'-Dimethoxyphenoxy)aniline (55)

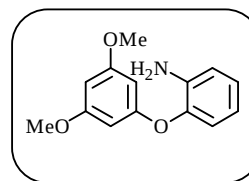
Brown oil

$C_{14}H_{15}NO_3$

$M_r = 245.27 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.72$ (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

Yield = 92%



Method O1: To a solution of 1,3-dimethoxy-5-(2'-nitrophenoxy)benzene (**54**) (250 mg, 0.91 mmol) in methanol (10 mL) at room temperature, saturated aqueous ammonium chloride (5 mL) and zinc dust (295 mg, 4.54 mmol) were added sequentially. After stirring 30 min at room temperature, additional zinc was added (295 mg, 4.54 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 2 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **55** as a brown oil (205 mg, 92% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 6.89 (td, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 1H, H_4), 6.82 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, H_3), 6.71 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H, H_6), 6.62 (td, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, H_5), 6.09 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, $H_{4'}$), 6.06 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, $2H_{2'}$), 6.05 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, $2H_{6'}$), 3.64 (s, 3H, CH_3), 3.60 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 170.3 ($\text{C}_{3'}$), 161.2 ($\text{C}_{5'}$), 159.4 ($\text{C}_{1'}$), 141.0 (C_2), 140.4 (C_1), 125.1 (C_4), 120.7 (C_5), 116.4 (C_3), 115.8 (C_6), 95.1 ($2\text{C}_{2',6'}$), 94.0 ($\text{C}_{4'}$), 55.0 (CH_3), 26.9 (CH_3).

IR (cm^{-1}): 3373, 2964, 1697, 1595, 1500, 1473, 1458, 1427, 1301, 1269, 1197, 1149, 1130, 1051.

MS (ESI), m/z (%): 246.1 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Experimental section

1,3-Dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan (57)

Yellow powder

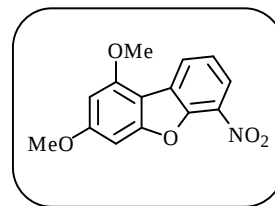
C₁₄H₁₁NO₅

M_r = 273.24 g.mol⁻¹

R_f = 0.64 (cyclohexane/ethyl acetate: 6/4)

Mp = 212-213 °C

Yield = 72%



Method Q1: 1,3-Dimethoxy-5-(2'-nitrophenoxy)benzene (**54**) (1.00 g, 3.6 mmol) was dissolved in warm pivalic acid (60 g). Silver acetate (1.20 g, 7.2 mmol) and palladium(II) acetate (40 mg, 0.18 mmol) were added and the reaction mixture was properly stirred at 135 °C for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with methanol (50 mL) and sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 9. Elemental silver was removed by filtration. The filtrate was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **57** (0.71 g) in 72% yield as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.27 (dd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1H, H₉), 8.18 (dd, ³*J* = 8.3, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1H, H₇), 7.55 (t, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H₈), 7.13 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₄), 6.66 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₂), 4.03 (s, 3H, CH₃), 3.90 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.2 (C₃), 158.2 (C₁), 155.5 (C), 147.1 (C), 132.9 (C₆), 127.6 (C₈), 126.9 (C), 123.7 (C₉), 120.5 (C₇), 104.4 (C), 95.3 (C₂), 89.3 (C₄), 56.1 (CH₃), 56.1 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3088, 2933, 1637, 1602, 1531, 1502, 1450, 1417, 1344, 1219, 1145, 1095.

MS (ESI), *m/z* (%): 274.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**58**)

Yellow powder

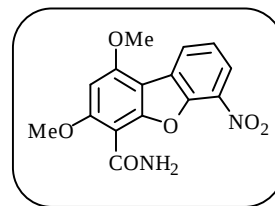
C₁₅H₁₂N₂O₆

M_r = 316.27 g.mol⁻¹

R_f = 0.63 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 298-299 °C

Yield = 53%



Method M: To a stirred suspension of 1,3-dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan (**57**) (1.00 g, 3.7 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (0.64 mL, 7.4 mmol). The mixture was maintained at room temperature for 24 h then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 24 h at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **58** as a yellow solid (0.61 g, 53% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.32 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, H₉), 8.20 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, H₇), 7.77 (s, 1H, CONH₂), 7.67 – 7.54 (m, 2H, CONH₂, H₈), 6.82 (s, 1H, H₂), 4.13 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.7 (C=O), 158.7 (C₁), 155.8 (C₃), 154.8 (C), 147.1 (C), 133.0 (C₆), 127.7 (C₈), 126.6 (C), 123.8 (C₉), 120.9 (C₇), 105.1 (C), 104.3 (C₄), 92.2 (C₂), 56.8 (CH₃), 56.4 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3136, 3091, 2846, 2140, 1977, 1643, 1606, 1521, 1427, 1355, 1323, 1217, 1085.

MS (ESI), *m/z* (%): 317.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dihydroxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**59**)

Yellow powder

C₁₃H₈N₂O₆

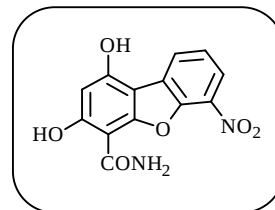
M_r = 288.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.67 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp > 300 °C

Yield = 72% (**Method K1**)

46% (**Method K2**)



Method K1: A mixture of 1,3-dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**58**) (50 mg, 0.16 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 10 min. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **59** as a yellow solid (33 mg, 72% yield).

Method K2: A mixture of the 1,3-dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**58**) (50 mg, 0.16 mmol) in dry dichloromethane (20 mL) at 0 °C under nitrogen was treated dropwise with boron tribromide (1M in dichloromethane, 13.6 mL, 13.6 mmol). The resulting mixture was allowed to warm to room temperature and stir overnight, after which time it was added dropwise to a stirring mixture of ice water (50 mL). The mixture was stirred for 30 min at room temperature then filtered and dried to provide the product **59** as a yellow solid (21 mg, 46%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.80 (s, 1H, OH), 11.77 (s, 1H, OH), 8.54 (s, 1H, CONH₂), 8.42 – 8.07 (m, 2H, CONH₂, H₉), 7.75 – 7.36 (m, 2H, H_{8,7}), 6.39 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.6 (C=O), 165.1 (C₁), 157.9 (C₃), 155.7 (C), 146.3 (C), 133.0 (C₆), 127.7 (C₈), 126.5 (C), 124.5 (C₉), 120.3 (C₇), 103.1 (C₄), 98.9 (C₂), 92.7 (C).

IR (cm⁻¹): 3458, 3196, 1654, 1629, 1608, 1517, 1477, 1440, 1404, 1359, 1323, 1251, 1220, 1195, 1120, 1082.

MS (ESI), *m/z* (%): 289.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

6-Amino-1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**60**)

Brown powder

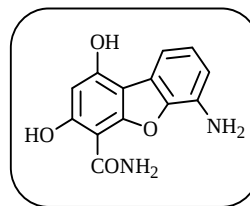
C₁₃H₁₀N₂O₄

M_r = 258.23 g.mol⁻¹

R_f = 0.34 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 292-293 °C

Yield = 62%



Method O1: To a solution of 1,3-dihydroxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**59**) (50 mg, 0.17 mmol) in methanol (10 mL) at room temperature, saturated aqueous ammonium chloride (5 mL) and zinc dust (55 mg, 0.85 mmol) were added sequentially. After stirring 30 min at room temperature, additional zinc was added (55 mg, 0.85 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 2 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **60** as a brown solid (28 mg, 62% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 14.19 (s, 1H, OH), 11.12 (s, 1H, OH), 8.19 (s, 1H, CONH₂), 8.11 (s, 1H, CONH₂), 7.12 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, H₉), 7.03 (t, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, H₈), 6.63 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, H₇), 6.25 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 170.2 (C=O), 164.2 (C₁), 157.7 (C₃), 154.8 (C), 142.2 (C), 133.3 (C₆), 124.4 (C₈), 123.0 (C), 110.2 (C₉), 108.1 (C₇), 105.3 (C₄), 97.8 (C₂), 92.5 (C).

IR (cm⁻¹): 3294, 3192, 1492, 1427, 1261, 1190, 1085, 1053.

MS (ESI), *m/z* (%): 259.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**61**)

Brown powder

C₁₃H₉NO₄

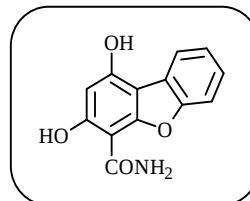
M_r = 243.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.20 (dichloromethane)

Mp = 219-220 °C

Yield = 52% (**Method P**)

46% (**Method K1**)



Method P: To a solution of 6-amino-1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**60**) (100 mg, 0.38 mmol) in ethanol (10 mL) at room temperature, sulfuric acid (25%, 40 mL) was added under warming. The mixture was cooled to 0 °C, and a solution of sodium nitrite (54 mg, 0.76 mmol) in 5 mL of water was added dropwise with stirring. The reaction mixture was stirred for 45 min at 80 °C then reaction was quenched with water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **61** as a brown solid (49 mg, 52% yield).

Method K1: A mixture of 1,3-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**64**) (50 mg, 0.18 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 10 min. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **61** as a yellow solid (20 mg, 46% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.93 (s, 1H, OH), 11.34 (s, 1H, OH), 8.28 (s, 1H, CONH₂), 8.03 – 7.88 (m, 1H, H₉), 7.85 (s, 1H, CONH₂), 7.77 – 7.65 (m, 1H, H₆), 7.57 – 7.25 (m, 2H, H_{7,8}), 6.31 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 170.0 (C=O), 164.3 (C₁), 157.7 (C₃), 155.2 (C), 154.2 (C), 124.8 (C₇), 123.7 (C₈), 122.7 (C), 121.0 (C₉), 111.3 (C₆), 104.4 (C₄), 98.0 (C₂), 92.6 (C).

IR (cm⁻¹): 3456, 3132, 1604, 1446, 1409, 1348, 1315, 1286, 1230, 1195, 1103, 1053.

MS (ESI), *m/z* (%): 244.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

6-Nitrodibenzo[*b,d*]furan-1,3-diol (**62**)

Yellow powder

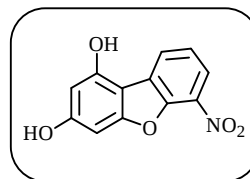
C₁₂H₇NO₅

M_r = 245.19 g.mol⁻¹

R_f = 0.68 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 223-224 °C

Yield = 66%



Method K1: A mixture of 1,3-dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan (**57**) (100 mg, 0.37 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave heating at 200 °C for 10 min. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **62** as a yellow solid (59 mg, 66% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.76 (s, 1H, OH), 10.07 (s, 1H, OH), 8.24 (dd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1H, H₉), 8.10 (dd, ³*J* = 8.3, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1H, H₇), 7.50 (t, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H₈), 6.63 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₄), 6.41 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, H₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.2 (C₃), 158.7 (C₁), 154.1 (C), 147.0 (C), 132.8 (C₆), 127.6 (C₈), 127.1 (C), 123.4 (C₉), 119.6 (C₇), 102.7 (C), 98.6 (C₂), 89.9 (C₄).

IR (cm⁻¹): 3556, 3435, 3390, 1610, 1498, 1342, 1213, 1138, 1039.

MS (ESI), *m/z* (%): 246.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

6-Amino-1,3-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (63)

Brown powder

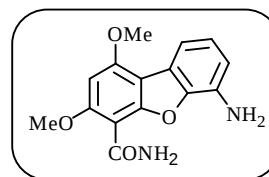
C₁₅H₁₄N₂O₄

M_r = 286.28 g.mol⁻¹

R_f = 0.52 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 293-294 °C

Yield = 49%



Method O1: To a solution of 1,3-dimethoxy-6-nitrodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**58**) (50 mg, 0.16 mmol) in methanol (10 mL) at room temperature, saturated aqueous ammonium chloride (5 mL) and zinc dust (55 mg, 0.85 mmol) were added sequentially. After stirring 30 min at room temperature, additional zinc was added (55 mg, 0.85 mmol) and the reaction mixture was refluxed for 2 h. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **63** as a brown solid (22 mg, 49% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.67 (s, 1H, CONH₂), 7.44 (s, 1H, CONH₂), 7.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₉), 7.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₈), 6.70 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H₇), 6.68 (s, 1H, H₂), 5.25 (s, 2H, NH₂), 4.05 (s, 3H, CH₃), 3.93 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.6 (C=O), 157.2 (C₁), 155.5 (C₃), 153.9 (C), 142.9 (C), 133.1 (C₆), 123.7 (C₈), 122.7 (C), 111.2 (C₉), 109.1 (C₇), 107.0 (C₄), 104.8 (C), 90.9 (C₂), 56.6 (CH₃), 56.0 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3180, 1643, 1604, 1492, 1413, 1319, 1211, 1101.

MS (ESI), *m/z* (%): 287.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**64**)

Brown powder

C₁₅H₁₃NO₄

M_r = 271.27 g.mol⁻¹

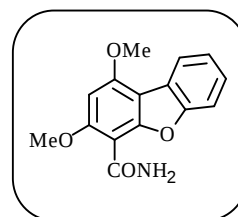
R_f = 0.41 (dichloromethane/methanol: 9/1)

M_p = 296-297 °C

Yield = 36% (**Method M**)

46% (**Method P**)

61% (**Method Q2**)



Method M: To a stirred suspension of 1,3-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan (**56**) (1.00 g, 4.4 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (0.64 mL, 7.4 mmol). The mixture was maintained at room temperature for 24 h then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 24 h at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **64** as a yellow solid (0.43 g, 36% yield).

Method P: To a solution of 6-amino-1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**63**) (50 mg, 0.17 mmol) in ethanol (10 mL) at room temperature, sulfuric acid (25%, 20 mL) was added under warming. The mixture was cooled to 0 °C, and a solution of sodium nitrite (24 mg, 0.34 mmol) in 5 mL of water was added dropwise with stirring. The reaction mixture was stirred for 45 min at 80 °C then the reaction was quenched with water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **64** as a brown solid (21 mg, 46% yield).

Method Q2: A mixture of 2'-fluoro-2-hydroxy-4,6-dimethoxybiphenyl-3-carboxamide (**69**) (50 mg, 0.17 mmol) and cesium carbonate (166 mg, 0.51 mmol) in acetonitrile was irradiated using microwave (80W) heating at 150 °C for 1 h. Ethyl acetate (50 mL) was added to the mixture and the organic layer was washed with water (2 x 50 mL), dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was crystallized with ether diisopropyl furnished the title compound **64** as pale brown solid (28 mg, 61%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.95 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H₉), 7.69 (s, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₆), 7.51 (s, 1H, NH), 7.38 (m, 2H, H_{7,8}), 6.72 (s, 1H, H₂), 4.09 (s, 3H, CH₃), 3.95 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.5 (C=O), 157.6 (C₁), 155.7 (C₃), 154.8 (C), 154.4 (C), 125.5 (C₇), 123.2 (C₈), 122.5 (C), 121.3 (C₉), 110.9 (C₆), 105.9 (C₄), 104.7 (C), 91.1 (C₂), 56.7 (CH₃), 56.1 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3381, 3201, 2968, 1641, 1602, 1452, 1421, 1321, 1213.

MS (ESI), *m/z* (%): 272.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dimethoxy-5-phenoxybenzene (65)

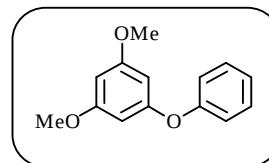
Colorless oil

$C_{14}H_{14}O_3$

$M_r = 230.26 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.68$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 32%



Method N2: To a solution of 3,5-dimethoxyphenol (**42**) (200 mg, 1.30 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL), copper(I) iodide (10 mol %), cesium carbonate (500 mg, 1.53 mmol) and iodobenzene (200 μ L, 1.79 mmol) were added sequentially. The reaction mixture was irradiated using microwave heating at 110 $^{\circ}$ C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with ethyl acetate (50 mL) then washed with water (3 x 50 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **65** (96 mg, 32%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.24 (mt, 2H, $\text{H}_{3',5'}$), 7.03 (mt, 1H, $\text{H}_{4'}$), 6.95 (mt, 2H, $\text{H}_{2',6'}$), 6.13 (t, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_2), 6.08 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{4,6}$), 3.64 (s, 6H, 2CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 161.6 (2C_{1,3}), 159.2 (C₅), 156.7 (C_{1'}), 129.7 (2C_{3',5'}), 123.5 (C_{4'}), 119.2 (2C_{2',6'}), 97.3 (2C_{4,6}), 95.5 (C₂), 55.4 (2CH₃).

IR (cm⁻¹): 1583, 1487, 1469, 1215, 1203, 1149, 1128, 1053.

MS (ESI), m/z (%): 231.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3-Dimethoxydibenzo[b,d]furan (56)

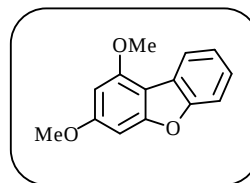
Colorless oil

$C_{14}H_{12}O_3$

$M_r = 228.24 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.64$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 73%



Method Q1: 1,3-Dimethoxy-5-phenoxybenzene (**65**) (200 g, 0.87 mmol) was dissolved in warm pivalic acid (50 g). Silver acetate (435 mg, 2.61 mmol) and palladium(II) acetate (20 mg, 0.09 mmol) were added and the reaction mixture was properly stirred at 130 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with methanol (50 mL) and sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 9. Elemental silver was removed by filtration. The filtrate was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **56** (145 mg) in 73% yield as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.92 (mt, 1H, H₆), 7.28 (mt, 1H, H₉), 7.27 - 7.15 (m, 2H, H_{7,8}), 6.63 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H₄), 6.33 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H₂), 3.92 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 161.0 (C₁), 158.1 (C₃), 155.9 (C_{4a}), 155.4 (C_{5a}), 124.6 (C₇), 123.7 (C_{9a}), 122.7 (C₈), 121.7 (C₉), 110.5 (C₆), 107.2 (C_{9b}), 93.8 (C₂), 88.4 (C₄), 55.6 (CH₃), 55.5 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 2970, 1697, 1483, 1413, 1365, 1300, 1197.

