

Thèse de Doctorat



Nathalie Gisèle AMOUSSOU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
et de Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : *Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique*

Spécialité : *Chimie thérapeutique*

Unité de recherche : *Laboratoire IICiMed- EA 1155*

Soutenue le 22 Mai 2017

Thèse N° :

Conception, synthèse, extraction phytochimique et étude biologique d'inhibiteurs potentiels de kinases à visée anticancéreuse

JURY

Président du jury : **Sophie TOMASI**, Professeur, Institut des Sciences Chimiques de Rennes

Rapporteurs : **Philippe CHAVATTE**, Professeur, Université de Lille 2

Sophie TOMASI, Professeur, Institut des Sciences Chimiques de Rennes

Directeur de Thèse : **Jean-Michel ROBERT**, Professeur, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse : **André BIGOT**, Professeur, Université d'Abomey-Calavi

A Martin

A mes parents

A mes sœurs

A mes amis

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés au sein du département de Chimie Thérapeutique de l'équipe EA1155-II CiMed de l'Université de Nantes et différents laboratoires de l'Université d'Abomey-Calavi sous la direction des professeurs Jean-Michel Robert et André Bigot.

Je remercie tout d'abord le Professeur André Bigot pour m'avoir accordé sa confiance depuis le début de ce travail de recherche. Vous avez été comme un père pour moi. Merci pour les connaissances que vous m'avez transmises et pour tous les conseils que vous m'avez prodigués.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Jean-Michel Robert pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de recherche. Vous m'avez fait confiance dès le début sans me connaître et vous m'avez accordé une grande autonomie dans la réalisation de mon travail. Merci pour le savoir-faire et le savoir-être que vous m'avez transmis durant toutes ces années de recherche.

Je remercie les Professeurs Patrice Le Pape et Muriel Duflos, pour m'avoir accueilli.

Mes remerciements s'adressent également aux Professeurs Philippe Chavatte (Université de Lille 2) et Sophie Tomasi (Université de Rennes 1) pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier l'équipe de Roscoff pour tous les tests réalisés. Merci pour les différents échanges que nous avons eus.

Je remercie également le Professeur Anatole Laleye pour ses conseils et pour sa contribution dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de physiologie de la FSS.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe II CiMed qui m'ont permis de toujours travailler dans de très bonnes conditions et avec bonne humeur. Merci au Docteur Cédric Logé pour ses compétences, ses conseils et pour le partage des connaissances en œnologie (mais je n'y comprends toujours pas grand-chose). Merci au Professeur Pascal Marchand

pour tous ses conseils, son encadrement et sa sympathie. Merci au Docteur Marc-Antoine Bazin ses conseils et pour sa disponibilité.

Un grand merci à Marie-Renée Nourrisson et Patricia Pinson pour leur aide pour la réalisation des spectres RMN, la mise à disposition des produits ainsi que leurs conseils.

Je remercie Alain et Cynthia pour leur gentillesse, mais aussi pour toute l'aide apportée lors de la réalisation de mes spectres IR.

Je remercie toute l'équipe décennale de la FSS qui m'a beaucoup aidé et permis la réalisation de ces travaux dans de bonnes conditions.

Je remercie David Montoir qui m'a beaucoup aidé et facilité mon intégration dans l'équipe dès mon arrivée à Nantes.

Merci aussi aux doctorants du laboratoire : Ousmane et Hung pour m'avoir permis de travailler dans un climat de bonne humeur générale et pour toutes les discussions que nous avons eues.

Je remercie les Docteurs Pascal Agbangnan et Yaya Koudoro de l'EPAC pour leurs conseils et leur aide précieuse.

Je remercie aussi tous les doctorants de la FSS pour leur soutien.

Je remercie le Docteur Ahonlonsou Prosper pour son soutien indéfectible.

Un grand merci à mes parents et mes sœurs qui m'ont toujours soutenue et encouragée pendant ce long cursus universitaire. Toute seule, j'aurais abandonné avant la fin.

Merci à tous mes amis (Sitou, Reine-Marie, Maurice, Rodrigue) qui m'ont soutenue et accompagnée durant ma formation.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES	1
INTRODUCTION	7
I- Le cancer et ses cibles thérapeutiques.....	7
A- Généralités sur les cancers.....	7
B- L'apoptose.....	9
C- La chimiothérapie anticancéreuse	11
1- L'hormonothérapie	11
2- L'immunothérapie	11
3- La chimiothérapie.....	12
II- Les protéines kinases.....	14
A- Généralités sur les protéines kinases.....	14
B- Classification des protéines kinases de la superfamille eucaryotes.....	14
C- Structure des protéines kinases et leurs fonctions	20
III- La protéine kinase Haspin.....	24
A- Distribution	24
B- Structure	24
1- Lobe N-terminal.....	25
2- Lobe C-terminal	29
C- Le substrat de Haspin.....	30
D- Rôle de l'histone H3T3 phosph durant la mitose	32
E- Régulation de l'activité de Haspin.....	37
F- Haspin et cancer.....	39
G- Inventaire des inhibiteurs de Haspin	42
1- 5-iodotubercidine : 5-iodo-7- β -D-ribofuranosyl-7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-amine.....	42
2- CHR-6494 : 3-(1 <i>H</i> -indazol-5-yl)- <i>N</i> -propylimidazo[1,2- <i>b</i>]pyridazin-6-amine	43
3- Dérivés de l'acridine: LDN-192960 et LDN-209929	44
4- Dérivés de la bêta-carboline.....	45

5-	Les analogues conjugués de l'adénosine et d'oligoarginine (ARCs)	46
IV-	Autres protéines kinases d'intérêt thérapeutique	49
	A-RIPK3	49
	B-DYRK1A	49
	C-PIM 49	
	D-CDK5	50
	E-CDK2	50
	F-CDK9	50
	G-CLK1	51
	H-CK151	
	I-TLK1	51
	J-GSK3	51
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	52
	PREMIERE PARTIE: SYNTHESE DE DERIVES ORIGINAUX DU 8-AMINO-4-OXO-3,4-DIHYDRO-5H-PYRIDAZIN[4,5-b]INDOLE	60
	Chapitre I : PARTIE THEORIQUE	61
I-	Accès aux dérivés du 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b] indole	62
	A- Intérêt de la structure en thérapeutique	62
	B- Approche rétrosynthétique	63
	C- voie d'accès utilisée	63
	1- Synthèse du 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle	64
	2- Synthèse du 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle	64
	3- Acylation de l'indole en position 3	65
	4- Synthèse du noyau pyridazino[4,5-b]indole	67
	5- Synthèse des dérivés du 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b] indole	67
II-	Synthèse des N-(pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)arylcarboxamides ou alkylcarboxamides	69
	A- Synthèse des N-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides	69
	1- Synthèse à partir d'un chlorure d'acyle	69
	2- Synthèse à partir d'un acide carboxylique	71
	3- Introduction d'une nouvelle fonction amine	73

B-	Synthèse des <i>N</i> -(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides	74
1-	Synthèse à partir d'un chlorure d'acide	74
2-	Synthèse des amides à partir d'un acide carboxylique	75
C-	Synthèse des <i>N</i> -(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides	75
1-	Synthèse des amides à partir d'un chlorure d'acide	75
2-	Synthèse des amides à partir d'un acide carboxylique	76
D-	Synthèse des dérivés <i>N</i> -(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides.....	76
1-	Synthèse à partir d'un chlorure d'acide	76
2-	Synthèse à partir d'un acide carboxylique	76
E-	Synthèse des <i>N</i> -(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides	77
1-	Synthèse à partir d'un chlorure d'acide	77
2-	Synthèse à partir d'un acide carboxylique	77
III-	Synthèse des <i>N</i> -(pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamides.....	78
A-	Synthèse des <i>N</i> -(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamide.....	78
B-	Synthèse des <i>N</i> -(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamides	80
C-	Synthèse des <i>N</i> -(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamides	80
D-	Synthèse des <i>N</i> -(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamides	81
E-	Synthèse des <i>N</i> -(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)arylsulfonamides	81
IV-	Synthèse de <i>N</i> -(1-alkyl ou aryl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée et cyclisation intramoléculaire	82
A-	Synthèse de la <i>N</i> -(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole)- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée	82
B-	Synthèse de la <i>N</i> -(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée.....	83
C-	Synthèse de la <i>N</i> -(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée.....	83

D-	Synthèse de la <i>N</i> -(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée et de la <i>N</i> -(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro)-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole- <i>N'</i> -2-chloroéthylurée	84
E-	Cyclisation des dérivés d'urée : synthèse du 8-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indole	84
V-	Synthèse du <i>N</i> -(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)éthyl]-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)-alkylcarboxamide et du <i>N</i> -(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-2,5-bis-[2-(diéthylamino)éthyl]-5 <i>H</i> -pyridazino[4,5- <i>b</i>]indol-8-yl)-alkylcarboxamide	84
A-	Synthèse des amides substitués en position 5.....	85
B-	Synthèse des amides substitués en position 3 et 5.....	86
VI-	Conclusion	87
Chapitre II- Partie expérimentale		89
I-	Généralités	90
II-	Méthodes générales de synthèse.....	91
III-	Protocoles et caractérisations	96
DEUXIEME PARTIE: EXTRACTION DE PRODUITS D'ORIGINE VEGETALE		207
Chapitre I- PARTIE THEORIQUE		208
I-	Généralités.....	209
II-	<i>Combretum paniculatum</i>	210
A-	Description botanique et usage en médecine traditionnelle.....	210
B-	Propriétés pharmacologiques	210
III-	<i>Amaranthus spinosus</i>	211
A-	Description botanique et usage en médecine traditionnelle.....	211
B-	Propriétés pharmacologiques	212
IV-	<i>Boerhaavia diffusa</i>	213
A-	Description botanique et usage en médecine traditionnelle.....	213
B-	Propriétés pharmacologiques	215
V-	<i>Boerhaavia erecta</i>	216
A-	Description botanique et usage en médecine traditionnelle.....	216
B-	Propriétés pharmacologiques	217
VI-	<i>Momordica charantia</i>	217
A-	Description botanique et usage en médecine traditionnelle.....	217
B-	Propriétés pharmacologiques	218

Chapitre II: TRAVAUX SUR LES PLANTES : EXTRACTION ET EVALUATION D'ACTIVITE SUR LES KINASES	219
I- Récolte des matières végétales, extraction et fractionnement	220
A- Récolte des plantes	220
B- Extraction des différentes drogues végétales	220
C- Fractionnement des extraits totaux.....	220
II- Mise en œuvre des tests phytochimiques sur les extraits éthanoliques des plantes ...	221
A- Protocoles	221
1- Recherche des alcaloïdes	221
2- Recherche des composés réducteurs.....	222
3- Recherche des tanins.....	222
4- Recherche des flavonoïdes.....	223
5- Recherche des anthocyanes.....	223
6- Recherche de leuco-anthocyanes.....	223
7- Recherche de mucilages.....	223
8- Recherche des coumarines.....	224
9- Recherche des anthraquinones.....	224
10- Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes	225
11- Recherche des saponosides.....	226
12- Recherche de protéines.....	226
B- Résultats.....	226
III- Mise en œuvre des tests de toxicité limite chez les rats	227
A- Matériel animal.....	227
B- Evaluation de la toxicité aigüe	228
TROISIEME PARTIE: ETUDE BIOLOGIQUE	229
Introduction	230
I- Evaluation des composés sur des lignées cellulaires cancéreuses.....	230
A- Protocole expérimental	230
B- Résultats.....	231
II- Evaluation de l'activité des composés sur les kinases :.....	232
A- Protocole expérimental	232
1- Les solutions tampons:.....	232

2- Les kinases.....	233
B- Evaluation des dérivés du pyridazino-indole : résultats biologiques et discussion	236
C- Evaluation des fractions de plantes sur les kinases : résultats et discussion	241
Conclusion	242
Conclusions et perspectives	244
BIBLIOGRAPHIE.....	247

LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

Adc : adénosine-4'-déhydrométhyl-4'- carboxylique

ADN : acide désoxyribonucléique

Ala (A) : alanine

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

AMTH : résidu acide 5-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-thiophène- 2-carboxylique

Akt : protéine kinase B

APC/C : anaphase-promoting complex/cyclosome

aPKs : protéines kinases atypiques

APAF1 : apoptotic peptidase activating factor 1

APP : acide polyphosphorique

ARCs : analogues conjugués de l'adénosine et d'oligoarginine

Arg (R) : arginine

ARNi : acide ribonucléique interférent

ARNm : acide ribonucléique messenger

Asn (N) : asparagine

Asp (D) : acide aspartique

ATP : adénosine triphosphate

ATTC : American Type Culture Collection

BIR : baculovirus IAP repeat

BRD : bromodomain-containing kinases

BSA : Bovine Serum Albumine

CaCl₂ : chlorure de calcium

CaMK : Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase

CCM : chromatographie sur couche mince

CDI : carbonyldiimidazole

CDK : cyclin-dependant kinase

CDK7-CycH-Mat1

cGK2 : cGMP-dependant protein kinase 2

CI₅₀ : concentration inhibitrice 50 %

CK1 : caséine kinase 1

CLK : CDC2-like kinase

CPC: chromosomal passenger complex

DCM : dichlorométhane

DCP : disodium phenyl phosphate

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO-d₆ : diméthylsulfoxyde deutéré

DTT : 1,4-dithiothreitol

DYRK : dual-specificity tyrosine Y regulated kinase

EDTA : éthylène diamine tétraacétique

EGTA : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

ePKs : protéines kinases conventionnel

ePKS : eucaryotic protein kinase superfamilly

ERK : extracellular signal–regulated kinase

ESI : Electrospray Ionisation Interface

Gln (Q) : glutamine

Glu (E) : acide glutamique

Gly (G) : Glycine

Gsg2 : germ cell-specific gene 2

GSK : glycogen synthase kinase

GTP : guanosine triphosphate

Haspin : haploid germ cell-specific nuclear protein kinase

HBIS : Haspin Basic Inhibitory Segment

HCl : acide chlorhydrique

HgCl₂ : chlorure de mercure(II)

His (H) : histidine

IAP : inhibitor of apoptosis protein

INCENP : inner centromere protein

IR : infrarouge

5-ITu : 5-iodotubercidine

K₂CO₃ : carbonate de potassium

KOH : hydroxyde de potassium

Leu (L) : leucine

LHRH : Luteinizing hormone-releasing hormone

Lys (K) : lysine

M : molarité

m/v : masse/volume

MAPK : mitogene-activated protein kinases

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7

MDA-MB-231 : cellules de lignées cancéreuses mammaires

MeOH : méthanol

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MHz : mégahertz

MnCl₂ : chlorure de manganèse

MM : masse molaire moléculaire

mM : millimolaire

MOPS : acide 4-morpholinepropanesulfonique

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

NaH : hydrure de sodium

NaHCO₃ : hydrogénocarbonate de sodium ou bicarbonate de sodium

NaOH : hydroxyde de soude

NSCLC-L16 : Non-small cell lung cancer

NFκB : nuclear factor kappa B

NH₄OH : amoniaque

OCDE : Organisation de Coopération et Développement Economique

PASK : Per-Arnt-Sim domain-containing kinase

PBD : Polo box domain

PBR : Peripheral Benzodiazepin Receptor

Pd/C 10 % : palladium sur charbon à 10 %

PDXK : pyridoxal kinase

PHDK : pyruvate dehydrogenase kinase

Phe (F) : phénylalanine

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIKK : phosphatidyl inositol 3 kinase-related kinases

PIPs : PP1 interacting proteins

PKA : protéine kinase A

PKD3 : protéine kinase D3

Plk1 : polo-like kinase 1

ppm : partie par million

Pro (P) : proline

Rf : rapport frontal

RHIM : RIP homotypic interaction motif

RIO : right open reading frame

RIPK3 : receptor-interacting serine/threonine protein kinases 3

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROCK 2 : Rho- associated protein kinase

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

Ser (S) : sérine

SnCl₂ : chlorure d'étain II

SnCl₄ : chlorure d'étain IV

TA : température ambiante

TEA : triéthylamine

TEP : tomoscintigraphie par émission de positons

Tf : température de fusion

THF : tétrahydrofurane

Thr (T) : thréonine

TIF1 : transcriptional intermediary factor 1

TK : tyrosines kinases

TKLs : tyrosines kinases like-kinases

TLK : tousled-like kinase

TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Tris : 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

TSPO : translocator protein

Tyr (Y) : tyrosine

UPLC-MS : Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

UV : ultraviolet

v/v : volume/volume

Val (V) : valine

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

δ : déplacement chimique

INTRODUCTION

I- Le cancer et ses cibles thérapeutiques

A- Généralités sur les cancers

Le terme « cancer » fait référence à un groupe de maladies affectant différents organes et caractérisé par des anomalies génomiques et des aberrations dans l'expression des gènes aboutissant à la formation de cellules mutantes stables. Ces cellules cancéreuses sont issues des cellules normales qui échappent au contrôle des mécanismes qui régulent la croissance et la multiplication cellulaire. Les différentes modifications observées sont (1–3) :

- une anomalie dans les voies de signalisation cellulaire
- une insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance cellulaire
- des anomalies dans la régulation du cycle cellulaire
- un échappement à l'apoptose
- une immortalité de ces cellules
- une (néo)angiogénèse
- la migration et l'invasion des tissus entraînant des métastases.

Ces modifications conduisent à la prolifération cellulaire incontrôlée entraînant une défaillance des organes aboutissant à la mort (4). Le développement du cancer se fait en cinq étapes majeures qui sont l'initiation, la promotion, la transformation en cellule maligne, la progression et la formation de métastase (5).

Les causes des cancers sont multiples (virus oncogènes, substances carcinogènes, radiations ionisantes ou mutations spontanées). Ces agents induisent différentes modifications au niveau cellulaire (mutations tumorales spécifiques, amplification de l'ADN

-
1. Graham LP. Oxford: Oxford University Press; 2012. 798 p.
 2. Floor SL, et al. Trends Mol Med. 2012 ; 18 (9) : 509-15.
 3. Desany B, et al. Drug Discov Today. 2004 ; 9 (18) : 795-802.
 4. Schmit TL, et al. Mol Cancer Ther. 2007 ; 6 (7) : 1920-31.
 5. Zhang B, et al. Dev Biol. 2007 ; 302 (1) : 1-12.

et translocations) conduisant à une altération de l'expression des gènes et de leurs fonctions des gènes pouvant aboutir au développement du cancer (3).

Le développement du cancer a été reconnu au début comme une anomalie génétique. Par la suite, plusieurs études ont permis de montrer l'association d'anomalie épigénétique aux modifications génétiques dans le développement du cancer (6). L'épigénome du cancer est caractérisé par des modifications caractéristiques de la méthylation de l'ADN ainsi que des histones. L'épigénome est normalement régulé par différents processus tels que la méthylation de l'ADN, le remodelage des nucléosomes, les modifications post-transcriptionnelles des histones, l'incorporation des variants d'histones et la régulation post-transcriptionnelle des gènes par les micro-ARN non codants. Les anomalies au niveau des mécanismes régulant le fonctionnement de l'épigénome impacteraient probablement l'expression des gènes ainsi que différents processus physiologiques tels que la condensation, la ségrégation des chromosomes et l'apoptose. Les dysfonctionnements observés au niveau des mécanismes régulant l'épigénome en combinaison avec les mutations génétiques contribuent à l'instauration et à la progression des maladies néoplasiques ainsi qu'au développement de la chimiorésistance (6,7).

En se basant sur les différentes études réalisées au cours des décennies passées, Futreal *et al.* (8) ont recensé les différents gènes impliqués dans le cancer et identifié les principales mutations observées. Les protéines codées par ces « gènes du cancer » sont normalement impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'angiogénèse et la mort cellulaire. Différentes mutations à la base de l'oncogénèse ont aussi été observées au niveau des gènes impliqués dans le processus de réparation de l'ADN. Celles-ci sont présentes sur au moins 291 gènes humains. En effet, sur les 25 000 gènes codant le génome humain, environ 1 % est impliqué dans la pathogénèse du cancer. Parmi ces gènes, environ 90 % présentent des mutations somatiques et 20 % des mutations germinales. De plus, des mutations somatiques et des cellules germinales simultanées sont possibles. Elles concernent environ 10 % des gènes du cancer (8).

La mutation la plus fréquente est la translocation qui résulte de la transcription chimérique ou de l'apposition d'un gène dans la séquence de régulation de l'activité d'un

6. Kanwal R, *et al.* Clin Genet. 2012 ; 81 (4) : 303-11.

7. Ducasse M, *et al.* Mol Cancer. 2006 ;5 : 60.

8. Futreal PA, *et al.* Nat Rev Cancer. 2004 ; 4 (3) : 177-83.

autre gène. Ce type de mutation est souvent observé au cours des leucémies, des lymphomes et des tumeurs touchant le mésenchyme. Sur les 2600 classes de protéines recensées à nos jours, 221 sont codées par les « gènes du cancer ». Parmi celles-ci figurent les tyrosines kinases et les sérine/thréonine kinases. Les tyrosines kinases représentent environ le quart de toutes les protéines kinases humaines et les deux-tiers des protéines kinases codées par les gènes du cancer. Les autres protéines codées par ces gènes sont impliquées dans la régulation de la transcription (8).

En dehors des « gènes du cancer », d'autres gènes sont aussi impliqués dans le développement des tumeurs. L'expression de ces derniers est affectée par différents processus: altération du niveau d'expression (inactivation épigénétique, microARN, activation transcriptionnelle) ou du mode d'expression (expression ectopique ou mauvaise régulation du développement) (9).

L'aneuploidie définie comme la présence d'une quantité supérieure ou inférieure à la quantité normale de chromosomes contenus dans une cellule est une des caractéristiques principales des cellules tumorales. L'apparition de l'aneuploidie au cours des premières étapes du développement du cancer met en exergue son implication dans le développement et la progression des cancers. De plus, différentes études ont montré que la majorité des tumeurs malignes sont aneuploïdes, agressives et de mauvais pronostic tandis que les tumeurs bénignes sont diploïdes et curables par résection chirurgicale. Différentes observations cliniques ont aussi montré que l'aneuploidie est indispensable à la transformation néoplasique ainsi qu'à l'acquisition de l'immortalité par les cellules (10).

Dans les conditions physiologiques normales, les cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme par apoptose mais au cours de la pathologie cancéreuse, les cellules mutantes échappent à ce programme de mort cellulaire.

B- L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus génétiquement régulé qui joue un rôle essentiel dans la multiplication cellulaire et dans plusieurs processus physiologiques. Dans l'organisme humain, l'apoptose est altérée au cours de plusieurs processus tumoral. Il en ressort que le dérèglement de la fonction apoptotique contribue à

9. Malumbres M, *et al.* *Curr Opin Genet Dev.* 2007; 17 (1) : 60-5.

10. Pihan GA, *et al.* *Semin Cancer Biol.* 1999; 9 (4) : 289-302.

la transformation de la cellule normale en cellule tumorale. L'apoptose cellulaire est déterminée par le ratio des protéines pro-apoptiques et anti-apoptiques. Les cellules en apoptose sont caractérisées par plusieurs modifications (diminution du volume cellulaire, aggrégation de la chromatine, apparition des corps apoptotiques...) survenant à la suite d'une cascade de signalisation cellulaire. Deux voies principales activent l'apoptose au niveau des cellules (11) :

-la **voie apoptotique extrinsèque** induite par les récepteurs de la mort cellulaire dont les principaux acteurs sont TNF, FAS ligand (FASL) et Apo2L/TRAIL (figure 1)

-la **voie apoptotique intrinsèque** médiée par la mitochondrie/apoptosome (complexe cytochrome C, APAF1, procaspase 9) dont les acteurs sont des protéines de la famille BCL2 (figure 1).

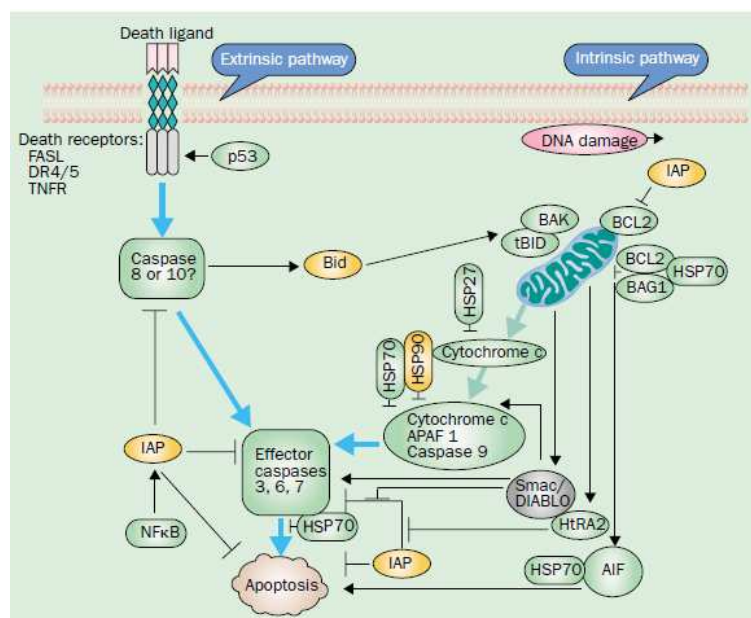


Figure 1 : Cascade d'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (11)

Il existe une interconnexion entre ces deux voies. Le résultat final de l'activation de ces deux voies est l'activation des caspases (cystéine aspartate-spécifiques protéases) et le clivage de substrats cellulaires spécifiques (lamine, cytokeratine 18, facteur de transcription AP-2 α , vimentine, huntingtine, topoisomérase 1...) aboutissant à la destruction des cellules. Ces deux voies apoptotiques peuvent être inhibées par différentes protéines telles que les protéines de la famille IAP (inhibiteur de protéase de l'apoptose), la survivine, les protéines de la voie de signalisation PI3K/AKT/NF κ B, et les HSP (heat shock protein) (11).

11. Hu W, *et al.* Lancet Oncol. 2003; 4 (12) : 721-9.

Certaines stratégies thérapeutiques anticancéreuses visent l'induction de l'apoptose au niveau des cellules cancéreuses par différents mécanismes (11,12) :

- soit directement en agissant sur les composants de la machinerie de la mort cellulaire : les protéines de la famille des BCL2, les caspases, les TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)
- soit une induction indirecte de l'apoptose par le ciblage des protéines kinases, des phosphatases, des facteurs de transcription, des protéasomes et des récepteurs de surface au niveau des cellules.

C- Les médicaments anticancéreux

Habituellement, les médicaments anticancéreux sont classés en trois catégories en fonction de la nature des substances utilisées (l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie) (13).

1- L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée dans le traitement des cancers hormono-dépendants. Elle regroupe les stéroïdes, les anti-oestrogènes, les anti-androgènes, les analogues LHRH (Luteinizing hormone-releasing hormone) et les inhibiteurs de l'aromatase. La stratégie thérapeutique varie en fonction du type de cancer. Lorsque la cellule cancéreuse requiert la présence d'une hormone spécifique, une autre hormone ayant un effet contraire (antagoniste) sur le développement de cette cellule peut être utilisée. (1,13).

2- L'immunothérapie

Elle repose sur l'utilisation des cellules immunitaires (lymphocytes T, cellules NK), d'anticorps monoclonaux (Rituximab, Cetuximab, Panitumumab...), de cytokines (interférons, interleukine 2) et des vaccins (vaccins à base de cellules dendritiques, vaccins anti-idiotypiques, vaccins à base de cellules tumorales entières...) dans le traitement de certaines pathologies cancéreuses. La finalité du traitement est l'activation de la réponse immunitaire en vue de l'élimination des cellules tumorales (13–15).

12. Los M, et al. *Drug Discov Today*. 2003; 8 (2) : 67-77.

13. Espinosa E, et al. *Cancer Treat Rev*. 2003; 29 (6) : 515-23.

14. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. *Eur J Pharmacol*. 2009; 625 : 41-54.