MS (ESI), m/z (%): 229.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

2'-Fluoro-2-hydroxy-4,6-dimethoxybiphenyl-3-carboxamide (**69**)

Brown powder

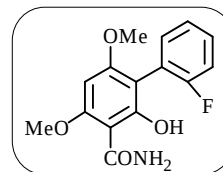
C₁₅H₁₄FNO₄

M_r = 291.27 g.mol⁻¹

R_f = 0.41 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 223-224 °C

Yield = 26%



Method R: 2-Hydroxy-3-iodo-4,6-dimethoxybenzamide (**44**) (1.00 g, 3.1 mmol), 2-fluorobenzeneboronic acid (650 mg, 4.7 mmol) and potassium phosphate (1.33 g, 6.2 mmol) were added to degassed acetonitrile (16 mL) and water (4 mL). After stirring during 10 min, palladium(II) acetate (35 mg, 0.05 eq) and triphenylphosphine (40 mg, 0.05 eq) were added to the mixture. The tube was then sealed and the reaction mixture was irradiated using microwave heating at 90 °C for 2 h. Acetonitrile was removed, the crude product was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to afford compound **69** (234 mg, 26%) as a brown powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 14.92 (s, 1H, OH), 8.13 (s, 1H, CONH₂), 8.03 (s, 1H, CONH₂), 7.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.26 - 6.95 (m, 3H), 6.32 (s, 1H, H₅), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.9 (C=O), 162.5 (C₂), 160.9 (C₆), 160.5 (C₄), 158.8 (d, ¹*J* = 243 Hz, C-F), 133.3 (d, ³*J* = 4 Hz, C_{6'}), 128.8 (d, ³*J* = 9 Hz, C_{4'}), 123.60 (d, ⁴*J* = 4 Hz, C_{5'}), 121.18 (d, ¹*J* = 17 Hz, C_{1'}), 115.0 (d, ²*J* = 22 Hz, C_{3'}), 104.4 (C₁), 96.5 (C₃), 86.8 (C₅), 56.2 (CH₃), 55.7 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3435, 1649, 1604, 1591, 1415, 1317, 1209, 1138, 1114.

MS (ESI), *m/z* (%): 292.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-[4-(3,5-Dimethoxyphenoxy)phenyl]ethanone (72)

Brown powder

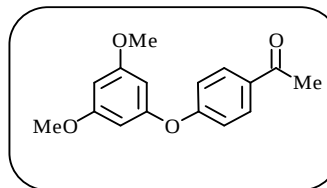
$C_{16}H_{16}O_4$

$M_r = 272.30 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.60$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 85-86 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 71%



Method N2: To a solution of 3,5-dimethoxyphenol (**42**) (1.00 g, 6.5 mmol), copper(I) iodide (124 mg, 0.65 mmol), cesium carbonate (4.20 g, 13 mmol) and 4-iodoacetophenone (2.40 g, 9.7 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL) were added sequentially. The reaction mixture was irradiated using microwave heating at 110 $^\circ\text{C}$ for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with ethyl acetate (50 mL) then washed with water (3 x 50 mL). The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **73** (1.20 g) in 71% yield as a brown powder.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.97 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.32 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.79 (s, 6H, 2CH₃), 2.60 (s, 3H, COCH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 196.7 (C=O), 161.7 (2C_{3',5'}), 161.5 (C₄), 157.3 (C_{1'}), 132.1 (C₁), 130.5 (2C_{2,6}), 117.6 (2C_{3,5}), 98.5 (2C_{2',6'}), 96.7 (C_{4'}), 55.4 (2CH₃), 26.4 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 1674, 1585, 1425, 1361, 1267, 1230, 1136, 1053.

MS (ESI), m/z (%): 273.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-(7,9-Dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (73)

Brown powder

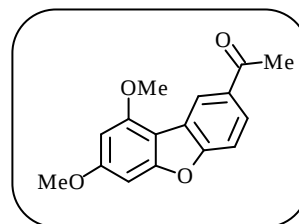
C₁₆H₁₄O₄

M_r = 270.30 g.mol⁻¹

R_f = 0.34 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Mp = 162-163 °C

Yield = 83%



Method Q1: 1-[4-(3,5-Dimethoxyphenoxy)phenyl]ethanone (**72**) (1.00 g, 3.7 mmol) was dissolved in warm pivalic acid (20 g). Silver acetate (3.06 g, 18.4 mmol) and palladium(II) acetate (80 mg, 0.37 mmol) were added and the reaction mixture was properly stirred at 135 °C for 24 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with methanol (50 mL) and sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 9. Elemental silver was removed by filtration. The filtrate was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **73** (0.83 g) in 83% yield as a brown powder.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ: 8.60 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁), 8.02 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₃), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₄), 6.74 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₆), 6.46 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₈), 4.06 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 2.73 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 197.6 (C=O), 161.6 (C₇), 158.8 (C), 158.3 (C₉), 156.1 (C), 132.7 (C₂), 125.8 (C₃), 124.1 (C), 122.6 (C₁), 110.6 (C₄), 106.7 (C), 94.4 (C₈), 88.6 (C₆), 55.8 (CH₃), 55.7 (CH₃), 26.8 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 1674, 1637, 1618, 1581, 1510, 1425, 1408, 1361, 1315, 1290, 1253, 1215, 1197, 1151, 1093, 1045, 1010.

MS (ESI), *m/z* (%): 271.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

8-Acetyl-1,3-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**71**)

Yellow powder

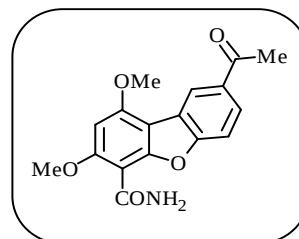
C₁₇H₁₅NO₅

M_r = 313.30 g.mol⁻¹

R_f = 0.61 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 237-238 °C

Yield = 32%



Method M: To a stirred suspension of 1-(7,9-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (**72**) (200 mg, 0.74 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (128 µL, 1.48 mmol). The mixture was maintained at room temperature for 12 h then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 12 h at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **71** as a yellow solid (74 mg, 32% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.48 (s, 1H, H₉), 8.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₇), 7.78 – 7.74 (m, 2H, H₆, CONH₂), 7.55 (s, 1H, CONH₂), 6.78 (s, 1H, H₂), 4.14 (s, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, CH₃), 2.68 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 197.0 (C=OCH₃), 164.1 (C=ONH₂), 158.2 (C₃), 157.5 (C₁), 155.9 (C), 155.1 (C), 132.6 (C₈), 126.6 (C₇), 122.9 (C), 121.3 (C₉), 110.9 (C₆), 105.3 (C₄), 104.8 (C), 91.6 (C₂), 56.7 (CH₃), 56.3 (CH₃), 26.8 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 3381, 1649, 1612, 1415, 1365, 1321, 1286, 1215, 1097.

MS (ESI), *m/z* (%): 314.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

8-Acetyl-1,3-dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (74)

Brown powder

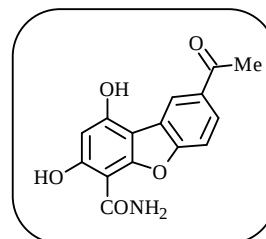
C₁₅H₁₁NO₅

M_r = 285.25 g.mol⁻¹

R_f = 0.53 (dichloromethane/methanol : 9/1)

Mp = 355-356 °C

Yield = 26%



Method K1: A mixture of 8-acetyl-1,3-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide **71** (50 mg, 0.16 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 15 min. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **74** as a yellow solid (11 mg, 26% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.98 (s, 1H, OH), 11.54 (s, 1H, OH), 8.47 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₉), 8.32 (s, 1H, CONH₂), 8.06 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₇), 7.88 (s, 1H, CONH₂), 7.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆), 6.36 (s, 1H, H₂), 2.68 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 197.0 (C=OCH₃), 169.8 (C=CONH₂), 164.8 (C₃), 157.8 (C₁), 156.8 (C), 156.0 (C), 133.0 (C₈), 125.9 (C₇), 123.2 (C), 121.0 (C₉), 111.3 (C₆), 103.9 (C₄), 98.4 (C₂), 92.8 (C), 26.8 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3479, 3190, 1600, 1415, 1359, 1284, 1249, 1190, 1045.

MS (ESI), *m/z* (%): 286.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-(7,9-Dihydroxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (75)

Brown powder

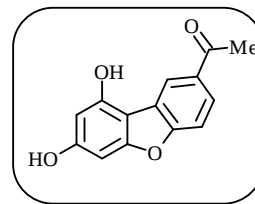
C₁₄H₁₀O₄

M_r = 242.28 g.mol⁻¹

R_f = 0.43 (dichloromethane/methanol : 9/1)

Mp = 215-216 °C

Yield = 57%



Method K1: A mixture of 1-(7,9-dimethoxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (**72**) (60 mg, 0.22 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 15 min. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **75** as a yellow solid (30 mg, 57% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.57 (s, 1H, OH), 9.86 (s, 1H, OH), 8.42 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁), 7.96 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H₃), 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₄), 6.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₆), 6.38 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₈), 2.65 (s, 1H, CH₃CO).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 197.0 (C=O), 159.4 (C₇), 158.7 (C), 157.3 (C₉), 154.0 (C), 132.3 (C₂), 125.5 (C₃), 124.1 (C), 120.8 (C₁), 110.4 (C₄), 103.6 (C), 98.1 (C₈), 89.8 (C₆), 26.8 (CH₃CO).

IR (cm⁻¹): 3211, 1643, 1598, 1442, 1359, 1246, 1134, 1049, 1016.

MS (ESI), *m/z* (%): 243.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-Iodo-3-methoxybenzene (77)

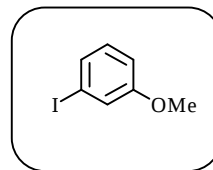
Brown oil

C₇H₇IO

M_r = 234.03 g.mol⁻¹

R_f = 0.57 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 89%



Method A2: 3-Iodophenol (**76**) (1.00 g, 4.5 mmol) and cesium carbonate (2.40 g, 6.8 mmol) were introduced in a round bottom flask under argon. Dry acetonitrile (20 mL) was added, followed by iodomethane (420 μ L, 6.8 mmol). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 12 h and then the reaction was diluted with water (50 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **77** as a brown oil (940 mg, 89% yield).

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.21 - 7.16 (m, 2H, H_{2,6}), 6.91 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₅), 6.78 (ddd, *J* = 8.4, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H₄), 3.69 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 160.1 (C₃), 130.7 (C₆), 129.8 (C₅), 123.0 (C₂), 113.7 (C₄), 94.3 (C₁), 55.3 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 1581, 1566, 1471, 1284, 1240, 1228, 1029.

MS (ESI), *m/z* (%): 233.1 (100) [M-H]⁻.

Experimental section

1,3-Dimethoxy-5-(3-methoxyphenoxy)benzene (78)

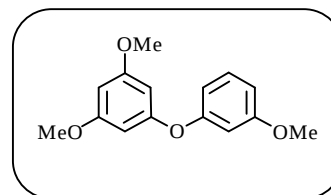
Colorless oil

$C_{15}H_{16}O_4$

$M_r = 260.29 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.55$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 30%



Method N2: To a solution of 3,5-dimethoxyphenol (**42**) (200 mg, 1.30 mmol), copper(I) iodide (10 mol %), cesium carbonate (1.27 g, 3.90 mmol) and 1-iodo-3-methoxybenzene (**77**) (455 mg, 1.95 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL) were added sequentially. The reaction mixture was irradiated using microwave (80W) heating at 100 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) then washed with water (3 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9/1) as eluent to give compound **78** (103 mg, 30%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.15 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_5), 6.64 - 6.49 (m, 3H, $H_{2',4',6'}$), 6.15 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_2), 6.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H, CH_3), 3.67 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 161.5 (2 $\text{C}_{1,3}$), 160.9 ($\text{C}_{3'}$), 158.9 ($\text{C}_{1'}$), 157.9 (C_5), 130.0 ($\text{C}_{5'}$), 111.3 ($\text{C}_{6'}$), 109.1 ($\text{C}_{2'}$), 105.1 ($\text{C}_{4'}$), 97.4 (2 $\text{C}_{4,6}$), 95.6 (C_2), 55.4 (2 CH_3), 55.3 (CH_3).

IR (cm $^{-1}$): 2835, 1583, 1261, 1193, 1143, 1126, 1047.

MS (ESI), m/z (%): 261.1 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Experimental section

1,3,7-Trimethoxydibenzo[*b,d*]furan (79)

White powder

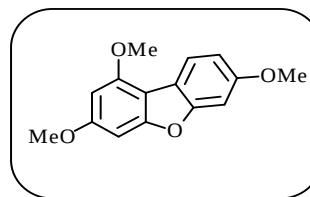
C₁₅H₁₄O₄

M_r = 258.27 g.mol⁻¹

R_f = 0.51 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Mp = 153-154 °C

Yield = 91%



Method Q1: 1,3-Dimethoxy-5-(3-methoxyphenoxy)benzene (**78**) (100 mg, 0.38 mmol) was dissolved in warm pivalic acid (2 g). Silver acetate (192 mg, 1.15 mmol) and palladium(II) acetate (9 mg, 0.04 mmol) were added and the reaction mixture was properly stirred at 130 °C for 12 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with methanol (50 mL) and sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 9. Elemental silver was removed by filtration. The filtrate was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **79** (90 mg) in 91% yield as a brown powder.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₉), 6.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₆), 6.82 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H₈), 6.61 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₄), 6.32 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₂), 3.91 (s, 3H, CH₃), 3.81 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 160.0 (C₃), 158.2 (C₇), 158.1 (C), 156.6 (C), 155.2 (C₁), 121.8 (C₉), 117.0 (C), 110.4 (C₈), 107.2 (C), 96.4 (C₂), 93.8 (C₄), 88.7 (C₆), 55.8 (CH₃), 55.7 (CH₃), 55.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 2940, 2832, 1594, 1435, 1365, 1320, 1264, 1206, 1125, 1036.

MS (ESI), *m/z* (%): 259.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3,7-Trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**80**)

White powder

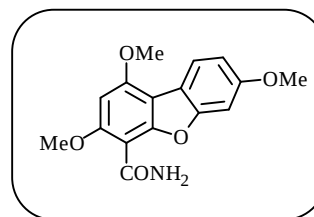
C₁₆H₁₅NO₅

M_r = 301.29 g.mol⁻¹

R_f = 0.67 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 332-333 °C

Yield = 44%



Method M: To a stirred suspension of 1,3,7-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan (**79**) (100 mg, 0.38 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (67 µL, 0.77 mmol). The mixture was maintained at room temperature for 2 h then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 4 h at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **80** as a white solid (52 mg, 44% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₉), 7.67 (s, 1H, CONH₂), 7.48 (s, 1H, CONH₂), 7.30 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₆), 6.95 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H₈), 6.69 (s, 1H, H₂), 4.07 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 164.5 (C=O), 158.2 (C₇), 156.5 (C), 156.1 (C), 154.8 (C₁), 154.4 (C₃), 121.4 (C₉), 115.5 (C), 110.8 (C₈), 106.1 (C₄), 104.9 (C), 96.7 (C₆), 91.2 (C₂), 56.7 (CH₃), 56.0 (CH₃), 55.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3377, 3192, 2970, 2839, 1643, 1610, 1454, 1431, 1375, 1321, 1267, 1209, 1107, 1026.

MS (ESI), *m/z* (%): 302.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1,3,7-Trihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**81**)

Brown powder

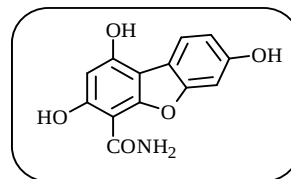
C₁₃H₉NO₅

M_r = 259.21 g.mol⁻¹

R_f = 0.67 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 360-361 °C

Yield = 38%



Method K1: A mixture of 1,3,7-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**80**) (50 mg, 0.16 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 15 min. After addition of water, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **81** as a brown solid (16 mg, 38% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.73 (s, 1H, OH), 11.09 (s, 1H, OH), 9.75 (s, 1H, OH), 8.20 (s, 1H, CONH₂), 7.80 (s, 1H, CONH₂), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₉), 7.10 (s, 1H, H₆), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₈), 6.25 (s, 1H, H₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 170.1 (C=O), 162.8 (C₇), 156.7 (C₃), 155.7 (C₁), 155.5 (C), 154.9 (C), 121.1 (C₉), 114.4 (C), 112.0 (C₈), 104.7 (C₄), 98.5 (C₂), 97.8 (C₆), 92.7 (C).

IR (cm⁻¹): 3423, 3321, 3242, 3219, 1664, 1556, 1502, 1446, 1288, 1257, 1190, 1107, 1029.

MS (ESI), m/z (%): 260.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

8-Acetyl-1,3,7-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**82**)

White powder

C₁₈H₁₇NO₆

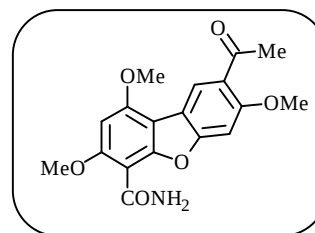
M_r = 343.33 g.mol⁻¹

R_f = 0.59 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 228-229 °C

Yield = 74% (**Method S**)

55% (**Method M**)



Method S: Anhydrous aluminium chloride (111 mg, 0.83 mmol) in 1,2-dichloroethane (10 mL) was added to acetyl chloride (24 µL, 0.33 mmol) and then 1,3,7-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**80**) in 1,2-dichloroethane (20 mL) slowly and left at room temperature for 1 h. After the reaction (TLC) was completed, the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 1N and extracted with dichloromethane (2 x 50 mL). The combined organic extracts were washed with water, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated in vacuum. The crude product obtained was purified over silica gel column chromatography using dichloromethane to obtain the pure product **82** (42 mg, 74% yield).

Method M: To a stirred suspension of 1-(3,7,9-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (**88**) (100 mg, 0.33 mmol) in acetonitrile (20 mL) at 0 °C under argon was added chlorosulfonyl isocyanate (58 µL, 0.66 mmol). The mixture was maintained at room temperature for 12 h then the reaction mixture was quenched with hydrochloric acid 5M (20 mL). After 12 h at 60 °C, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6/4) as eluent to give compound **82** as a white solid (52 mg, 55% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.12 (s, 1H, H₉), 7.70 (s, 1H, CONH₂), 7.55 (s, 1H, H₆), 7.53 (s, 1H, H₆), 6.73 (s, 1H, H₂), 4.09 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃), 3.94 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 197.9 (C=O), 164.2 (CONH₂), 158.6 (C), 158.3 (C₇), 157.1 (C), 155.1 (C₁), 154.9 (C₃), 124.2 (C₈), 122.1 (C₉), 115.4 (C), 105.5 (C), 105.0 (C₄), 96.0 (C₆), 91.6 (C₂), 56.7 (CH₃), 56.4 (CH₃), 56.2 (CH₃), 31.6 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 3387, 3197, 1606, 1402, 1317, 1273, 1089.

MS (ESI), m/z (%): 344.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

8-Acetyl-1,3,7-trihydroxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**83**)

Brown powder

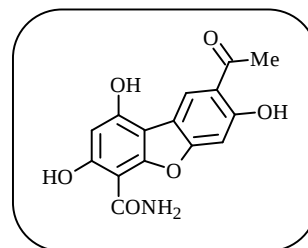
C₁₅H₁₁NO₆

M_r = 301.25 g.mol⁻¹

R_f = 0.53 (dichloromethane/methanol: 9/1)

Mp = 335-336 °C

Yield = 39%



Method K1: A mixture of 8-acetyl-1,3,7-trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide (**82**) (50 mg, 0.15 mmol) in warm pyridine hydrochloride (3g) was irradiated using microwave (100W) heating at 200 °C for 15 min. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane as eluent to give compound **83** as a brown solid (18 mg, 39% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.82 (s, 1H, OH), 12.44 (s, 1H, OH), 11.38 (s, 1H, OH), 8.30 (m, 2H, H₉, CONH₂), 7.81 (s, 1H, CONH₂), 7.25 (s, 1H, H₆), 6.32 (s, 1H, H₂), 2.74 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 203.7 (C=O), 169.7 (CONH₂), 163.7 (C₇), 160.1 (C₃), 158.8 (C), 157.0 (C₁), 155.7 (C), 123.3 (C₉), 117.4 (C), 115.5 (C₈), 103.5 (C₄), 99.8 (C₂), 98.5 (C₆), 93.0 (C), 27.8 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 3462, 3334, 3170, 1614, 1469, 1396, 1246, 1103, 1041.

MS (ESI), m/z (%): 302.1 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

3-Iodophenyl acetate (**85**)

White powder

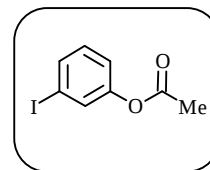
$C_8H_7IO_2$

$M_r = 262.04 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.65$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 74\text{-}75 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 90%



Method A1: Acetic anhydride (4.3 mL, 45.47 mmol) was added to a solution of 3-iodophenol (**76**) (1.00 g, 4.55 mmol) in pyridine (5 mL). After stirring at 130 °C for 2 h, the reaction was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) to give compound **85** as a white solid (1.06 g, 90% yield).

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.49 (dt, $J = 7.2, 1.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.43 - 7.37 (m, 1H), 7.05 - 6.98 (m, 2H), 2.21 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 168.9 (C=O), 150.9 (C_1), 134.9 (C_4), 130.8 (C_5), 130.6 (C_2), 121.1 (C_6), 93.5 (C_3), 21.0 (CH_3).

IR (cm $^{-1}$): 1747, 1735, 1573, 1365, 1201, 1192, 1072, 1031, 1001, 981.

MS (ESI), m/z (%): 263.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Experimental section

1-(2-Hydroxy-4-iodophenyl)ethanone (86)

Beige powder

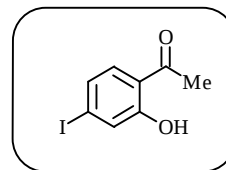
$C_8H_7IO_2$

$M_r = 262.04 \text{ g.mol}^{-1}$

$R_f = 0.68$ (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

$M_p = 52\text{-}53 \text{ }^\circ\text{C}$

Yield = 88%



Method T: 3-Iodophenyl acetate (**85**) 250 mg (0.95 mmol) was dissolved in 4 mL of boron trifluoride acetic acid complex ($BF_3 \cdot 2CH_3COOH$). The mixture was heated at $180 \text{ }^\circ\text{C}$ for 12 h. After cooling to room temperature, sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 8. The mixture was extracted with dichloromethane (100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Compound **86** is obtained after purification by chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/ethyl acetate: 8/2) in the form of a beige powder with a yield of 88%.

1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 12.18 (s, 1H, OH), 7.50 – 7.24 (m, 2H), 7.27 - 7.07 (m, 1H), 2.53 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 204.1 (C=O), 162.2 (C_2), 131.2 (C_5), 128.3 (C_6), 127.8 (C_3), 119.0 (C_1), 103.7 (C_4), 26.5 (CH_3).

IR (cm⁻¹): 1620, 1600, 1543, 1475, 1365, 1317, 1284, 1211.

MS (ESI), m/z (%): 263.0 (100) $[M+H]^+$.

Experimental section

1-(4-Iodo-2-methoxyphenyl)ethanone (**84**)

White powder

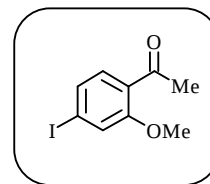
C₉H₉IO₂

M_r = 276.07 g.mol⁻¹

R_f = 0.53 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Mp = 70-71 °C

Yield = 91%



Method A2: A mixture of 1-(2-hydroxy-4-iodophenyl)ethanone (**86**) (1.00 g, 3.8 mmol) and cesium carbonate (3.71 g, 11.4 mmol) in acetonitrile (10 ml) was refluxed, then methyl iodide (490 µL, 7.6 mmol) was added dropwise. The mixture was heated at 90 °C for 2 h, the solvent and low boiling point components were removed under reduced pressure. Water was added to the residue and the organic matter was extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate after the solvent was removed under reduced pressure and purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) to give compound **84** as a white solid (0.95 g, 91% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.53 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₃), 7.42 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H₅), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₆), 3.91 (s, 3H, CH₃), 3.33 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 198.1 (C=O), 158.5 (C₂), 130.8 (C₅), 129.4 (C₆), 127.3 (C₁), 121.4 (C₃), 101.0 (C₄), 56.2 (CH₃), 31.4 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 3089, 2997, 1660, 1570, 1392, 1357, 1278, 1240, 1186, 1085, 1016.

MS (ESI), m/z (%): 277.0 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-[4-(3',5'-Dimethoxyphenoxy)-2-methoxyphenyl]ethanone (**87**)

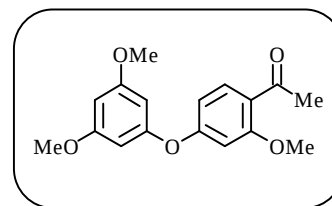
Colorless oil

C₁₇H₁₈O₅

M_r = 302.32 g.mol⁻¹

R_f = 0.54 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Yield = 34%



Method N2: To a solution of 3,5-dimethoxyphenol (**42**) (400 mg, 2.6 mmol), copper(I) iodide (10 mol %), cesium carbonate (2.50 g, 7.8 mmol) and 1-(4-iodo-2-methoxyphenyl)ethanone (**85**) (680 mg, 2.6 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (4 mL). The reaction mixture was irradiated using microwave heating (80W) at 120 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) then washed with water (3 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **87** (266 mg, 34%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ : 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₆), 6.54 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₃), 6.49 (dt, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H, H₅), 6.22 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{4'}), 6.18 – 6.06 (m, 2H, H_{2',6'}), 3.79 (s, 3H, CH₃), 3.69 (s, 6H, 2CH₃), 2.52 (s, 3H, COCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 198.0 (C=O), 162.2 (C₂), 161.7 (2C_{3',5'}), 160.9 (C₄), 157.3 (C_{1'}), 132.4 (C₆), 122.9 (C₁), 109.7 (C₅), 101.7 (C₃), 98.3 (2C_{2',6'}), 96.7 (C_{4'}), 55.6 (CH₃), 55.4 (2CH₃), 31.8 (COCH₃).

IR (cm⁻¹): 2839, 1644, 1579, 1462, 1419, 1357, 1257, 1195, 1149, 1128, 1051, 1028.

MS (ESI), *m/z* (%): 303.2 (100) [M+H]⁺.

Experimental section

1-(3,7,9-Trimethoxydibenzo[*b,d*]furan-2-yl)ethanone (**88**)

White powder

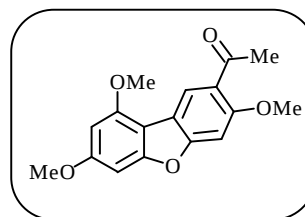
C₁₇H₁₆O₅

M_r = 300.31 g.mol⁻¹

R_f = 0.48 (cyclohexane/ethyl acetate: 8/2)

Mp = 155-156 °C

Yield = 71%



Method Q1: 1-[4-(3,5-dimethoxyphenoxy)-2-methoxyphenyl]ethanone (**87**) (100 mg, 0.33 mmol) was dissolved in warm pivalic acid (4 g). Silver acetate (192 mg, 1.15 mmol) and palladium(II) acetate (9 mg, 0.03 mmol) were added and the reaction mixture was properly stirred at 130 °C for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with methanol (50 mL) and sodium hydroxide (1M) was added until the pH reached 9. Elemental silver was removed by filtration. The filtrate was extracted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 100 mL). The organic layers were washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8/2) as eluent to give compound **88** (70 mg) in 71% yield as a brown powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.10 (s, 1H, H₉), 7.46 (s, 1H, H₆), 6.92 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₄), 6.57 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₂), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃), 3.86 (s, 3H, CH₃), 2.58 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ: 198.0 (C=O), 160.6 (C₃), 158.5 (C₇), 158.0 (C), 157.9 (C), 154.9 (C₁), 124.1 (C₈), 121.9 (C₉), 115.9 (C), 105.4 (C), 95.8 (C₂), 94.5 (C₄), 89.2 (C₆), 56.3 (CH₃), 55.9 (CH₃), 55.8 (CH₃), 31.6 (CH₃).

IR (cm⁻¹): 1664, 1600, 1462, 1408, 1354, 1269, 1236, 1139, 1095.

MS (ESI), *m/z* (%): 301.2 (100) [M+H]⁺.

III. Evaluation de l'activité des composés sur les kinases

Protocole expérimental

L'évaluation de l'activité des molécules synthétisées et des extraits de plantes est réalisée à la station biologique de Roscoff (France). L'activité kinasique est déterminée dans les solutions tampons appropriées en présence du substrat (protéines ou peptides). La réaction se déroule en présence de 15 μM d'ATP marqué ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) dans un volume final de 30 μL ²⁴³²³⁶. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard après addition de liquide scintillant ACS (Amersham). Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité maximale, c'est-à-dire en absence d'inhibiteur. Le contrôle négatif est effectué avec des dilutions appropriées d'une solution de diméthylsulfoxyde. Les différents substrats utilisés sont fournis par Proteogenix (Oberhausbergen, France). Les tests, réalisés en triplicate, mesure le taux de phosphorylation des protéines substrats associées aux différentes kinases.

Les solutions tampons

Différentes solutions tampons de composition variées sont utilisées :

- **Tampon A** : Il est composé de 10 mM de MgCl_2 ; 1 mM d'EGTA (Ethylene glycol-bis(2- aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) ; 1 mM de DTT (1,4-dithiothreitol), 25 mM du Tris-HCl pH 7,5 et 50 $\mu\text{g/mL}$ d'héparine.

- **Tampon B** : Il est composé de 60 mM de β -glycérophosphate, 30 mM de p-nitrophénylphosphate, 25 mM MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique) à pH 7 ; 5 mM EGTA ; 15 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT et 0,1 mM d'orthovanadate de sodium.

- **Tampon D** : Il est composé de 25 mM MOPS à pH 7,2 ; 12,5 mM β -glycérophosphate, 25 mM MgCl_2 ; 5 mM EGTA ; 2 mM EDTA (éthylène diamine tétraacétique) et 0,25 mM de DTT.

- **Tampon H** : Il est composé de MOPS 25 mM pH 7,5 et 10 mM MgCl_2 .

- **Tampon K** : Il est composé de Tris (2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) 50 mM pH 7,5 ; 20 mM MgCl_2 et 2 mM MnCl_2 .

- **Tampon R** : Il contient 5 mM MOPS pH 7,2 ; 2,5 mM β -glycérophosphate, 4 mM MgCl_2 ; 2,5 mM MnCl_2 ; 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA ; 50 $\mu\text{g/mL}$ BSA (Bovine Serum Albumine) et 0,05 mM DTT.

Les kinases

Les évaluations biologiques ont été faites les kinases suivantes.

HsCDK2/Cycline A (cyclin-dependent kinase-2)

D'origine humaine, cette kinase est fournie par le Dr. A. Echallier-Glazer (Leicester, UK). Elle est testée dans le tampon A avec 0,15 mg/mL de BSA, 0,23 mg/mL de DTT et comme substrat 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de l'histone H1. Après 10 min à 30 °C, 25 μL du surnageant sont transférés sur du papier Whatman P81 (en phosphocellulose) de dimension 2,5 x 3 cm. Après

Experimental section

20 secondes, les papiers filtres sont lavés cinq fois (au moins 5 min chaque fois) dans une solution d'acide phosphorique à 1% et la radioactivité mesurée.

HsCDK5/p25

C'est une protéine kinase recombinante d'origine humaine exprimée par *Escherichia coli*. Le test est effectué dans le tampon B avec comme substrat 0,8 µg/µL de l'histone H1. Après 30 min d'incubation à 30 °C, 25 µL du surnageant sont transférés sur du papier Whatman P81 (en phosphocellulose) de dimension 2,5 x 3 cm. Après 20 secondes, les papiers filtres sont lavés cinq fois (au moins 5 min chaque fois) avec une solution d'acide phosphorique 1% suivi de la mesure de la radioactivité.

HsCDK9/CyclineT

Il s'agit d'une protéine kinase recombinante d'origine humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9. Le test est réalisé dans le tampon A avec 0,15 mg/mL de BSA, 0,23 mg/mL de DTT et 0,27 µg/µL du peptide (YSPTSPSYPTSPSYPTSPSKKKK) comme substrat. Après 30 min à 30 °C, 25 µL du surnageant est transféré sur du papier Whatman P81 (en phosphocellulose) de dimension 2,5 x 3 cm. Après 20 secondes, les papiers filtres sont lavés cinq fois (au moins 5 min chaque fois) avec une solution d'acide phosphorique à 1% suivi de la mesure de la radioactivité.

HsPIM1

Elle est obtenue à partir d'un proto-oncogène humain recombinant exprimé dans une bactérie et testée dans le tampon B avec 0,8 µg/µL de l'histone H1 (Sigma#H5505) comme substrat. Après 30 min d'incubation à 30 °C, la réaction est arrêtée et le milieu est transféré sur un filtre P81 en phosphocellulose grâce au collecteur de cellules (Filtermate Harvester). Après lavage du filtre avec une solution d'acide polyphosphorique 1%, la radioactivité est mesurée.

HsHaspine

D'origine humaine et constituée par les acides aminés (470 à 798) du domaine kinasique, elle est exprimée par *Escherichia coli*. Le test est effectué dans le tampon H avec comme substrat 0,007 µg/µL de la chaîne peptidique (ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA) de l'histone H3 (acides aminés 1 à 21). Après 30 min d'incubation à 30 °C, la réaction est arrêtée et le milieu est collecté sur un filtre P81 en phosphocellulose (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) grâce au collecteur de cellules (Filtermate Harvester, Packard, Meriden, CT, USA). Après lavage du filtre avec une solution d'acide polyphosphorique 1%, la radioactivité est mesurée.

MmCLK1

La kinase est obtenue à partir de *Mus musculus*. Le test est effectué dans le tampon A additionné de 0,15 mg/mL de BSA, 0,23 mg/mL de DTT et 0,027 µg/µL du peptide GRSRSRSRSRSR. Après 30 min d'incubation à 30 °C, le milieu est transféré sur un filtre P81 en phosphocellulose (GE Healthcare) grâce au collecteur de cellules (Filtermate Harvester, Packard). Le filtre est lavé avec une solution d'acide polyphosphorique 1% et la radioactivité mesurée.