15. Los M. *Eur J Pharmacol*. 2009 ; 625: 1-5.

3- La chimiothérapie

Elle consiste en l'utilisation d'agents alkylants, d'antibiotiques, d'antimétabolites, d'inhibiteurs de la topoisomérase I et II, de dérivés de platine, d'inhibiteurs de la mitose ou d'autres substances (urées substituées, agents photosensibilisants, dérivés de la mélamine...) pour le traitement des cancers. L'objectif du traitement est l'induction de dommages au niveau de différents loci conduisant à un déséquilibre entre les signaux pro-apoptotiques et anti-apoptotiques aboutissant à la mort cellulaire (1,13,16).

En raison du développement de nouvelles stratégies en chimiothérapie, une nouvelle classification a été proposée par Espinosa et *al* (13) (Tableau 1). Cette nouvelle classification tient compte des cibles visées par ces molécules. En effet, celles-ci peuvent agir au niveau des cellules tumorales ou au niveau d'autres structures (endothélium, matrice extracellulaire, système immunitaire et cellules osseuses). Les différentes cibles peuvent être localisées au niveau de l'ADN, de l'ARN ou des protéines.

16. Makin G, *et al.* Trends Cell Biol. 2001; 11 (11) : S22-6.

Tableau 1 : Nouvelle classification des molécules anticancéreuses en fonction de leurs cibles (13)

Target		
Tumour	DNA	<i>Non-specific</i> DNA break: chemotherapy DNA-related proteins: chemotherapy
	RNA	<i>Specific</i> Hormonal therapy, retinoids Interferon α Gene therapy
	Proteins	Antisense oligonucleotides <i>Membrane receptors</i> Extracellular domain: MoAb Intracellular domain: small molecules <i>Cytoplasm</i> Intracellular pathways: small molecules Tubulin: chemotherapy
Endothelium (*)	DNA	Combretastatin
	Proteins	Monoclonal antibodies Small molecules
Extracellular matrix	MMPs	MMPs inhibitors
	Other elements	Monoclonal antibodies and small molecules
Immune system	Lymphocytes and macrophages	Interferons Interleukin2 Vaccines
Host cells	Bone cells	Bisphosphonates, osteoprotogerin

Bien que plusieurs classes de protéines soient impliquées dans le développement du cancer, trois catégories de cibles sont privilégiées. Il s'agit des récepteurs et marqueurs de surface cellulaires, des protéines sécrétées et des kinases intracellulaires (3). Ce ciblage s'appuie sur la mise en évidence de la production excessive d'hormone, de facteur de croissance, de récepteur de protéines kinases ou de protéines kinases dans plusieurs cancers. En raison du rôle important des protéines kinases dans la signalisation et la transduction cellulaire ainsi que leurs implications dans la croissance et la division cellulaire, les recherches se sont orientées vers le développement d'inhibiteurs de protéines kinases pour le traitement des cancers (1,3). La signalisation cellulaire consiste en plusieurs séquences d'événements incluant des modifications covalentes (phosphorylation), le recrutement, l'activation ou l'inhibition allostérique et la liaison aux protéines (17). Différentes modifications au niveau cellulaire entraînent parfois une dysrégulation des

17. Hornberg JJ, *et al.* Biosystems. 2006; 83 : 81-90.

kinases du cycle cellulaire. Les récentes découvertes sur les gènes humains impliqués dans le cancer ont montré une surexpression de certaines protéines kinases démontrant ainsi une corrélation entre ces kinases et le développement de certaines formes de cancer (3).

II- Les protéines kinases

A- Généralités sur les protéines kinases

Les protéines kinases constituent un groupe très répandu d'enzymes qui catalysent le transfert du groupe phosphate de l'ATP vers les résidus sérine, thréonine ou tyrosine de certains substrats spécifiques. Ces enzymes transfèrent le γ -phosphate de l'ATP (ou GTP) pour générer des mono-esters de phosphate en utilisant les groupements alcools (sérine ou thréonine) ou phénols (tyrosine) des protéines comme accepteur de phosphate (18). Cette phosphorylation module la fonction de divers substrats (facteurs de transcription, enzymes métaboliques et autres kinases). Les protéines kinases jouent un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire et leurs dysfonctionnements entraînent de nombreuses pathologies (19). La majorité des protéines kinases présentes chez les eucaryotes appartient à la superfamille des ePKS (eucaryotic protein kinase superfamily), les autres appartenant à la famille des histidine-protéine kinases des procaryotes. Ces ePKS sont retrouvées chez les mammifères et autres vertébrés mais aussi au niveau des plantes, des champignons et chez les protozoaires. Le domaine catalytique encore appelé domaine à activité kinasique des ePKS est constitué d'environ 250 à 300 acides aminés (18).

B- Classification des protéines kinases de la superfamille eucaryotes

La première classification des protéines kinases a été proposée par Hanks et *al.* (18) qui ont reparti ces protéines kinases en différentes classes, groupes et sous-famille en fonction des caractéristiques de leur domaine catalytique.

Par la suite, dans la ressource en ligne KinBase (<http://www.kinase.com/kinbase/>), la nouvelle classification divise les protéines kinases des cellules eucaryotes en deux grands groupes ; celui des protéines kinases conventionnelles (ePKs) et celui des protéines kinases atypiques (aPKs) (20). Les ePKs sont classifiées en huit familles (Tableau 1). Cette

18. Hanks SK, *et al.* FASEB J. 1995; 9 (8) : 576-96.

19. Higgins JMG. Protein Sci. 2001;10(8):1677-84.

20. Manning G, *et al.* Trends Biochem Sci. 2002; 27 (10) : 514-20.

classification tient compte de la similarité des domaines catalytiques, de la présence de domaine accessoire et du mode de régulation de l'activité de ces kinases (18,21,22). Ces huit familles sont réparties comme suit (22,23) :

-la famille des AGC regroupant les nucléotides cycliques et calcium-phospholipide-dépendant kinases, la ribosome S6-phosphorylating kinase, les kinases couplées à la protéine G, et kinases similaires

-les CAMKS (les kinases régulant la calmoduline)

-la famille des CK1 (caséine kinase et kinases apparentées)

-la famille des CGMC : CDK (cyclin dépendant kinase), MAPK (mitogene-activated protein kinases), CDK-like kinases et GSK (glycogen synthase kinase)

-la famille des RGC : kinases des récepteurs à la guanylate cyclase et les tyrosines kinases

-la famille des STE incluant plusieurs kinases qui interviennent dans la cascade des MAP kinases

-la famille des tyrosines kinases (TK)

-la famille des tyrosines kinases like-kinases (TKLs) regroupant les tyrosines kinases ayant dans certains cas une activité sérine-thréonine kinase (Tableau 2)

Le deuxième groupe comporte les autres kinases atypiques dont la structure est divergente de celles des autres kinases mais qui possèdent aussi une activité kinasique (22). Ces kinases atypiques sont regroupées dans quatre familles principales (22) (Tableau 3) :

-Alpha kinases (24)

-PIKK (phosphatidyl inositol 3 kinase-related kinases) (24)

-PHDK (pyruvate dehydrogenase kinase) (24)

-RIO (right open reading frame) (25)

21. Manning G. *et al.* Science. 2002; 298 (5600) : 1912-34.

22. Miranda-Saavedra D. *et al.* Proteins Struct Funct Bioinforma. 2007; 68 (4) : 893-914.

23. Hanks SK. Genome Biol. 2003; 4 : 111.

24. Martin DMA. *et al.* Nucleic Acids Res. 2009; 37 (suppl 1) : D244-50.

A ces différentes familles sont ajoutées les kinases BRD (bromodomain-containing kinases) (22), ABC1 (ABC1 domain-containing kinase) (22,25), TIF1 (transcriptional intermediary factor 1) (22).

Plus récemment, à ce groupe de protéine kinase atypique a été ajouté la protéine kinase Haspin (20,26).

25. Leonard CJ, *et al.* Genome Res. 1998 ; 8 (10) : 1038-47.

26. Higgins JMG, *et al.* Cell Mol Life Sci. 2003; 60 (3) : 446-62.

Tableau 2 : Classification des ePKs recensées chez l'homme (23)

The 428 human ePKs with known or likely kinase catalytic function				
Group	Number within group	Family	Number within family	Family members (SUGEN nomenclature)
TK	84	Ack	2	ACK, TNK1
		Abl	2	ABL, ARG
		Csk	2	CSK, CTK
		FAK	2	FAK, PYK2
		Fer	2	FER, FES
		JAK	4	JAK1, JAK2, JAK3, TYK2
		Src	11	BLK, BRK, FGR, FRK, FYN, HCK, LCK, LYN, SRC, SRM, YES
		Syk	2	SYK, ZAP70
		Tec	5	BMX, BTK, ITK, TEC, TXK
		Alk	2	ALK, LTK
		Axl	3	AXL, MER, TYRO3
		DDR	2	DDR1, DDR2
		EGFR	3	EGFR, HER2/ErbB2, HER4/ErbB4
		Eph	12	EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4
		FGFR	4	FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4
		InsR	3	IGF1R, INSR, IRR
		Lmr	3	LMR1, LMR2, LMR3
		Met	2	MET, RON
		Musk	1	MUSK
		PDGFR/VEGFR	8	FLT3, FMS, KIT, PDGFRa, PDGFRb, FLT1, FLT4, KDR
		Ret	1	RET
		Ror	2	ROR1, ROR2
		Sev	1	ROS
Tie	2	TIE1, TIE2		
Trk	3	TRKA, TRKB, TRKC		
AGC	61	PKA	5	PKACa, PKACb, PKACg, PRKX, PRKY
		PKG	2	PKG1, PKG2
		PKC	9	PKCa, PKCb, PKCd, PKCe, PKCg, PKCh, PKCi, PKCt, PKCz
		AKT	3	AKT1, AKT2, AKT3
		DMPK	7	CRIK, DMPK1, DMPK2, MRCKa, MRCKb, ROCK1, ROCK2
		GRK	7	BARK1, BARK2, GPRK4, GPRK5, GPRK6, GPRK7, RHOK
		MAST	5	MAST1, MAST2, MAST3, MAST4, MASTL
		NDR	4	LATS1, LATS2, NDR1, NDR2
		PKB	1	PDK1
		PKN	3	PKN1, PKN2, PKN3
		RSK	9	MSK1, MSK2, RSK1, RSK2, RSK3, RSK4, SgK494, p70S6K, p70S6Kb
		SGK	3	SGK, SGK2, SGK3
		YANK	3	YANK1, YANK2, YANK3
CAMK	66	CAMK1	5	CaMK1a, CaMK1b, CaMK1d, CaMK1g, CaMK4
		CAMK2	4	CaMK2a, CaMK2b, CaMK2d, CaMK2g
		CAMKL	20	AMPKa1, AMPKa2, BRSK1, BRSK2, CHK1, HUNK, LKB1, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, MEL, NIMI, NuaK1, NuaK2, PASK, QIK, QSK, SIK, SNRK
		DAPK	5	DAPK1, DAPK2, DAPK3, DRAK1, DRAK2
		DCAMKL	3	DCAMKL1, DCAMKL2, DCAMKL3
		MAPKAPK	5	MAPKAPK2, MAPKAPK3, MAPKAPK5, MNK1, MNK2
		MLCK	4	caMLCK, skMLCK, smMLCK, SgK085
		PHK	2	PHKg1, PHKg2
		PIM	3	PIM1, PIM2, PIM3
		PKD	3	PKD1, PKD2, PKD3
		PSK	1	PSKH1
		RAD53	1	CHK2
		Trio	4	Obscn, SPEG, Trad, Trio

Group	Number within group	Family	Number within family	Family members
CMGC	61	TSSK	5	SSTK, TSSK1, TSSK2, TSSK3, TSSK
		CAMK-Unique	1	STK33
		CDK	20	CCRK, CDC2, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, CDK11, CHED, CRK7, PCTAIRE1, PCTAIRE2, PCTAIRE3, PFTAIRE1, PFTAIRE2, PITSLRE
		MAPK	14	Erk1, Erk2, Erk3, Erk4, Erk5, Erk7, JNK1, JNK2, JNK3, NLK, p38a, p38b, p38d, p38g
		GSK	2	GSK3A, GSK3B
		CLK	4	CLK1, CLK2, CLK3, CLK4
		CDKL	5	CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKL5
		DYRK	10	DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, HIPK1, HIPK2, HIPK3, HIPK4, PRP4
		RCK	3	ICK, MAK, MOK
SRPK	3	MSSK1, SRPK1, SRPK2		
STE	45	STE7	7	MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3, MAP2K4, MAP2K5, MAP2K6, MAP2K7
		STE20	28	GCK, HPK1, KHS1, KHS2, LOK, MST1, MST2, MST3, MST4, MYO3A, MYO3B, OSR1, PAK1, PAK2, PAK3, PAK4, PAK5, PAK6, SLK, STLK3, TAO1, TAO2, TAO3, YSK1, ZC1/HGK, ZC2/TNIK, ZC3/MINK, ZC4/NRK
		STE11	8	MAP3K1, MAP3K2, MAP3K3, MAP3K4, MAP3K5, MAP3K6, MAP3K7, MAP3K8
		STE-Unique	2	COT, NIK
TKL	37	IRAK	2	IRAK1, IRAK4
		LISK	4	LIMK1, LIMK2, TESK1, TESK2
		LRRK	2	LRRK1, LRRK2
		MLK	9	DLK, HH498, LZK, MLK1, MLK2, MLK3, MLK4, TAK1, ZAK
		RAF	3	ARAF, BRAF, RAF1
		RIPK	5	ANKRD3, RIPK1, RIPK2, RIPK3, SgK288
		STKR	12	ACTR2, ACTR2B, ALK1, ALK2, ALK4, ALK7, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, MISR2, TGFbR1, TGFbR2
CKI	11	CKI	7	CK1a, CK1a2, CK1d, CK1e, CK1g1, CK1g2, CK1g3
		TTBK	2	TTBK1, TTBK2
		VRK	2	VRK1, VRK2
Other	63	Aur	3	AurA, AurB, AurC
		BUB	1	BUB1
		Bud32	1	PRPK
		CAMKK	2	CaMKK1, CaMKK2
		CDC7	1	CDC7
		CK2	2	CK2a1, CK2a2
		IKK	4	IKKa, IKKb, IKKe, TBK1
		IRE	2	IRE1, IRE2
		MOS	1	MOS
		NAK	4	AAK1, BIKE, GAK, MPSK1
		NEK	11	NEK1, NEK2, NEK3, NEK4, NEK5, NEK6, NEK7, NEK8, NEK9, NEK10, NEK11
		NKF1	3	SBK, SgK069, SgK110
		NKF2	1	PINK1
		NKF4	2	CLIK1, CLIK1L
		PEK	4	GCN2, HRI, PEK, PKR
		PLK	4	PLK1, PLK2, PLK3, PLK4
		TLK	2	TLK1, TLK2
		TOPK	1	PBK
		TTK	1	TTK
		ULK	4	Fused, ULK1, ULK2, ULK3
		VPS15	1	PIK3R4
WEE	3	MYT1, Wee1, Wee1B		
Wnk	4	Wnk1, Wnk2, Wnk3, Wnk4		
Other-Unique	2	KIS, SgK496		

Tableau 3 : Classification des aPKs

Organism/family	Protein length	KinBase accession number	Swiss-Prot accession number	Notes
<i>S. cerevisiae</i> /PIKK	2368	6319612_MEC1	P38111	ESR1 protein
<i>S. cerevisiae</i> /PIKK	2787	TEL1	P38110	Telomer length regulation protein TEL1
<i>S. cerevisiae</i> /PIKK	2470	TOR1	P35169	PI3K-related kinase TOR1
<i>S. cerevisiae</i> /PIKK	2473	TOR2	P32600	PI3K-related kinase TOR2
<i>S. cerevisiae</i> /PIKK	3744	TRA1	P38811	Transcription-associated protein 1
<i>D. melanogaster</i> /PIKK	3741	CG2905	Q818U7	DTRA1 (Transcription-associated protein 1). CG2905 and Q818U7 are isoforms
<i>D. melanogaster</i> /PIKK	3218	CG4549	Q9W3V6	Smg-1
<i>D. melanogaster</i> /PIKK	2429	CG6535	Q9VFB1	CG6535-PA
<i>D. melanogaster</i> /PIKK	2470	Tor	Q9VK45	Tor
<i>D. melanogaster</i> /PIKK	2354	mei-41	Q9VXG8	mei-41
<i>C. elegans</i> /PIKK	2697	B0261.2	Q95095	Target of rapamycin homolog (CeTOR), gene let-363
<i>C. elegans</i> /PIKK	3944	C47D12.1	Q6A4L2	Hypothetical protein C47D12.1b, gene trr-1
<i>C. elegans</i> /PIKK	2531	atl-1	Q22258	Hypothetical protein T06E4.3a
<i>C. elegans</i> /PIKK	649	atm-1	Q9N3Q4	ATM family protein 1
<i>C. elegans</i> /PIKK	2327	Smg-1	O01510	Smg-1 (suppressor with morphological effect on genitalia protein 1). KinBase smg-1 and O01510 are isoforms
<i>M. musculus</i> /PIKK	2635	ATR	Q9JKK8	No direct correspondence. Q9JKK8 is a fragment of KinBase ATR
<i>M. musculus</i> /PIKK	4128	DNAPK	P97313	DNA-dependent protein kinase
<i>M. musculus</i> /PIKK	2549	FRAP	Q9JLN9	FKBP12-rapamycin complex-associated protein
<i>M. musculus</i> /PIKK	3658	SMG1	Q8BLU4	smg-1
<i>M. musculus</i> /PIKK	3877	TRRAP	Q80YV3	Transformation/transcription-associated protein. TRRAP and Q80YV3 are isoforms
<i>H. sapiens</i> /PIKK	3056	ATM	Q13315	ATM ser/thr protein kinase
<i>H. sapiens</i> /PIKK	2644	ATR	Q13535	ATR
<i>H. sapiens</i> /PIKK	4128	DNAPK	P78527	DNA-dependent protein kinase
<i>H. sapiens</i> /PIKK	2549	FRAP	P42345	FKBP12-rapamycin complex-associated protein
<i>H. sapiens</i> /PIKK	3657	SMG-1	Q96Q15	PI3K-related protein kinase smg-1
<i>H. sapiens</i> /PIKK	3877	TRRAP	Q9Y4A5	Transformation/Transcription domain-associated protein
<i>S. cerevisiae</i> /RIO	484	6324693_RIO1	Q12196	Ser/Thr protein kinase RIO1
<i>S. cerevisiae</i> /RIO	425	6324122_RIO2	P40160	Ser/Thr protein kinase RIO2
<i>D. melanogaster</i> /RIO	585	CG11660	Q9VTL5	CG11660-PA, isoform A
<i>D. melanogaster</i> /RIO	538	CG11859	Q9UBU2	CG11859-PA
<i>D. melanogaster</i> /RIO	603	CG3008	Q9VR42	CG3008-PA
<i>C. elegans</i> /RIO	548	M01B12.5	O44959	Hypothetical protein M01B12.5
<i>C. elegans</i> /RIO	510	ZK632.3	P34649	Putative RIO-type ser/thr protein kinase
<i>C. elegans</i> /RIO	529	aSWK440	Q95Q34	Hypothetical protein Y105E8B.3
<i>M. musculus</i> /RIO	567	RIOK1	Q9CU84	RIOK1 ser/thr protein kinase
<i>M. musculus</i> /RIO	547	RIOK2	Q9CQ55	RIOK2 ser/thr protein kinase
<i>M. musculus</i> /RIO	519	RIOK3	Q9DBU3	RIOK3 ser/thr protein kinase
<i>H. sapiens</i> /RIO	568	RIOK1	Q9BRS2	RIO1 ser/thr protein kinase
<i>H. sapiens</i> /RIO	552	RIOK2	Q9BVS4	RIO2 ser/thr protein kinase
<i>H. sapiens</i> /RIO	519	RIOK3	O14730	RIO3 ser/thr protein kinase
<i>S. cerevisiae</i> /PDHK	445	6321379_YGL059W	P53170	Hypothetical 51.9 kDa protein in PYC-UBC2 intergenic region
<i>S. cerevisiae</i> /PDHK	394	6322147_YIL042C	P40530	Hypothetical 45.4 kDa protein in CBR5-NOT3 intergenic region
<i>D. melanogaster</i> /PDHK	413	PDK	P91622	Pyruvate dehydrogenase kinase
<i>C. elegans</i> /PDHK	401	ZK370.5	Q02332	Probable PDHK, mitochondrial precursor
<i>M. musculus</i> /PDHK	412	BCKDK	O55028	BCKDK, mitochondrial precursor
<i>M. musculus</i> /PDHK	434	PDHK1	Q8BFP9	PDHK, isozyme 1, mitochondrial precursor
<i>M. musculus</i> /PDHK	407	PDHK2	Q9JK42	PDHK2, mitochondrial precursor
<i>M. musculus</i> /PDHK	415	PDHK3	Q922H2	PDHK3, mitochondrial precursor
<i>M. musculus</i> /PDHK	412	PDHK4	O70571	PDHK4, mitochondrial precursor
<i>H. sapiens</i> /PDHK	412	BCKDK	O14874	BCKDK, mitochondrial precursor
<i>H. sapiens</i> /PDHK	436	PDHK1	Q15118	PDHK, isozyme 1, mitochondrial precursor
<i>H. sapiens</i> /PDHK	407	PDHK2	Q15119	PDHK, isozyme 2, mitochondrial precursor
<i>H. sapiens</i> /PDHK	406	PDHK3	Q15120	PDHK, isozyme 3, mitochondrial precursor
<i>H. sapiens</i> /PDHK	411	PDHK4	Q16654	PDHK, isozyme 4, mitochondrial precursor
<i>C. elegans</i> /Alpha	760	efk-1	O01991	Elongation factor-2 kinase
<i>M. musculus</i> /Alpha	1862	ChaK1	Q923J1	TRMP7
<i>M. musculus</i> /Alpha	2028	ChaK2	Q8CIR4	TRMP6
<i>M. musculus</i> /Alpha	724	eEF2K	O08796	Elongation factor-2 kinase
<i>H. sapiens</i> /Alpha	1907	AlphaK1	Q96L96	Muscle Alpha-kinase
<i>H. sapiens</i> /Alpha	1531	AlphaK2	Q96L95	Heart Alpha-kinase
<i>H. sapiens</i> /Alpha	1244	AlphaK3	Q96QP1	Lymphocyte Alpha-kinase
<i>H. sapiens</i> /Alpha	1865	ChaK1	Q96QT4	TRPM7 human
<i>H. sapiens</i> /Alpha	2012	ChaK2	Q9BX84-2	TRPM6
<i>H. sapiens</i> /Alpha	725	eEF2K	O00418	Elongation factor-2 kinase

C- Structure et fonctions des sous-domaines des protéines kinases

Le domaine kinasique des protéines kinases des cellules eucaryotes possède une structure bilobée composée d'un petit lobe N-terminal ou lobe N et d'un grand lobe C-terminal ou lobe C, reliés par une région charnière (27). A la jonction des deux lobes se trouve le site actif dont les acides aminés sont invariables. L'activité kinasique des protéines kinases est liée à la présence de motif indispensable à la liaison et à la catalyse de l'ATP/ Mg^{2+} . Trois fonctions principales sont attribuées à ce domaine catalytique (18) :

-la liaison et l'orientation du phosphate de l'ATP (ou GTP) dans un complexe avec un cation divalent qui est habituellement le magnésium (Mg^{2+}) ou le manganèse (Mn^{2+})

-la liaison et l'orientation du substrat

-le transfert du γ -phosphate de l'ATP (ou GTP) vers le résidu hydroxyle accepteur (sérine, thréonine ou tyrosine) du substrat.

Le domaine kinasique est divisé en douze sous-domaines (numérotés en chiffres romains) et défini comme étant les régions non interrompues par de grosses insertions d'acides aminés et contenant des résidus conservés.

Le lobe N-terminal (sous-domaine I à IV) est composé de feuillets β (reliés entre eux) et d'une hélice α (l'hélice αC). Il contient des résidus conservés indispensables à la liaison aux nucléotides (18,27). Le lobe C-terminal (sous-domaine VIA à XI) contenant majoritairement d'hélices est impliqué dans la liaison au substrat et l'initiation du transfert du phosphore (18,28). Entre ces deux lobes, se trouve le sous-domaine V qui constitue le site actif (18).

La fonction des douze sous-domaines est répartie comme suit (18):

- Sous-domaine I : il est constitué par les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ qui recouvrent et servent de point d'ancrage aux phosphates non-transférables de l'ATP. Ce sous-domaine contient le motif consensuel Gly-x-Gly-x-x-Gly-Val (x représente des acides aminés variables).

27. Huse M, *et al.* Cell. 2002; 109 (3) : 275-82.

28. Hunter T, *et al.* Trends Biochem Sci. 1997; 22 (1) : 18-22.

- Sous-domaine II : il contient une lysine invariable qui est essentielle pour une activité enzymatique maximale. Cette lysine interagit avec le feuillet $\beta 3$ et favorise l'ancrage et l'orientation de l'ATP par interaction avec l' α -phosphate ainsi que le β -phosphate.
- Sous-domaine III : il représente l'hélice αC . Il contient un résidu Glu conservé dans le centre de l'hélice et qui participe à la stabilisation des interactions entre la lysine (invariable du sous-domaine II) et les phosphates α et β de l'ATP.
- Sous-domaine IV : il correspond au feuillet hydrophobe $\beta 4$. Il contient des résidus variables qui ne jouent apparemment pas un rôle dans la catalyse ni la reconnaissance du substrat.
- Sous-domaine V : il relie le lobe N au lobe C et est composé du feuillet $\beta 5$ (très hydrophobe) du lobe N, de l'hélice αD du lobe C et d'une chaîne reliant les deux. Il contient des résidus favorisant l'ancrage de l'ATP par formation de liaison hydrogène avec l'adénine ou le ribose. La liaison à l'ATP se fait avec la boucle (boucle P ou boucle de liaison au phosphate) reliant $\beta 1$ et $\beta 2$ contenant un motif riche.
- Sous-domaine VIA : il est constitué par la grande hélice hydrophobe αE . Il sert de support à toute la structure.
- Sous-domaine VIB : il est constitué des feuillets hydrophobes $\beta 6$ et $\beta 7$ séparés par une boucle (boucle catalytique). Il contient deux résidus invariables (Asp et Asn) formant le motif consensuel His-Arg-Asp-Leu-Lys-x-x-Asn (HRDLKxxN) impliqués dans le mécanisme du transfert du phosphore. L'Asp est considéré comme une base catalytique. Il joue le rôle d'accepteur de proton lors de l'attaque du groupement hydroxyl du substrat. Les liaisons hydrogène entre ces deux acides aminés (Asn et Asp) stabilisent la boucle catalytique. De plus, l'Asn chélate l'ion Mg^{2+} qui forme un pont entre les phosphates α et γ de l'ATP (29).
- Sous-domaine VII : il est organisé en une structure feuillet $\beta 8$ -boucle-feuillet $\beta 9$. Il contient le motif conservé DFG (Asp-Phe-Gly) situé à la base de la boucle et stabilisant celle-ci par des liaisons hydrogènes entre l'acide aspartique et la glycine. Cet acide aspartique chélate l'ion Mg^{2+} qui forme un pont entre les phosphates β et γ de l'ATP et oriente le phosphate γ en vue de son transfert sur la protéine kinase.

29. Krupa A, *et al.* J Mol Biol. 2004 ; 339 (5) : 1025-39.

- Sous-domaine VIII : il contient le motif APE (Ala-Pro-Glu) qui se replie en une chaîne tortueuse en face de la région charnière. Ce résidu Glu forme une paire d'ions avec l'arginine conservé du domaine XI et participe à la stabilisation du lobe C. Ce sous-domaine joue un rôle important dans la reconnaissance du substrat. Plusieurs protéines kinases sont activées par la phosphorylation des résidus contenus dans ce sous-domaine.
- Sous-domaine IX : il correspond à l'hélice αF qui contient un acide aspartique conservé au niveau de la région NH_2 -terminale. Ce dernier interagit avec la liaison peptidique entre deux acides aminés (Arg et Tyr) du sous-domaine VIII et participe à la stabilisation de la boucle catalytique par des liaisons hydrogènes.
- Sous-domaine X : il est très peu conservé dans la superfamille et correspond à l'hélice αG . Sa fonction n'est pas clairement définie.
- Sous-domaine XI : il s'étend jusqu'à l'extrémité COOH terminale du domaine kinasique et contient un résidu conservé arginine très conservé situé entre les hélices αH et αI . (18).

La structure générale du domaine catalytique d'une sérine/thréonine ou tyrosine kinase est représentée sur la figure 2.

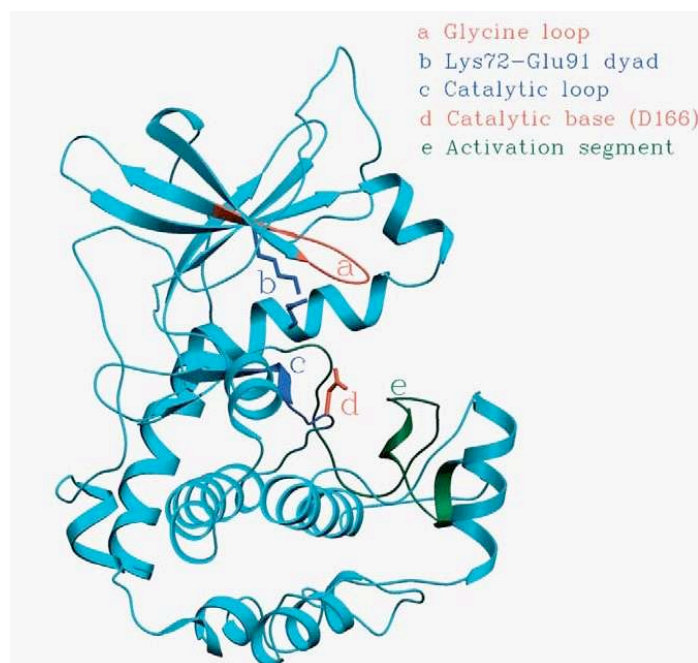


Figure 2: Représentation 3D du domaine catalytique d'une sérine/thréonine ou tyrosine kinase (29)

Le segment d'activation de ces protéines kinases localisé entre le motif DFG et le motif APE est constitué de quatre éléments (figure 3) (30):

- un site de liaison au métal (Mg^{2+}) constituant le motif DFG (Asp-Phe-Gly)
- un court feuillet β ($\beta 9$)
- une boucle d'activation
- une boucle P+1.

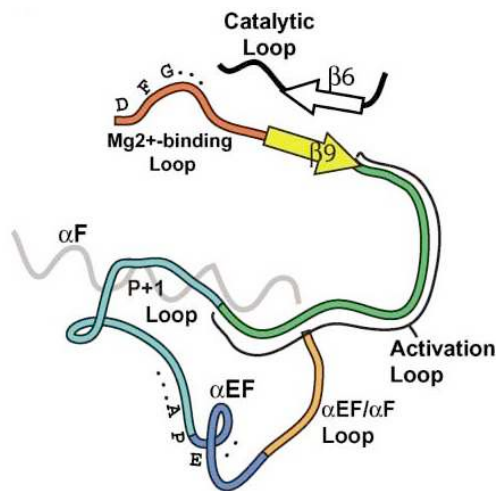


Figure 3 : Structure du segment d'activation (30)

La boucle P contient une séquence riche en glycine qui facilite l'approche des phosphates de l'ATP et coordonne les différentes interactions. Ces glycines confèrent une très grande flexibilité à la boucle P en l'absence de l'ATP (27). La phosphorylation résultant du transfert du phosphate de l'ATP stabilise le segment d'activation dans une conformation favorable à la liaison aux substrats (30).

Il a été montré que douze résidus de ces différents domaines varient très peu dans cette superfamille. Ces différents résidus jouent un rôle essentiel dans l'activité enzymatique (18). Chez l'homme, environ 10 % des ePKS ne possèdent pas un ou plusieurs motifs catalytiques essentiels et étaient considérés comme inactifs (21). Par la suite, il a été montré que la plupart de ces protéines sont des kinases actives. La protéine kinase Haspin appartient à ce groupe atypique.

30. Nolen B, *et al.* Mol Cell. 2004; 15 (5) : 661-75.

III- La protéine kinase Haspin

A- Distribution

L'ARN messager de Haspin (haploid germ cell-specific nuclear protein kinase) a été décrit pour la première fois au niveau de cellules germinales mâles des souris (31,32). Par la suite, il a été détecté au niveau des cellules diploïdes humaines. Il est retrouvé dans le thymus, la moelle épinière, le poumon, le foie et les ganglions lymphatiques de l'adulte ainsi que dans le tissu fœtal (33). L'ARNm de Haspin est aussi présent dans toutes les cultures de lignées cellulaires prolifératives en particulier dans les cellules Ramos B et Jurkat T, les cellules épithéliales du sein 16E6.A5, les cellules H69 du carcinome pulmonaire à petites cellules et les cellules SK-N-SH du neuroblastome (33).

La protéine kinase Haspin est aussi retrouvée dans les cellules eucaryotes d'autres vertébrés, chez les arthropodes, les nématodes, les champignons ainsi que dans les plantes (26,34).

La protéine kinase Haspin est codée par le gène Gsg2 (germ cell-specific gene 2) et possède une activité sérine/thréonine kinase (32).

B- Structure

La protéine kinase Haspin a une structure bilobée comme les ePKS avec un lobe N-terminal, un lobe C-terminal et une clé intermédiaire située entre les deux lobes (19). Malgré la différence de certaines séquences en comparaison avec les ePKs, Haspin conserve les résidus impliqués dans la liaison aux nucléotides, à l'ion Mg^{2+} et d'autres résidus indispensables à l'activité catalytique (35).

Le domaine catalytique de Haspin s'étend de la Lys-470 à la fin du lobe C-terminal par la Lys-798 (36). La structure générale de Haspin (acides aminés 452 à 798) est représentée sur la figure 4 (35).

31. Tanaka H, *et al.* FEBS Lett. 1994 ; 355 (1) : 4-10.

32. Tanaka H, *et al.* J Biol Chem. 1999 ; 274 (24) : 17049-57.

33. Higgins JMG. Gene. 2001 ; 267 (1) : 55-69.

34. Higgins JMG. Chromosoma. 2009 ; 119 (2) : 137-47.

35. Villa F, *et al.* Proc Natl Acad Sci. 2009 ; 106 (48) : 20204-9.

36. Eswaran J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2009 ; 106 (48) : 20198-203.

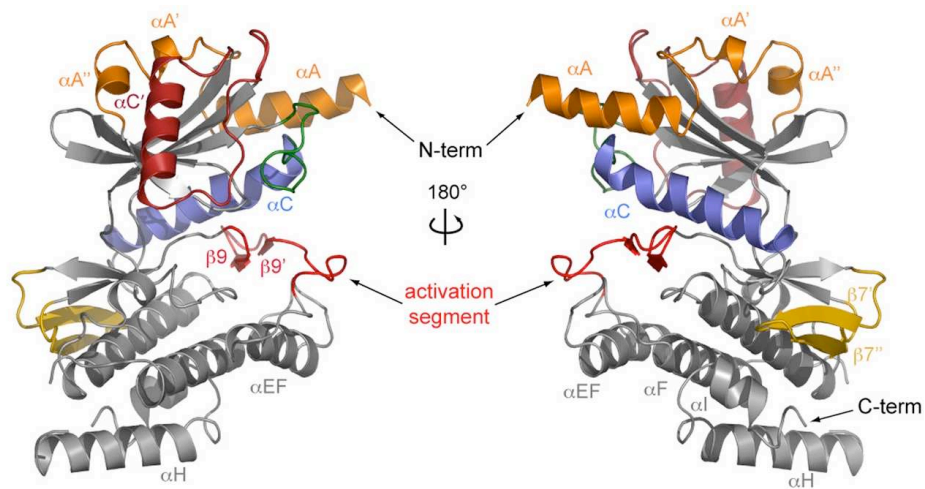


Figure 4 : Structure générale de Haspin⁴⁵²⁻⁷⁹⁸ (35)

La région N-terminale des protéines Haspin est très peu conservée entre les différentes espèces mais on note une prédominance des résidus sérine et arginine/lysine (7).

La comparaison de la structure de Haspin à la structure générale des ePKs a permis de mettre en évidence les similitudes ainsi que les divergences structurales.

1- Lobe N-terminal

Le lobe N-terminal de la kinase Haspin, caché sous une couche additionnelle, crée trois éléments distincts :

-le premier élément est une extension N-terminale (résidus 452 à 487) précédant la boucle riche en glycine ($\beta 1$ - $\beta 2$). La première partie de cette insertion est repliée sous forme d'une hélice α (αA : résidus 452 à 467). Elle surmonte l'hélice αC et contribue à sa stabilisation. Cette extension serpente la surface du lobe N-terminal et forme deux segments hélicoïdaux courts ($\alpha A'$ et $\alpha A''$) avant de se connecter au feuillet β . Les résidus conservés dans cette région (incluant Gln-469, Phe-475 et Leu-477) contribuent à sa stabilisation par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes (figure 5) (35).

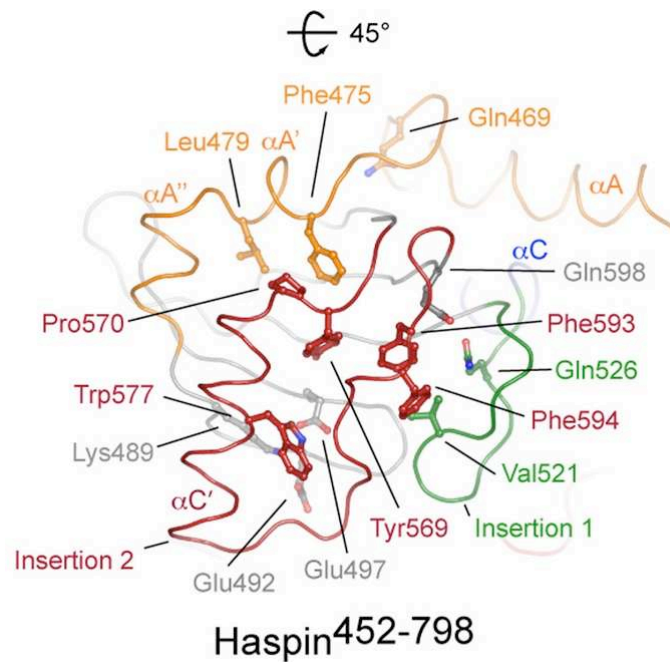


Figure 5 : Représentation de Haspin⁴⁵²⁻⁷⁹⁸ après une rotation de 45° par rapport à la figure précédente montrant les chaînes secondaires favorisant les différentes interactions critiques au niveau du lobe N (35)

-le deuxième élément est inséré entre β_3 et α_C (insertion 1 : résidus 515 à 528). L'insertion 1 forme une structure irrégulière mais rigide qui remplace l'hélice α_B observée chez les membres de la famille des ePKs (35).

-le troisième élément est inséré entre β_4 et β_5 (insertion 2 : résidus 567 à 598). L'insertion 2 est une structure rigide dont la première partie (résidus 571 à 584) est repliée sous forme d'une hélice α nommée α_C' (encore appelé ulH : upper lobe helix) maintenue en place par des interactions avec le cœur du lobe N-terminal par des liaisons secondaires entre Tyr-569 et Pro-570 (35). La Trp-577 de cette hélice établit des liaisons secondaires avec trois résidus de la boucle riche en glycine (Lys-489, Glu-492 et Glu-497) ce qui favorise la stabilisation de cette dernière dans une conformation favorable à sa liaison à l'ATP (figure 6). Cette hélice α est reliée au feuillet β_5 par une large boucle (Tyr-569 à Phe-593) (35,36).

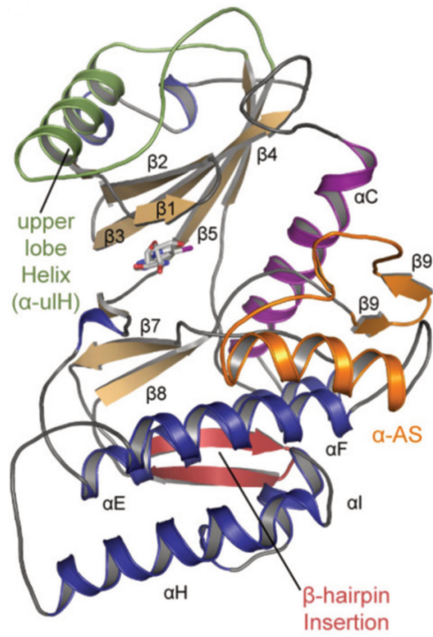


Figure 6 : Structure de Haspin montrant les différentes parties. L'hélice ulH en vert, le segment d'activation en jaune et l'insertion en tête d'épingle en marron (36)

Cette boucle interagit avec la boucle P sur toute sa longueur et crée un réseau d'interaction polaire entre Lys-489, Glu-492, Glu-497 (de la boucle riche en glycine) et Asn-588 (36). (Figure 7 et 8)

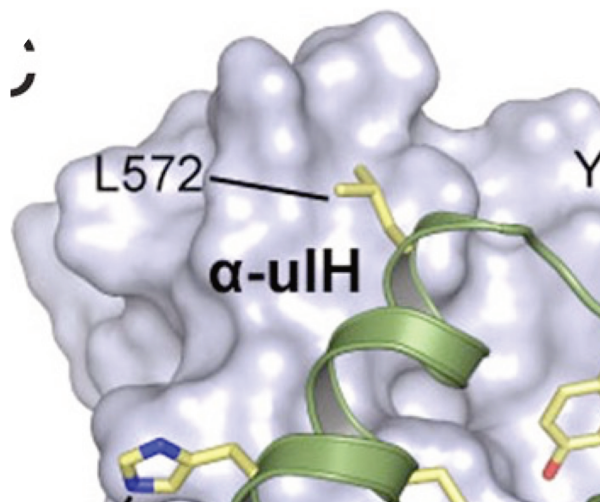


Figure 7 : Situation de l'insertion ulH (36)

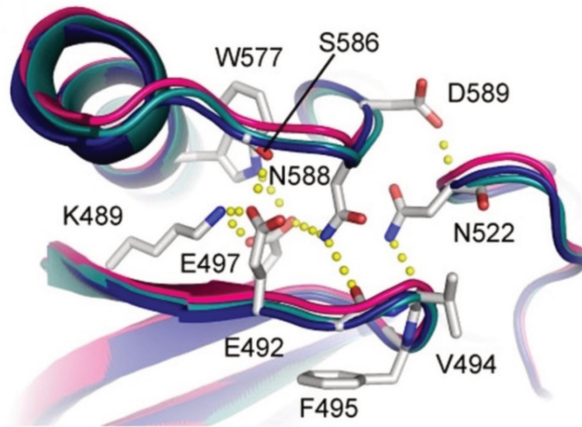


Figure 8 : Détail des interactions entre l'insertion ulH et la boucle P (36)

Les liaisons hydrogènes sont marquées sous forme de pointillés et les résidus aminés interagissant sont identifiés par leur symbole et leur position.

Habituellement mobile dans les autres kinases, l'hélice αC de Haspin est immobilisée par un grand nombre d'interactions hydrophobes (figure 9). Au niveau des autres kinases, divers mécanismes régulent l'orientation correcte de cette hélice favorisant la catalyse. Le pont salin entre αC (au niveau de Glu-535) et le résidu lysine du site actif (Lys-511) est une caractéristique principale présente au niveau des protéines actives. Ce pont salin est retrouvé au niveau des protéines kinases Haspin de toutes les espèces et indique le bon positionnement de l'hélice αC pour la catalyse. De plus, l'hélice αC est aussi relié au segment d'activation par différentes interactions hydrophobes avec le feuillet β de la boucle d'activation (36). Toutes ces caractéristiques structurales permettent à Haspin d'exister dans sa conformation active.

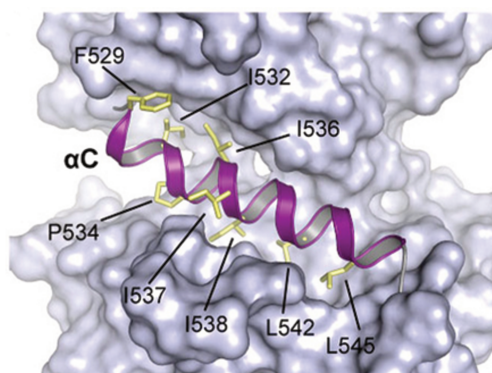


Figure 9 : Structure de l'hélice αC montrant les différentes interactions hydrophobes (36)

2- Lobe C-terminal

➤ Organisation du segment d'activation

L'organisation du segment d'activation ainsi que celle du site de liaison au substrat de Haspin est non conventionnelle. Ce segment d'activation est plus court que celui des ePKs classiques et présente les différences notables suivantes (36):

-le motif DFG (Asp-Phe-Gly) est changé en DYT (Asp-Tyr-Thr).

-il existe un feuillet additionnel β ($\beta 9'$) qui est antiparallèle au feuillet $\beta 9$ ce qui induit un raccourcissement de la boucle d'activation et une réorientation de la structure de ce segment (figure 6). Ce feuillet additionnel $\beta 9'$ relie le segment d'activation à l'hélice αC par plusieurs interactions hydrophobes.

-on note une absence du feuillet $\beta 6$ qui est habituellement présent chez les ePKs (figure 6). Il est antiparallèle au feuillet $\beta 9$ au niveau des ePKs. Au niveau de Haspin, ce feuillet $\beta 6$ est remplacé par le feuillet $\beta 9'$.

-le motif APE (Ala-Pro-Glu), la boucle P+1 sont remplacés par la large insertion hélicoïdale αAS (Gln-718 à Lys-727) (figure 6). La totalité du segment d'activation est bien structurée et est dans sa conformation active. L'architecture inhabituelle du segment d'activation (présence des résidus acides : Asp-707, Glu-708 et Asp-709, absence de la boucle P+1 et du motif APE) altère significativement la liaison du substrat à son site (35).

-la présence d'un cœur aromatique qui stabilise la conformation du segment d'activation est remarquée au niveau de Haspin chez toutes les espèces.

-le motif arginine (Arg-648) de la boucle catalytique HRD (His-Arg-Asp) forme une liaison hydrogène avec le sommet de la boucle d'activation et reliant ces segments entre eux. Habituellement, ce motif arginine interagit avec les résidus phosphates dans les sérine/thréonine kinases permettant la phosphorylation et l'activation de ce segment.

➤ L'insertion supplémentaire

On note la présence d'une insertion β (Lys-663 à Cys-679) sous forme d'une tête d'épingle entre les boucles $\beta 7$ et $\beta 8$ (figure 6). Cette 3^{ème} insertion contenant deux feuillets β ($\beta 7'$ et $\beta 7''$) s'étend à l'arrière du domaine catalytique et interagit avec la boucle αC - $\beta 4$ par

des liaisons hydrogènes entre Asn-670 et Asn-551 (35,36). Cette insertion est aussi retrouvée au niveau de CLK (Cdc2-like kinase) mais son orientation est différente.

Les différentes interactions entre le lobe C et le lobe N sont représentées sur la figure 10.

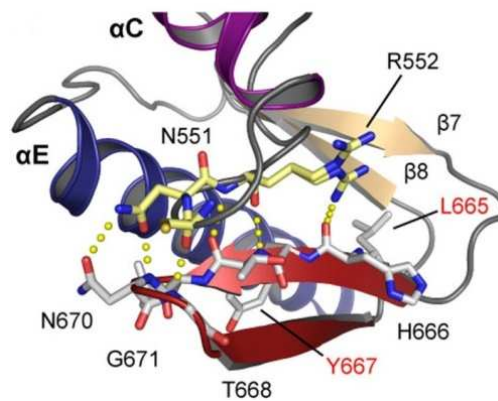


Figure 10 : Interactions entre l'insertion β en tête d'épingle, le lobe C-terminal à l'hélice αC . Les liaisons hydrogènes sont marquées sous forme de pointillés et les résidus aminés interagissant entre eux sont identifiés par leur symbole et leur position (36)

➤ Absence de l'hélice αG

L'hélice αG qui forme une partie du site de liaison au substrat au niveau des autres kinases est absente. Habituellement cette hélice est proéminente sur la face du lobe C-terminal (26,34–36).

C- Le substrat de Haspin

Dans la chromatine, les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont organisées en structures complexes avec l'ADN pour former les chromosomes. Ces histones subissent plusieurs modifications telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation. Ces différentes modifications produisent un haut degré de complexité qui constitue la base de la régulation du contrôle de la structure des chromatides. Ces histones constituent les principales cibles des différentes kinases. En effet, les différentes histones contiennent plusieurs résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés par différentes kinases (37).

37. Dai J, *et al.* Genes Dev. 2005; 19 (4) : 472-88.

Actuellement, le seul substrat connu de la kinase Haspin est l'histone H3 (37,38). Différentes phosphorylations sont possibles au niveau de l'extrémité N-terminale de cette histone sur la sérine 10 (H3S10phosph), la sérine 28 (H3S28phosph), la thréonine 11 (H3T11phosph) et la thréonine 3 (H3T3phosph). Haspin phosphoryle l'histone H3 sur la thréonine 3 au cours des premières étapes de la mitose (39). La localisation de H3T3phosph varie au cours de la mitose. Durant la prophase, H3T3phosph est détecté au niveau du chromosome puis on observe sa décroissance durant l'anaphase. H3T3phosph est absent durant la télophase. Sa déphosphorylation survient au cours de l'anaphase (37).

Les phénomènes électrostatiques de la surface de Haspin ainsi que sa forme favorise l'insertion de l'extrémité basique de l'histone H3 au niveau du sillon étroit formé entre l'hélice uH et le segment d'activation (36).

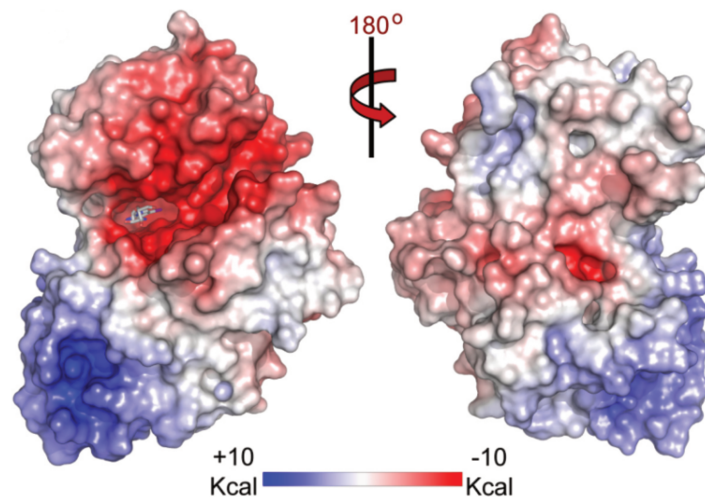


Figure 11 : Structure de Haspin montrant la charge négative de la partie supérieure servant de point d'ancrage à l'histone H3. La partie inférieure quant à elle contient des régions chargées positivement (36)

Les différentes interactions entre les acides aminés de Haspin et de l'histone H3 sont détaillées sur la figure 12 (40).

38. Dai J, *et al.* Cell Cycle. 2005; 4 (5) : 665-8.

39. Polioudaki H, *et al.* FEBS Lett. 2004; 560 : 39-44.

40. Maiolica A, *et al.* Mol Cell Proteomics. 2014; 13 (7) : 1724-40.

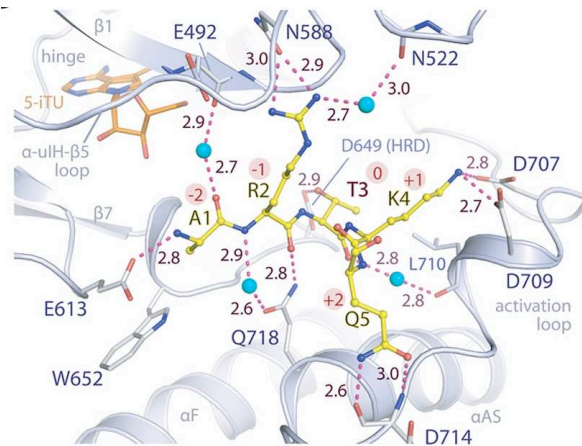


Figure 12 : Interactions entre l'histone H3 et la kinase Haspin (40)

La déphosphorylation de H3T3phosph survient en fin de mitose et est médiée par le complexe PP1 γ /Repo-Man (41). La PP1 (protein phosphatase 1) est une sérine/thréonine phosphatase qui assure la déphosphorylation de différentes protéines au cours de la mitose. Son action est contrôlée par les PIPs (PP1 interacting protein) qui sont des sous-unités d'adressage. Parmi ces PIPs figurent la protéine Repo-Man qui à une action sélective sur la phosphatase PP1 et restreint l'activité phosphatase de PP1 à H3T3phosph. Elle se lie à la PP1 au niveau du motif RVXF et favorise sa localisation au niveau de la chromatine lors de la transition métaphase-anaphase au cours de la mitose (42,43). En fin de mitose, la phosphatase PP1 (principalement l'isoforme γ) assure aussi la déphosphorylation de H3S10phosph, H3T11phosph et H3S28phosph. La protéine Repo-Man promeut la déphosphorylation de H3T11phosph par un mécanisme indirect (41).

D- Rôle de l'histone H3T3 phosph durant la mitose

La mitose est un processus contrôlé et régulé par diverses protéines kinases avec l'existence de différents points de contrôle (check points). Le cycle cellulaire est composé de cinq phases (phase G0, phase G1, phase S, phase G2 et mitose). En début de cycle cellulaire, les cellules normales sont en phase G0. Ces cellules sous l'action des facteurs de croissance passent en phase G1. A cette étape, les cellules possèdent une seule copie de l'ADN. La cellule passe ensuite à la phase S au cours de laquelle, on observe une croissance cellulaire avec duplication de l'ADN. Par la suite, la cellule passe à la phase G2 et entre mitose. Au

41. Qian J, *et al.* Curr Biol. 2011; 21 (9) : 766-73.

42. Trinkle-Mulcahy L, *et al.* J Cell Biol. 2006 ; 172 (5) : 679-92.

43. Vagnarelli P, *et al.* Dev Cell. 2011; 21 (2) : 328-42.

cours de la phase G2, on observe une réplication des centrosomes. Entre la phase G2 et S, il y existe un point de contrôle (DNA damage checkpoint) permettant de vérifier les altérations éventuelles de l'ADN. Cette étape ne peut être franchie si l'ADN est altéré (4,34,44).

La première étape de la mitose est la prophase. Au cours de la prophase, l'enveloppe nucléaire est dégradée et les chromosomes se condensent. Ensuite la cellule passe en prométaphase au cours de laquelle les chromosomes sont attachés au niveau des microtubules reliés aux centrosomes. Durant cette étape, la cellule passe le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (SAC : spindle assembly checkpoint). La cellule reste à ce stade jusqu'à l'attachement correct des chromosomes aux centrosomes. Cette nouvelle étape franchie, le complexe promoteur de l'anaphase (APC : anaphase-promoting complex) est activé entraînant la dégradation des protéines régulant le cycle cellulaire (sécurine et cycline B) et promeut l'entrée des cellules en anaphase. Les chromosomes fils se séparent et la cellule entre en télophase durant laquelle les enveloppes nucléaires sont formées et la cellule se divise en deux cellules filles identiques. Les cellules filles retournent encore en phase G0 ou G1 pour poursuivre leur différenciation. Ces différents points de contrôle permettent à la cellule de s'assurer du bon déroulement du processus de division cellulaire (4,34,44).