RnDYRK1A

Il s'agit d'une protéine recombinante obtenue à partir de *Rattus norvegicus* et constitué des acides aminés 1 à 499 (incluant le domaine kinasique). Le vecteur ADN est fourni par le Dr W. Becker (Aachen, Allemagne). Le test est réalisé dans le tampon A additionné de 0,5

Experimental section

mg/mL de BSA, 0,23 mg/mL de DTT et 0,033 µg/µL du peptide KKISGRLSPIMTEQ comme substrat. Après 30 min d'incubation à 30 °C, le surnageant est récupéré sur du papier filtre 3MM qui est lavé avec une solution d'acide trifluoroacétique avant la mesure de l'activité.

SscGSK-3α/β (glycogen synthase kinase-3)

Il s'agit d'une protéine d'origine porcine et purifiée. Le test est effectué dans le tampon A avec 0,15 mg/mL de BSA, 0,23 mg/mL de DTT et 0,010 µg/µL du peptide GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE) qui est un substrat sélectif de GSK-3. Après 30 min d'incubation à 30 °C, le surnageant est transféré sur du papier filtre 3MM qui est lavé avec une solution d'acide trifluoroacétique avant la mesure de l'activité.

SscCK1δ/ε (casein kinase 1δ/ε)

Elle est d'origine porcine et purifiée. Le test est effectué dans le tampon B avec 0,022 µg/µL du peptide (RRKHAAIGSpAYSITA) (substrat spécifique de CK1). Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, le surnageant est récupéré sur du papier filtre 3MM qui est lavé avec une solution d'acide trifluoroacétique puis l'activité est mesurée.

HsAurora B

C'est une protéine kinase recombinante d'origine humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9 (SignalChem). Le test est effectué dans le milieu D avec 0,2 µg/µL de MBP comme substrat. Après 30 min d'incubation à 30 °C, 25 µL du surnageant sont transférés est transféré sur un filtre P81 en phosphocellulose. Le papier filtre est lavé cinq fois avec une solution d'acide polyphosphorique 1% suivi de la mesure de la radioactivité.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Suh, S.-O.; Blackwell, M.; Kurtzman, C. P.; Lachance, M.-A. Phylogenetics of Saccharomycetales, the Ascomycete Yeasts. *Mycologia* **2006**, 98 (6), 1006–1017.
- (2) Butler, G.; Rasmussen, M. D.; Lin, M. F.; Santos, M. A. S.; Sakthikumar, S.; Munro, C. A.; Rheinbay, E.; Grabherr, M.; Forche, A.; Reedy, J. L.; et al. Evolution of Pathogenicity and Sexual Reproduction in Eight *Candida* Genomes. *Nature* **2009**, 459 (7247), 657–662.
<https://doi.org/10.1038/nature08064>.
- (3) Diezmann, S.; Cox, C. J.; Schöniar, G.; Vilgalys, R. J.; Mitchell, T. G. Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: A Multigenic Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, 42 (12), 5624–5635. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004>.
- (4) Fitzpatrick, D. A.; Logue, M. E.; Stajich, J. E.; Butler, G. A Fungal Phylogeny Based on 42 Complete Genomes Derived from Supertree and Combined Gene Analysis. *BMC Evol. Biol.* **2006**, 6 (1), 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-99>.
- (5) McManus, B. A.; Coleman, D. C. Molecular Epidemiology, Phylogeny and Evolution of *Candida albicans*. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, 21, 166–178.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.008>.
- (6) *Candida* - Classifications <http://eol.org/pages/32103/names>.
- (7) Min, J.-H.; Kang, M.-G.; Ryu, J.-J.; Lee, H.-B.; Kim, C.-M.; Kim, H.-K.; Lee, J.-S. Two New Species of *Cryptococcus* Sp. and *Candida* Sp. from Wild Flowers in Korea. *Mycobiology* **2012**, 40 (4), 255. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.4.255>.
- (8) Spampinato, C.; Leonardi, D. Molecular Fingerprints to Identify *Candida* Species. *Bio.Med. Research International* **2013**, 923742, 10 pages.
<https://doi.org/10.1155/2013/923742>.
- (9) Yapar, N. Epidemiology and Risk Factors for Invasive Candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2014**, 10, 95–105. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>.
- (10) Pappas, P. G.; Lionakis, M. S.; Arendrup, M. C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Kullberg, B. J. Invasive Candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2018**, 4, 18026.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>.
- (11) 2010-Bioforma-44-Levures, Levuroses.pdf.
- (12) Cavalheiro, M.; Teixeira, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front. Med.* **2018**, 5, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>.
- (13) Papon, N.; Courdavault, V.; Clastre, M.; Bennett, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog.* **2013**, 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550>.

Bibliographie

- (14) Ascioglu, S.; Rex, J. H.; de Pauw, B.; Bennett, J. E.; Bille, J.; Crokaert, F.; Denning, D. W.; Donnelly, J. P.; Edwards, J. E.; Erjavec, Z.; et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2002**, 34 (1), 7–14. <https://doi.org/10.1086/323335>.
- (15) Delaloye, J.; Calandra, T. Invasive Candidiasis as a Cause of Sepsis in the Critically Ill Patient. *Virulence* **2014**, 5 (1), 161–169. <https://doi.org/10.4161/viru.26187>.
- (16) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, 20 (1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>.
- (17) Cleveland, A. A.; Harrison, L. H.; Farley, M. M.; Hollick, R.; Stein, B.; Chiller, T. M.; Lockhart, S. R.; Park, B. J. Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of *Candida* Resistance in Two US Metropolitan Areas, 2008–2013: Results from Population-Based Surveillance. *PLOS ONE* **2015**, 10 (3), e0120452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120452>.
- (18) Méan, M.; Marchetti, O.; Calandra, T. Bench-to-Bedside Review: *Candida* Infections in the Intensive Care Unit. *Crit. Care* **2008**, 12 (1), 204. <https://doi.org/10.1186/cc6212>.
- (19) Dadar, M.; Tiwari, R.; Karthik, K.; Chakraborty, S.; Shahali, Y.; Dhama, K. *Candida albicans* - Biology, Molecular Characterization, Pathogenicity, and Advances in Diagnosis and Control – An Update. *Microb. Pathog.* **2018**, 117, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>.
- (20) Sadeghi, G.; Ebrahimi-Rad, M.; Mousavi, S. F.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Razzaghi-Abyaneh, M. Emergence of Non-*Candida albicans* Species: Epidemiology, Phylogeny and Fluconazole Susceptibility Profile. *J. Mycol. Medicae* **2018**, 28 (1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.008>.
- (21) Scorzoni, L.; de Paula e Silva, A. C. A.; Marcos, C. M.; Assato, P. A.; de Melo, W. C. M. A.; de Oliveira, H. C.; Costa-Orlandi, C. B.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Fusco-Almeida, A. M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front. Microbiol.* **2017**, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00036>.
- (22) K Mazu, T.; A Bricker, B.; Flores-Rozas, H.; Y Ablordeppey, S. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini Rev. Med. Chem.* **2016**, 16 (7), 555–578.
- (23) McCarthy, M. W.; Kontoyiannis, D. P.; Cornely, O. A.; Perfect, J. R.; Walsh, T. J. Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. *J. Infect. Dis.* **2017**, 216 (suppl_3), S474–S483. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix130>.
- (24) Maubon, D.; Garnaud, C.; Calandra, T.; Sanglard, D.; Cornet, M. Resistance of *Candida* Spp. to Antifungal Drugs in the ICU: Where Are We Now? *Intensive Care Med.* **2014**, 40 (9), 1241–1255. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>.
- (25) Surarit, R.; Shepherd, M. G. The Effects of Azole and Polyene Antifungals on the Plasma Membrane Enzymes of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **1987**, 25 (6), 403–413.

Bibliographie

- (26) McManus, D. S. Chapter 27 - Antifungal Drugs. In *Side Effects of Drugs Annual*; Ray, S. D., Ed.; A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions; Elsevier, **2015**, Vol. 37, pp 307–319. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2015.07.007>.
- (27) Morris, M. I.; Villmann, M. Echinocandins in the Management of Invasive Fungal Infections, Part 2. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* **2006**, 63 (19), 1813–1820. <https://doi.org/10.2146/ajhp050464.p2>.
- (28) Larru, B.; Zaoutis, T. E. Newer Antifungal Agents: *Curr. Opin. Pediatr.* **2013**, 25 (1), 110–115. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32835c1fc2>.
- (29) Vandeputte, P.; Ferrari, S.; Coste, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/713687>.
- (30) Trejo, W. H.; Bennett, R. E. *Streptomyces Nodosus* Sp. N., the Amphotericin-Producing Organism. *J. Bacteriol.* **1963**, 85 (2), 436–439.
- (31) Brautaset, T.; Sekurova, O. N.; Sletta, H.; Ellingsen, T. E.; Strøm, A. R.; Valla, S.; Zotchev, S. B. Biosynthesis of the Polyene Antifungal Antibiotic Nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the Gene Cluster and Deduction of the Biosynthetic Pathway. *Chem. Biol.* **2000**, 7 (6), 395–403.
- (32) Atta, H. M.; El-Sayed, A. S.; El-Desoukey, M. A.; Hassan, M.; El-Gazar, M. Biochemical Studies on the Natamycin Antibiotic Produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, Extraction and Biological Activities. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, 19 (4), 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.001>.
- (33) Brautaset, T.; Sletta, H.; Degnes, K. F.; Sekurova, O. N.; Bakke, I.; Volokhan, O.; Andreassen, T.; Ellingsen, T. E.; Zotchev, S. B. New Nystatin-Related Antifungal Polyene Macrolides with Altered Polyol Region Generated via Biosynthetic Engineering of *Streptomyces noursei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77 (18), 6636–6643. <https://doi.org/10.1128/AEM.05780-11>.
- (34) Kamiński, D. M. Recent Progress in the Study of the Interactions of Amphotericin B with Cholesterol and Ergosterol in Lipid Environments. *Eur. Biophys. J.* **2014**, 43 (10–11), 453–467. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0983-8>.
- (35) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; et al. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10 (5), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1496>.
- (36) Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12 (4), 501–517.
- (37) Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68 (2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.

Bibliographie

- (38) Barrett, J. P.; Vardulaki, K. A.; Conlon, C.; Cooke, J.; Daza-Ramirez, P.; Evans, E. G. V.; Hawkey, P. M.; Herbrecht, R.; Marks, D. I.; Moraleda, J. M.; et al.. A Systematic Review of the Antifungal Effectiveness and Tolerability of Amphotericin B Formulations. *Clin. Ther.* **2003**, 25 (5), 1295–1320. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80125-X](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80125-X).
- (39) Duschinsky, R.; Pleven, E.; Heidelberger, C. THE SYNTHESIS OF 5-FLUOROPYRIMIDINES. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79 (16), 4559–4560. <https://doi.org/10.1021/ja01573a087>.
- (40) Grunberg, E.; Titsworth, E.; Bennett, M. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Chemother. Act. 5-Fluorocytosine* **1964**, 566–568.
- (41) Harder, E. J.; Hermans, P. E. Treatment of Fungal Infections With Flucytosine. *Arch. Intern. Med.* **1975**, 135 (2), 231–237. <https://doi.org/10.1001/archinte.1975.00330020035003>.
- (42) Vermes, A.; Guchelaar, H.-J.; Dankert, J. Flucytosine: A Review of Its Pharmacology, Clinical Indications, Pharmacokinetics, Toxicity and Drug Interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46 (2), 171–179. <https://doi.org/10.1093/jac/46.2.171>.
- (43) Mori, R.; Futamura, M.; Tanahashi, T.; Tanaka, Y.; Matsushashi, N.; Yamaguchi, K.; Yoshida, K. 5FU Resistance Caused by Reduced Fluoro-Deoxyuridine Monophosphate and Its Reversal Using Deoxyuridine. *Oncol. Lett.* **2017**, 14 (3), 3162–3168. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6512>.
- (44) Denning, D. W.; Hope, W. W. Therapy for Fungal Diseases: Opportunities and Priorities. *Trends Microbiol.* **2010**, 18 (5), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.004>.
- (45) White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, 11 (2), 382–402.
- (46) Odds, F. C. In *Candida albicans*, Resistance to Flucytosine and Terbinafine Is Linked to MAT Locus Homozygosity and Multilocus Sequence Typing Clade 1. *FEMS Yeast Res.* **2009**, 9 (7), 1091–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00577.x>.
- (47) Folk, A.; Balta, C.; Herman, H.; Ivan, A.; Boldura, O. M.; Paiusan, L.; Ardelean, A.; Hermenean, A. Flucytosine and Amphotericin B Coadministration Induces Dose-Related Renal Injury. *Dose-Response* **2017**, 15 (2), 155932581770346. <https://doi.org/10.1177/1559325817703461>.
- (48) Ernst, E. J.; Yodoi, K.; Roling, E. E.; Klepser, M. E. Rates and Extents of Antifungal Activities of Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole, and Voriconazole against *Candida lusitanae* Determined by Microdilution, Etest, and Time-Kill Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46 (2), 578–581. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.578-581.2002>.
- (49) Inselmann, G.; Inselmann, U.; Heidemann, H. T. Amphotericin B and Liver Function. *Eur. J. Intern. Med.* **2002**, 13 (5), 288–292.
- (50) Woolley, D. W. Some Biological Effects Produced by Benzimidazole and Their Reversal by Purines. *J. Biol. Chem.* **1944**, 152, 225–232.

Bibliographie

- (51) Fromtling, R. A. Overview of Medically Important Antifungal Azole Derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, 1 (2), 187–217.
- (52) Heeres, J.; Backx, L. J. J.; Mostmans, J. H.; Van Cutsem, J. Antimycotic Imidazoles. Part 4. Synthesis and Antifungal Activity of Ketoconazole, a New Potent Orally Active Broad-Spectrum Antifungal Agent. *J. Med. Chem.* **1979**, 22 (8), 1003–1005.
<https://doi.org/10.1021/jm00194a023>.
- (53) Brammer, K. W.; Farrow, P. R.; Faulkner, J. K. Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Fluconazole in Humans. *Rev. Infect. Dis.* **1990**, 12 Suppl 3, S318–326.
- (54) Smith, D.; van de Velde, V.; Woestenborghs, R.; Gazzard, B. G. The Pharmacokinetics of Oral Itraconazole in AIDS Patients. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44 (7), 618–619.
- (55) Lewis, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, 86 (8), 805–817. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0247>.
- (56) Miceli, M. H.; Kauffman, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2015**, 61 (10), 1558–1565.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ571>.
- (57) Martel, C. M.; Parker, J. E.; Bader, O.; Weig, M.; Gross, U.; Warrilow, A. G. S.; Rolley, N.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Identification and Characterization of Four Azole-Resistant erg3 Mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (11), 4527–4533. <https://doi.org/10.1128/AAC.00348-10>.
- (58) https://www.unitheque.com/Livre/tec_et_doc_-_em_inter_-_lavoisier/Monographies_de_microbiologie/Candida_pathogenes-6201.html.
- (59) Yang, H.; Tong, J.; Lee, C. W.; Ha, S.; Eom, S. H.; Im, Y. J. Structural Mechanism of Ergosterol Regulation by Fungal Sterol Transcription Factor Upc2. *Nat. Commun.* **2015**, 6 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms7129>.
- (60) Sanglard, D. Resistance and Tolerance Mechanisms to Antifungal Drugs in Fungal Pathogens. *Mycologist* **2003**, 17 (2), 74–78. <https://doi.org/10.1017/S0269915X03002076>.
- (61) Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E. Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Its Relevance as an Antifungal Target and Role in Antifungal Drug Resistance. *Front. Microbiol.* **2013**, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00439>.
- (62) Lamb, D. C.; Warrilow, A. G. S.; Rolley, N. J.; Parker, J. E.; Nes, W. D.; Smith, S. N.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba Castellani* and *Acanthamoeba Polyphaga* through Inhibition of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (8), 4707–4713.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00476-15>.
- (63) Cowen, L. E.; Steinbach, W. J. Stress, Drugs, and Evolution: The Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryot. Cell* **2008**, 7 (5), 747–764.
<https://doi.org/10.1128/EC.00041-08>.

Bibliographie

- (64) Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, 75 (2), 213–267. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00045-10>.
- (65) Dupont, S.; Lemetais, G.; Ferreira, T.; Cayot, P.; Gervais, P.; Beney, L. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND? *Evolution* **2012**, 66 (9), 2961–2968. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x>.
- (66) Kontoyiannis, D. P. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and A Global Challenge. *J. Infect. Dis.* **2017**, 216 (suppl_3), S431–S435. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix179>.
- (67) Whaley, S. G.; Berkow, E. L.; Rybak, J. M.; Nishimoto, A. T.; Barker, K. S.; Rogers, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Front. Microbiol.* **2017**, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>.
- (68) Kamai, Y.; Maebashi, K.; Kudoh, M.; Makimura, K.; Naka, W.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. Characterization of Mechanisms of Fluconazole Resistance in a *Candida albicans* Isolate from a Japanese Patient with Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *Microbiol. Immunol.* **2004**, 48 (12), 937–943.
- (69) Warrilow, A. G.; Parker, J. E.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Azole Affinity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57 (3), 1352–1360. <https://doi.org/10.1128/AAC.02067-12>.
- (70) Mukherjee, P. K.; Chandra, J.; Kuhn, D. M.; Ghannoum, M. A. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *Infect. Immun.* **2003**, 71 (8), 4333–4340. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003>.
- (71) Park, S.; Perlin, D. S. Establishing Surrogate Markers for Fluconazole Resistance in *Candida albicans*. *Microb. Drug Resist.* **2005**, 11 (3), 232–238.
- (72) Tsao, S.; Rahkhoodaee, F.; Raymond, M. Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53 (4), 1344–1352. <https://doi.org/10.1128/AAC.00926-08>.
- (73) Girmenia, C. New Generation Azole Antifungals in Clinical Investigation. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, 18 (9), 1279–1295. <https://doi.org/10.1517/13543780903176407>.
- (74) Mast, N.; Zheng, W.; Stout, C. D.; Pikuleva, I. A. Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1. *Mol. Pharmacol.* **2013**, 84 (1), 86–94. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085902>.
- (75) Boogaerts, M. A.; Maertens, J.; Geest, R. V. D.; Bosly, A.; Michaux, J.-L.; Hoof, A. V.; Cleeren, M.; Wostenborghs, R.; Beule, K. D. Pharmacokinetics and Safety of a 7-Day Administration of Intravenous Itraconazole Followed by a 14-Day Administration of Itraconazole Oral Solution in Patients with Hematologic Malignancy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45 (3), 981–985. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.981-985.2001>.