Durant la mitose, Haspin est localisée au niveau des chromosomes (au niveau du centromère après la destruction de l'enveloppe nucléaire et au niveau des faisceaux de microtubules durant la métaphase) (37,38). La phosphorylation de l'histone H3 par Haspin entraîne une augmentation de la quantité de H3T3phosph au cours de la mitose. H3T3phosph permet le positionnement du CPC (chromosomal passenger complex) à l'intérieur du centromère (45). Le CPC est constitué de quatre éléments : Aurora B, INCENP (inner centromere protein), survivine et boréaline ou Dasra B (46). Aurora B est une sérine/thréonine kinase. Les trois autres éléments sont des sous-unités non enzymatiques qui contrôlent l'adressage, l'activité enzymatique et la stabilité de Aurora B (47). La survivine est un membre de la famille des IAP possédant un seul domaine BIR (baculovirus IAP repeat) responsable de sa dimérisation. La boréaline et l'INCENP sont liés à la survivine pour former

44. Vader G, *et al.* Cell Div. 2008; 3 (1) :1-9.

45. Wang F, *et al.* Curr Biol. 2011; 21 (12) : 1061-9.

46. Ruchaud S, *et al.* Cell. 2007; 131 (2): 230-1.

47. Lens SMA, *et al.* Mol Biol Cell. 2006; 17 (4) : 18.

un bloc de trois hélices par différentes interactions hydrophobes et électrostatiques (figure 13) (48).

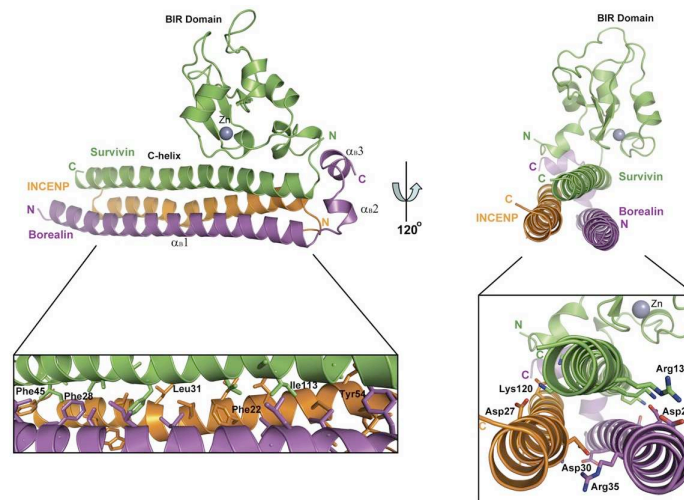


Figure 13 : Structure du block formé par la boréaline, INCENP et la survivine (48)

La phosphorylation de H3T3 crée un épitope sur l'histone H3 qui est reconnu par le domaine BIR de la survivine (20,21). Ce domaine BIR est constitué de trois feuilletts β antiparallèles entourés par quatre hélices α incluant un ion zinc dont le rôle structural (48,49).

Deux voies régulent le recrutement centromérique des CPC :

- la phosphorylation Bub1-dépendante de l'histone H2A sur la thréonine 120 crée un site de fixation pour la boréaline par l'action de shugoshine (50,51)
- la liaison directe de la survivine à l'H3T3phosph par son extrémité N-terminale (32,34,35,52)

La thréonine 3 phosphorylée de l'histone H3 s'insère dans une petite zone chargée positivement localisée entre Lys-62 et His-80 de la survivine en établissant une liaison hydrogène entre l'atome d'azote et l'atome d'oxygène du groupement phosphate. L'extrémité N-terminale de l'histone H3 entre directement en contact avec les groupements carboxylates de Asp-71 et de Glu-76. Le groupement amino de Lys-4 (chargée positivement) établit des liaisons secondaires avec les groupements carboxylates des Glu-51 et 63.

48. Jeyaprakash AA, et al Cell. 2007; 131 (2) : 271-85.
 49. Sun C, et al. Biochemistry. 2005; 44 (1) : 11-7.
 50. Kawashima SA, et al. Science. 2010; 327 (5962) : 172-7.
 51. Tsukahara T, et al. Nature. 2010; 467 (7316) : 719-23.
 52. Kelly AE, et al. Science. 2010; 330 (6001) : 235-9.

Plusieurs autres interactions hydrophobes contribuent aussi à la liaison à la survivine (figure 14) (53).

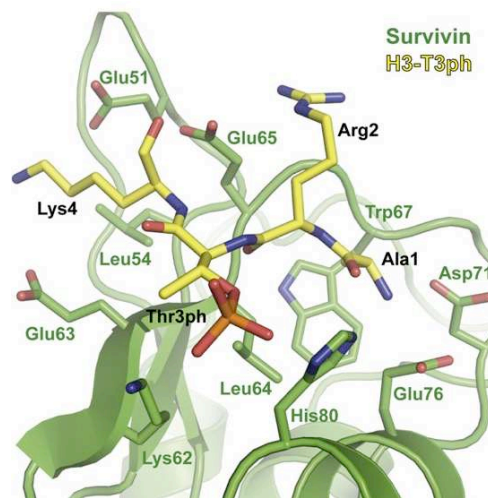


Figure 14 : Interaction entre le domaine BIR de la survivine et H3T3 phosph (53)

Par la suite, Aurora B se lie à la région C-terminale de l'INCENP (IN box) dont les acides aminés 822-877 sont impliqués dans la formation du complexe avec Aurora et les acides aminés 878-892 jouent un rôle critique dans l'activation de la kinase Aurora B. L'activation de la kinase Aurora B par l'INCENP se fait en deux étapes. En premier lieu, la liaison de l'INCENP active Aurora B qui à son tour phosphoryle l'INCENP au niveau du motif TSS (T893, S894 et S895). La phosphorylation de ces trois résidus permet d'avoir une activité maximale de la kinase Aurora B. Ce mécanisme constitue une boucle d'activation par rétrocontrôle positif (Figure 15) (54–59).

-
53. Jeyaprakash AA, *et al.* Structure. 2011 ; 19 (11) : 1625-34.
54. Adams RR, *et al.* J Cell Biol. 2001; 153 (4) : 865-80.
55. Bishop JD, *et al.* J Biol Chem. 2002; 277 (31) : 27577-80.
56. Honda R, *et al.* Mol Biol Cell. 2003; 14 (8) : 3325-41.
57. Sessa F, *et al.* Mol Cell. 2005; 18 (3) : 379-91.
58. Klein UR, *et al.* Mol Biol Cell. 2006; 17 (6) : 2547-58.
59. Carmena M, *et al.* Curr Opin Cell Biol. 2009; 21 (6) : 796-805.

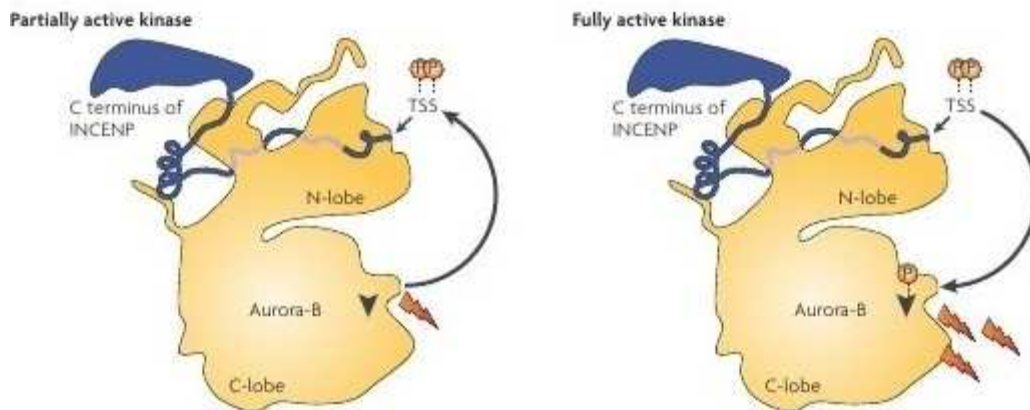


Figure 15 : Activation de la kinase Aurora B en deux étapes par l'INCENP (60). L'interaction avec l'INCENP active partiellement Aurora B qui s'autophosphoryle au niveau de la boucle T (tête de flèche en noir) et phosphoryle aussi le motif TSS de l'IN box conduisant à une stimulation de l'activité kinase (flash orange).

Au cours de la mitose, l'activité kinase de Aurora B est indispensable pour la localisation correcte du CPC (45). Au cours de la prophase et de la métaphase, le CPC est localisé au niveau du centromère. En début d'anaphase, il est transféré au milieu du fuseau. Le CPC est essentiel pour l'assemblage ainsi que la stabilité de fuseau mitotique et joue un rôle important dans la régulation de la ségrégation des chromosomes et dans la cytodierèse (44,47,58,60,61).

Dai *et al* (37,38) ont aussi montré que la déplétion de Haspin par l'ARNi prévient l'alignement normal des chromosomes durant la métaphase tandis que sa surexpression prolonge la durée de la métaphase. La déplétion de Haspin entraîne aussi une activation du point de contrôle du fuseau (SAC : spindle assembly checkpoint) et l'arrêt de la mitose dans une phase proche de la prométaphase. Ceci s'explique par la perte prématurée de la cohésion entre les chromosomes au niveau du centromère conduisant à la dissociation des chromatides. Cette perte de cohésion n'est pas due à l'activation prématurée de la voie APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome)-Séparase. Le prolongement de la durée de la mitose observée lors de la surexpression de Haspin est due à la stabilisation des bras des chromatides par prévention de la perte du complexe de la cohésine durant la mitose (62). Ce défaut de libération de la cohésine pourrait expliquer en partie l'allongement du délai entre la prophase et la prométaphase observée par Dai *et al* (37).

60. Ruchaud S, *et al*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8 (10) : 798-812.

61. Xu Z, *et al*. J Cell Biol. 2009; 187 (5) :637-53.

62. Dai J, *et al*. Dev Cell. 2006; 11 (5) : 741-50.

E- Régulation de l'activité de Haspin

L'extrémité N-terminale de la protéine kinase Haspin contient un segment riche en résidus basiques. Encore appelé HBIS (Haspin Basic Inhibitory Segment), ce segment inactive Haspin au cours de l'interphase par interaction directe avec son domaine kinasique (63). L'existence de ce segment explique l'inhibition de Haspin au cours de l'interphase étant donné que celle-ci existe déjà dans sa conformation active. L'activité de Haspin est régulée positivement et négativement par différentes kinases. Au cours de la mitose, la protéine kinase Haspin est hyperphosphorylée par différentes kinases au niveau de son extrémité N-terminale. Les études de spectrométrie de masse ont montré qu'elle possède 29 sites de phosphorylation potentiels. Parmi ces sites, neuf sont des sites potentiels de phosphorylation par Aurora B selon le consensus R/K-x-S/T et huit sont des cibles potentielles des CDKs (Cyclin-dependent kinases) (45,64).

A ce jour, différentes kinases sont connues pour potentialiser l'activité de Haspin : Polo-like kinase 1 (Plk1), Aurora B et Cdk1. Au cours de la mitose le régulateur de mitose Cycline B-Cdk1 phosphoryle Haspin au niveau de la sérine 128 de son extrémité N-terminale. Cette phosphorylation génère le motif S-T₁₂₈-P qui constitue un site de liaison pour Plk1 au niveau de son domaine PBD (Polo box domain). Plk1 se lie habituellement à plusieurs substrats par son domaine PBD sur des sites phosphorylés par le complexe Cdk1-Cycline B. La liaison de Plk1 à la kinase Haspin favorise la phosphorylation de Haspin par celle-ci sur plusieurs résidus de l'extrémité N-terminale. Ceci entraîne une cascade d'évènements qui neutralisent le segment HBIS et stimule l'activité kinase de Haspin. La levée de cette inhibition a pour conséquence une augmentation de la phosphorylation de H3T3 par Haspin (63,64). H3T3 ainsi phosphorylée permet le recrutement centromérique des CPC et active Aurora B. Aurora B activé phosphoryle à son tour Haspin. Cette phosphorylation amplifie la phosphorylation de H3T3 par Haspin qui à son tour favorise aussi le recrutement des CPC constituant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (45). La phosphorylation de Haspin par Aurora B est indispensable pour la phosphorylation complète de H3T3 par Haspin.

63. Ghenoiu C, *et al.* Mol Cell. 2013; 52 (5) : 734-45.

64. Zhou L, *et al.* EMBO Rep. 2014; 15 (3) : 273-81.

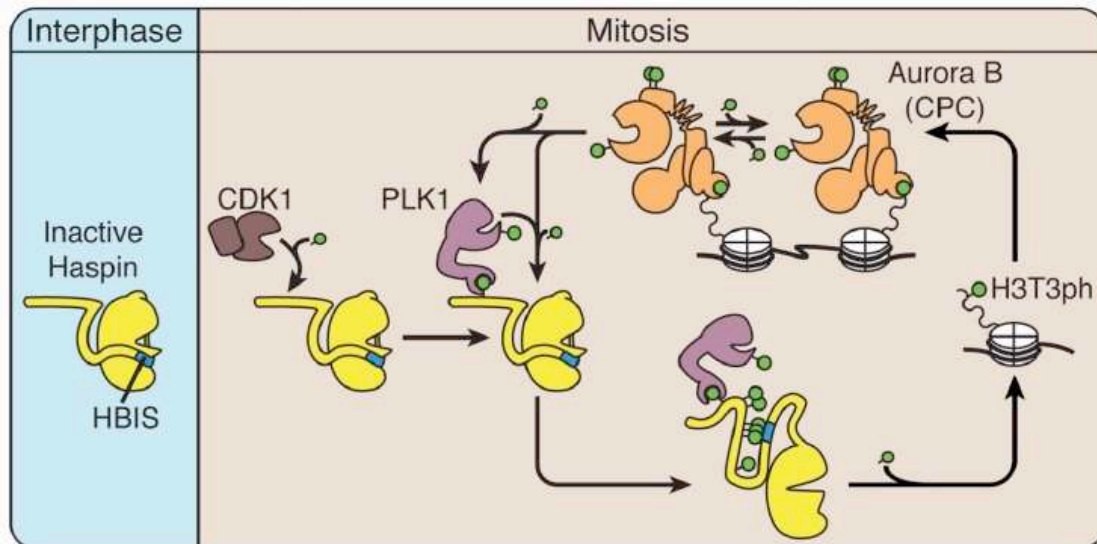


Figure 16 : Mécanisme d'activation de Haspin ainsi que sa boucle de rétrocontrôle positive (63). Durant l'interphase, l'activité kinase de Haspin est inhibée par le segment HBIS. Lorsque la cellule entre en mitose, Cdk1 activé phosphoryle l'extrémité N-terminale de Haspin entraînant une reconnaissance par Plk1 qui phosphoryle à son tour Haspin au niveau de son extrémité N-terminale. L'extrémité N-terminale phosphorylée interagit avec le segment HBIS et entraîne la libération du domaine kinasique activant ainsi Haspin. Haspin phosphoryle H3T3 qui se lie au CPC. Cette liaison de H3T3phosph au CPC entraîne l'autophosphorylation et l'activation de Aurora B. Aurora B activé phosphoryle à son tour Plk1 et Haspin provoquant une stimulation de l'activité de Plk1 ainsi que la phosphorylation de H3T3 par Haspin.

La mutation des sites de phosphorylation de la kinase Aurora B sur Haspin compromet les mécanismes de localisation centromérique des CPC. Il en est de même lors de l'inhibition de la kinase Aurora B par l'héspéradine qui est un inhibiteur connu de cette kinase (45). L'inhibition chimique de Plk1 durant la mitose ou son inhibition par l'ARNi réduit le taux de H3T3phosph dans les lignées cancéreuses HeLa. Les inhibiteurs de Plk1 retardent l'augmentation de H3T3phosph au cours de la prophase et diminuent son taux au cours de la prométaphase. Il apparaît clairement que l'activation de Haspin par Cdk1 et Plk1 au cours de la prophase est indispensable et préalable à l'activation par Aurora B. De plus, la phosphorylation de la thréonine 128 de Haspin par le régulateur de mitose Cycline B-Cdk1 restreint la génération de H3T3phosph à la mitose. La reconnaissance du motif S-T128-P par Plk1 limite la génération de H3T3phosph à la présence simultanée de Cdk1 et Plk1 activés. Tous ces mécanismes contrôlent le bon déroulement de la mitose et la régulation de l'attachement des kinétochores et microtubules (64).

L'inhibition de l'activité de la protéine kinase Haspin se fait de manière indirecte par la déphosphorylation de H3T3phosph. Cette déphosphorylation est médiée par la phosphatase PP1 γ principalement. L'activité de la phosphatase PP1 est contrôlée par les

protéines interagissant avec PP1 (PIPs : PP1 interacting proteins) spécialement Repo-Man dont le rôle est le recrutement de PP1 lors de l'anaphase. Au cours de l'interphase, Repo-Man est associé à l'histone H2B et joue un rôle important dans la régulation des mécanismes de réparation de l'ADN. En début de mitose, le régulateur de mitose Cdk1-Cycline B phosphoryle Repo-Man entraînant une diminution de son affinité pour la chromatine. Repo-Man se lie au bras des chromosomes durant l'anaphase et catalyse la déphosphorylation de H3T3phosph. Cette déphosphorylation entraîne une délocalisation des CPC du centromère. L'inactivation de Repo-Man cause une inhibition de la déphosphorylation de l'histone H3 au niveau des thréonines 3 et 11 (H3T3phosph et H3T11phosph). En raison du rétrocontrôle positif existant entre Haspin et Aurora B, le complexe PP1 γ /Repo-Man agit donc principalement comme un antagoniste de la kinase Haspin en catalysant la déphosphorylation de H3T3phosph en fin de mitose (41,43,65).

F- Haspin et cancer

Récemment, les études ont permis de faire un parallèle entre la dysrégulation du cycle cellulaire et la progression des cancers. Dans la plupart des cas de cancers, des altérations spécifiques au niveau des processus de régulation des kinases impliquées dans le cycle cellulaire ont été rapportées (66).

L'apparition des phénomènes de résistance aux premières molécules anticancéreuses (les agents alkylants, les poisons du fuseau, les anti-métabolites et les inhibiteurs de la topoisomérase I et II) constitue l'un des obstacles majeurs de l'efficacité des traitements. Ces mécanismes de résistance sont multifactoriels et impliquent différents processus (diminution de la recapture des molécules hydro-solubles, augmentation de la réparation des lésions de l'ADN, baisse de l'apoptose induite par les molécules, altération du métabolisme des molécules et augmentation des pompes à efflux ATP-dépendantes entraînant une diminution de l'efficacité, modification de l'expression de certaines enzymes...) (67–69). De plus, le manque de sélectivité de ces inhibiteurs se traduit par une action « out-of target » importante au niveau des cellules non-prolifératives. A partir des années 1980, les recherches se sont orientées vers la découverte de petites molécules

65. Peng A, et al. *Curr Biol.* 2010; 20 (5) : 387-96.

66. Pérez de Castro I, et al. *Curr Opin Pharmacol.* 2008; 8 (4) : 375-83.

67. Zheng T, et al. *Int J Cancer.* 2010; 126 (1) : 2-10.

68. Tan DS-W, et al. *Eur J Cancer.* 2010; (12) : 2166-77.

69. Ma X, et al. *Drug Discov Today.* 2009; 14 : 1136-42.

ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses et particulièrement les protéines impliquées dans le cycle cellulaire dans le but de limiter les effets toxiques des traitements anticancéreux (69).

Le ciblage de ces kinases du cycle cellulaire constitue de ce fait la nouvelle stratégie thérapeutique. Plusieurs molécules inhibant les kinases mitotiques ou impliquées dans la survie cellulaire sont utilisées dans le but d'arrêter la prolifération et de provoquer l'apoptose des cellules tumorales. Utilisée seule ou en combinaison avec d'autres traitements, cette nouvelle stratégie thérapeutique constituerait une meilleure option dont l'avantage serait l'augmentation de l'index thérapeutique. En raison du fait que ces kinases mitotiques sont exprimées durant le cycle cellulaire, elles constituent une bonne cible dans le traitement des tumeurs parce que les autres cellules (déjà différenciées) seraient épargnées. Les premières stratégies thérapeutiques utilisées ciblent les kinases majeures impliquées dans la régulation de la progression de la mitose telles que les CDKs, Aurora et Polo-like kinases (9,70). Les processus ciblés par ces nouvelles stratégies varient en fonction du rôle des différentes kinases au cours de la mitose (Figure 17). Malheureusement, dans la plupart des cas, les cellules tumorales développent des mécanismes compensatoires se traduisant par une tolérance à ces inhibiteurs (mutations au niveau de la boucle P ou niveau de la région reliant le lobe N au lobe C) (71). Aussi, en raison des effets délétères causés par l'inactivation des kinases visées par cette première génération d'inhibiteurs de kinases (toxicité embryonnaire, apparition d'effet indésirable dû à la suppression des autres fonctions de ces kinases) de nouvelles cibles ont été étudiées (66). Pour contourner le phénomène de résistance, une combinaison de molécules anticancéreuses est aussi de plus en plus utilisée. En effet, la sélectivité n'étant plus le principal objectif en matière de chimiothérapie, des combinaisons de substances cytotoxiques et d'inhibiteurs de kinases sont de plus en plus étudiées. De plus, de nouvelles molécules ayant plusieurs cibles ont été développées. Ces molécules dites « multitargeted » ainsi que les nouvelles combinaisons sont moins affectées par les problèmes de résistance que les molécules dites « single-target » (72). Toutefois, les recherches pour identifier de nouveaux inhibiteurs de kinases plus spécifiques sont encore en cours.

70. Lapenna S, *et al.* Nat Rev Drug Discov. 2009 ; 8 (7) : 547-66.

71. Balzano D, *et al.* Chem Biol. 2011; 18 (8) : 966-75.

72. Broxterman HJ, *et al.* Drug Resist Updat. 2005; 8 (4) : 183-97.

La kinase Haspin figure parmi les nouvelles cibles thérapeutiques étudiées (73). Elle joue un rôle important au cours de la mitose notamment dans la cohésion des chromosomes, de la formation de la plaque équatoriale et de la progression du cycle cellulaire (37,62,74). Ces différentes fonctions ont permis de considérer que les inhibiteurs de Haspin pourraient avoir un effet anti-mitotique et par conséquent pourraient être capables de prévenir la prolifération des cellules tumorales.

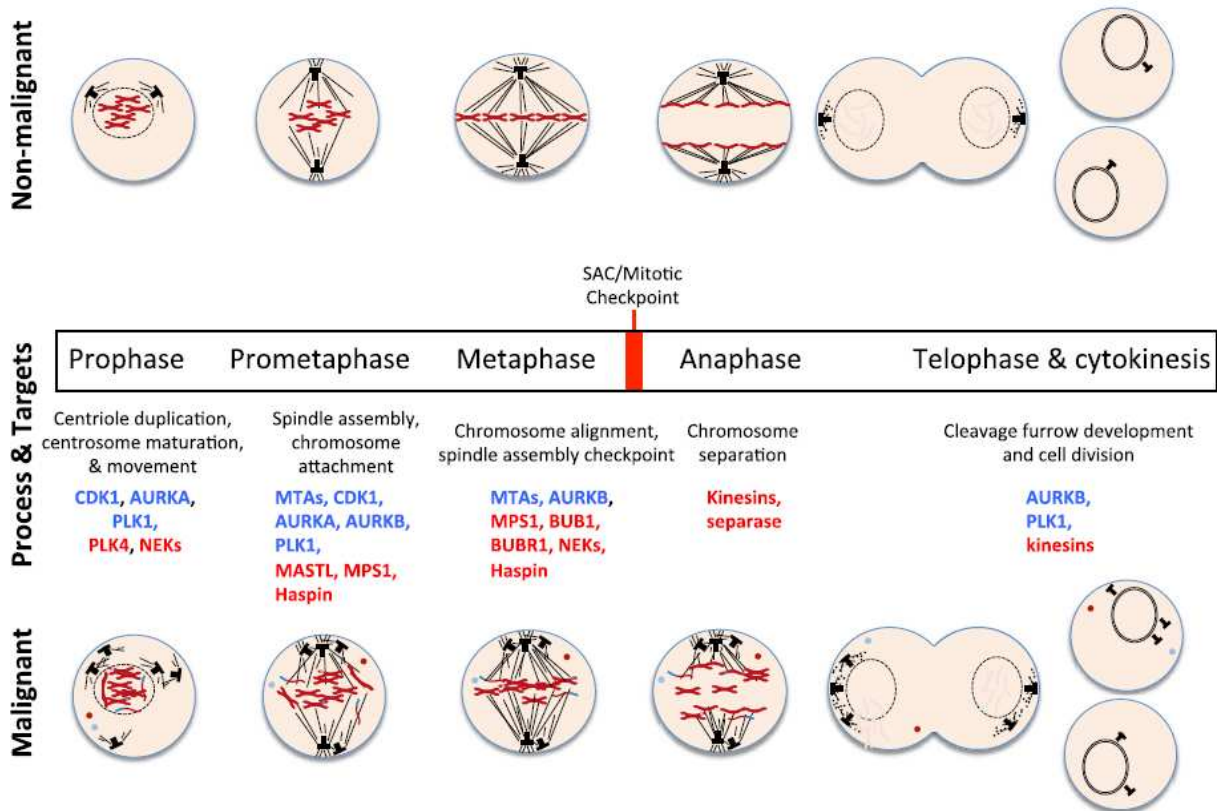


Figure 17 : Cycles cellulaires normale et lors du processus malin et les cibles thérapeutiques (en bleu, les anciennes et en rouge les nouvelles) (73)

Plusieurs facteurs militent en faveur du ciblage de la protéine kinase Haspin dans le traitement du cancer :

- l'ARNm de Haspin est fortement exprimé dans les cellules en prolifération en particulier les cellules Ramos B, Jurkat T et 16E6 (33)
- la structure atypique et différente de la kinase Haspin en comparaison des autres protéines kinases retrouvées chez les eucaryotes

73. Dominguez-Brauer C, *et al.* Mol Cell. 2015; 60 (4) : 524-36.

74. Dai J, *et al.* J Cell Sci. 2009; 122 (22) : 4168-76.

- le seul substrat connu actuellement de la kinase Haspin est l'histone H3. Par conséquent, son inhibition pourrait avoir moins d'effets indésirables que ceux observés suite à l'inhibition des autres protéines kinases.

Toutes ces observations ont conduit plusieurs équipes à axer leurs travaux sur l'identification et la synthèse de composés possédant une action inhibitrice sélective sur la protéine kinase Haspin. Ainsi, des inhibiteurs de Haspin de classe et de diverses structures ont été identifiés au cours des dernières années et leur mécanisme d'action élucidé.

G- Inventaire des inhibiteurs de Haspin

Les inhibiteurs de la kinase Haspin rapportés dans les travaux publiés au cours de ces dernières années sont essentiellement des petites molécules ayant pour point commun un élément polyhétérocyclique azoté. Il est possible de les répartir dans les cinq familles suivantes :

1- 5-iodotubercidine : 5-iodo-7-β-D-ribofuranosyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine

Il s'agit d'un dérivé de la pyrimidine dont la structure est représentée sur la figure 18. Encore appelé 5-ITu, il est initialement connu comme inhibiteur de l'adénosine kinase (75).

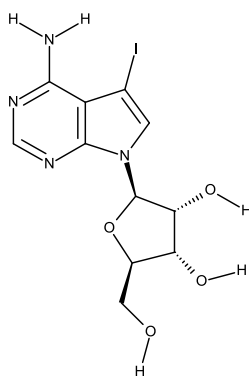


Figure 18 : Structure chimique du 5-iodotubercidine (75)

Par la suite, il a été décrit comme inhibiteur de sérine/thréonine kinase tel que la caséine kinase et la PKA (76). De récentes études ont montré que la 5-ITu interagit avec le site de liaison à l'ATP de Haspin (36).