Bibliographie

- (76) Sabo, J. A.; Abdel-Rahman, S. M. Voriconazole: A New Triazole Antifungal. *Ann. Pharmacother.* **2000**, 34 (9), 1032–1043. <https://doi.org/10.1345/aph.19237>.
- (77) Kanafani, Z. A.; Perfect, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46 (1), 120–128. <https://doi.org/10.1086/524071>.
- (78) Pound, M. W.; Townsend, M. L.; Dimondi, V.; Wilson, D.; Drew, R. H. Overview of Treatment Options for Invasive Fungal Infections. *Med. Mycol.* **2011**, 49 (6), 561–580. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.560197>.
- (79) Pfaller, M. A.; Boyken, L.; Hollis, R. J.; Kroeger, J.; Messer, S. A.; Tendolkar, S.; Diekema, D. J. In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* Spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, 46 (1), 150–156. <https://doi.org/10.1128/JCM.01901-07>.
- (80) Emri, T.; Majoros, L.; Tóth, V.; Pócsi, I. Echinocandins: Production and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97 (8), 3267–3284. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4761-9>.
- (81) Walsh, T. J.; Azie, N.; Andes, D. R. Development of New Strategies for Echinocandins: Progress in Translational Research. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, 61 (suppl_6), S601–S603. <https://doi.org/10.1093/cid/civ676>.
- (82) Perlin, D. S. Echinocandin Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management. *Drugs* **2014**, 74 (14), 1573–1585. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0286-5>.
- (83) Hector, R. F. Compounds Active against Cell Walls of Medically Important Fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **1993**, 6 (1), 1–21.
- (84) Maertens, J.; Theunissen, K.; Boogaerts, M. Invasive Aspergillosis: Focus on New Approaches and New Therapeutic Agents. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents*. **2002**, 1 (1), 65–81. <https://doi.org/info:doi/10.2174/1568012023355036>.
- (85) Singh-Babak, S. D.; Babak, T.; Diezmann, S.; Hill, J. A.; Xie, J. L.; Chen, Y.-L.; Poutanen, S. M.; Rennie, R. P.; Heitman, J.; Cowen, L. E. Global Analysis of the Evolution and Mechanism of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* **2012**, 8 (5), e1002718. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002718>.
- (86) Wagener, J.; Loiko, V. Recent Insights into the Paradoxical Effect of Echinocandins. *J. Fungi* **2017**, 4 (1), 5. <https://doi.org/10.3390/jof4010005>.
- (87) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Andes, D.; Arendrup, M. C.; Brown, S. D.; Lockhart, S. R.; Motyl, M.; Perlin, D. S. Clinical Breakpoints for the Echinocandins and *Candida* Revisited: Integration of Molecular, Clinical, and Microbiological Data to Arrive at Species-Specific Interpretive Criteria. *Drug Resist. Updat.* **2011**, 14 (3), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.004>.

Bibliographie

- (88) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Rex, J. H.; Alexander, B. D.; Andes, D.; Brown, S. D.; Chaturvedi, V.; Ghannoum, M. A.; Knapp, C. C.; et al. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, 46 (8), 2620–2629. <https://doi.org/10.1128/JCM.00566-08>.
- (89) Patil, A.; Majumdar, S. Echinocandins in Antifungal Pharmacotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, 69 (12), 1635–1660. <https://doi.org/10.1111/jphp.12780>.
- (90) Ingham, C. J.; Schneeberger, P. M. Microcolony Imaging of *Aspergillus Fumigatus* Treated with Echinocandins Reveals Both Fungistatic and Fungicidal Activities. *PLOS ONE* **2012**, 7 (4), e35478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035478>.
- (91) Perfect, J. R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, 16 (9), 603–616. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>.
- (92) Warrilow, A. G. S.; Parker, J. E.; Price, C. L.; Nes, W. D.; Garvey, E. P.; Hoekstra, W. J.; Schotzinger, R. J.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. The Investigational Drug VT-1129 Is a Highly Potent Inhibitor of *Cryptococcus* Species CYP51 but Only Weakly Inhibits the Human Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60 (8), 4530–4538. <https://doi.org/10.1128/AAC.00349-16>.
- (93) Warrilow, A. G. S.; Hull, C. M.; Parker, J. E.; Garvey, E. P.; Hoekstra, W. J.; Moore, W. R.; Schotzinger, R. J.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. The Clinical Candidate VT-1161 Is a Highly Potent Inhibitor of *Candida albicans* CYP51 but Fails To Bind the Human Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58 (12), 7121–7127. <https://doi.org/10.1128/AAC.03707-14>.
- (94) Hargrove, T. Y.; Garvey, E. P.; Hoekstra, W. J.; Yates, C. M.; Wawrzak, Z.; Rachakonda, G.; Villalta, F.; Lepesheva, G. I. Crystal Structure of the New Investigational Drug Candidate VT-1598 in Complex with *Aspergillus Fumigatus* Sterol 14 α -Demethylase Provides Insights into Its Broad-Spectrum Antifungal Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (7), e00570-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00570-17>.
- (95) Sandison, T.; Ong, V.; Lee, J.; Thye, D. Safety and Pharmacokinetics of CD101 IV, a Novel Echinocandin, in Healthy Adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01627-16>.
- (96) Wiederhold, N. P. Antifungal Resistance: Current Trends and Future Strategies to Combat. *Infect. Drug Resist.* **2017**, 10, 249–259. <https://doi.org/10.2147/IDR.S124918>.
- (97) Zhao, Y.; Perez, W. B.; Jiménez-Ortigosa, C.; Hough, G.; Locke, J. B.; Ong, V.; Bartizal, K.; Perlin, D. S. CD101: A Novel Long-Acting Echinocandin: CD101: A Novel Long-Acting Echinocandin. *Cell. Microbiol.* **2016**, 18 (9), 1308–1316. <https://doi.org/10.1111/cmi.12640>.

Bibliographie

- (98) Larkin, E.; Hager, C.; Chandra, J.; Mukherjee, P. K.; Retuerto, M.; Salem, I.; Long, L.; Isham, N.; Kovanda, L.; Borroto-Esoda, K. The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (5), e02396–16.
- (99) Berkow, E. L.; Angulo, D.; Lockhart, S. R. In Vitro Activity of a Novel Glucan Synthase Inhibitor, SCY-078, against Clinical Isolates of *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00435-17>.
- (100) Oliver, J. D.; Sibley, G. E. M.; Beckmann, N.; Dobb, K. S.; Slater, M. J.; McEntee, L.; du Pré, S.; Livermore, J.; Bromley, M. J.; Wiederhold, N. P.; et al. F901318 Represents a Novel Class of Antifungal Drug That Inhibits Dihydroorotate Dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608304113>.
- (101) Wiederhold, N. P.; Najvar, L. K.; Fothergill, A. W.; McCarthy, D. I.; Bocanegra, R.; Olivo, M.; Kirkpatrick, W. R.; Everson, M. P.; Duncanson, F. P.; Patterson, T. F. The Investigational Agent E1210 Is Effective in Treatment of Experimental Invasive Candidiasis Caused by Resistant *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59 (1), 690–692. <https://doi.org/10.1128/AAC.03944-14>.
- (102) Webb, B. L. J.; Hirst, S. J.; Giembycz, M. A. Protein Kinase C Isoenzymes: A Review of Their Structure, Regulation and Role in Regulating Airways Smooth Muscle Tone and Mitogenesis. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, 130 (7), 1433–1452. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703452>.
- (103) Kishimoto, A.; Takai, Y.; Mori, T.; Kikkawa, U.; Nishizuka, Y. Activation of Calcium and Phospholipid-Dependent Protein Kinase by Diacylglycerol, Its Possible Relation to Phosphatidylinositol Turnover. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255 (6), 2273–2276.
- (104) Ali, A. S.; Ali, S.; El-Rayes, B. F.; Philip, P. A.; Sarkar, F. H. Exploitation of Protein Kinase C: A Useful Target for Cancer Therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, 35 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.006>.
- (105) Schenk, P. W.; Snaar-Jagalska, B. E. Signal Perception and Transduction: The Role of Protein Kinases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1999**, 1449 (1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00178-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00178-5).
- (106) Kostich, M.; English, J.; Madison, V.; Gheyas, F.; Wang, L.; Qiu, P.; Greene, J.; Laz, T. M. Human Members of the Eukaryotic Protein Kinase Family. *Genome Biol.* **2002**, 3 (9), research0043.1-research0043.12.
- (107) Lipp, P.; Reither, G. Protein Kinase C: The “Masters” of Calcium and Lipid. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004556>.
- (108) Heinisch, J. J.; Rodicio, R. Protein Kinase C in Fungi more than Just Cell Wall Integrity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, 42 (1), fux051.
- (109) Levin, D. E. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69 (2), 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005>.

Bibliographie

- (110) Schmitz, H.-P.; Heinisch, J. J. Evolution, Biochemistry and Genetics of Protein Kinase C in Fungi. *Curr. Genet.* **2003**, 43 (4), 245–254. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0403-6>.
- (111) Nomura, W.; Ito, Y.; Inoue, Y. Role of Phosphatidylserine in the Activation of Rho1-Related Pkc1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Signal.* **2017**, 31, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.002>.
- (112) Heinisch, J. J. Baker's Yeast as a Tool for the Development of Antifungal Kinase Inhibitors targeting Protein Kinase C and the Cell Integrity Pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, 1754 (1–2), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.032>.
- (113) Fuchs, B. B.; Mylonakis, E. Our Paths Might Cross: The Role of the Fungal Cell Wall Integrity Pathway in Stress Response and Cross Talk with Other Stress Response Pathways. *Eukaryot. Cell* **2009**, 8 (11), 1616–1625. <https://doi.org/10.1128/EC.00193-09>.
- (114) Xie, J. L.; Grahl, N.; Sless, T.; Leach, M. D.; Kim, S. H.; Hogan, D. A.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Signaling through Lrg1, Rho1 and Pkc1 Governs *Candida albicans* Morphogenesis in Response to Diverse Cues. *PLOS Genet.* **2016**, 12 (10), e1006405. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006405>.
- (115) Kumamoto, C. A. A Contact-Activated Kinase Signals *Candida albicans* Invasive Growth and Biofilm Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102 (15), 5576–5581.
- (116) Monge, R. A. The MAP Kinase Signal Transduction Network in *Candida albicans*. *Microbiology* **2006**, 152 (4), 905–912. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28616-0>.
- (117) LaFayette, S. L.; Collins, C.; Zaas, A. K.; Schell, W. A.; Betancourt-Quiroz, M.; Gunatilaka, A. A. L.; Perfect, J. R.; Cowen, L. E. PKC Signaling Regulates Drug Resistance of the Fungal Pathogen *Candida albicans* via Circuitry Comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog.* **2010**, 6 (8), e1001069. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001069>.
- (118) Sugawara, F.; Strobel, S.; Strobel, G.; Larsen, R. D.; Berglund, D. L.; Gray, G.; Takahashi, N.; Coval, S. J.; Stout, T. J.; Clardy, J. The Structure and Biological Activity of Cercosporamide from *Cercosporidium henningsii*. *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (3), 909–910. <https://doi.org/10.1021/jo00003a002>.
- (119) Ingólfssdóttir, K. Usnic Acid. *Phytochemistry* **2002**, 61 (7), 729–736.
- (120) Conover, M. A.; Mierzwa, R.; King, A.; Loebenberg, D.; Bishop, W. R.; Puar, M.; Patel, M.; Coval, S. J.; Hershenhorn, J.; Strobel, G. A. Usnic Acid Amide, a Phytotoxin and Antifungal Agent from *Cercosporidium henningsii*. *Phytochemistry* **1992**, 31 (9), 2999–3001.
- (121) Sussman, A.; Huss, K.; Chio, L.-C.; Heidler, S.; Shaw, M.; Ma, D.; Zhu, G.; Campbell, R. M.; Park, T.-S.; Kulanthaivel, P.; et al. Discovery of Cercosporamide, a Known Antifungal Natural Product, as a Selective Pkc1 Kinase Inhibitor through High-Throughput Screening. *Eukaryot. Cell* **2004**, 3 (4), 932–943. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.932-943.2004>.

Bibliographie

- (122) Hoffman, A. M.; Mayer, S. G.; Strobel, G. A.; Hess, W. M.; Sovocool, G. W.; Grange, A. H.; Harper, J. K.; Arif, A. M.; Grant, D. M.; Kelley-Swift, E. G. Purification, Identification and Activity of Phomodione, a Furandione from an *Endophytic phoma* Species. *Phytochemistry* **2008**, 69 (4), 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.031>.
- (123) Konicek, B. W.; Stephens, J. R.; McNulty, A. M.; Robichaud, N.; Peery, R. B.; Dumstorf, C. A.; Dowless, M. S.; Iversen, P. W.; Parsons, S.; Ellis, K. E.; et al. Therapeutic Inhibition of MAP Kinase Interacting Kinase Blocks Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and Suppresses Outgrowth of Experimental Lung Metastases. *Cancer Res.* **2011**, 71 (5), 1849–1857. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3298>.
- (124) Hou, J.; Lam, F.; Proud, C.; Wang, S. Targeting Mnks for Cancer Therapy. *Oncotarget* **2012**, 3 (2), 118.
- (125) Lin, S.; Sin, W. L. W.; Koh, J.-J.; Lim, F.; Wang, L.; Cao, D.; Beuerman, R. W.; Ren, L.; Liu, S. Semisynthesis and Biological Evaluation of Xanthone Amphiphilics as Selective, Highly Potent Antifungal Agents to Combat Fungal Resistance. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (24), 10135–10150. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01348>.
- (126) Shan, T.; Ma, Q.; Guo, K.; Liu, J.; Li, W.; Wang, F.; Wu, E. Xanthonenes from Mangosteen Extracts as Natural Chemopreventive Agents: Potential Anticancer Drugs. *Curr. Mol. Med.* **2011**, 11 (8), 666–677.
- (127) Hoshi, N.; Langeberg, L. K.; Gould, C. M.; Newton, A. C.; Scott, J. D. Interaction with AKAP79 Modifies the Cellular Pharmacology of PKC. *Mol. Cell* **2010**, 37 (4), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.014>.
- (128) Bazin, M.-A.; Boderio, L.; Tomasoni, C.; Rousseau, B.; Roussakis, C.; Marchand, P. Synthesis and Antiproliferative Activity of Benzofuran-Based Analogs of Cercosporamide against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 69, 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.013>.
- (129) Nagahara, T.; Yokoyama, Y.; Inamura, K.; Katakura, S.; Komoriya, S.; Yamaguchi, H.; Hara, T.; Iwamoto, M. Dibasic (Amidinoaryl) Propanoic Acid Derivatives as Novel Blood Coagulation Factor Xa Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (8), 1200–1207.
- (130) Zeni, G.; Larock, R. C. Synthesis of Heterocycles via Palladium π -Olefin and π -Alkyne Chemistry. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (5), 2285–2310. <https://doi.org/10.1021/cr020085h>.
- (131) Chao, B.; Lin, S.; Ma, Q.; Lu, D.; Hu, Y. Copper(I)-Mediated Cascade Reactions: An Efficient Approach to the Synthesis of Functionalized Benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines. *Org. Lett.* **2012**, 14 (9), 2398–2401. <https://doi.org/10.1021/ol300822a>.
- (132) Oter, O.; Ertekin, K.; Kirilmis, C.; Koca, M.; Ahmedzade, M. Characterization of a Newly Synthesized Fluorescent Benzofuran Derivative and Usage as a Selective Fiber Optic Sensor for Fe(III). *Sens. Actuators B Chem.* **2007**, 122, 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.06.010>.

Bibliographie

- (133) Jung, M. E.; Perez, F. Synthesis of 2-Substituted 7-Hydroxybenzofuran-4-Carboxylates via Addition of Silyl Enol Ethers to *O*-Benzoquinone Esters. *Org. Lett.* **2009**, *11* (10), 2165–2167. <https://doi.org/10.1021/ol900416x>.
- (134) Rindhe, S. S.; Rode, M. A.; Karale, B. K. New Benzofuran Derivatives as an Antioxidant Agent. *Indian J. Pharm. Sci.* **2010**, *72* (2), 231–235. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.65022>.
- (135) Karunakar, P.; Girija, C. R.; Krishnamurthy, V.; Krishna, V.; Shivakumar, K. V. In Silico Antitubercular Activity Analysis of Benzofuran and Naphthofuran Derivatives. *Tuberc. Res. Treat.* **2014**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/697532>.
- (136) Sharma, V.; Chitranshi, N.; Agarwal, A. K. Significance and Biological Importance of Pyrimidine in the Microbial World. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/202784>.
- (137) Hwang, J. Y.; Kawasuji, T.; Lowes, D. J.; Clark, J. A.; Connelly, M. C.; Zhu, F.; Guiguemde, W. A.; Sigal, M. S.; Wilson, E. B.; DeRisi, J. L.; et al. Synthesis and Evaluation of 7-Substituted 4-Aminoquinoline Analogues for Antimalarial Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (20), 7084–7093. <https://doi.org/10.1021/jm200636z>.
- (138) Hafez, H. N.; El-Gazzar, A.-R. B. A.; Nawwar, G. A. M. Synthesis, Biological and Medicinal Significance of S-Glycosido-thieno[2,3-*d*]-Pyrimidines as New Anti-Inflammatory and Analgesic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (4), 1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.056>.
- (139) Scherbakov, A. M.; Komkov, A. V.; Komendantova, A. S.; Yastrebova, M. A.; Andreeva, O. E.; Shirinian, V. Z.; Hajra, A.; Zavarzin, I. V.; Volkova, Y. A. Steroidal Pyrimidines and Dihydrotriazines as Novel Classes of Anticancer Agents against Hormone-Dependent Breast Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00979>.
- (140) Dinakaran, V. S.; Bomma, B.; Srinivasan, K. K. Fused Pyrimidines: The Heterocycle of Diverse Biological and Pharmacological Significance. *Pharma Chem* **2012**, *4* (1), 255–265.
- (141) Jantova, S.; Stankovský, Š.; Špírková, K. *In vitro* Antibacterial Activity of Ten Series of Substituted Quinazolines. *Biologia (Bratisl.)* **2004**, *59* (6), 741–752.
- (142) Maghsoodlou, M. T.; Marandi, G.; Hazeri, N.; Habibi-Khorassani, S. M.; Mirzaei, A. A. Synthesis of 5-Aryl-1,3-Dimethyl-6-(Alkyl- or Aryl-Amino) Furo [2,3-*d*]pyrimidine Derivatives by Reaction between Isocyanides and Pyridinecarbaldehydes in the Presence of 1,3-Dimethylbarbituric Acid. *Mol. Divers.* **2011**, *15* (1), 227–231. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9257-2>.
- (143) Bonthagarala, B.; Ch.Pratyusha; G.Poornima; Rani, K. S.; A.Krishnaveni; B.Brahmaiah. AN OVERVIEW ON SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PYRIMIDINES. *Int. J. Pharm. Rev. Res.* **2013**, 86–90.
- (144) Al-Issa, S. A. Synthesis and Anticancer Activity of Some Fused Pyrimidines and Related Heterocycles. *Saudi Pharm. J. SPJ* **2013**, *21* (3), 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.09.002>.

Bibliographie

- (145) Kikuchi, H.; Yamamoto, K.; Horoiwa, S.; Hirai, S.; Kasahara, R.; Hariguchi, N.; Matsumoto, M.; Oshima, Y. Exploration of a New Type of Antimalarial Compounds Based on Febrifugine. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (15), 4698–4706. <https://doi.org/10.1021/jm0601809>.
- (146) Khodarahmi, G.; Asadi, P.; Hassanzadeh, F.; Khodarahmi, E. Benzofuran as a Promising Scaffold for the Synthesis of Antimicrobial and Antibreast Cancer Agents: A Review. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **2015**, 20 (11), 1094–1104. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.172835>.
- (147) Zanatta, N.; Schneider, J. M. F. M.; Schneider, P. H.; Wouters, A. D.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Wessjohann, L. A. Regiospecific Synthesis of 4-Alkoxy and 4-Amino Substituted 2-Trifluoromethyl Pyrroles. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (18), 6996–6998. <https://doi.org/10.1021/jo061058k>.
- (148) Welsh, J. W.; Mahadevan, D.; Ellsworth, R.; Cooke, L.; Bearss, D.; Stea, B. The c-Met Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor MP470 Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Radiat. Oncol.* **2009**, 4 (1), 69. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-69>.
- (149) Xia, M.; Huang, R.; Guo, V.; Southall, N.; Cho, M.-H.; Inglese, J.; Austin, C. P.; Nirenberg, M. Identification of Compounds That Potentiate CREB Signaling as Possible Enhancers of Long-Term Memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (7), 2412–2417.
- (150) Savall, B. M.; Gomez, L.; Chavez, F.; Curtis, M.; Meduna, S. P.; Kearney, A.; Dunford, P.; Cowden, J.; Thurmond, R. L.; Grice, C.; et al. Tricyclic Aminopyrimidine Histamine H4 Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (21), 6577–6581. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.014>.
- (151) Park, H.; Kim, Y.-J.; Hahn, J.-S. A Novel Class of Hsp90 Inhibitors Isolated by Structure-Based Virtual Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (22), 6345–6349. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.069>.
- (152) Matasi, J. J.; Caldwell, J. P.; Hao, J.; Neustadt, B.; Arik, L.; Foster, C. J.; Lachowicz, J.; Tulshian, D. B. The Discovery and Synthesis of Novel Adenosine Receptor (A2A) Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15 (5), 1333–1336. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.01.019>.
- (153) Agarwal, A.; Louise-May, S.; Thanassi, J. A.; Podos, S. D.; Cheng, J.; Thoma, C.; Liu, C.; Wiles, J. A.; Nelson, D. M.; Phadke, A. S.; et al. Small Molecule Inhibitors of *E. Coli* Primase, a Novel Bacterial Target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (10), 2807–2810. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.056>.
- (154) Ochs, R. S. Understanding Enzyme Inhibition. *J. Chem. Educ.* **2000**, 77 (11), 1453.
- (155) Kose, L. P.; Gülçin, İ.; Özdemir, H.; Atasever, A.; Alwasel, S. H.; Supuran, C. T. The Effects of Some Avermectins on Bovine Carbonic Anhydrase Enzyme. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31 (5), 773–778. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1064406>.
- (156) Zorn, J. A.; Wells, J. A. Turning Enzymes ON with Small Molecules. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6 (3), 179–188. <https://doi.org/10.1038/nchembio.318>.

Bibliographie

- (157) Strelow, J.; Dewe, W.; Iversen, P. W.; Brooks, H. B.; Radding, J. A.; McGee, J.; Weidner, J. Mechanism of Action Assays for Enzymes. **2012**.
- (158) Saboury, A. A. Enzyme Inhibition and Activation: A General Theory. *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, 6 (2), 219–229.
- (159) Ramsay, R.; Tipton, K. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, 22 (7), 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>.
- (160) Davis, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2016**, 20 (5), S2–S8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>.
- (161) Gass, P.; Riva, M. A. CREB, Neurogenesis and Depression. *BioEssays* **2007**, 29 (10), 957–961. <https://doi.org/10.1002/bies.20658>.
- (162) Vitolo, O. V.; Sant'Angelo, A.; Costanzo, V.; Battaglia, F.; Arancio, O.; Shelanski, M. Amyloid β -Peptide Inhibition of the PKA/CREB Pathway and Long-Term Potentiation: Reversibility by Drugs That Enhance cAMP Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (20), 13217–13221. <https://doi.org/10.1073/pnas.172504199>.
- (163) Thurmond, R. L. The Histamine H₄ Receptor: From Orphan to the Clinic. *Front. Pharmacol.* **2015**, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00065>.
- (164) Savall, B. M.; Chavez, F.; Tays, K.; Dunford, P. J.; Cowden, J. M.; Hack, M. D.; Wolin, R. L.; Thurmond, R. L.; Edwards, J. P. Discovery and SAR of 6-Alkyl-2,4-Diaminopyrimidines as Histamine H₄ Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (6), 2429–2439. <https://doi.org/10.1021/jm401727m>.
- (165) Park, C.-J.; Seo, Y.-S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol. J.* **2015**, 31 (4), 323–333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>.
- (166) Neckers, L. Heat Shock Protein 90: The Cancer Chaperone. *J. Biosci.* **2007**, 32 (3), 517–530.
- (167) Boczek, E. E.; Reefschräger, L. G.; Dehling, M.; Struller, T. J.; Häusler, E.; Seidl, A.; Kaila, V. R. I.; Buchner, J. Conformational Processing of Oncogenic v-Src Kinase by the Molecular Chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 112 (25), E3189–E3198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424342112>.
- (168) Mellatyar, H.; Talaei, S.; Pilehvar-Soltanahmadi, Y.; Barzegar, A.; Akbarzadeh, A.; Shahabi, A.; Barekati-Mowahed, M.; Zarghami, N. Targeted Cancer Therapy through 17-DMAG as an Hsp90 Inhibitor: Overview and Current State of the Art. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2018**, 102, 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.102>.
- (169) Aoyama, S.; Kase, H.; Borrelli, E. Rescue of Locomotor Impairment in Dopamine D₂ Receptor-Deficient Mice by an Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist. *J. Neurosci.* **2000**, 20 (15), 5848–5852.

Bibliographie

- (170) Kanda, T.; Jackson, M. J.; Smith, L. A.; Pearce, R. K. B.; Nakamura, J.; Kase, H.; Kuwana, Y.; Jenner, P. Combined Use of the Adenosine A2A Antagonist KW-6002 with L-DOPA or with Selective D1 or D2 Dopamine Agonists Increases Antiparkinsonian Activity but Not Dyskinesia in MPTP-Treated Monkeys. *Exp. Neurol.* **2000**, 162 (2), 321–327. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7350>.
- (171) Vallano, A.; Fernandez-Duenas, V.; Pedros, C.; Arnau, J. M.; Ciruela, F. An Update on Adenosine A2A Receptors as Drug Target in Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2011**, 10 (6), 659–669.
- (172) Rowen, L.; Kornberg, A. Primase, the dnaG Protein of *Escherichia Coli*. An Enzyme Which Starts DNA Chains. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253 (3), 758–764.
- (173) Zhu, L.; Jin, J.; Liu, C.; Zhang, C.; Sun, Y.; Guo, Y.; Fu, D.; Chen, X.; Xu, B. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Quinazoline-Derived Human Pin1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (9), 2797–2807. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.058>.
- (174) Chen, Y.; Feng, M.; Li, S.; Xu, J.; Ning, H.; He, Y.; Wang, X.; Ding, R.; Qi, C. Synthesis and Evaluation of Novel F-18 Labeled 4-Aminoquinazoline Derivatives: Potential PET Imaging Agents for Tumor Detection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (14), 4745–4749. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.069>.
- (175) Heravi, M. M.; Sadjadi, S.; Mokhtari Haj, N.; Oskooie, H. A.; Shoar, R. H.; Bamoharram, F. F. A Novel Multi-Component Synthesis of 4-Arylaminoquinazolines. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (8), 943–945. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.12.044>.
- (176) Loidreau, Y.; Marchand, P.; Dubouilh-Benard, C.; Nourrisson, M.-R.; Duflos, M.; Lozach, O.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Besson, T. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-arylbenzo[*b*]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-Amines and Their Pyrido and Pyrazino Analogues as Ser/Thr Kinase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.006>.
- (177) Liu, J.; Fitzgerald, A. E.; Mani, N. S. Facile Assembly of Fused Benzo[4,5]furo Heterocycles. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (7), 2951–2954. <https://doi.org/10.1021/jo8000595>.
- (178) Hayakawa, M.; Kaizawa, H.; Moritomo, H.; Koizumi, T.; Ohishi, T.; Yamano, M.; Okada, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S.; Raynaud, F. I.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-*d*]pyrimidine Derivatives as Novel PI3 Kinase p110 α Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17 (9), 2438–2442. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.032>.
- (179) Loidreau, Y.; Marchand, P.; Dubouilh-Benard, C.; Nourrisson, M.-R.; Duflos, M.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Besson, T. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Aryl-7-methoxybenzo[*b*]furo[3,2-*d*]pyrimidin-4-Amines and Their *N*-arylbenzo[*b*]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-Amine Analogues as Dual Inhibitors of CLK1 and DYRK1A Kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.11.030>.
- (180) Sato, T.; Oishi, T.; Torikai, K. 2-Naphthylmethoxymethyl as a Mildly Introdudible and Oxidatively Removable Benzyloxymethyl-Type Protecting Group. *Org. Lett.* **2015**, 17 (12), 3110–3113. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01408>.

Bibliographie

- (181) Hintz, H. A.; Sortedahl, N. J.; Meyer, S. M.; Decato, D. A.; Dahl, B. J. The Synthesis of Lactone-Bridged 1,3,5-Triphenylbenzene Derivatives as Pi-Expanded Coumarin Triskelions. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58 (50), 4703–4708. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.11.010>.
- (182) Sapkota, K.; Roh, E.; Lee, E.; Ha, E.-M.; Yang, J.-H.; Lee, E.-S.; Kwon, Y.; Kim, Y.; Na, Y. Synthesis and Anti-Melanogenic Activity of Hydroxyphenyl Benzyl Ether Analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19 (7), 2168–2175. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.02.044>.
- (183) Oramas-Royo, S.; Pantoja, K. D.; Amesty, Á.; Romero, C.; Lorenzo-Castrillejo, I.; Machín, F.; Estévez-Braun, A. Synthesis and Antibacterial Activity of New Symmetric Polyoxygenated Dibenzofurans. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 141, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.062>.
- (184) Liu, G.-B.; Xu, J.-L.; Geng, M.; Xu, R.; Hui, R.-R.; Zhao, J.-W.; Xu, Q.; Xu, H.-X.; Li, J.-X. Synthesis of a Novel Series of Diphenolic Chromone Derivatives as Inhibitors of NO Production in LPS-Activated RAW264.7 Macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (8), 2864–2871. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.020>.
- (185) Barhate, N. B.; Gajare, A. S.; Wakharkar, R. D.; Bedekar, A. V. Simple and Practical Halogenation of Arenes, Alkenes and Alkynes with Hydrohalic Acid/H₂O₂ (or TBHP). *Tetrahedron* **1999**, 55 (36), 11127–11142.
- (186) Tatsugi, J.; Zhiwei, T.; Tsuchiya, Y.; Takayoshi, I. Halogenation of 1-Alkyl-7-Azaisatins Using N-Halosuccinimides: Regioselective Synthesis of 1-Alkyl-5-Halo-7-Azaisatins. *Arkivoc* **2009**, 2, 132–137.
- (187) Sun, C.; Hunt, D. K.; Clark, R. B.; Lofland, D.; O'Brien, W. J.; Plamondon, L.; Xiao, X.-Y. Synthesis and Antibacterial Activity of Pentacyclines: A Novel Class of Tetracycline Analogs. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (11), 3704–3731. <https://doi.org/10.1021/jm1015395>.
- (188) Tadross, P. M.; Gilmore, C. D.; Bugga, P.; Virgil, S. C.; Stoltz, B. M. Regioselective Reactions of Highly Substituted Arynes. *Org. Lett.* **2010**, 12 (6), 1224–1227. <https://doi.org/10.1021/ol1000796>.
- (189) Jagodzinski, T. S.; Wesolowska, A.; Sosnicki, J. G. Reactions of Secondary Beta-Ketothioamides with Ethyl Bromoacetate and Ethyl 2-Bromopropionate. The Synthesis of N-Substituted 2-Acylmethylidene-1, 3-Thiazolidin-4-Ones. *Pol. J. Chem.* **2000**, 74 (8), 1101–1114.
- (190) Bretéché, A.; Marchand, P.; Nourrisson, M.-R.; Hautefaye, P.; De Nanteuil, G.; Duflos, M. A Convenient Route to Functionalized 3-Amino-N-methylfuro[3,2-*b*]pyridine-2-Carboxamides. *Tetrahedron* **2011**, 67 (26), 4767–4773.
- (191) Koelsch, C. F.; Whitney, A. G. THE ROSENMUND-von BRAUN NITRILE SYNTHESIS1. *J. Org. Chem.* **1941**, 6 (6), 795–803.
- (192) Littke, A.; Soumeillant, M.; Kaltenbach, R. F.; Cherney, R. J.; Tarby, C. M.; Kiau, S. Mild and General Methods for the Palladium-Catalyzed Cyanation of Aryl and Heteroaryl Chlorides. *Org. Lett.* **2007**, 9 (9), 1711–1714. <https://doi.org/10.1021/ol070372d>.