75. Wotring LL, *et al.* Cancer Res. 1979; 39 (8) : 3018-23.

76. Fedorov O, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104 (51) : 20523-8.

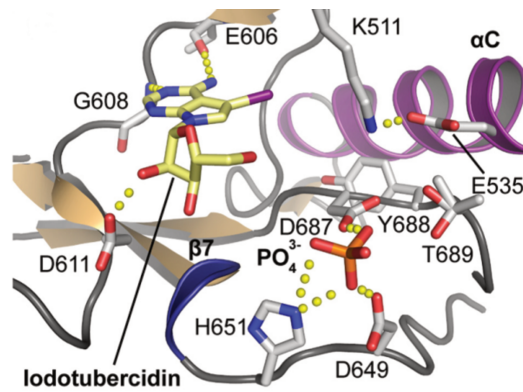


Figure 19 : Liaison de l'iodotubercidine et de l'ion phosphate au niveau du site de liaison de l'ATP de Haspin.

La 5-ITu est aussi active sur plusieurs autres kinases telles que CLK (Cdc2-like kinase) et DYRK (dual-specificity tyrosine Y regulated kinase) (77). Par ailleurs, elle est inactive sur plusieurs kinases mitotiques telles que Aurora A, Aurora B, Bub1, Cdk1/Cycline, Mps1, Nek2A et Plk1 (71,77). *In vitro*, la 5-ITu inhibe le domaine kinasique de Haspin avec une CI_{50} de 9 nM (71). Dans la gamme de concentration entre 0,1 et 5 μ M, la 5-ITu entraîne une décroissance de la quantité de H3T3phosph au niveau des cellules HeLa avec une inhibition complète pour une concentration de 10 μ M. Elle provoque aussi un déplacement dose-dépendante de la boréaline et de la kinase Aurora B des centromères. Ceci entraîne une anomalie de la bi-orientation des chromatides ainsi qu'un déplacement partiel de Bub1 et BubR1 (deux composants du point de contrôle de la mitose). Ces différentes perturbations en présence de 5-ITu n'affectent pas la cytotérière (77). La 5-ITu possède une bonne activité inhibitrice mais la présence d'iode dans sa structure n'en fait pas un bon candidat médicament.

2- CHR-6494 : 3-(1H-indazol-5-yl)-N-propylimidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

C'est une imidazopyridazine dont la structure est représentée sur la figure 20.

77. De Antoni A, *et al.* J Cell Biol. 2012; 199 (2) : 269-84.

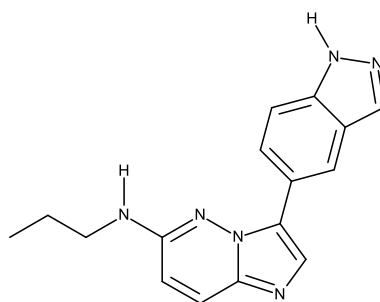


Figure 20 : Structure chimique du CHR-6494 (78)

Sa Cl_{50} est de 2 nM pour Haspin et de l'ordre du micromolaire pour un panel de 27 autres kinases. Elle entraîne une inhibition sélective dose-dépendante de la phosphorylation de H3T3 au niveau de trois lignées cellulaires cancéreuses : HeLa (col de l'utérus), HCT-116 (côlon) et MDA-MB-231 (poumon). Le test au XTT ((2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-(sulfophényl)2H-tétrazolium-5-carboxanilide) montre une inhibition de la croissance de ces trois lignées cellulaires avec des valeurs de Cl_{50} de 500 nM pour HCT-116, 473 nM pour HeLa et 752 nM pour MDA-MB-231. L'inhibition de la prolifération cellulaire observée est due à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M entraînant une apoptose. Les cellules présentent un défaut d'alignement des chromosomes avec une existence de fuseau multipolaire probablement causé par défaut de duplication du centrosome. Elle possède aussi une activité anti-angiogénèse *ex-vivo* et un effet antitumoral *in vivo*. L'histopathologie ne montre aucune anomalie au niveau des tissus sains chez les souris traitées par CHR-6494 (78).

3- Dérivés de l'acridine: LDN-192960 et LDN-209929

Ces deux composés sont des dérivés de l'acridine possédant une action inhibitrice de Haspin avec des Cl_{50} de 10 nM pour LDN-192960 et de 55 nM pour LDN-209929.

78. Huertas D, *et al.* Oncogene. 2012; 31 (11) : 1408-18.

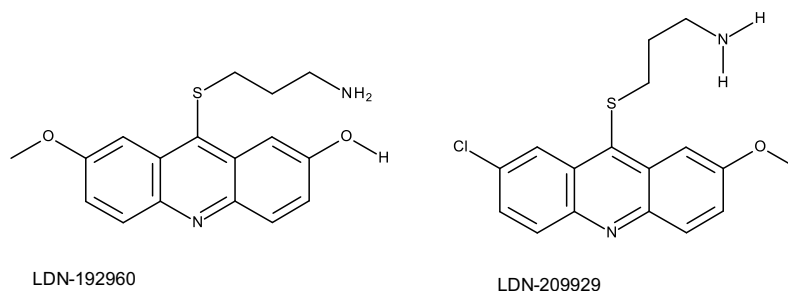


Figure 21 : Structure chimique du LDN-192960 et LDN-209929 (79,80)

Les études de relation structure-activité ont montré l'importance du tricyclic aromatique ainsi que d'un ou des deux groupements méthoxy pour l'activité inhibitrice (79,80).

Le composé LDN-192960 est sélectif vis-à-vis de Haspin (180 fois plus actif sur Haspin que sur DYRK2) (80).

4- Dérivés de la bêta-carboline

Des études préliminaires ont montré que l'harmine et l'harmol possèdent une activité inhibitrice modérée sur Haspin avec des Cl_{50} de 0,59 μ M et 0,77 μ M respectivement.

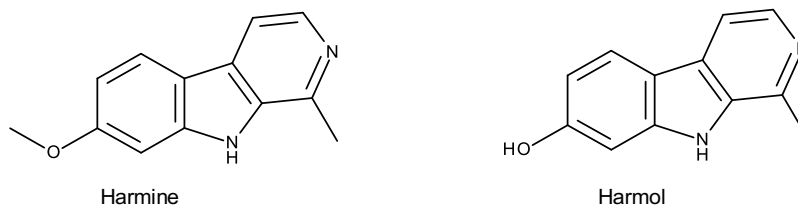


Figure 22 : Structure chimique de l'harmine et l'harmol (81)

Différents dérivés de la bêta-carboline ont été synthétisés en se basant sur les études de relation structure-activité des analogues de l'acridine précédemment décrits. Parmi les nouveaux composés synthétisés, le dérivé LDN-211898 a montré une meilleure activité inhibitrice sur Haspin avec une Cl_{50} de 0,1 μ M.

79. Patnaik D, *et al.* J Biomol Screen. 2008; 13 (10) : 1025-34.

80. Cuny GD, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2010; 20 (12) : 3491-4.

81. Cuny GD, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2012; 22 (5) : 2015-9.

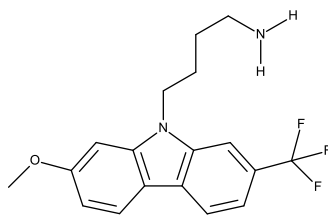


Figure 23 : Structure chimique du LDN-211898 (81)

Cette meilleure activité est obtenue par l'introduction d'une amine primaire en position 9 du cycle et d'un groupement trifluorométhyle en position 1. Testés sur un panel de 292 kinases à la dose de 10 μ M, ce composé inhibe treize kinases (CaMK2b, CaMK2d, CDK7-CycH-Mat1, cGK2, CK1d, CLK1, CLK2, DYRK1A, DYRK1B, DYRK3, PASK, PIM1 et PKD3) en plus de Haspin. La comparaison avec LDN-209929 montre que ces deux composés ont une activité inhibitrice commune sur six kinases (Haspin, CLK1, DYRK1A, DYRK1B, DYRK3 et PIM1). Le composé LDN-211898 présente l'avantage d'avoir une excellente stabilité métabolique dans les microsomes hépatiques de souris *in vitro* (81).

5- Les analogues conjugués de l'adénosine et d'oligoarginine (ARCs)

Ces analogues bisubstrats inhibiteurs de protéines kinases sont composés d'un fragment mimant les nucléosides se liant au site de fixation de l'ATP sur la kinase et d'un fragment peptidique se liant au site de fixation du substrat de la protéine kinase. Ces deux fragments sont reliés entre eux par une chaîne (82). La reconnaissance simultanée de la cible par les deux fragments augmente le potentiel inhibiteur de ces composés et constitue l'intérêt principal de leur utilisation (83). L'oligoarginine permet la reconnaissance de protéines kinases basophiles et facilite l'internalisation de ces conjugués à l'intérieur des cellules vivantes. Cette approche a été utilisée pour la synthèse d'inhibiteurs des protéines kinases basophiles du groupe des AGC en particulier cAMP-dependent protein kinase, ROCK-II et PKB/Akt (83–86). La même approche a été utilisée pour développer des analogues bisubstrats inhibiteurs de Haspin. Le lead utilisé dans ce cas est le composé ARC-902 (Figure 24).

82. Uri A, *et al.* Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics. 2010; 1804 (3) : 541-6.

83. Lavogina D, *et al.* ChemMedChem. 2010; 5 (1) : 23-34.

84. Enkvist E, *et al.* J Med Chem. 30 nov 2006; 49 (24) : 7150-9.

85. Enkvist E, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2007; 17 (19) : 5336-9.

86. Enkvist E, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2009; 19 (21) : 6098-101.

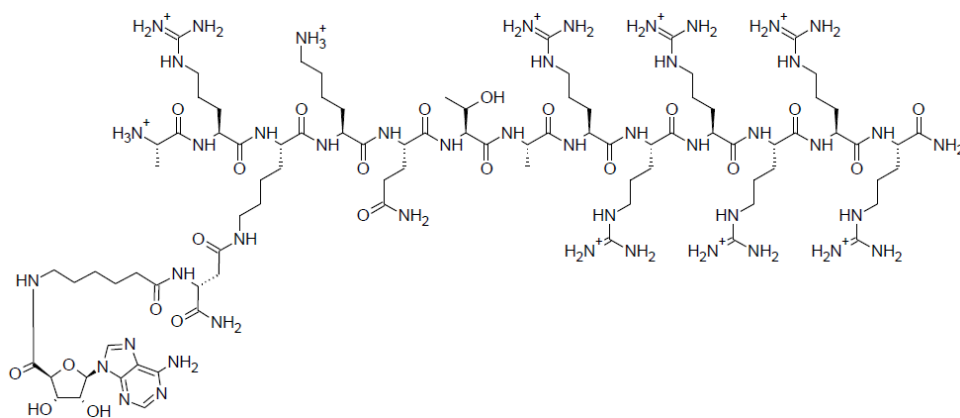


Figure 24 : Structure du composé ARC-902

L'utilisation d'un nucléoside mimant l'histone H3 (acide aminé 1 à 7) a été évaluée. Deux possibilités d'interactions avec le peptide histone H3-like ont été envisagées. Les différents conjugués synthétisés contiennent le résidu acide 5-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-thiophène-2-carboxylique (AMTH) ou l'acide adénosine-4'-déhydrométhyl-4'-carboxylique (Adc) comme fragment ciblant le site de liaison de l'ATP sous forme d'un carboxamide. Au niveau de la chaîne peptidique, l'alanine en position 1 de l'histone H3 est remplacée par différents acides aminés (D-Lys, acide D-diaminopropionique). La Thr3 est parfois remplacée par la L-Asp ou L-Lys. Un motif Arg-6 a été aussi introduit au niveau de l'extrémité N- ou C-terminale du peptide mimant l'histone H3. Les deux fragments sont reliés entre eux soit directement par une chaîne de liaison soit par un espaceur chiral (D-amino-acide). Ces différentes modifications ont entraîné une baisse de l'affinité des composés pour Haspin. Les études de relation structure- activité ont montré que l'affinité des différents composés pour Haspin est fonction du nombre de résidus arginine contenus dans le fragment peptidique : la présence de deux résidus arginine double l'affinité. Les résultats obtenus pour ces composés ont aussi montré que l'espaceur chiral est indispensable pour le positionnement correct des fragments du conjugué sur le site de liaison au niveau de Haspin. La liaison de ces conjugués à la kinase Haspin est influencée par la charge positive du peptide oligoarginine. L'introduction du peptide mimant l'histone H3 en remplacement du résidu oligoarginine du conjugué augmente la sélectivité vis-à-vis de Haspin. Par contre l'incorporation simultanée du peptide mimant l'histone H3 et du fragment oligoarginine entraîne une baisse de la sélectivité vis-à-vis de Haspin (87).

87. Kestav K, *et al.* Bioconjug Chem. 2015; 26 (2) : 225-34.

Parmi les nouveaux conjugués, deux composés (ARC-3353 et ARC-3354) ont été évalués sur un panel de 43 kinases.

Le composé ARC-3353 (figure 25) inhibe trois kinases (Haspin, PKAc, and ROCK2 : Rho- associated protein kinase 2) à la concentration 5 μ M avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 80 %.

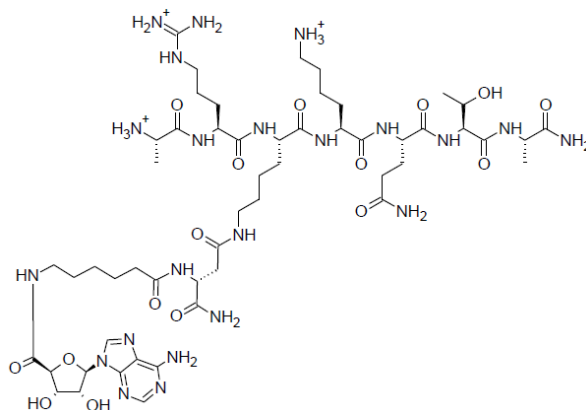


Figure 25 : Structure du composé ARC-3353

La constante de dissociation du composé ARC-3354 (figure 26) est de 0,42 pour Haspin (meilleure que celle de la 5-Itu dont la valeur est de 3,9). A la concentration de 1 μ M, ce composé inhibe plusieurs kinases (kinases du groupe des AGC, CAMK ainsi que CLK1, Aurora B, CDK et Haspin) avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 80 %. La sélectivité de ce composé pour ces kinases est similaire à celle du composé ARC-902. Ce composé est 90 fois plus sélectif vis-à-vis de Hapin en comparaison de PKAc. Il entraîne une baisse de la phosphorylation de l'histone H3 de 33 % dans les cellules HeLa. A la même concentration, la 5-iodotubercidine entraîne une baisse de 95 % de la phosphorylation.

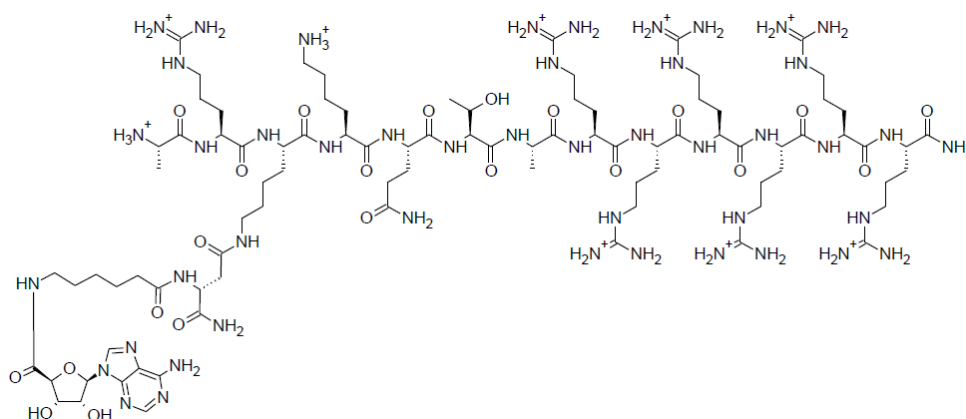


Figure 26 : Structure du composé ARC-3354

IV- Autres protéines kinases d'intérêt thérapeutique

A- RIPK3

La protéine kinase RIPK3 (receptor-interacting serine/threonine protein kinases 3) est impliquée dans la nécrose mais aussi dans l'apoptose dans certaines conditions. Elle contient un motif unique permettant les interactions protéine-protéines : RHIM (RIP homotypic interaction motif). Ce motif permet la formation du complexe RIPK1-RIPK3 appelé nécrosome. Elle joue aussi un rôle important dans la survie cellulaire. Les inhibiteurs de RIPK3 induisent l'apoptose et pourraient être utilisés dans le traitement des cancers et de diverses pathologies inflammatoires (88–90).

B- DYRK1A

DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) est une proline-directed kinase appartenant au groupe des CMGC. Elle est impliquée dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs des cellules neuronales au cours des premières étapes de la vie. Elle joue aussi un rôle anti-apoptotique et est impliquée dans la phosphorylation de la protéine Tau. Elle est aussi 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 (91).

C- PIM

Pim-1 kinase est une sérine thréonine/thréonine kinase de la famille des Pim kinases. Les membres de cette famille sont des oncogènes impliqués dans la tumorigénèse. Des taux élevés de Pim-1 sont observés dans différents types de cancers. De récentes études ont mis en évidence une corrélation entre Pim-1 et la chimiorésistance. En raison de son implication dans le processus de tumorigénèse, les inhibiteurs de Pim utilisés seuls ou en association pourraient avoir un potentiel thérapeutique (92).

88. Moriwaki K, *et al.* Cytokine Growth Factor Rev. 2014 ; 25 (2) : 167-74.

89. Mandal P, *et al.* Mol Cell. 2014 ;56 (4) : 481-95.

90. Newton K. Trends Cell Biol. 2015 ; 25 (6) : 347-53.

91. Abbassi R, *et al.* Pharmacol Ther. 2015 ; 151 : 87-98.

92. Blanco-Aparicio C, *et al.* Cancer Lett. 2011 ; 300 (2) : 145-53.

D- CDK5

CDK5 (Cyclin-dependant kinase 5) est une proline-directed kinase. CDK5 est activée par deux protéines (p35 et p39). Elle joue un rôle important dans le développement embryonnaire des neurones (migration, différenciation, développement des synapses et fonctions synaptiques). Elle est aussi impliquée dans la mort des cellules neuronales. Son accumulation observée lors de la maladie d'Alzheimer est liée à l'augmentation de la conversion de p35 en p25. L'inhibition de l'action de CDK5 ou la prévention de sa liaison à la protéine p25 pourrait atténuer la perte des neurones et la formation de plaque amyloïde (93–95).

E- CDK2

CDK2 (Cyclin-dependant kinase 2) est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des CDK. Le complexe CDK2/cycline A est impliqué dans la réplication de l'ADN. Ce complexe régule l'activation de Cdc25B durant la phase S et de Cdc25C à la phase G2/M. La dysrégulation de CDK2 est observée au cours des cancers de mauvais pronostic (96,97).

F- CDK9

CDK9 est une protéine kinase membre de la famille des CDC2-like kinases. Elle forme un complexe avec différents membres de la famille des cyclines T. Le complexe CDK9/Cycline T1 est impliqué dans différents processus cellulaires (croissance cellulaire, prolifération et différenciation) en particulier lors du programme d'activation des cellules lymphoïdes. Il joue aussi un rôle important dans la transcription ARN polymérase II-dépendant. Sa dysrégulation pourrait être impliquée dans le processus de transformation en cellule maligne. CDK9 est surexprimée dans les myélomes, les cancers de la prostate et les cancers pulmonaires (98–102).

93. Noble W, et al. *Neuron*. 2003 ; 38 (4) : 555-65.

94. Tsai L-H, et al. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1697(1-2):137-42.

95. Cheung ZH, et al. *Trends Cell Biol*. 2012 ; 22 (3) : 169-75.

96. Mitra J, et al. *Oncogene*. 2004 ; 23 (19) : 3361-7.

97. De Boer L, et al. *Oncogene*. 2008 ; 27 (31) : 4261-8.

98. Shim EY, et al. *Genes Dev*. 2002 ; 16 (16) : 2135-46.

99. Bellan C, et al. *J Pathol*. 2004 ; 203 (4) : 946-52.

100. Garriga J, et al. *Gene*. 2004 ; 337 : 15-23.

101. Radhakrishnan SK, et al. *Cell Cycle*. 2006 ; 5 (5) : 519-21.

102. Leucci E, et al. *J Cell Physiol*. 2007 ; 412 : 411-5.

G- CLK1

CLK1 (CDC2-like kinase 1) est une kinase appartenant à la famille des Dual Specificity kinase. Elle est impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif de l'ARN et dans le contrôle des infections virales. La dysrégulation de l'épissage alternatif étant une caractéristique commune de différents cancers, l'inhibition de CLK1 pourrait avoir un intérêt dans le traitement des cancers (103–105).

H- CK1

CK1 (Caséine kinase 1) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (formation du fuseau mitotique et ségrégation), la régulation du rythme circadien et l'apoptose. Le développement de certains cancers et de certaines maladies neurodégénératives est lié à la dysrégulation ou à la mutation de CK1 (106,107).

I- TLK1

TLK1 (Tousled-like kinase 1) est une sérine/thréonine kinase qui régule le cycle cellulaire (assemblage de la chromatine et réparation de l'ADN). Son inhibition entraîne une augmentation de l'apoptose et pourrait être utilisée pour contrecarrer les mécanismes de chimiorésistance (108–110).

J- GSK3

GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans divers processus cellulaires (production du peptide β -amyloïde, phosphorylation de la protéine tau, action de l'insuline, apoptose...). Ses inhibiteurs pourraient avoir un effet bénéfique pour le traitement de plusieurs pathologies humaines (diabète, cancers, maladie d'Alzheimer et de Huntington...) (111,112).

-
103. Mott BT, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 ; 19 (23) : 6700-5.
 104. Bullock AN, et al. *Structure*. 2009 ; 17 (3) : 352-62.
 105. Fedorov O, et al. *Chem Biol*. 2011 ; 18 (1) : 67-76
 106. Knippschild U, et al. *Cell Signal*. 2005 ; 17 (6) : 675-89.
 107. Cheong JK, et al. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 ; 43 (4) : 465-9.
 108. Krause DR, et al. *Oncogene*. 2003 ; 22 (38) : 5927-37.
 109. Carrera P, et al. *Genes Dev*. 2003 ; 17 (20) : 2578-90.
 110. Takayama Y, et al. *Cancer Lett*. 2010 ; 296 (1) : 27-34.
 111. Cohen P, et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 ; 3 (6) : 479-87.
 112. Beurel E, et al. *Pharmacol Ther*. 2015 ; 148 : 114-31.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif général de ce travail est la valorisation des structures d'origine naturelle dans une application antiproliférative pouvant trouver une utilisation comme agents anti-tumoraux ou immuno-modulateurs potentiels. Ce travail de thèse s'articule autour de deux aspects principaux, Chimie Médicinale d'une part Phytochimie d'autre part.

ASPECT CHIMIE MEDICINALE.

Le premier aspect de ce travail est principalement constitué d'un travail de pharmacomodulation d'une structure connue en vue d'en améliorer les caractéristiques physico-chimiques ainsi que l'activité. Le modèle utilisé est inspiré du *scaffold* fourni par les grossularines A et B (Figure 27) extraites d'un tunicier marin, *Dendrodoa grossularia* (groseille de mer). Les travaux précédents réalisés dans le laboratoire ont permis d'évaluer l'incidence de l'inversion du motif indolique sur l'activité pharmacologique. Des composés tétracycliques à structure **8,9-dihydroimidazo[4,5-c]pyrrolo[3,2-g]quinolin-4(5H)-one** qui sont des analogues « inversés » directs des grossularines, ont été synthétisés mais malheureusement, comme pour les grossularines elles-mêmes, les composés ayant une activité antiproliférative ne disposaient pas d'un index thérapeutique ni d'un profil pharmacocinétique satisfaisants (113).

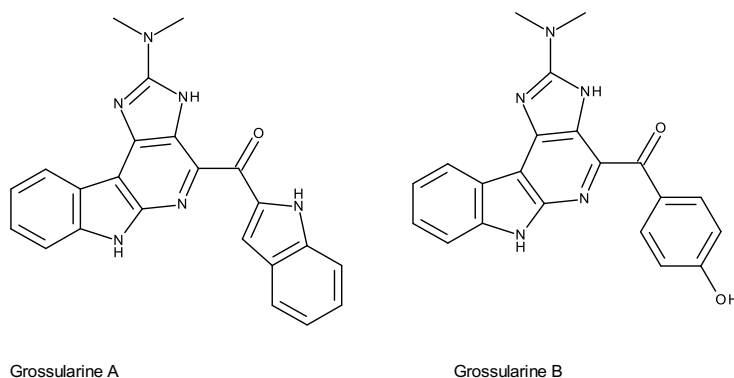


Figure 27 : Structure des grossularines A et B

Le modèle tétracyclique a été par la suite simplifié au profit d'un modèle structural conservant des garanties d'interactions potentielles avec des cibles protéiques par le biais d'un système « donneur-accepteur » de liaisons hydrogènes.

Le modèle retenu est une structure présentant en fait un enchaînement « donneur-accepteur-donneur » de liaisons hydrogènes de type « HN-CO-NH » potentiellement

113. Delest B, et al. Tetrahedron. 2004; 60 (29) : 6079-83.

modulable au niveau des atomes d'azote ; ce motif est inclus dans une structure tricyclique de type **4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole** (Figure 28).

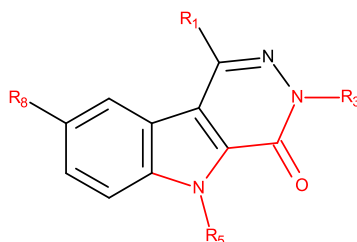


Figure 28 : Modèle structural retenu avec l'enchaînement HN-CO-NH, pyridazino-indole avec possibilités de pharmacomodulations sur les sites R₁, R₃, R₅ et R₈

A partir du modèle structural, trois séries de composés (Figure 29) ont été déclinées en premier lieu, de façon à exploiter les diverses possibilités de pharmacomodulation de celui-ci. Les molécules des séries 1 à 3 ont fait l'objet d'évaluation sur kinases purifiées (DYRK1A, PI3K α et γ , Aurora A) ainsi que sur lignées tumorales humaines (Huh7 : foie, PC3 : prostate, Caco : colon, HCT116 : sein, MDA-MB231 : sein, NSCL16 : poumon). Les composés de la série 1 se sont avérés globalement peu actifs dans les modèles d'évaluation ; cependant les problèmes rencontrés lors de la mise en solution de ceux-ci dans des systèmes compatibles avec les tests à réaliser incitent à penser que cette inactivité n'est pas intrinsèque mais liée à la physicochimie de ces produits et par conséquent à leur profil pharmacocinétique défavorable (114).

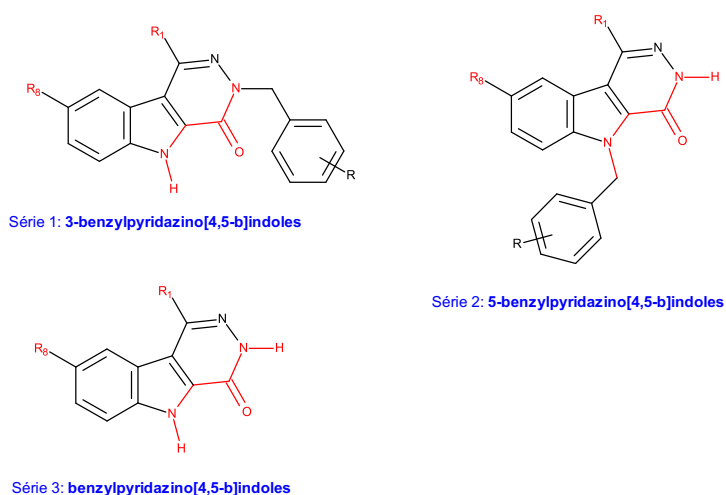


Figure 29 : Structure générale des trois premières séries de composés

114. Bruel A, et al. Eur J Med Chem. 2012; 57 : 225-33.

En effet, la solubilité médiocre des molécules synthétisées dans les solvants usuels posent des problèmes lors de la réalisation des solutions d'évaluation biologique.

Dans la série 2 (molécules benzylées en position 5), les molécules présentées dans la figure 30 s'avèrent être les plus actives (114).

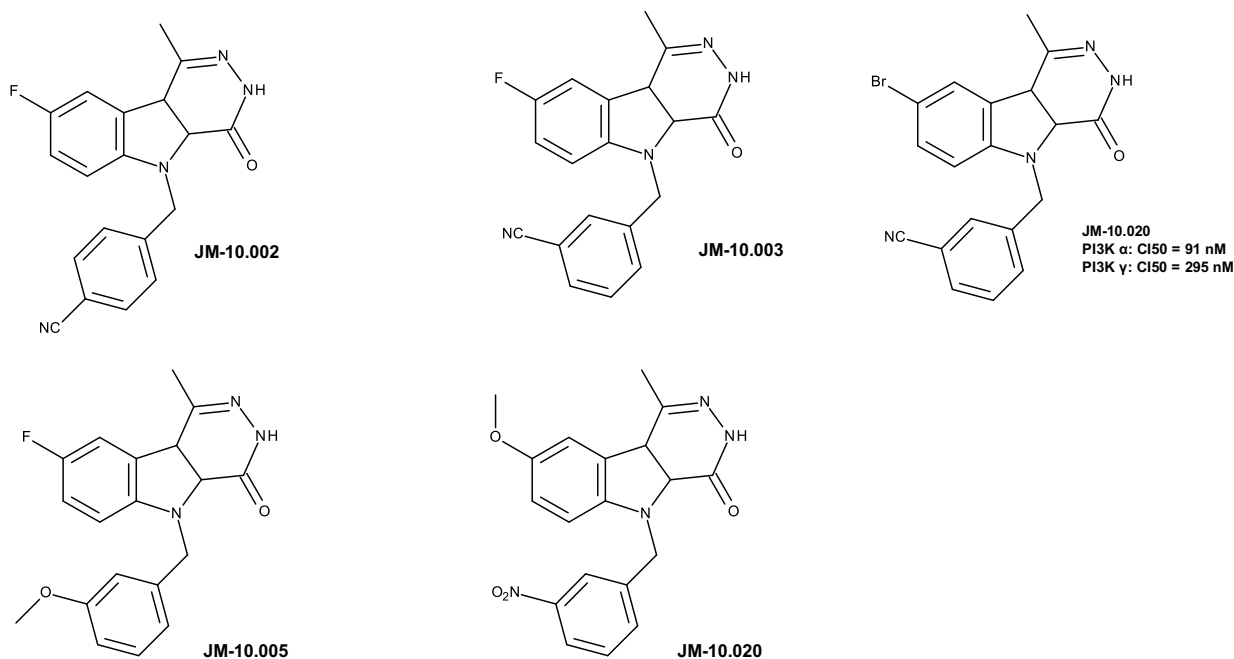


Figure 30 : Structure des molécules de la série 2

Les résultats des tests d'activité réalisés sur les lignées tumorales sont résumés dans le tableau 4. Ces tests ont été réalisés sur les lignées NSCLC16 (lignée de cancer pulmonaire non à petites cellules), HuH7 (lignée de carcinome hépatocellulaire), CaCo2 (lignée tumorale humaine d'adénocarcinome colique de type épithélial), MDA-MB231 (lignée de cellules épithéliales de tumeur mammaire), HCT116 (lignée tumorale humaine de côlon de type épithéliale), PC3 (lignée tumorale humaine prostatique). Ces résultats obtenus sous forme de CI_{50} sont exprimés en $\mu\text{M}/\text{mL}$. Ceux-ci montrent une sélectivité des molécules vis-à-vis des cellules tumorales avec deux composés ayant une activité particulièrement marquée sur MDA-MB231 et PC3.

Tableau 4 : Résultats des activités biologiques des molécules ayant une bonne activité sur les lignées tumorales (Cl_{50} ; μM)

	NSCLC16	Huh7	Caco	MDA-MB231	HCT116	PC3	Fibroblastes sains
JM-10.002	16,4	4	1,5	0,6	4	0,6	> 25
JM-10.003	22,8	3	2	1,5	5	1	> 25
JM-10.005	> 30	1,5	2	0,9	4	0,4	> 25
JM-10.020	32,3	1,5	5	4	4	2,5	2

Concernant les molécules synthétisées dans la série 3, certaines ont manifesté une activité inhibitrice notable sur certaines kinases (Aurora A, PI3K et DYRK1A) (Figure 31)

Ces molécules ont aussi montré une activité sur les lignées cellulaires cancéreuses citées précédemment. Les résultats les plus significatifs sont consignés dans le tableau 5 et ont été comparés à ceux obtenus avec la roscovitine qui est un inhibiteur des CDKs et de plusieurs autres kinases : CK1, GSK3 α - β , DYRK1A, ERK1, ERK2 et PDXK (70).

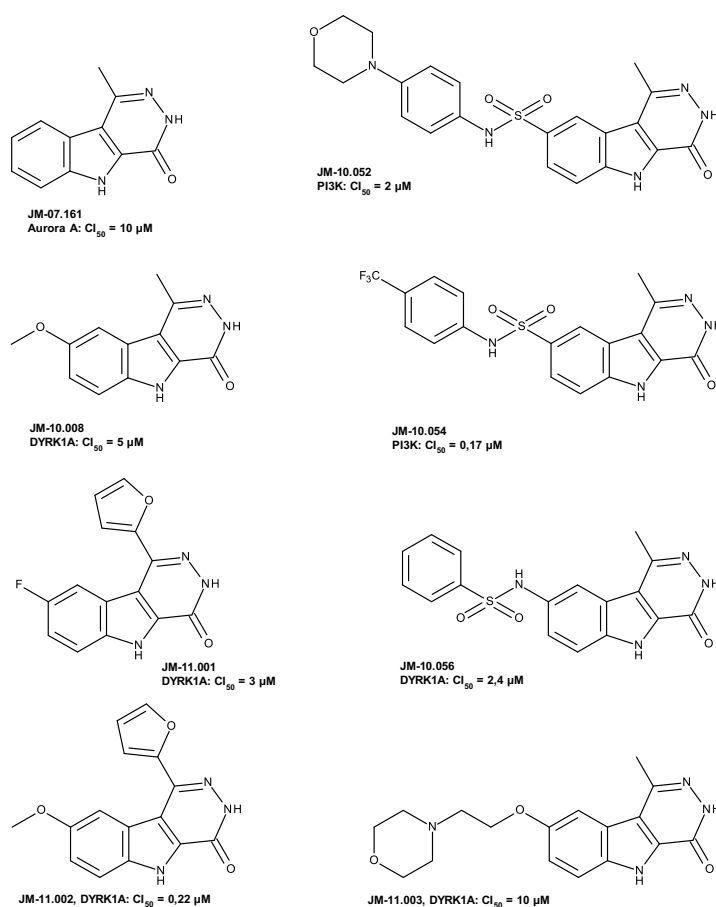


Figure 31 : Molécules possédant un profil de « hits » dans la série 3

Tableau 5 : Résultats des tests d'activité sur lignées cancéreuses des molécules de la série 3 (CI₅₀ ; μM)

	Huh7	MDA-MB231	HCT 116	PC3	NCI	Fibroblastes sains
JM-11.001	0,4	0,6	> 25	> 25	> 25	> 25
JM-11.001	0,25	0,3	3	> 25	> 25	> 25
Roscovitine	2	2	1,5	2	3	3

La quatrième série de composés (série de molécules à structure 4-arylamino-pyridazine-3-one) (Figure 32) a été envisagée pour être moins contrainte suite à la suppression du cycle central dans le système tricyclique initial. Cette suppression favorise la flexibilité de ces molécules et améliorerait leur profil pharmacocinétique (115).

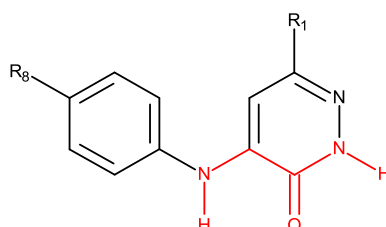


Figure 32 : Structure de la série 4 (4-arylamino-pyridazine-3-ones)

Cependant, les difficultés liées à la synthèse de ces produits et surtout les méthodes de purification fastidieuses ont limité le développement de cette série.

Deux nouvelles séries ont été développées par la suite :

- **Série 5 : 3,5-N-dibenzilation**

Deux groupements de type benzyle (substitués ou non) ont été introduits en position 3 et 5 du tricycle (Figure 33). Il a été envisagé de préparer dans cette série quelques molécules-sondes possédant le même motif benzylé sur les deux sites azotés et de n'envisager l'introduction (plus complexe) de motifs benzylés différents qu'après un retour des résultats d'évaluations biologiques. Les résultats peu probants ainsi obtenus et les caractéristiques physicochimiques (peu en faveur d'une pharmacocinétique favorable) de ces molécules ont contraint à en limiter le développement.

115. Bruel A, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2014; 24 (21) : 5037-40.

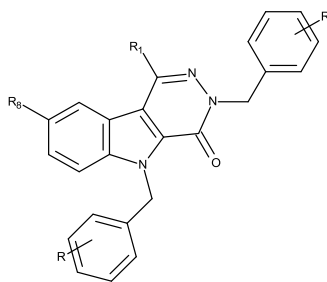


Figure 33 : Structure générale des molécules de la série 5

- Série 6 : 3-*N*-acylation (Figure 34)

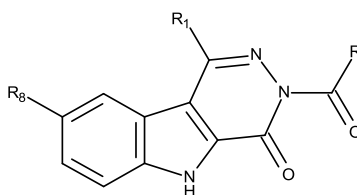


Figure 34 : Structure générale des molécules de la série 6

Comme pour la série 5, il s'agissait dans ce cas de développer un petit nombre de molécules-sondes. Face aux résultats peu significatifs obtenus lors de l'évaluation biologique, cette série n'a pas été développée.

Par contre, les résultats biologiques encourageants quant à l'émergence d'activités valorisables dans les séries 2 et 3 nous ont encouragés à poursuivre les modulations structurales entreprises sur le scaffold et les investigations des activités pharmacologiques. Nous avons procédé à la synthèse de nouveaux composés : la série 7. Le point essentiel de ce travail est la modulation simultanée des positions 1, 3, 5 et 8. Dans un premier temps, nous avons choisi d'introduire une fonction amine sur la position 8. L'intérêt de cette fonction réside dans le fait qu'elle pourra nous permettre d'accéder à plusieurs types de dérivés tels que des amides, des sulfonamides ou encore des urées. Dans ces structures, l'enchaînement « donneur-accepteur-donneur » de liaisons hydrogènes de type « HN-CO-NH » est conservé. La pharmacomodulation en position 1 permet d'évaluer l'incidence de ces groupements sur les caractéristiques physico-chimiques et l'activité biologique de ces molécules. Pour résoudre les problèmes de solubilité des produits, l'introduction d'une chaîne diéthylaminoéthyle a été envisagée en position 5 ou en position 3 et 5.

ASPECT PHYTOCHIMIE.

La deuxième partie de ce travail est dédiée à l'étude de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise : *Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia diffusa* et *Combretum paniculatum*. Le choix de ces plantes est orienté par les données recueillies auprès des tradithérapeutes ainsi que les données de la revue bibliographique. Les tests phytochimiques ont permis d'identifier les différents groupes de métabolites contenus dans ces plantes. Les drogues végétales ont été extraites et les différents extraits sont séparés par chromatographie de séparation liquide-liquide. Les différentes fractions ont été testées sur un panel de kinases.

PREMIERE PARTIE:

**SYNTHESE DE DERIVES ORIGINAUX DU 8-AMINO-
4-OXO-3,4-DIHYDRO-5*H*-PYRAZINO[4,5-*b*]INDOLE**

Chapitre I : PARTIE THEORIQUE

I-Accès aux dérivés du 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole.

A-Intérêt thérapeutique de la structure

Les dérivés indoliques constituent une classe importante de composés hétérocycliques ayant des applications biologiques diverses et variées. Depuis plusieurs décennies, différentes méthodes de synthèse et de fonctionnalisation des dérivés indoliques ont été développées. Différentes études ont mis en évidence les propriétés thérapeutiques des dérivés du pyridazino[4,5-b]indole : action anti-hypertensive et vasodilatatrice (116–118), action inhibitrice de phosphodiesterases et anti-agrégant plaquettaire (119), inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse de VIH-1 (120), effet anti-microbien (121). De récentes études ont permis aussi de mettre en évidence leur action anti-cancéreuse. Ces composés étant considérés comme des aza analogues de la β et γ -carboline, plusieurs auteurs ont focalisé leur recherche sur des structures analogues (114,115,122–124). Les β et γ -carboline possèdent une activité génotoxique, mutagène et cytotoxique en raison de leur capacité de liaison à l'ADN (125). Les résultats des recherches effectuées sur les dérivés pyridazino[4,5-b]indole ont montré une action anti-proliférative (123), une inhibition de la PI3K (114) ainsi que celle de DYRK1A (115). Certains dérivés synthétisés sont des ligands spécifiques des récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR : Peripheral Benzodiazepin Receptor) encore appelé TSPO (translocator protein) (122,124) présentant un intérêt pour l'imagerie TEP (tomoscintigraphie par émission de positons) dans les cancers. La TSPO étant fortement exprimée par les cellules cancéreuses, elle constitue un marqueur d'agressivité tumorale (124).

-
116. Vega AM, *et al.* J Pharm Sci. 1982; 71 (12) : 1406-8.
117. Monge A, *et al.* J Med Chem. 1987; 30 (6) : 1029-35.
118. Frechilla D, *et al.* Eur J Pharmacol. 1992; 219 : 409-14.
119. Monge A, *et al.* Arch Pharm. 1995; 328 (10) : 689-98.
120. Font M, *et al.* Eur J Med Chem. 1995; 30 (12) : 963-71.
121. Avan I, *et al.* Turk J Chem. 2013; 37 (2) : 271-91.
122. Vin V, *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2003; 310 (3) : 785-90.
123. Li RD, *et al.* Chin Chem Lett. 2007; 18 (10) : 1191-4.
124. Cheung Y-Y, *et al.* Cancer Res. 2014; 74 (19S) : 110-110.
125. Patel K, *et al.* Asian Pac J Trop Biomed. 2012 ; 2 (8) : 660-4.

En raison de l'intérêt thérapeutique des pyridazino-indoles, nous avons poursuivi les travaux de modulation précédemment effectués dans le laboratoire en vue d'obtenir des nouveaux inhibiteurs de la protéine kinase Haspin.

B-Approche rétrosynthétique

Pour réaliser la synthèse du 8-aminopyridazinoindole, nous avons envisagé l'approche rétrosynthétique suivante :

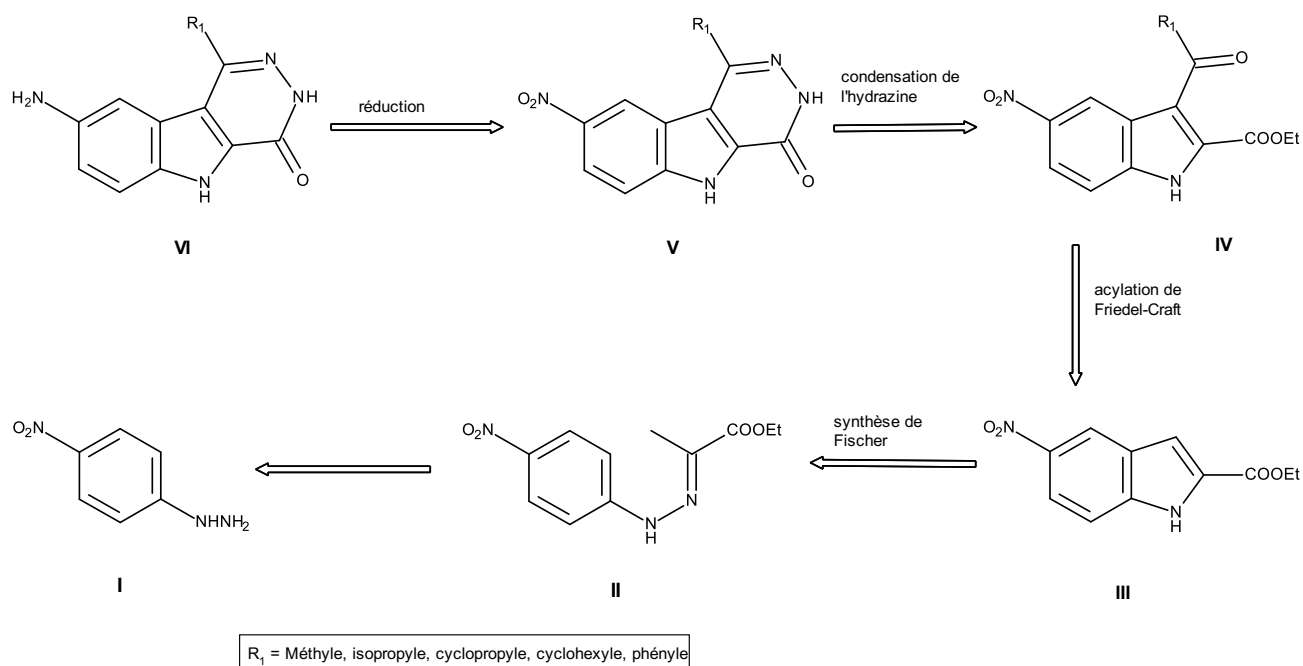


Schéma 1 : Voies d'accès aux 8-aminopyridazino[4,5-b]indoles

Pour cette synthèse, nous avons choisi la 4-nitrophénylhydrazine **I** commerciale comme produit de départ. Elle est mise en réaction avec le pyruvate d'éthyle pour donner l'hydrazone **II**. Celle-ci, par une réaction de Fischer permet d'obtenir la 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle **III**. La 5-nitro-1H-indole carboxylate d'éthyle est par la suite acylée en position 3 en présence d'un chlorure d'acyle commercial conduisant à l'obtention du composé **IV** qui sera par la suite cyclisé en présence d'hydrazine pour donner le composé tricyclique **V**. La dernière étape consiste en une réduction de groupement nitro en position 8 du pyridazino-indole pour donner le composé **VI**. Ce composé constitue l'intermédiaire clé pour la synthèse des divers dérivés.

C-Voie d'accès utilisée

1- Synthèse du 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle

La 4-nitrophénylhydrazine est mise en réaction avec le pyruvate d'éthyle dans l'éthanol au reflux (**Méthode A**) pendant 1 h 30 pour donner la 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle (Schéma 2) (114,126). L'hydrazone précipite dans le milieu réactionnel. Ce dernier est refroidi et le précipité filtré. Après la purification sur colonne chromatographique, le produit désiré est obtenu avec un rendement de 55 %.

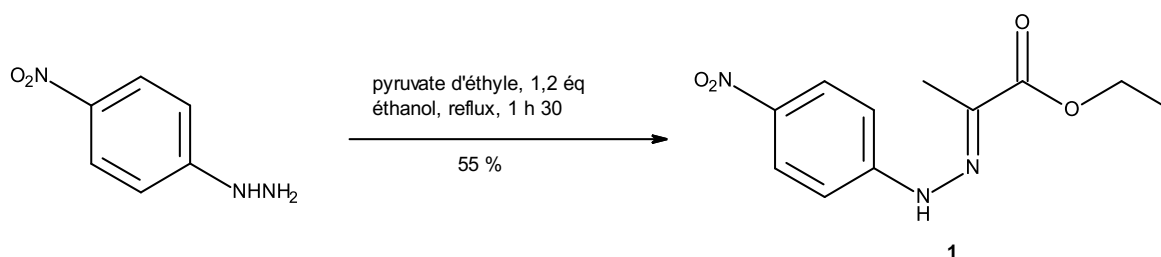


Schéma 2 : Synthèse du 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle

2- Synthèse du 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle

La réaction de Fischer constitue une méthode simple et efficace pour la transformation de *N*-arylhydrazone énoisable en indole. Le mécanisme général de la réaction passe par un réarrangement [3,3]-sigmatropique d'une ène-hydrazone pour donner une bis iminobenzylcétone suivi d'une cyclisation et d'une aromatisation du cycle (127,128).

Cette réaction se déroule principalement en trois étapes :

- l'établissement d'un équilibre hydrazone-ènehydrazone par tautomérisation
- la formation d'une nouvelle liaison carbone- carbone
- l'élimination de l'ammonium (127)

Pour obtenir le 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle, l'hydrazone précédemment synthétisée est mise en réaction dans un large excès d'acide polyphosphorique (APP) et chauffée à 85 °C (Schéma 3). L'acide polyphosphorique est utilisé ici comme catalyseur

126. Horiuchi T, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2009; 19 (2) : 305-8.

127. Robinson B. Chem Rev. 1963; 63 (4) : 373-401.

128. Humphrey, *et al.* Chem Rev. 2006; 106 (7) : 2875-911.

(129,130). Le milieu réactionnel passe de l'orange au brun. En raison de la forte viscosité de l'acide polyphosphorique à température ambiante, l'agitation est difficile en début de réaction. Dans le but d'éviter la formation de produit secondaire, le milieu réactionnel est refroidi immédiatement à la fin de la réaction par ajout d'eau glacée. Le pH du milieu réactionnel est ramené à 9 avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. L'indole est extrait avec de l'acétate d'éthyle et purifié sur une colonne chromatographique en éluant par le dichlorométhane (**Méthode B**). L'indole est obtenu avec un rendement de 57 %.

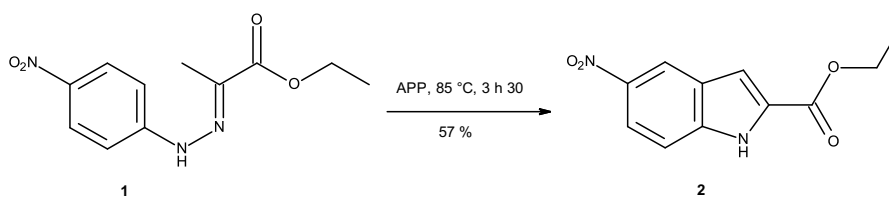


Schéma 3 : Synthèse du 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle

3- Acylation de l'indole en position 3

Pour l'acylation des indoles, la réaction d'acylation de Vilsmeier-Haack ainsi que celle de Friedel-Crafts sont les plus utilisés. Les réactions de substitutions électrophiles se font préférentiellement en position 3 de l'indole à cause de sa meilleure réactivité. Toutefois, les faibles rendements parfois obtenus lors de l'acylation sont dus à la formation des produits 1-acylés ou 1,3-diacylés. De plus, la polymérisation de l'indole est souvent observée lorsque la réaction se fait en milieu acide (131,132).

La réaction d'acylation de Friedel-Crafts se fait en présence d'un acide de Lewis. Cette réaction est indiquée pour les indoles possédant un groupement électroattracteur ce qui permet l'éviction de la formation du composé 1-acylé ainsi que la polymérisation du composé formé (131,132).

Pour obtenir le produit 3-acylé, le chlorure d'étain IV (SnCl_4) est ajouté à la suspension de l'indole dans du dichlorométhane à 0 °C sous atmosphère inerte. Au cours de cette étape, il se forme un complexe entre l'acide de Lewis et l'indole. Le chlorure d'acide

129. Kissman H. *et al.* J Am Chem Soc. 1952; 74 (15) : 3948-9.

130. Benincori T, *et al.* J Org Chem. 1988; 53 (6) : 1309-12.

131. Okauchi T, *et al.* Org Lett. 2000; 2 (10) : 1485-7.

132. Ottoni O, *et al.* Org Lett. 2001; 3 (7) : 1005-7.

est ensuite introduit dans le milieu réactionnel à température ambiante suivi du nitrométhane (Schéma 4). Ici, le nitrométhane ajouté sert de co-solvant ce qui permet ainsi de solubiliser le complexe. La réaction est rapide (1 à 6 heures) et presque totale (**Méthode C**). En l'absence du nitrométhane, la réaction est très lente (48h minimum) et incomplète. Par ailleurs, les tentatives de synthèse effectuées avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃) n'ont pas permis d'obtenir le produit acylé. Dans ces cas, l'indole présent dans le milieu réactionnel peut être récupéré.

Les indoles acylés sont obtenus avec des rendements compris entre 75 et 87 % (Tableau 6).

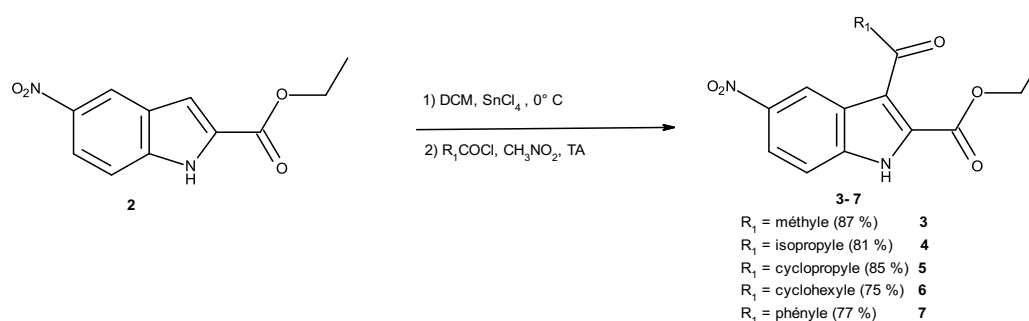


Schéma 4 : Synthèse des indoles acylés en position 3

Pour l'indole **5**, lorsque le temps de réaction est supérieur à 1 h, il se forme un deuxième produit (probablement le produit diacylé).

Tableau 6 : Conditions opératoires pour la synthèse des indoles 3-acylés

Composés	R ₁	Ratio Indole/ AL/ CA	Temps de réaction	Rendement
3	Méthyle	1/ 1,2 / 3	3 h 30	87 %
4	Isopropyle	1/ 2/ 3	5 h	81 %
5	Cyclopropyle	1/ 2/ 3	1 h	85 %
6	Cyclohexyle	1/ 2/ 3	6 h	75 %
7	Phényle	1/ 2/ 3	4 h	77 %

AL : Acide de Lewis, CA : chlorure d'acycle

4- Synthèse du noyau 4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole

La réaction de condensation de l'hydrazine sur les composés **3-7** permet d'accéder aux pyridazino[4,5-b]indoles correspondants avec de bons rendements (114,133). Les indoles acylés sont mis en solution dans de l'éthanol au reflux. Après addition de la solution d'hydrazine monohydrate, l'indole précipite dans le milieu réactionnel (Schéma 5). Le précipité obtenu est filtré et lavé (**Méthode D**). Ces derniers ne migrent pas sur la colonne chromatographique. Le temps de réaction ainsi que les rendements varient en fonction des composés (Tableau 7).