Bibliographie

- (193) Yang, C.; Williams, J. M. Palladium-Catalyzed Cyanation of Aryl Bromides Promoted by Low-Level Organotin Compounds. *Org. Lett.* **2004**, 6 (17), 2837–2840. <https://doi.org/10.1021/ol049621d>.
- (194) Schareina, T.; Zapf, A.; Beller, M. Improving Palladium-Catalyzed Cyanation of Aryl Halides: Development of a State-of-the-Art Methodology Using Potassium hexacyanoferrate(II) as Cyanating Agent. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689 (24), 4576–4583. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2004.08.020>.
- (195) Pereira, A. R.; Strangman, W. K.; Marion, F.; Feldberg, L.; Roll, D.; Mallon, R.; Hollander, I.; Andersen, R. J. Synthesis of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Inhibitory Analogues of the Sponge Meroterpenoid Liphagal. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (24), 8523–8533. <https://doi.org/10.1021/jm100531u>.
- (196) Sleebs, B. E.; Levit, A.; Street, I. P.; Falk, H.; Hammonds, T.; Wong, A. C.; Charles, M. D.; Olson, M. F.; Baell, J. B. Identification of 3-aminothieno[2,3-*b*]pyridine-2-Carboxamides and 4-aminobenzothieno[3,2-*d*]pyrimidines as LIMK1 Inhibitors. *Med.Chem.Comm.* **2011**, 2 (10), 977. <https://doi.org/10.1039/c1md00137j>.
- (197) Tsai, C.-J.; Chen, C.-C.; Tsai, C.-W.; Wu, M.-J. Base-Mediated Cyclization Reaction of 2-(5-Hydroxy-1-Pentynyl)benzonitriles to 4-Amino-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*]Furanes and Synthesis of Furanonaphthoquinones. *J. Org. Chem.* **2016**, 81 (9), 3882–3889. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02514>.
- (198) Patil, P.; Madhavachary, R.; Kurpiewska, K.; Kalinowska-Tłuścik, J.; Dömling, A. De Novo Assembly of Highly Substituted Morpholines and Piperazines. *Org. Lett.* **2017**, 19 (3), 642–645. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b03807>.
- (199) Sato, S.; Tetsuhashi, M.; Sekine, K.; Miyachi, H.; Naito, M.; Hashimoto, Y.; Aoyama, H. Degradation-Promoters of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 Based on Bestatin and Actinonin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (8), 4685–4698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.024>.
- (200) Abdelhamid, A. O. Convenient Synthesis of Some New pyrazolo[1,5-*a*]Pyrimidine, Pyridine, thieno[2,3-*b*]Pyridine, and isoxazolo[3,4-*d*]Pyridazine Derivatives Containing Benzofuran Moiety. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, 46 (4), 680–686. <https://doi.org/10.1002/jhet.141>.
- (201) Bollier, M.; Klupsch, F.; Six, P.; Dubuquoy, L.; Azaroual, N.; Millet, R.; Leleu-Chavain, N. One- or Two-Step Synthesis of C-8 and N-9 Substituted Purines. *J. Org. Chem.* **2018**, 83 (1), 422–430. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02269>.
- (202) Brown, S. D.; Du, H.; Franzini, M.; et al. PCT Int Appl. WO 2009086264; Chem. Abstr. **2009**, 151, 124032.
- (203) Jarowicki, K.; Kocienski, P. Protecting Groups. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2001**, No. 18, 2109–2135. <https://doi.org/10.1039/b103282h>.
- (204) Jarowicki, K.; Kociński, P. Protecting Groups. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1999**, No. 12, 1589–1616.

Bibliographie

- (205) Burgess, K.; Lim, D. Y. Asymmetric Syntheses of the Stereoisomers of Protected 2,3-Methanoglutamine. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (43), 7815–7818.
- (206) Bret    , A.; Marchand, P.; Nourrisson, M.-R.; De Nanteuil, G.; Duflos, M. A Convenient Route to Functionalized 3-Amino-6-bromofuro[3,2-*b*]pyridine-2-Carboxamides. *Tetrahedron* **2010**, 66 (25), 4490–4494. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.04.071>.
- (207) Barré, A.;       , M.-L.; Alix, F.; Gembus, V.; Papamica  l, C.; Levacher, V. Palladium-Catalyzed Carbonylation of (Hetero)Aryl, Alkenyl and Allyl Halides by Means of *N*-Hydroxysuccinimidyl Formate as CO Surrogate. *J. Org. Chem.* **2015**, 80 (13), 6537–6544. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01119>.
- (208) Grant, S. W.; Gallagher, T. F.; Bobko, M. A.; Duquenne, C.; Axten, J. M. Rapid Synthesis of Diversely Functionalized 3,4,7-Trisubstituted Indoles. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (26), 3376–3378. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.04.086>.
- (209) Schenkel, L. B.; Huang, X.; Cheng, A.; Deak, H. L.; Doherty, E.; Emkey, R.; Gu, Y.; Gunaydin, H.; Kim, J. L.; Lee, J.; et al. Discovery of Potent and Highly Selective Thienopyridine Janus Kinase 2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (24), 8440–8450. <https://doi.org/10.1021/jm200911r>.
- (210) Varma, R. S.; Naicker, K. P. The Urea Hydrogen Peroxide Complex: Solid-State Oxidative Protocols for Hydroxylated Aldehydes and Ketones (Dakin Reaction), Nitriles, Sulfides, and Nitrogen Heterocycles. *Org. Lett.* **1999**, 1 (2), 189–192. <https://doi.org/10.1021/ol990522n>.
- (211) HAUSER, C. R.; HOFFENBERG, D. S. Conversion of Nitriles to Amides and Acids by Means of Boron Fluoride. *J. Org. Chem.* **1955**, 20 (10), 1448–1453.
- (212) McClure, K. J.; Huang, L.; Arienti, K. L.; Axe, F. U.; Brunmark, A.; Blevitt, J.; Guy Breitenbucher, J. Novel Non-Benzimidazole chk2 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (7), 1924–1928. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.096>.
- (213) Li, D. Y.; Shi, K. J.; Mao, X. F.; Zhao, Z. L.; Wu, X. Y.; Liu, P. N. Selective Cyclization of Alkynols and Alkynylamines Catalyzed by Potassium *Tert*-Butoxide. *Tetrahedron* **2014**, 70 (39), 7022–7031. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.06.078>.
- (214) Jepsen, T. H.; Larsen, M.; J  rgensen, M.; Nielsen, M. B. Synthesis of Dibenzothiophene, Dibenzofuran and Carbazole Donor–Acceptor Chromophores. *Synthesis* **2013**, 45 (8), 1115–1120. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1318484>.
- (215) Morio, F.; Loge, C.; Besse, B.; Hennequin, C.; Le Pape, P. Screening for Amino Acid Substitutions in the *Candida albicans* Erg11 Protein of Azole-Susceptible and Azole-Resistant Clinical Isolates: New Substitutions and a Review of the Literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, 66 (4), 373–384.
- (216) Morio, F.; Pagniez, F.; Lacroix, C.; Miegerville, M.; Le Pape, P. Amino Acid Substitutions in the *Candida albicans* Sterol 5,6-Desaturase (Erg3p) Confer Azole Resistance: Characterization of Two Novel Mutants with Impaired Virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, 67 (9), 2131–2138. <https://doi.org/10.1093/jac/dks186>.

Bibliographie

- (217) Morio, F.; Jensen, R. H.; Le Pape, P.; Arendrup, M. C. Molecular Basis of Antifungal Drug Resistance in Yeasts. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, 50 (5), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.012>.
- (218) Meletiadis, J.; Curfs-Breuker, I.; Meis, J. F.; Mouton, J. W. *In vitro* Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates with the EUCAST Methodology, a New Method for ECOFF Determination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02372-16>.
- (219) Pagniez, F.; Pape, P. L. New fluorometric screening test for possible antifungal drugs. */data/revues/11565233/00110002/73/* **2008**.
- (220) Uzarski, J. S.; DiVito, M. D.; Wertheim, J. A.; Miller, W. M. Essential Design Considerations for the Resazurin Reduction Assay to Noninvasively Quantify Cell Expansion within Perfused Extracellular Matrix Scaffolds. *Biomaterials* **2017**, 129, 163–175.
- (221) Sopirala, M. M.; Mangino, J. E.; Gebreyes, W. A.; Biller, B.; Bannerman, T.; Balada-Llasat, J.-M.; Pancholi, P. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (11), 4678–4683. <https://doi.org/10.1128/AAC.00497-10>.
- (222) Hsieh, M. H.; Yu, C. M.; Yu, V. L.; Chow, J. W. Synergy Assessed by Checkerboard. A Critical Analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1993**, 16 (4), 343–349.
- (223) Meletiadis, J.; Pournaras, S.; Roilides, E.; Walsh, T. J. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and *In vitro-In vivo* Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus Fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (2), 602–609. <https://doi.org/10.1128/AAC.00999-09>.
- (224) Odds, F. C. Synergy, Antagonism, and What the Chequerboard Puts between Them. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 52 (1), 1–1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>.
- (225) Gangjee, A.; Zhao, Y.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E.; Bailey-Downs, L. C.; Kisliuk, R. L. Novel Tricyclic indeno[2,1-*d*]pyrimidines with Dual Antiangiogenic and Cytotoxic Activities as Potent Antitumor Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20 (14), 4217–4225.
- (226) Altman, J. K.; Szilard, A.; Konicek, B. W.; Iversen, P. W.; Kroczyńska, B.; Glaser, H.; Sassano, A.; Vakana, E.; Graff, J. R.; Plataniak, L. C. Inhibition of Mnk Kinase Activity by Cercosporamide and Suppressive Effects on Acute Myeloid Leukemia Precursors. *Blood* **2013**, 121 (18), 3675–3681. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-477216>.
- (227) Showalter, H. D.; Bridges, A. J.; Zhou, H.; Sercel, A. D.; McMichael, A.; Fry, D. W. Tyrosine Kinase Inhibitors. 16. 6,5,6-Tricyclic benzo[3,2-*d*]pyrimidines and pyrimido[5,4-*b*] and -[4,5-*b*]indoles as Potent Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (26), 5464–5474.
- (228) De Boer, L.; Oakes, V.; Beamish, H.; Giles, N.; Stevens, F.; Somdevilla-Torres, M.; Desouza, C.; Gabrielli, B. Cyclin A/cdk2 Coordinates Centrosomal and Nuclear Mitotic Events. *Oncogene* **2008**, 27 (31), 4261–4268. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.74>.

Bibliographie

- (229) Cheung, Z. H.; Ip, N. Y. Cdk5: A Multifaceted Kinase in Neurodegenerative Diseases. *Trends Cell Biol.* **2012**, 22 (3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.003>.
- (230) Romano, G.; Giordano, A. Role of the Cyclin-Dependent Kinase 9-Related Pathway in Mammalian Gene Expression and Human Diseases. *Cell Cycle* **2008**, 7 (23), 3664–3668. <https://doi.org/10.4161/cc.7.23.7122>.
- (231) Blanco-Aparicio, C.; Collazo, A. M. G.; Oyarzabal, J.; Leal, J. F.; Albarán, M. I.; Lima, F. R.; Pequeño, B.; Ajenjo, N.; Becerra, M.; Alfonso, P.; et al. Pim 1 Kinase Inhibitor ETP-45299 Suppresses Cellular Proliferation and Synergizes with PI3K Inhibition. *Cancer Lett.* **2011**, 300 (2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.016>.
- (232) Feizbakhsh, O.; Place, M.; Fant, X.; Buron, F.; Ruchaud, S. R. The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors. *Protein Phosphorylation* **2017**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70732>.
- (233) Jain, P.; Karthikeyan, C.; Moorthy, N. S. H. N.; Waiker, D. K.; Jain, A. K.; Trivedi, P. Human CDC2-like Kinase 1 (CLK1): A Novel Target for Alzheimer's Disease. *Curr. Drug Targets* **2014**, 15 (5), 539–550.
- (234) Abbassi, R.; Johns, T. G.; Kassiou, M.; Munoz, L. DYRK1A in Neurodegeneration and Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Pharmacol. Ther.* **2015**, 151, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.004>.
- (235) Reyes, C.; Serrurier, C.; Gauthier, T.; Gachet, Y.; Tournier, S. Aurora B Prevents Chromosome Arm Separation Defects by Promoting Telomere Dispersion and Disjunction. *J. Cell Biol.* **2015**, 208 (6), 713–727. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407016>.
- (236) Bach, S.; Knockaert, M.; Reinhardt, J.; Lozach, O.; Schmitt, S.; Baratte, B.; Koken, M.; Coburn, S. P.; Tang, L.; Jiang, T.; et al. Roscovitine Targets, Protein Kinases and Pyridoxal Kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (35), 31208–31219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500806200>.
- (237) Zhang, L.; Zhang, Y.-X.; Hu, Y.; Shi, X.-B.; Jiang, Z.-Q.; Wang, Z.-K.; Liao, L.-S. Highly Efficient Blue Phosphorescent Organic Light-Emitting Diodes Employing a Host Material with Small Bandgap. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8 (25), 16186–16191. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01304>.
- (238) Manniche, S.; Sprogø, K.; Dalsgaard, P. W.; Christophersen, C.; Larsen, T. O. Karnatakafurans A and B: Two Dibenzofurans Isolated from the Fungus *Aspergillus K. Arnatakaensis*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (12), 2111–2112. <https://doi.org/10.1021/np049843k>.
- (239) Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (9), 696–709. <https://doi.org/10.1038/nrd895>.
- (240) Lakshminarayana, N.; Prasad, Y. R.; Gharat, L.; Thomas, A.; Narayanan, S.; Raghuram, A.; Srinivasan, C. V.; Gopalan, B. Synthesis and Evaluation of Some Novel Dibenzo[b,d]furan Carboxylic Acids as Potential Anti-Diabetic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (9), 3709–3718. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.020>.

Bibliographie

- (241) Carotenuto, A.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S. Porric Acids A–C – New Antifungal Dibenzofurans from the Bulbs of *Allium Porrum* L. *Eur. J. Org. Chem.* **1998** (4), 661–663.
- (242) Nitiss, J. L. Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9 (5), 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrc2607>.
- (243) Carney, J. R.; Scheuer, P. J. Popolohuanone E, a Topoisomerase-II Inhibitor with Selective Lung Tumor Cytotoxicity from the Pohnpei Sponge *Dysidea* Sp. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34 (23), 3727–3730. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79211-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79211-2).
- (244) Katoh, T.; Nakatani, M.; Shikita, S.; Sampe, R.; Ishiwata, A.; Ohmori, O.; Nakamura, M.; Terashima, S. Studies toward the Total Synthesis of Popolohuanone E: Enantioselective Synthesis of 8-O-MethylpopolohuanoneE. *Org. Lett.* **2001**, 3 (17), 2701–2704. <https://doi.org/10.1021/ol016285h>.
- (245) Casero, C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Demo, M.; Méndez-Álvarez, S.; Machín, F. Achyrofuran Is an Antibacterial Agent Capable of Killing Methicillin-Resistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus Aureus* in the Nanomolar Range. *Phytomedicine* **2013**, 20 (2), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.11.003>.
- (246) Shou, Q.; Banbury, L. K.; Renshaw, D. E.; Lambley, E. H.; Mon, H.; Macfarlane, G. A.; Griesser, H. J.; Heinrich, M. M.; Wohlmuth, H. Biologically Active Dibenzofurans from *Pilodistigma glabrum*, an Endemic Australian Myrtaceae. *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75 (9), 1612–1617. <https://doi.org/10.1021/np300433r>.
- (247) Prado, S.; Ledoit, H.; Michel, S.; Koch, M.; Darbord, J. C.; Cole, S. T.; Tillequin, F.; Brodin, P. Benzofuro[3,2-f][1]benzopyrans: A New Class of Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (15), 5423–5428. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.033>.
- (248) Termentzi, A.; Khouri, I.; Gaslonde, T.; Prado, S.; Saint-Joanis, B.; Bardou, F.; Amanatiadou, E. P.; Vizirianakis, I. S.; Kordulakova, J.; Jackson, M.; et al. Synthesis, Biological Activity, and Evaluation of the Mode of Action of Novel Antitubercular Benzofurobenzopyrans Substituted on A Ring. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (12), 5833–5847. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.048>.
- (249) Surineni, G.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Kantevari, S. Click-Based Synthesis and Antitubercular Evaluation of Dibenzofuran Tethered Thiazolyl-1,2,3-Triazolyl Acetamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26 (15), 3684–3689. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.085>.
- (250) Yempala, T.; Sridevi, J. P.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Kantevari, S. Design, Synthesis and Antitubercular Evaluation of Novel 2-Substituted-3H-Benzofuro Benzofurans via Palladium–copper Catalysed Sonagashira Coupling Reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (19), 5393–5396. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.048>.
- (251) Liu, Z.; Larock, R. C. Synthesis of Carbazoles and Dibenzofurans via Cross-Coupling of *O* -Iodoanilines and *O* -Iodophenols with Silylaryl Triflates. *Org. Lett.* **2004**, 6 (21), 3739–3741. <https://doi.org/10.1021/ol048564l>.

Bibliographie

- (252) Panda, N.; Mattan, I.; Nayak, D. K. Synthesis of Dibenzofurans via C–H Activation of O-Iodo Diaryl Ethers. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (13), 6590–6597. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00634>.
- (253) Campeau, L.-C.; Parisien, M.; Jean, A.; Fagnou, K. Catalytic Direct Arylation with Aryl Chlorides, Bromides, and Iodides: Intramolecular Studies Leading to New Intermolecular Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (2), 581–590. <https://doi.org/10.1021/ja055819x>.
- (254) Wassmundt, F. W.; Pedemonte, R. P. An Improved Synthesis of Dibenzofurans by a Free-Radical Cyclization. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (16), 4991–4994. <https://doi.org/10.1021/jo00121a016>.
- (255) Du, Z.; Zhou, J.; Si, C.; Ma, W. Synthesis of Dibenzofurans by Palladium-Catalysed Tandem Denitration/C–H Activation. *Synlett* **2011**, *2011* (20), 3023–3025. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1289881>.
- (256) Lockner, J. W.; Dixon, D. D.; Risgaard, R.; Baran, P. S. Practical Radical Cyclizations with Arylboronic Acids and Trifluoroborates. *Org. Lett.* **2011**, *13* (20), 5628–5631. <https://doi.org/10.1021/ol2023505>.
- (257) Gajera, J. M.; Gopalan, B.; Yadav, P. S.; Patil, S. D.; Gharat, L. A. Synthesis of Multi-Substituted Dibenzofuran. *J. Heterocycl. Chem.* **2011**, *45* (3), 797–801. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570450326>.
- (258) Wang, C.; Piel, I.; Glorius, F. Palladium-Catalyzed Intramolecular Direct Arylation of Benzoic Acids by Tandem Decarboxylation/C–H Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (12), 4194–4195. <https://doi.org/10.1021/ja8100598>.
- (259) Maetani, S.; Fukuyama, T.; Ryu, I. Rhodium-Catalyzed Decarbonylative C–H Arylation of 2-Aryloxybenzoic Acids Leading to Dibenzofuran Derivatives. *Org. Lett.* **2013**, *15* (11), 2754–2757. <https://doi.org/10.1021/ol4010905>.
- (260) Shen, Z.; Ni, Z.; Mo, S.; Wang, J.; Zhu, Y. Palladium-Catalyzed Intramolecular Decarboxylative Coupling of Arene Carboxylic Acids/Esters with Aryl Bromides. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (16), 4859–4865. <https://doi.org/10.1002/chem.201103438>.
- (261) Oliveira, A. M.; Raposo, M. M. M.; Oliveira-Campos, A. M.; Griffiths, J.; Machado, A. E. Synthesis of Psoralen Analogues Based on Dibenzofuran. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86* (8), 2900–2907.
- (262) Liégault, B.; Lee, D.; Huestis, M. P.; Stuart, D. R.; Fagnou, K. Intramolecular Pd(II)-Catalyzed Oxidative Biaryl Synthesis Under Air: Reaction Development and Scope. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (13), 5022–5028. <https://doi.org/10.1021/jo800596m>.
- (263) Bartholomäus, R.; Dommershausen, F.; Thiele, M.; Karanjule, N. S.; Harms, K.; Koert, U. Total Synthesis of the Postulated Structure of Fulcineroside. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (23), 7423–7436. <https://doi.org/10.1002/chem.201204545>.