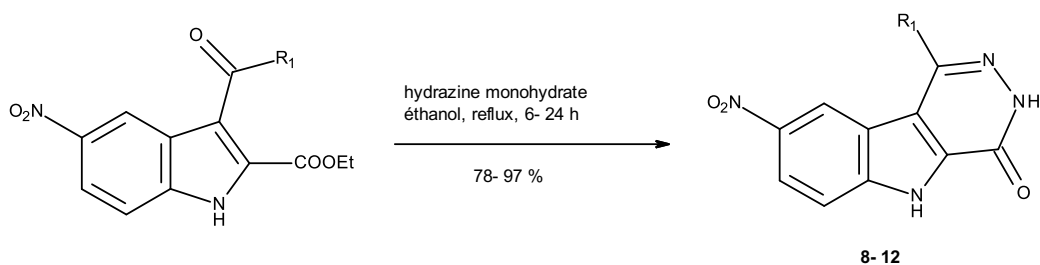


Schéma 5 : Synthèse des composés 8 à 12

Tableau 7 : Conditions opératoires de synthèse des dérivés du 8-nitropyridazino[4,5-b]indole

Composés	R ₁	Temps de réaction	Rendement
8	méthyle	6 h	89 %
9	isopropyle	19 h	97 %
10	cyclopropyle	19 h	97 %
11	cyclohexyle	24 h	78 %
12	phényle	24 h	95 %

5- Accès au 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole

Plusieurs méthodes de réduction du groupement nitro sont utilisées en chimie pour la synthèse des amines. Les plus fréquentes sont les hydrogénations catalytiques en présence de l'hydrogène gaz et d'un métal (platine, palladium, ruténium, cuivre, cobalt, chrome, molybdène, fer, nickel...). Il existe d'autres méthodes de transfert catalytique d'hydrogène dans lesquelles l'hydrogène gaz est remplacé par des donneurs d'hydrogène

133. Zhungietu GI, *et al.* Chem Heterocycl Compd. 1982; 18 (8) : 811-3.

tels que l'hydrazine, l'acide formique, le propan-2-ol, le 1,4-cyclohexanediène, le cyclohexène, l'acide phosphinique, le phosphonate de sodium, l'acide acétique et le formate d'ammonium (134–145).

D'autres méthodes utilisant des systèmes plus complexes tels que : $\text{Na}_2\text{S}/\text{H}_2\text{O}$, samarium (Sm) et le di-iode, $\text{NiCo}_2\text{O}_4/\text{NaOH}$, $\text{SnCl}_2/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, 1,1,3,3-tétraméthylidisiloxane (TMDS)/ $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (acétylacétonate de fer), polyméthylhydroxysiloxane/Fer donnent aussi de bons résultats (142,146–150).

Nous avons choisi d'utiliser la méthode au chlorure d'étain II (SnCl_2) en milieu acide (151). Pour cette méthode, Dračinský utilisait 30 équivalents de SnCl_2 (148). Les composés **8** à **12** sont mis en réaction avec du SnCl_2 en milieu acide (acide chlorhydrique) avec de l'eau au reflux (Schéma 6). La variation des conditions opératoires nous a permis de diminuer la quantité de chlorure d'étain engagée dans la réaction (**Méthode E**). Avec 15 équivalents de SnCl_2 , les amines désirées sont obtenues avec de bons rendements (Tableau 8).

Ces amines sont récupérées après ajout d'une solution de NaOH pour ramener le pH à 10 suivi d'une extraction par l'acétate d'éthyle.

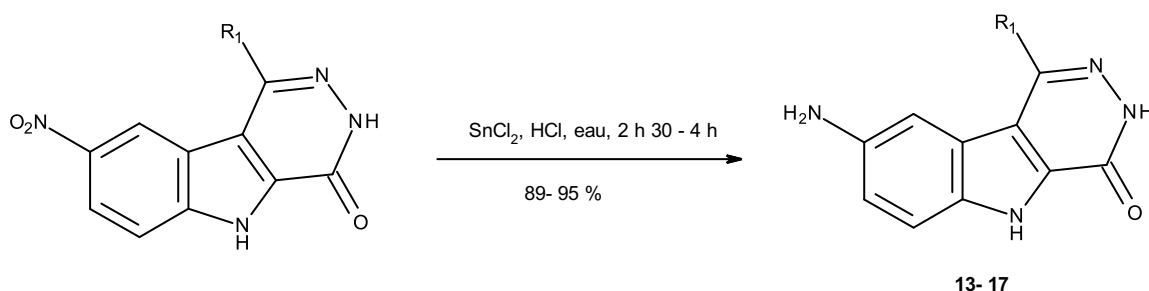


Schéma 6 : Synthèse des composés 13 à 17

134. Braude EA, *et al.* J Chem Soc Resumed. 1954; 3586-3595
 135. Brieger G, *et al.* Chem Rev. 1974; 74 (5) : 567-80.
 136. Entwistle ID, *et al.* J Chem Soc. 1977; (4) : 443-4.
 137. Ram S, *et al.* Tetrahedron Lett. 1984; 25 (32) : 3415-8.
 138. Lauwiner M, *et al.* Appl Catal Gen. 1998; 172 (1) : 141-8.
 139. Anderluh M, *et al.* Eur J Med Chem. 2005; 40 (1) : 25-49.
 140. Fu L, *et al.* Tetrahedron Lett. 2007; 48 (52) : 9155-8.
 141. Pogorelić I, *et al.* J Mol Catal Chem. 2007; 274 : 202-7.
 142. Chaubal NS, *et al.* J Mol Catal Chem. 2007; 261 (2) : 232-41.
 143. Wahba AE, *et al.* Tetrahedron Lett. 2009; 50 (27) : 3901-4.
 144. Wen H, *et al.* Catal Commun. 2009; 10 (8) : 1207-11.
 145. Quinn JF, *et al.* Tetrahedron Lett. 2010; 51 (5) : 786-9.
 146. Huber D, *et al.* Tetrahedron Lett. 1988; 29 (6) : 635-8.
 147. Banik BK, *et al.* Tetrahedron Lett. 1998; 39 (40) : 7243-6.
 148. Dračinský M, *et al.* Tetrahedron Lett. 2007; 48 (39) : 6893-5.
 149. Pehlivan L, *et al.* Tetrahedron Lett. 2010; 51 (15) : 1939-41.
 150. Pehlivan L, *et al.* Tetrahedron. 2011; 67 (10) : 1971-6.
 151. Bellamy FD, *et al.* Tetrahedron Lett. 1984; 25 (8) : 839-42.

Tableau 8 : Synthèse des dérivés du 8-nitropyridazino[4,5-b]indole

Composés	R ₁	Temps de réaction	Rendement
13	méthyle	2 h 30	91 %
14	isopropyle	2 h 30	92 %
15	cyclopropyle	3 h	95 %
16	cyclohexyle	4 h	89 %
17	phényle	3 h	95%

II-Synthèse des *N*-(4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylcaboxamides et alkylcaboxamides

A-Synthèse des *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)alkylcaboxamides et arylcaboxamides

Dans la littérature, la formation de la liaison amide se fait essentiellement par deux méthodes. Une première qui met en jeu des couplages peptidiques entre une amine et un acide carboxylique, et une seconde, plus classique, mais aussi plus efficace, qui passe par l'usage de chlorures d'acides que l'on met en réaction avec des amines en présence d'accepteurs de protons (152).

1- Synthèse à partir d'un chlorure d'acyle

La synthèse des amides par action d'un chlorure d'acyle sur une amine constitue l'une des méthodes fréquemment utilisées pour le couplage. Ces chlorures d'acides peuvent être préparés directement en vue de leur utilisation s'ils ne sont pas commerciaux. Le mécanisme général de la réaction est montré sur le schéma 7.

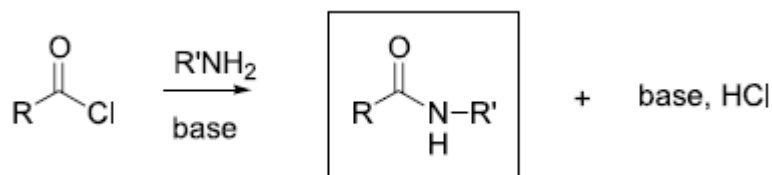


Schéma 7 : Réaction d'aminolyse (152)

152. Montalbetti CAGN, *et al.* Tetrahedron. 2005; 61 (46) : 10827652.

L'utilisation d'une base additionnelle est fréquente et permet d'éviter la formation d'un chlorhydrate avec l'acide chlorhydrique libéré. Ces réactions de couplage sont généralement mises en œuvre dans des solvants inertes et anhydres en présence d'une amine tertiaire non nucléophile (152).

Afin d'obtenir les composés souhaités, le 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (composé **13**) est mis en réaction avec différents chlorures d'acides commerciaux dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) en présence de la triéthylamine (TEA) à température ambiante (**Méthode F**). Le DMF est utilisé ici comme solvant en raison de la faible solubilité des différentes amines dans les autres solvants organiques (153). Au cours de la réaction, il se forme parfois un précipité en raison de la faible solubilité de certains amides synthétisés. Ces derniers sont récupérés après filtration, lavés à l'eau et dans certains cas purifiés sur colonne. Lorsqu'il ne se forme pas de précipités, les amides sont extraits avec un solvant organique après addition d'eau au milieu réactionnel ou après évaporation du DMF. Les temps de réaction ainsi que les rendements sont résumés dans le tableau 9.

153. Zhang L, *et al.* Tetrahedron Lett. 2009; 50 (24) : 2964-6.

Tableau 9 : Synthèse des composés **18** à **32**

Composés	R ₈	Temps de réaction	Rendements (%)
18	morpholinoylcarboxamide	4 h	46
19	3-fluorobenzamide	45 min	26
20	4-méthoxybenzamide	2 h 30	40
21	4-fluorobenzamide	7 h	10
22	nicotinamide	7 h	75
23	phénylacétamide	3 h	13
24	3-(2-chlorophényl)-5-méthylisoxazole-4-carboxamide	48 h	9
25	4-trifluorométhylbenzamide	1 h	24
26	2-furoylcarboxamide	1 h 30	20
27	3-chlorobenzamide	3 h	44
28	4-méthylbenzamide	6 h	31
29	4-chlorobenzamide	4 h	47
30	1-acétylpirépidine-4-carboxamide	5 h	26
31	4-(méthylthio)benzamide	15 min	45
32	4-bromobenzamide	30 min	17

2- Synthèse à partir d'un acide carboxylique

La synthèse d'amide est possible à partir d'un acide carboxylique et d'une amine en présence d'un agent de couplage. Différents agents de couplage sont utilisés pour cette synthèse (152,154–156).

La première tentative de couplage réalisée avec le DCP (agent de couplage) conduit à une faible formation du produit désiré rendant l'isolement difficile (Tableau 10).

Les autres tentatives sont réalisées avec un autre agent de couplage : le carbonyldiimidazole (CDI). Il est fréquemment utilisé et permet le couplage amidique sans activation préalable de l'acide carboxylique. Au cours de cette réaction, l'acide carboxylique

154. Al-Warhi TI, *et al.* J Saudi Chem Soc. 2012 ; 16 (2) : 97-116.

155. Carpino LA, *et al.* J Org Chem. 1996 ; 61 (7) : 2460-5.

156. Park J-H, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2010 ; 20 (19) : 5895-9.

est mis en réaction avec le CDI pendant une heure. Il se forme un acylcarboxyimidazole avec l'imidazole. C'est l'acylimidazole préformé qui réagit avec l'amine lors de son addition pour conduire à la formation de l'amide. Dans cette réaction, il n'est plus nécessaire d'ajouter une base additionnelle car l'imidazole généré *in situ* permet la neutralisation du milieu (152). Cette méthode est compatible avec l'utilisation de sel d'amine sous forme de chlorhydrate. Le mécanisme général de la réaction est résumé sur le schéma 8.

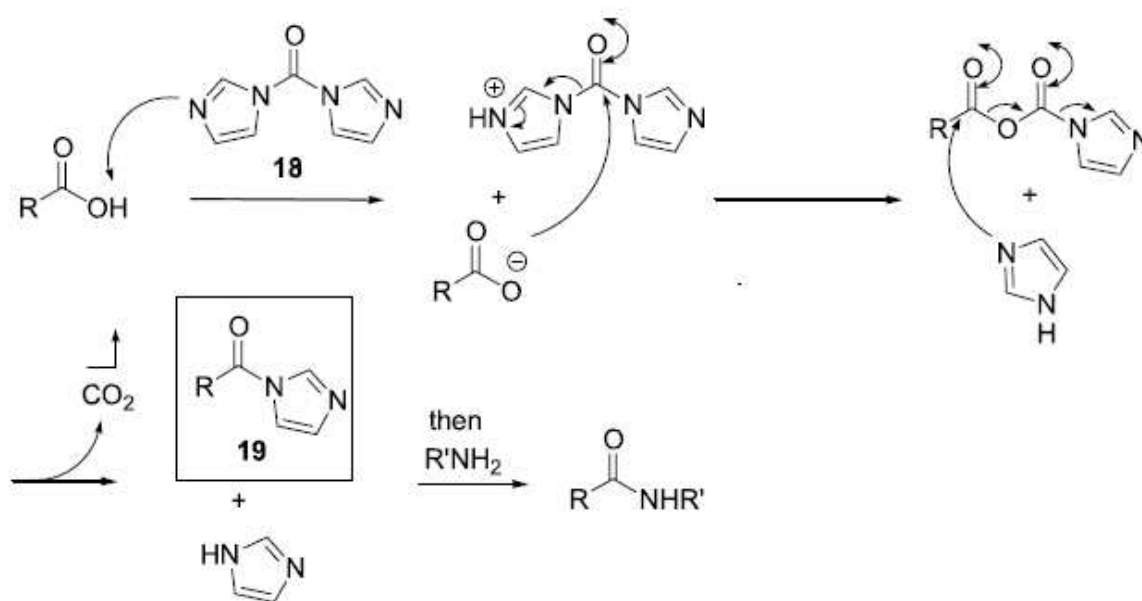


Schéma 8 : Mécanisme général du couplage amidique en présence de CDI (152)

La première tentative avec le CDI conduit aussi à une faible conversion en raison de la faible solubilité de l'amine dans le THF. En remplaçant le THF par le DMF, les produits désirés sont obtenus avec de bons rendements (Tableau 10).

Tableau 10 : Conditions opératoires des essais de couplage d'un acide carboxylique et d'une amine en présence de différents agents de couplage

Essai	Conditions opératoires	Observations
1	DMF, DCP, TEA, TA, 72 h	Faible conversion
2	THF, CDI, TA, 72 h	Faible conversion
3	DMF, CDI, TA, 22-24 h	Bonne conversion

Les conditions opératoires du troisième essai sont alors utilisées pour la synthèse des amides lorsque nous ne disposons pas des chlorures d'acides commerciaux (Tableau 10).

Pour cette réaction le CDI est mis en réaction avec les acides carboxyliques dans le DMF pendant une heure. Par la suite, le composé **13** est ajouté au milieu réactionnel et agité à température ambiante durant plusieurs heures (**Méthode G**). La réaction est plus lente que lors de l'utilisation d'un chlorure d'acide. Les composés désirés précipitent dans le milieu réactionnel et sont récupérés après filtration, lavage et purification sur colonne dans certains cas. Les temps de réaction et les rendements sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Synthèse des composés **33** à **35**

Composés	R ₈	Temps de réaction	Rendements (%)
33	isonicotinamide	21 h	74
34	4-cyanobenzamide	24 h	11
35	3-nitrobenzamide	24 h	51

3- Introduction d'une nouvelle fonction amine

La réduction du groupement nitré du composé **35** (*N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-nitrobenzamide) a été envisagée en vue d'introduire une nouvelle fonction amine. La première tentative réalisée avec SnCl₂ en présence d'acide chlorhydrique (148,151) et d'eau conduit au mélange de deux amines : le composé **13** et le composé désiré. En effet, en milieu acide, le composé **35** est partiellement dégradé pour redonner le composé **13** (Schéma 9). Le mélange obtenu est difficile à purifier avec un rendement de 5 % après purification sur colonne.

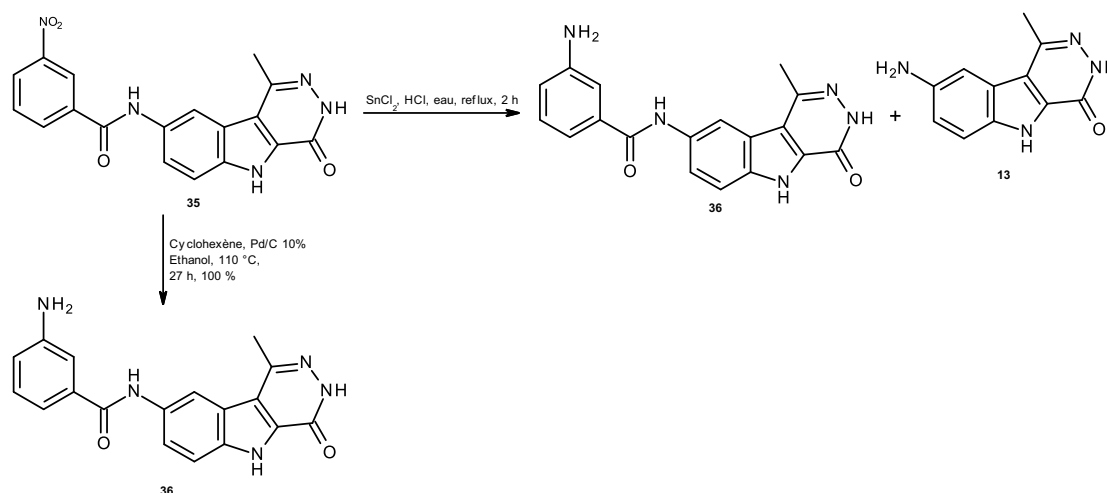


Schéma 9 : Synthèse du composé **36**

Pour éviter la formation de produits secondaires, une autre méthode de réduction est utilisée. La méthode d'hydrogénation en présence de cyclohexène et de palladium sur charbon à 10 % (134) (**Méthode H**) conduit à la transformation complète du composé **35** pour donner le composé **36** avec un rendement quantitatif (Schéma 9). Ce dernier est récupéré par filtration.

B-Synthèse des *N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides

1- Synthèse à partir d'un chlorure d'acide

La synthèse des amides à partir de l'amine **14** (8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole) et de différents chlorures d'acides est réalisée selon la **méthode F** et conduit à la formation des composés **37** à **50**. Le temps de réaction et les rendements sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Conditions opératoires de synthèse des composés **37** à **50**

Composés	R ₈	Temps de réaction	Rendements (%)
37	4-morpholinoylcarboxamide	5 h 30	48
38	3-fluorobenzamide	1 h	60
39	4-méthoxybenzamide	1 h 30	59
40	4-fluorobenzamide	1 h	70
41	nicotinamide	2 h	49
42	isonicotinamide	45 min	40
43	3-chlorobenzamide	1 h	14
44	4-chlorobenzamide	45 min	68
45	1-acétylpipéridine-4-carboxamide	2 h	24
46	4-(méthylthio)benzamide	15 min	56
47	4-(trifluorométhyl)benzamide	30 min	51
48	4-bromobenzamide	15 min	50
49	benzamide	1 h 30	20
50	phénylacétamide	1 h	41

2- Synthèse des amides à partir d'un acide carboxylique

Cette synthèse est réalisée en mettant en réaction l'acide carboxylique et l'amine **14** selon la *méthode G* permettant l'obtention du composé **51** après 22 h de réaction avec un rendement de 40 % (Schéma 10).

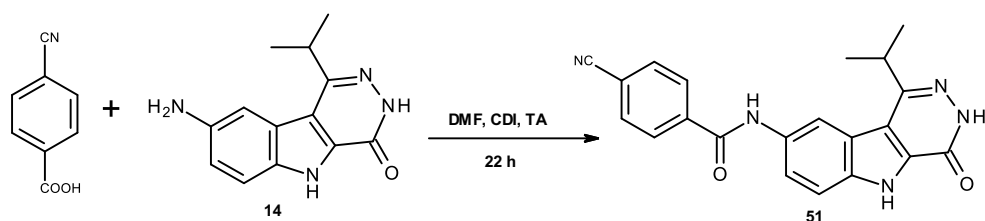


Schéma 10 : Synthèse du composé **51**

C-Synthèse des *N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides

1- Synthèse des amides à partir d'un chlorure d'acide

La synthèse des amides à partir de l'amine **14** (8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole) et des chlorures d'acides choisis a été effectuée selon la *méthode F*. Les temps de réaction et les rendements des composés **52** à **60** sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Synthèse des composés **52-60**

Composés	R _g	Temps de réaction	Rendements (%)
52	4-fluorobenzamide	30 min	40
53	4-(trifluorométhyl)benzamide	30 min	59
54	4-(méthylthio)benzamide	15 min	15
55	4-bromobenzamide	30 min	47
56	4-chlorobenzamide	45 min	46
57	isonicotinamide	45 min	39
58	4-méthoxybenzamide	1 h 30	53
59	4-morpholinoylcarboxamide	4 h	53
60	phénylacétamide	17 h	19

2- Synthèse des amides à partir d'un acide carboxylique

Cette synthèse est effectuée en mettant en réaction l'acide carboxylique, l'amine **14** et le CDI comme précédemment décrit (*Méthode G*). Les temps de réaction et les rendements des composés **61** et **62** sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Synthèse des composés **61** et **62**

Composés	R _g	Temps de réaction	Rendements (%)
61	4-cyanobenzamide	22 h	45
62	1-acétylpipéridin-4-carboxamide	24 h	19

D-Synthèse des dérivés *N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides

1- Synthèse à partir d'un chlorure d'acide

La synthèse de composés **63-70** est réalisée selon la *méthode F*. Les temps de réaction et les rendements sont mentionnés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Synthèse des composés **63** à **70**

Composés	R _g	Temps de réaction	Rendements (%)
63	4-(trifluorométhyl)benzamide	2 h	38
64	4-fluorobenzamide	1 h	28
65	4-méthylthiobenzamide	4 h	48
66	4-méthoxybenzamide	3 h	69
67	4-morpholinoylcarboxamide	6 h	54
68	4-chlorobenzamide	45 min	47
69	4-bromobenzamide	30 min	62
70	isonicotinamide	2 h	30

2- Synthèse à partir d'un acide carboxylique

Le composé **16** est mis en réaction avec l'acide 4-cyanobenzoïque selon la *méthode G* pour donner le composé **71** avec un rendement de 25 % après purification sur colonne

chromatographique en éluant par DCM puis le dichlorométhane-méthanol (95/5) (Schéma 11).

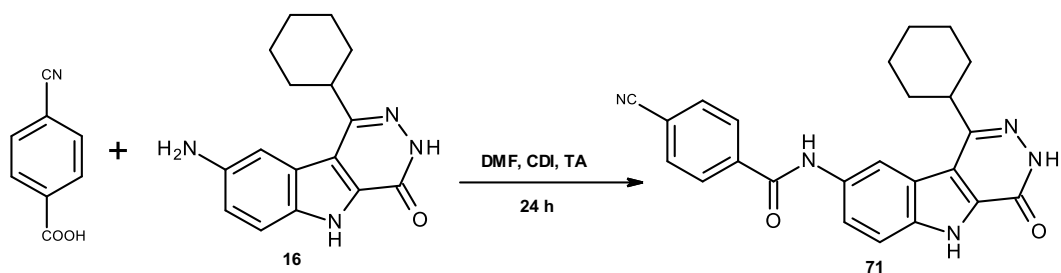


Schéma 11 : Synthèse du composé 71

E-Synthèse des *N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)alkylcarboxamides et arylcarboxamides

1- Synthèse à partir d'un chlorure d'acide

Le composé **17** est mis en réaction avec différents chlorures d'acides commerciaux selon la *méthode F* pour donner les composés **72- 79** avec des rendements de 16 à 63 % après purification sur colonne chromatographique (Tableau 16).

Tableau 16 : Synthèse des composés **68** à **75**

Composés	R ₈	Temps de réaction	Rendements (%)
72	phénylacétamide	17 h	18
73	4-fluorobenzamide	2 h	23
74	4-méthoxybenzamide	2 h	23
75	3-chlorobenzamide	2 h	63
76	4-chlorobenzamide	1 h	54
77	4-morpholinoylcarboxamide	26 h	16
78	3-fluorobenzamide	2 h 30	25
79	4-(trifluorométhyl)benzamide	1 h 30	40

2- Synthèse à partir d'un acide carboxylique

Pour obtenir les composés **80- 82**, le composé **17** est mis en réaction avec différents acides carboxyliques selon la *méthode G*. Les rendements obtenus varient entre 19 et 76 % après purification sur colonne chromatographique (Tableau 17).

Tableau 17 : Synthèse de composés 80 à 82

Composés	R ₈	Temps de réaction	Rendements (%)
80	nicotinamide	44 h	19
81	isonicotinamide	25 h	68
82	1-acétylpipéridin-4-carboxamide	26 h	76

III-Synthèse des *N*-(pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

A-Synthèse des *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

Les sulfonamides présentent un intérêt dans l'industrie pharmaceutique en raison de leurs différentes activités antibactériennes, antifongiques, anti-glaucomeuses, hypoglycémiantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (157–172). Du fait de leur utilité, diverses voies de synthèse ont été développées. La méthode conventionnelle de synthèse des sulfonamides consiste à faire réagir une amine et un chlorure de sulfonyle. Deux protocoles sont généralement utilisés pour cette synthèse. Le premier se fait dans un solvant organique en présence d'une base organique (pyridine, triéthylamine...) qui permet de piéger l'acide chlorhydrique libéré (158,159,170,171,173–176). Dans ces conditions, la

-
157. Maren TH. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1976; 16 (1) :309-27.
 158. Yoshino H, *et al.* *J Med Chem.* 1992; 35 (13) : 2496-7.
 159. Skulnick HI, *et al.* *J Med Chem.* 1995; 38 (26) : 4968-71.
 160. Turner SR, *et al.* *J Med Chem.* 1998; 41 (18) : 3467-76.
 161. Owa T, *et al.* *J Med Chem.* 1999; 42 (19) : 3789-99.
 162. Gadad AK, *et al.* *Eur J Med Chem.* 2000; 35 (9) : 853-7.
 163. Selvam P, *et al.* *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14 (4) : 313-6.
 164. Supuran CT, *et al.* *Med Res Rev.* 2003; 23 (5) : 535-58.
 165. Mohan R, *et al.* *Biochemistry (Mosc).* 2006; 45 (17) : 5440-9.
 166. Özbek N, *et al.* *Bioorg Med Chem.* 2007; 15 (15) : 5105-9.
 167. Zhao Z, *et al.* *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18 (2) : 554-9.
 168. Lopez M, *et al.* *J Med Chem.* 2009; 52 (20) : 6421-32.
 169. Chohan ZH, *et al.* *Eur J Med Chem.* 2010; 45 (3) : 1189-99.
 170. Fortin S, *et al.* *Eur J Med Chem.* 2011; 46 (11) : 5327-42.
 171. Keche AP, *et al.* *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22 (21) : 6611-5.
 172. Shoaib ASS, *et al.* *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13 (1) : 70-86.
 173. Bajare S, *et al.* *Eur J Med Chem.* 2012; 58 : 355-60.
 174. Natarajan A, *et al.* *J Med Chem.* 2004; 47 (21) : 4979-82.
 175. Laconde G, *et al.* *Eur J Med Chem.* 2005; 40 (2) : 167-72.
 176. Purushottamachar P, *et al.* *Bioorg Med Chem.* 2008; 16 (7) : 3519-29.

bisulfonation est la principale réaction secondaire observée lors de l'utilisation d'une amine primaire ce qui rend la purification difficile. La seconde procédure utilise les conditions de Schotten-Baumann et ses variantes. Cette réaction s'effectue dans un milieu biphasique composé d'un solvant organique et d'une solution aqueuse de base (Na_2CO_3 ou NaOH) (176). Le principal inconvénient de cette méthode est l'hydrolyse du chlorure de sulfonyle. Pour améliorer les rendements, il est nécessaire d'utiliser un excès de chlorure de sulfonyle.

Pour la synthèse de nos sulfonamides, nous utilisons des chlorures de sulfonyles commerciaux dans un solvant organique en présence d'une base organique. Les premières tentatives sont réalisées avec de la triéthylamine (**Méthode I**) (171). En fonction des chlorures de sulfonyle utilisés, nous obtenons un mélange de deux produits : produit monosubstitué et produit disubstitué. En raison de la difficulté de séparation des deux produits sur colonne chromatographique, nous avons envisagé une autre méthode. L'utilisation de l'hydrogénocarbonate de sodium comme base (**Méthode J**) permet de contourner ce problème et conduit à l'obtention du produit désiré uniquement (Schéma 12).