Bibliographie

- (264) Cho, J. Y.; Roh, G.; Cho, E. J. Visible-Light-Promoted Synthesis of Dibenzofuran Derivatives. *J. Org. Chem.* **2018**, 83 (2), 805–811. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02796>.
- (265) Wang, J.-Q.; Harvey, R. G. Synthesis of Polycyclic Xanthenes and Furans via Palladium-Catalyzed Cyclization of Polycyclic Aryltriflate Esters. *Tetrahedron* **2002**, 58 (29), 5927–5931. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00534-3).
- (266) Camargo Solórzano, P.; Brigante, F.; Pierini, A. B.; Jimenez, L. B. Photoinduced Synthesis of Dibenzofurans: Intramolecular and Intermolecular Comparative Methodologies. *J. Org. Chem.* **2018**, 83 (15), 7867–7877. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00742>.
- (267) Zhao, H.; Yang, K.; Zheng, H.; Ding, R.; Yin, F.; Wang, N.; Li, Y.; Cheng, B.; Wang, H.; Zhai, H. A One-Pot Synthesis of Dibenzofurans from 6-Diazo-2-Cyclohexenones. *Org. Lett.* **2015**, 17 (23), 5744–5747. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02783>.
- (268) Peng, C.; Yan, G.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Wang, J. Palladium-Catalyzed Coupling Reaction of α -Diazocarbonyl Compounds with Aromatic Boronic Acids or Halides. *Synthesis* **2010**, 2010 (24), 4154–4168. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1258322>.
- (269) Kumar, A.; Yadav, A.; Verma, A.; Jana, S.; Sattar, M.; Kumar, S.; Prasad, C. D.; Kumar, S. Chemoselective Arylation of Phenols with Bromo-Nitroarenes: Synthesis of Nitro-Biaryl-Ols and Their Conversion into Benzofurans and Carbazoles. *Chem Commun* **2014**, 50 (67), 9481–9484. <https://doi.org/10.1039/C4CC03090G>.
- (270) Marzo, L.; Pagire, S. K.; Reiser, O.; König, B. Visible-Light Photocatalysis: Does It Make a Difference in Organic Synthesis? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57 (32), 10034–10072. <https://doi.org/10.1002/anie.201709766>.
- (271) Wei, Y.; Yoshikai, N. Oxidative Cyclization of 2-Arylphenols to Dibenzofurans under Pd(II)/Peroxybenzoate Catalysis. *Org. Lett.* **2011**, 13 (20), 5504–5507. <https://doi.org/10.1021/ol202229w>.
- (272) Xiao, B.; Gong, T.-J.; Liu, Z.-J.; Liu, J.-H.; Luo, D.-F.; Xu, J.; Liu, L. Synthesis of Dibenzofurans via Palladium-Catalyzed Phenol-Directed C–H Activation/C–O Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (24), 9250–9253. <https://doi.org/10.1021/ja203335u>.
- (273) Arienti, A.; Bigi, F.; Maggi, R.; Moggi, P.; Rastelli, M.; Sartori, G.; Trerè, A. Highly Selective Conversion of Hydroxylated Biaryls to Dibenzofuranderivatives over Zeolite Catalyst. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1997**, 0 (9), 1391–1394. <https://doi.org/10.1039/A607282H>.
- (274) Yamato, T.; Hideshima, C.; Prakash, G. S.; Olah, G. A. Solid Superacid Catalyzed Organic Synthesis. 6. Perfluorinated Resinsulfonic Acid (Nafion-H) Catalyzed Ring Closure Reaction of 2, 2'-dihydroxybiphenyls. A Preparative Route to Dibenzofurans. *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (9), 3192–3194.
- (275) Dastoorani, P.; Maghsoodlou, M. T.; Khalilzadeh, M. A.; Sarina, E. Synthesis of New Dibenzofuran Derivatives via Diels–Alder Reaction of Euparin with Activated Acetylenic Esters. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (3), 314–316. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.12.021>.

Bibliographie

- (276) Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Montagnon, T.; Vassilikogiannakis, G. The Diels–Alder Reaction in Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** (10), 1668–1698.
- (277) Scannell, R. T.; Stevenson, R. Syntheses of the Natural Dibenzofuran, Ruscodibenzofuran. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1983**, 0 (0), 2927–2931.
<https://doi.org/10.1039/P19830002927>.
- (278) Della Rosa, C. D.; Sanchez, J. P.; Kneeteman, M. N.; Mancini, P. M. E. Diels–Alder Reactions of Nitrobenzofurans: A Simple Dibenzofuran Synthesis. Theoretical Studies Using DFT Methods. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (18), 2316–2319.
- (279) Zhang, Q.; Wang, D.; Wang, X.; Ding, K. (2-Pyridyl)acetone-Promoted Cu-Catalyzed O-Arylation of Phenols with Aryl Iodides, Bromides, and Chlorides. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (18), 7187–7190. <https://doi.org/10.1021/jo9012157>.
- (280) Fang, L.; Fang, X.; Gou, S.; Lupp, A.; Lenhardt, I.; Sun, Y.; Huang, Z.; Chen, Y.; Zhang, Y.; Fleck, C. Design, Synthesis and Biological Evaluation of D-Ring Opened Galantamine Analogs as Multifunctional Anti-Alzheimer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.035>.
- (281) Cameron, A.; Fisher, B.; Rizzacasa, M. A. A Four Step Synthesis of Violaceic Acid. *Tetrahedron* **2018**, 74 (12), 1203–1206. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.10.071>.
- (282) Blanchard, S.; Grig-Alexa, I.; Patriciu, O.-I.; Fînar, A.; Guillaumet, G. Dihydropyridopyrazines: synthesis and functionalization. *St. Cerc. St. CICBIA* **2010**, 11 (1), 45 – 65.
- (283) Kelly, S. M.; Lipshutz, B. H. Chemoselective Reductions of Nitroaromatics in Water at Room Temperature. *Org. Lett.* **2014**, 16 (1), 98–101. <https://doi.org/10.1021/ol403079x>.
- (284) Krug, M.; Wichapong, K.; Erlenkamp, G.; Sippl, W.; Schächtele, C.; Totzke, F.; Hilgeroth, A. Discovery of 4-Benzylamino-Substituted α -Carbolines as a Novel Class of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Chem.Med.Chem.* **2011**, 6 (1), 63–72.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201000384>.
- (285) Punna, S.; Meunier, S.; Finn, M. G. A Hierarchy of Aryloxide Deprotection by Boron Tribromide. *Org. Lett.* **2004**, 6 (16), 2777–2779. <https://doi.org/10.1021/ol0489898>.
- (286) Kosak, T. M.; Conrad, H. A.; Korich, A. L.; Lord, R. L. Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr_3 -Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers: Ether Cleavage Re-Investigated. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015 (34), 7460–7467.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201501042>.
- (287) Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synth. Commun.* **1981**, 11 (7), 513–519.
- (288) Corbet, J.-P.; Mignani, G. Selected Patented Cross-Coupling Reaction Technologies. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (7), 2651–2710. <https://doi.org/10.1021/cr0505268>.

Bibliographie

- (289) Li, J.-H.; Liu, W.-J. Dabco as an Inexpensive and Highly Efficient Ligand for Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction. *Org. Lett.* **2004**, 6 (16), 2809–2811. <https://doi.org/10.1021/ol048907f>.
- (290) Darses, S.; Jeffery, T.; Genet, J.-P.; Brayer, J.-L.; Demoute, J.-P. Cross-Coupling of Arenediazonium Tetrafluoroborates with Arylboronic Acids Catalysed by Palladium. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 (22), 3857–3860.
- (291) Molander, G. A.; Biolatto, B. Efficient Ligandless Palladium-Catalyzed Suzuki Reactions of Potassium Aryltrifluoroborates. *Org. Lett.* **2002**, 4 (11), 1867–1870. <https://doi.org/10.1021/ol025845p>.
- (292) Ohsumi, M.; Nishiwaki, N. Selective Synthesis of (Benzyl)biphenyls by Successive Suzuki–Miyaura Coupling of Phenylboronic Acids with 4-Bromobenzyl Acetate under Air Atmosphere. *ACS Omega* **2017**, 2 (11), 7767–7771. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01450>.
- (293) Liu, J.; Fitzgerald, A. E.; Mani, N. S. Facile Assembly of Fused Benzo[4,5]furo Heterocycles. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (7), 2951–2954. <https://doi.org/10.1021/jo8000595>.
- (294) Barnes, D. M.; Barkalow, J.; Plata, D. J. A Facile Method for the Preparation of MOM-Protected Carbamates. *Org. Lett.* **2009**, 11 (2), 273–275. <https://doi.org/10.1021/ol8022769>.
- (295) Kim, S.; Park, Y. H.; Kee, I. S. Mild Deprotection of Methoxymethyl, Methylthiomethyl, Methoxyethoxymethyl, and β -(Trimethylsilyl) Ethoxymethyl, Esters with Magnesium Bromide in Ether. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (26), 3099–3100.
- (296) Han, J. H.; Kwon, Y. E.; Sohn, J.-H.; Ryu, D. H. A Facile Method for the Rapid and Selective Deprotection of Methoxymethyl (MOM) Ethers. *Tetrahedron* **2010**, 66 (9), 1673–1677. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.01.007>.
- (297) Kaiser, F.; Schwink, L.; Velder, J.; Schmalz, H.-G. Studies towards the Total Synthesis of Mumbaistatin: Synthesis of Highly Substituted Benzophenone and Anthraquinone Building Blocks. *Tetrahedron* **2003**, 59 (18), 3201–3217. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00427-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00427-7).
- (298) Ghodke, S. V.; Chudasama, U. V. Friedel-Crafts Alkylation and Acylation of Aromatic Compounds under Solvent Free Conditions Using Solid Acid Catalysts. *Int. J. Chem. Stud.* **2015**, 2 (5), 27–34.
- (299) Liu, L.-X.; Wang, X.-Q.; Yan, J.-M.; Li, Y.; Sun, C.-J.; Chen, W.; Zhou, B.; Zhang, H.-B.; Yang, X.-D. Synthesis and Antitumor Activities of Novel Dibenzo[*b,d*]furan–imidazole Hybrid Compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.011>.
- (300) Chiranjeevi, B.; Koyyada, G.; Prabusreenivasan, S.; Kumar, V.; Sujitha, P.; Kumar, C. G.; Sridhar, B.; Shaik, S.; Chandrasekharam, M. Iron-Catalyzed Aryl–Aryl Cross Coupling Route for the Synthesis of 1-(2-Amino)-Phenyl)dibenzo[*b,d*]furan-2-Ol Derivatives and Their Biological Evaluation. *RSC Adv.* **2013**, 3 (37), 16475. <https://doi.org/10.1039/c3ra43345e>.

Bibliographie

- (301) Sengul, I. F.; Wood, K.; Kumar, N.; Black, D. S. Synthesis of Macrocyclic Systems Derived from Di-(2-Indolyl)heteroarenes. *Tetrahedron* **2012**, 68 (44), 9050–9055.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.08.063>.
- (302) Keumi, T.; Nakamura, M.; Kitamura, M.; Tomioka, N.; Kitajima, H. Solvent Effects on Isomer Distributions and Relative Rates in Friedel–Crafts Benzylation and Benzoylation of Dibenzofuran Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1985**, 0 (7), 909–913.
<https://doi.org/10.1039/P29850000909>.
- (303) Peterson, P. W.; Shevchenko, N.; Breiner, B.; Manoharan, M.; Lufti, F.; Delaune, J.; Kingsley, M.; Kovnir, K.; Alabugin, I. V. Orbital Crossings Activated through Electron Injection: Opening Communication between Orthogonal Orbitals in Anionic C1–C5 Cyclizations of Ene-dynes. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (48), 15617–15628.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b08540>.
- (304) Karthik, G.; Kulangiappar, K.; Marken, F.; Kulandainathan, M. A. Electrochemically Promoted Friedel–Crafts Acylation of Aromatic Compounds. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (16), 2625–2627. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.084>.
- (305) Bennett, C. J.; Caldwell, S. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Duthie, G. G.; Hartley, R. C. Potential Therapeutic Antioxidants That Combine the Radical Scavenging Ability of Myricetin and the Lipophilic Chain of Vitamin E to Effectively Inhibit Microsomal Lipid Peroxidation. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12 (9), 2079–2098.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.02.031>.
- (306) Boyer, J. L.; Krum, J. E.; Myers, M. C.; Fazal, A. N.; Wigal, C. T. Synthetic Utility and Mechanistic Implications of the Fries Rearrangement of Hydroquinone Diesters in Boron Trifluoride Complexes. *J. Org. Chem.* **2000**, 65 (15), 4712–4714.
<https://doi.org/10.1021/jo000412q>.

Titre : Conception, synthèse et évaluation biologique de benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines et dibenzo[*b,d*]furanes, dérivés du cercosporamide d'origine naturelle

Mots clés : benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine, dibenzo[*b,d*]furane, cercosporamide, *Candida albicans* Pkc1, inhibiteurs de kinases, restauration de la sensibilité au fluconazole, activité antifongique

Résumé : *Candida albicans* est la principale levure impliquée en pathologie humaine. Chez *C. albicans*, la protéine kinase C (CaPkc1), impliquée dans la voie des MAP kinases, a un rôle de régulateur de l'intégrité de la paroi cellulaire durant la croissance, la morphogénèse et la réponse au stress pariétal. Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré que des inhibiteurs de CaPkc1 rétablissaient la sensibilité au fluconazole de souches de *C. albicans* résistantes aux azolés mais non mutées au niveau du gène *ERG11*.

Le (-)-cercosporamide, de structure de base 9,9a-dihydro-1,3,7-trihydroxy-9a-méthyl-9-oxodibenzo[*b,d*]furane-4-carboxamide, est un produit naturel antifongique à large spectre ayant un effet inhibiteur de CaPkc1. Nous avons décidé de synthétiser des analogues hétérocycliques simplifiés en s'affranchissant de la présence du carbone asymétrique.

Le cercosporamide ayant une affinité pour le site de fixation de l'ATP de certaines kinases via le 3-OH et le 4-CONH₂ de la partie phényle, nous avons donc choisi de maintenir le dihydroxybenzofurane-carboxamide dans la conception de nouveaux composés tricycliques, à structures benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine et dibenzo[*b,d*]furane.

L'activité antifongique directe et la restauration de la sensibilité au fluconazole de souches résistantes ont été évaluées *in vitro* sur un panel de 6 souches de *C. albicans*. L'inhibition de l'activité de CaPkc1 a été mesurée pour les molécules les plus prometteuses, en parallèle d'un profil de sélectivité sur un panel de kinases humaines afin de valider la pertinence de la cible protéique envisagée.

Title: Design, synthesis and biological evaluation of benzofuro[3,2-*d*]pyrimidines and dibenzo[*b,d*]furans, derivatives of cercosporamide, a natural product

Keywords: benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine, dibenzo[*b,d*]furan, cercosporamide, *Candida albicans* Pkc1, kinase inhibitors, restoration of fluconazole susceptibility, antifungal activity

Abstract: *Candida albicans* is the main yeast involved in human pathology. In *C. albicans*, protein kinase C (CaPkc1), which is involved in the MAP kinase pathway, regulates cell wall integrity during growth, morphogenesis and wall stress response. Previous results in the laboratory showed that inhibitors of CaPkc1 restored fluconazole susceptibility to resistant *C. albicans* strains if not mutated on *ERG11* gene.

(-)-Cercosporamide, with a base structure of 9,9a-dihydro-1,3,7-trihydroxy-9a-methyl-9-oxodibenzo[*b,d*]furan-4-carboxamide, a natural broad spectrum antifungal product has an inhibitory effect on CaPkc1. We decided to synthesize simplified heterocyclic analogues by avoiding the presence of asymmetric carbon.

Cercosporamide has an affinity for the ATP binding site of certain kinases via 3-OH and 4-CONH₂ of the phenyl moiety, we have therefore chosen to maintain dihydroxybenzofuran-carboxamide in the design of new tricyclic compounds with benzofuro[3,2-*d*]pyrimidine and dibenzo[*b,d*]furan structures.

The direct antifungal activity and the restoration of fluconazole susceptibility of resistant strains were evaluated *in vitro* on a panel of 6 strains of *C. albicans*. The inhibition of CaPkc1 activity has been measured on the most promising molecules, in parallel with a selectivity profile on a panel of human kinases in order to validate the relevance of the considered protein target.