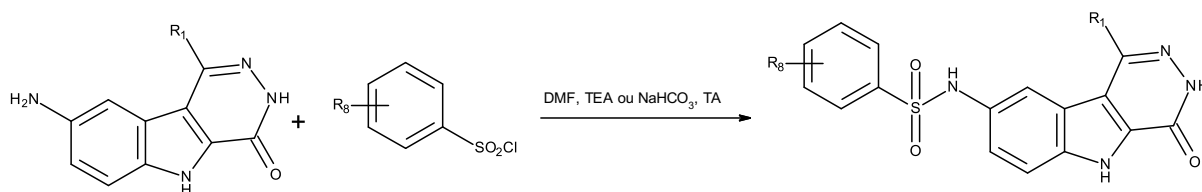


Schéma 12 : Méthode générale de synthèse des sulfonamides

Pour obtenir les différents sulfonamides **83** à **86**, l'amine **13** est mise en réaction avec un chlorure de sulfonyle et de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3). Dans ces conditions, la réaction est rapide et complète mais les purifications sont fastidieuses et difficiles entraînant dans la plupart des cas un faible rendement. Les conditions opératoires ainsi que les rendements sont résumés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Synthèse des composés **83** à **86**

Composés	R ₈	Base	Temps de réaction	Rendements (%)
83	4-F	TEA	1 h	20
84	3-CF ₃	NaHCO ₃	1 h	14
85	3-Me	TEA	2 h	11
86	4-CF ₃	NaHCO ₃	1 h	57

B-Synthèse des *N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

Pour obtenir les composés **87- 91**, le composé **14** est mis en réaction avec différents chlorures de sulfonyle dans le DMF selon la *Méthode I* ou la *méthode J*. Les rendements obtenus varient entre 19 et 76 % après purification sur colonne chromatographique (Tableau 19)

Tableau 19 : Synthèse des composés **88 à 91**

Composés	R ₈	Base	Temps de réaction	Rendements (%)
87	4-F	TEA	45 min	14
88	4-Me	TEA	1 h 30	64
89	3-CF ₃	NaHCO ₃	30 min	29
90	4-Cl	NaHCO ₃	30 min	50
91	4-CF ₃	NaHCO ₃	1 h	52

C-Synthèse des *N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

Les composés **92 à 94** sont synthétisés à partir de l'amine **15** et des chlorures de sulfonyle correspondants selon la *méthode J*. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau 20.

Tableau 20 : Synthèse des composés **92 à 94**

Composés	R ₈	Base	Temps de réaction	Rendements (%)
92	4-Cl	NaHCO ₃	30 min	34
93	4-F	NaHCO ₃	1 h	64
94	3-CF ₃	NaHCO ₃	20 min	11

D-Synthèse des *N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

Le composé **16** est mis en réaction avec différents chlorure de sulfonyle commerciaux selon la *méthode J* pour donner les composés **95- 96** avec de bons rendements après purification sur colonne chromatographique (Tableau 21).

Tableau 21 : Synthèse des composés **95** à **97**

Composés	R ₈	Base	Temps de réaction	Rendements (%)
95	4-Cl	NaHCO ₃	30 min	53
96	3-CF ₃	NaHCO ₃	30 min	58
97	4-F	NaHCO ₃	30 min	54

E-Synthèse des *N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)arylsulfonamides

L'amine **17** est mise en réaction avec différents chlorures de sulfonyle commerciaux selon la *méthode J* pour donner les composés **98- 100** avec de bons rendements après purification sur colonne chromatographique (Tableau 22).

Tableau 22 : Synthèse des composés **98** à **100**

Composés	R ₈	Base	Temps de réaction	Rendements (%)
98	4-Cl	NaHCO ₃	1 h	59
99	3-CF ₃	NaHCO ₃	1 h	40
100	4-F	NaHCO ₃	2 h	24

IV-Synthèse de *N*-(1-alkyl ou aryl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée et cyclisation intramoléculaire

A-Synthèse de la *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole)-*N'*-2-chloroéthylurée

Au cours des dernières décennies, différents dérivés d'urée ont été synthétisés et évalués pour leurs propriétés anticancéreuses (177–187). Parmi ces dérivés, plusieurs ont montré des activités intéressantes vis-à-vis de certaines kinases impliquées dans le cycle cellulaire. En raison des activités encourageantes surtout vis-à-vis des tyrosines kinases, nous avons envisagé l'introduction d'une fonction urée sur quelques molécules.

Pour accéder au composé désiré, le composé **13** en mis en réaction en présence du 2-chloroéthylisocyanate dans le DMF à température ambiante (170,185). Le produit désiré **101** précipite dans le milieu réactionnel. Il est récupéré après filtration, lavé à l'eau, séché et trituré dans de l'éther diisopropylique (*Méthode K*) avec un rendement de 58 % (Schéma 13).



Schéma 13 : Synthèse du composé **101**

-
177. Manley PW, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14 (23) : 5793-7.
178. Nakamura K, *et al.* Cancer Res. 2006; 66 (18) : 9134-42.
179. Wilhelm S, *et al.* Nat Rev Drug Discov. 2006; 5 (10) : 835-44.
180. Dai Y, *et al.* J Med Chem. 2007; 50 (7) : 1584-97.
181. Cao P, Huang X-F, *et al.* Chem Biodivers. 2007; 4 (5) : 881-6.
182. Ling S, *et al.* Heteroat Chem. 2008; 19 (1) : 2-6.
183. Song D-Q, *et al.* J Med Chem. 2008; 51 (11) : 3094-103.
184. Song D-Q, *et al.* Bioorg Med Chem Lett. 2009; 19 (3) : 755-8.
185. Song D-Q, *et al.* Bioorg Med Chem. 2009; 17 (11) : 3873-8.
186. Li H-Q, *et al.* Eur J Med Chem. 2009; 44 (2) : 453-9.
187. Zhang B, *et al.* Chem Pharm Bull. 2012; 60 (8) : 1046-54.

B-Synthèse de la *N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée

La synthèse du composé **98** est réalisée à partir de l'amine **14** (8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole) et du 2-chloroéthylisocyanate dans le DMF selon la **Méthode K**. Après addition d'eau au milieu réactionnel, le composé désiré précipite dans le milieu et est récupéré après filtration. Le résidu obtenu est purifié sur colonne chromatographique en utilisant un gradient d'élution (acétate d'éthyle puis le mélange acétate d'éthyle-méthanol (9/1)) pour donner le composé **102** avec un rendement de 43 % (Schéma 14).

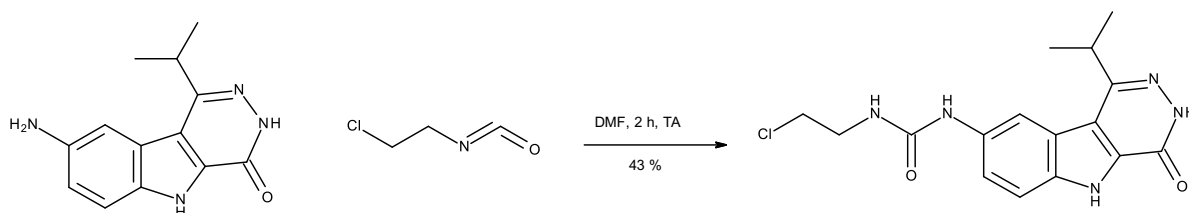


Schéma 14 : Synthèse du composé **102**

C-Synthèse de la *N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée

La synthèse du composé **103**, réalisée à partir de l'amine **16** (8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole) et du 2-chloroéthylisocyanate est effectuée selon les conditions de la **méthode K**. Celui-ci précipite dans le milieu réactionnel. Après lavage, le composé **103** est obtenu avec un rendement de 16 % (Schéma 15).

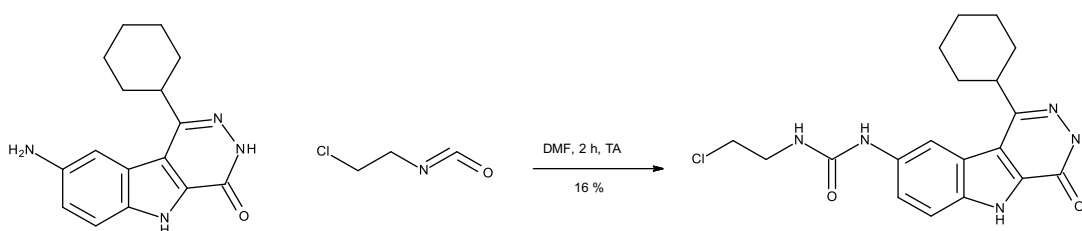


Schéma 15 : Synthèse du composé **103**

D-Synthèse de la *N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée et de la *N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée

En raison de la difficulté de purification de ces produits, la synthèse de ces composés a été abandonnée.

E-Cyclisation des dérivés d'urée : synthèse du 8-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole

Le composé **102** est cyclisé selon la méthode de Fortin et *al.* (170). Ce composé est mis en réaction avec l'hydrure de sodium (NaH) qui favorise la cyclisation (**Méthode L**). L'hydrure de sodium est une base utilisée pour la déprotonation et pour la réduction dans différentes réactions de synthèse organique. L'hydrure de sodium commercial que nous avons utilisé est la forme dispersée dans la paraffine.

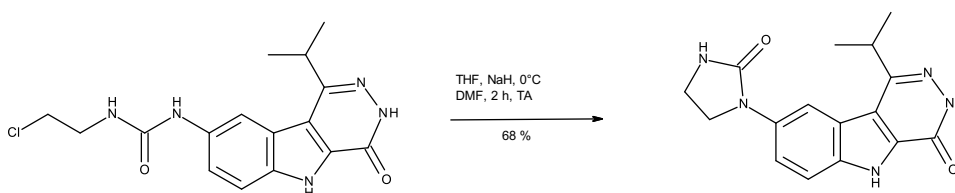


Schéma 16 : Synthèse du composé **104**

V-Synthèse du *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)-éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-alkylcarboxamide et du *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-2,5-bis-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-alkylcarboxamide

Devant les problèmes de solubilité rencontrés par la plupart des molécules finales, surtout les amides, l'introduction d'une chaîne diéthylaminoéthyle en position 5 et ou en position 3 du tricycle a été envisagée sur certains composés afin d'améliorer la solubilité et d'étudier l'incidence de ces substitutions sur l'activité biologique de ces molécules.

A-Synthèse des amides substitués en position 5

En se basant sur les travaux d'El-Kashef et *al.* (188), nous avons utilisé comme base le carbonate de potassium (K_2CO_3) dans le DMF pour procéder à la monosubstitution en position 5 de quelques amides précédemment synthétisés. Les premières tentatives de substitution sont faites dans le DMF au reflux. Mais les résultats obtenus sont différents de ceux attendus. En effet, en présence de carbonate de potassium et d'un équivalent de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle, il se forme préférentiellement le produit disubstitué avec une conversion totale de l'amine (contrôle par l'UPLC-MS). Nous avons envisagé dans un premier temps une baisse de la température du milieu réactionnel à 80 °C. Dans ces conditions, nous obtenons le produit disubstitué préférentiellement. La diminution simultanée du temps et de la température de réaction conduit toujours à la formation du produit disubstitué. Pour contourner cette difficulté, nous avons envisagé l'utilisation d'une autre base : le carbonate de sodium (Na_2CO_3). Avec celui-ci, en présence d'un équivalent de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle à 80 °C nous obtenons le produit monosubstitué (**Méthode M**). En mettant en réaction les composés **18**, **19**, **16**, **25** et **27** avec un équivalent de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle à 80° C dans le DMF, nous obtenons respectivement les composés **105**, **106**, **107**, **108** et **109** (Schéma 17). Les temps de réaction ainsi que les rendements des réactions varient entre 33 et 56 % (Tableau 23).

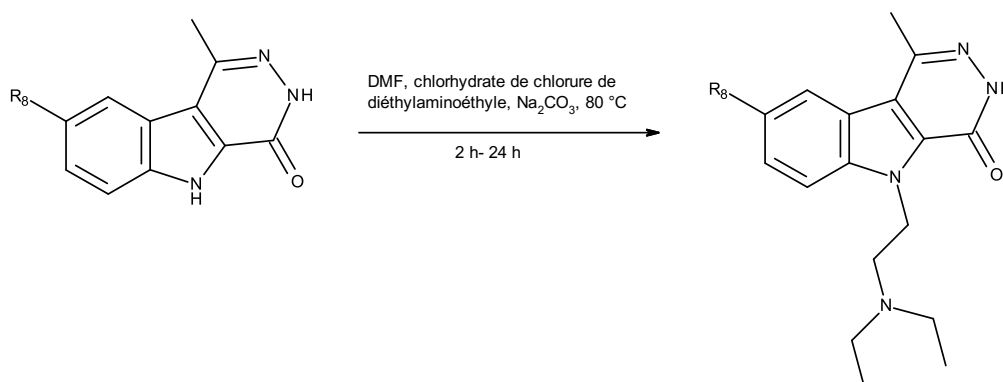


Schéma 17 : Synthèse des composés **105** à **109**

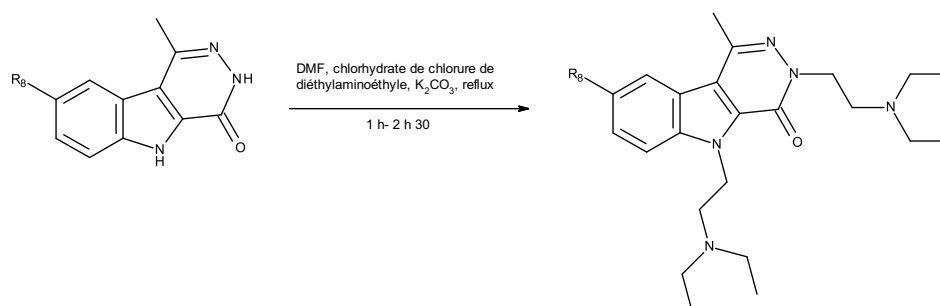
188. El-Kashef H, *et al.* Arkivoc. 2003; 14 : 198-209.

Tableau 23 : Synthèse des composés 105 à 109

Composés	R ₈	R ₅	Temps de réaction	Rendement (%)
105	4-méthoxybenzamide	diéthylaminoéthyle	2 h	35
106	morpholinoylcarboxamide	diéthylaminoéthyle	3 h	56
107	3-chlorobenzamide	diéthylaminoéthyle	24 h	53
108	3-fluorobenzamide	diéthylaminoéthyle	3 h 30	33
109	4-trifluorométhylbenzamide	diéthylaminoéthyle	24	48

B-Synthèse des amides substitués en position 3 et 5

Par la suite, nous avons procédé à la synthèse de quelques produits disubstitués en utilisant deux équivalents de chlorure de chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle en présence de carbonate de potassium au reflux (**Méthode N**). La réaction est rapide et permet d'obtenir les composés désirés d'abord sous forme d'une huile (Schéma 18) qui cristallise lentement (Tableau 24).

**Schéma 18 : Synthèse des composés 110 et 111****Tableau 24 : Synthèse des composés 110 et 111**

Composés	R ₈	R ₃ et R ₅	Temps de réaction	Rendement (%)
110	4-méthoxybenzamide	diéthylaminoéthyle	1 h	39
111	4-morpholinoylcarboxamide	diéthylaminoéthyle	2 h 30	26

VI-Conclusion

Au total, 111 composés ont été synthétisés. Parmi ceux-ci, dix-huit sont des intermédiaires ayant servi à la synthèse des composés finaux (composés **1** à **17** ainsi que l'amide **35**), les quatre-vingt-treize autres composés étant des produits finaux. En raison de la difficulté de purification, deux composés ont été abandonnés.

Pour la synthèse des amides, deux méthodes sont utilisées. La première consiste à mettre en réaction l'amine et différents chlorure d'acides commerciaux dans le DMF en raison de la faible solubilité des amines synthétisées. Les temps de réaction varient fortement en fonction du chlorure d'acide utilisé mais aussi de l'amine. Un total de cinquante quatre composés sont synthétisés par cette méthode. La deuxième méthode consiste à faire réagir l'amine et un acide carboxylique en présence d'un agent de couplage. Les premières tentatives se sont révélées infructueuses car les réactions sont incomplètes avec de très faibles rendements et les purifications quasi-impossibles à mettre en œuvre en raison de la difficulté de séparation des amides et amines. La modification des conditions opératoires (changement d'agent de couplage et de solvant) nous a permis d'obtenir les différents amides désirés (au total dix composés). Ces amides ont généralement une faible solubilité dans les solvants organiques usuels. Ils sont lavés et ou purifiés sur colonne chromatographique. Au total, soixante-quatre nouveaux amides sont synthétisés.

Dix-sept sulfonamides sont aussi synthétisés à partir des différentes amines. Les premières molécules sont synthétisées en présence de la triéthylamine. Dans certains cas, et en fonction des produits de départ (amine et chlorure de sulfonyle), nous obtenons un mélange du produit monosubstitué et d'un produit disubstitué difficile à séparer sur colonne chromatographique. Pour contourner ce problème, la triéthylamine est remplacée par l'hydrogencarbonate de sodium. En comparaison des amides précédemment synthétisés, ces sulfonamides présentent de meilleures caractéristiques physico-chimiques (point de fusion, solubilité).

L'introduction d'un cycle (oxoimidazole) en position 8 du pyridazino-indole a aussi été expérimentée. Pour ce faire, les urées (composés **101** à **103**) sont synthétisés à partir de nos différentes amines. La synthèse de certaines urées est abandonnée en raison de la difficulté

de purification. Un seul produit (composé **104**) est synthétisé en mettant en réaction l'urée **102** en présence de l'hydrure de sodium.

Pour pallier la difficulté de solubilisation des amides finaux, nous avons expérimenté l'introduction d'une chaîne diéthylaminoéthyle en position 5 et/ou 3. En fonction des conditions opératoires, la réaction de substitution se fait uniquement en position 5 ou simultanément en position 5 et 3. Nous obtenons au total cinq composés substitués en position 5 du pyridazino-indole (composés **105** à **109**) et deux composés substitués en position 5 et 3 (composé **110** et **111**). L'introduction de cette chaîne améliore les caractéristiques physico-chimiques et augmentent leur lipophilie.

Chapitre II- Partie expérimentale

I- Généralités

Les solvants commerciaux sont utilisés tels quels sans purification préalable. Les solvants anhydres sont distillés ou séchés selon les procédés décrits ci-dessous et conservés sous atmosphère inerte (azote ou argon) :

- distillation sur sodium et benzophénone pour le tétrahydrofurane (THF)
- passage sur le chlorure de calcium pour les solvants chlorés tels que le dichlorométhane

Les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice Merck 60 F254 (épaisseur 0,25) ou par l'UPLC-MS. Les rendements sont calculés sur les produits purs après lavage ou purification par chromatographie. Les purifications par chromatographie sont réalisées sur colonne chromatographique ouverte ou sur une colonne chromatographie flash. La phase stationnaire utilisée est le gel de silice Merck 60 (70-230 mesh ASTM).

Les points de fusion en degré Celsius (°C) sont mesurés avec un tube capillaire sur un appareil digital IA9300 Electrothermal.

Les spectres infrarouges sont réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Shimadzu IRAffinity-1 IR-FT. Les spectres RMN du proton et du carbone sont réalisés sur les composés purs dissous dans le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d₆) avec parfois quelques gouttes de D₂O sur un spectrophotomètre Bruker AVANCE 400 MHz. Les déplacements chimiques δ sont rapportés par rapport au déplacement chimique du tétraméthylsilane utilisé comme standard. Les valeurs sont exprimées en partie par million (ppm). Les multiplicités sont rapportées comme suit :

s = singulet

d = doublet

dd = doublet de doublet

ddd = doublet de doublet de doublet

dddd = doublet de doublet de doublet de doublet

dt = doublet de triplet

t = triplet

m = multiplet

q = quadruplet

Les spectres de masse sont réalisés sur un appareil Waters ACQUITY UPLC-MS composé d'un détecteur quadripôle, d'un spectromètre de masse équipé d'une interface d'ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation Interface = ESI) et d'un détecteur à barette de diodes.

II-Méthodes générales de synthèse

Méthode A : Synthèse de l'hydrazone (1)

Dans 20 ml d'éthanol, introduire 1,4 g de 4-nitrophényl hydrazine. Ajouter 1,11 ml de pyruvate d'éthyle et agiter au reflux pendant 1 h 30. Revenir à température ambiante puis refroidir le milieu réactionnel dans un bain de glace. Filtrer et laver le précipité avec de l'éthanol. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec l'éther diéthylique. Le produit désiré est obtenu sous forme de cristaux de couleur orange avec un rendement de 55 %.

Méthode B : Synthèse de l'indole (2)

Introduire 2 g de 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle dans 22 g d'acide polyphosphorique. Mélanger et chauffer à 85 °C pendant 3 h 30. Revenir à température ambiante et ajouter de l'eau glacée au milieu réactionnel. Triturer pour obtenir une solution. Ajouter une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium pour ramener le pH à 9. Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et triturer le précipité avec de l'éther diisopropylique puis filtrer. Le produit obtenu est une poudre orange pâle avec un rendement de 57 %.

Méthode C : Procédure générale d'acylation en position 3 de l'indole (3-7)

Introduire 1 g (4,27 mmol) de 5-nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du chlorure de calcium (CaCl₂) à 0 °C. Ajouter du tétrachlorure d'étain (SnCl₄) dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 min. Ajouter ensuite le chlorure d'acyle souhaité, dilué dans quelques ml de dichlorométhane sec puis 10 à 15 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 1 à 6 h. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glacé et extraire avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et triturer le précipité avec de l'éther diisopropylique puis filtrer. Les produits désirés sont obtenus avec des rendements variant entre 75 et 87 %.

Méthode D : Procédure générale de synthèse du noyau pyridazino[4,5-*b*]indole (8-12)

Dissoudre 1 g de l'indole acylé en position 3 dans 30 ml d'éthanol absolu au reflux. Ajouter l'hydrazine monohydrate et agiter pendant 6 à 24 h. Laisser refroidir et filtrer le précipité. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. Les produits désirés sont obtenus avec des rendements de 78 à 97 %.

Méthode E : Procédure générale d'accès aux 8-aminopyridazino[4,5-*b*]indole (13-17)

Introduire 0,5 g du 8-nitro-pyridazino[4,5-*b*]indole dans un ballon contenant de l'acide chlorhydrique concentré (20 ml) et de l'eau (20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 15 équivalents de chlorure d'étain II (SnCl₂). Mettre le mélange au reflux et agiter pendant 2 h 30 à 4 h. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre. Evaporer le solvant, triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 89 à 95 %.

Méthode F : Procédure générale de synthèse des amides à partir d'un chlorure d'acyle

Dissoudre 100 mg des 8-amino-pyridazino[4,5-*b*]indole correspondant dans 3 ml de diméthylformamide (DMF) à température ambiante. Ajouter la triéthylamine (TEA) puis le

chlorure d'acide souhaité et agiter à température ambiante pendant 15 min à 48 h. Filtrer le précipité ou l'extraire avec un solvant organique en cas d'absence de précipité. Laver ou purifier le résidu sur colonne chromatographique. Les produits sont obtenus avec des rendements de 9 à 75 %.

Méthode G : Procédure générale de synthèse des amides à partir d'un acide carboxylique

Dans un ballon contenant 4 ml de DMF, introduire le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) et l'acide 4-carboxylique souhaité et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite le 8-amino-pyridazino[4,5-b]indole et poursuivre l'agitation pendant 21 à 44 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau ou purifier sur une colonne chromatographique en cas de besoin. Les produits désirés sont obtenus avec des rendements de 11 à 76 %.

Méthode H : Procédure de synthèse du *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)-3-aminobenzamide

Dans un ballon, introduire le *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)-3-nitrobenzamide, 15 mg de Pd/C à 10%, 10 ml d'éthanol et 1 ml de cyclohexène. Agiter le milieu réactionnel à 110 °C pendant 27 h. Filtrer et laver le résidu plusieurs fois avec du méthanol et de l'acétone. Evaporer le filtrat, dissoudre le résidu dans un mélange méthanol-acétone et filtrer. Evaporer le solvant et récupérer le résidu sec. Le produit désiré est récupéré sous forme d'une poudre beige avec un rendement de 100 %.

Méthode I : Procédure générale de synthèse des sulfonamides avec la TEA

Dissoudre les 8-aminopyridazino[4,5-b]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante puis ajouter la TEA et le chlorure de sulfonyle correspondant et agiter à température ambiante pendant 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec à l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique ouverte ou une colonne flash. Le produit désiré est récupéré avec un rendement de 11 à 64 %.

Méthode J : Procédure générale de synthèse des sulfonamides avec l'hydrogencarbonate de sodium

Dissoudre le 8-aminopyridazino[4,5-b]indole dans le DMF à température ambiante. Ajouter du bicarbonate de sodium (NaHCO₃, 2 équivalents), laisser dissoudre puis ajouter le

chlorure sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 20 min à 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique. Les produits désirés sont obtenus avec des rendements variant entre 11 et 64 %.

Méthode K : Procédure générale de synthèse des urées

Dissoudre 100 mg des 8-aminopyridazino[4,5-b]indole dans le DMF à température ambiante et ajouter le 2-chloroéthylisocyanate. Poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique et sécher. Les produits désirés sont obtenus sous forme de poudre blanche avec des rendements variant entre 16 et 58 %.

Méthode L : Procédure générale de cyclisation de l'urée

Introduire dans un ballon contenant du THF fraîchement distillé du *N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-b]indole-*N'*-2-chloroéthylurée sous atmosphère d'azote. Après quelques minutes d'agitation à 0 °C, ajouter du NaH (1,15 mmol) et ajouter du DMF anhydre. Après 2 h d'agitation sous atmosphère d'azote, ajouter de l'eau et filtrer. Laver le précipité avec de l'eau, de l'acétone et du méthanol successivement. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre beige avec un rendement de 68 %.

Méthode M : Procédure générale de synthèse des amides substitués en position 3

Dissoudre 100 mg de l'amide dans le DMF à 80 °C. Ajouter du carbonate de sodium (Na₂CO₃) et laisser dissoudre. Ajouter ensuite le chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter à 80 °C pendant 2 h à 24 h. Evaporer le solvant, reprendre le résidu sec avec de l'eau et extraire trois fois avec du dichlorométhane et purifier sur colonne chromatographique. Les produits sont obtenus avec des rendements de 35 à 56 %.

Méthode N : Procédure générale de synthèse des amides substitués en position 3 et 5

Dissoudre 100 mg de l'amide dans 5 ml de DMF à 130 °C. Ajouter du carbonate de potassium (K₂CO₃) et laisser dissoudre. Ajouter ensuite du chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter au reflux pendant 1 h à 2 h 30. Filtrer pour éliminer le reste de K₂CO₃ et évaporer le solvant. Ajouter de l'eau au résidu et extraire avec le dichlorométhane

ou purifier sur colonne chromatographique. Les produits désirés sont obtenus sous forme d'huile avec des rendements variant entre 26 et 39 %.

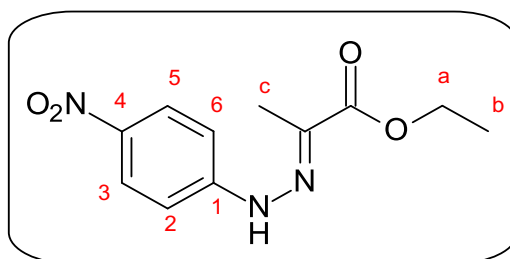
III-Protocoles et caractérisations

2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle (1)

$C_{11}H_{13}N_3O$

MM = 251,24 g.mol⁻¹

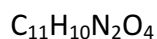
Tf = 180- 181 °C



Dans 20 ml d'éthanol, introduire 1,4 g (9,14 mmol) de 4-nitrophényl hydrazine. Ajouter 1,11 ml (9,56 mmol) de pyruvate d'éthyle et agiter au reflux pendant 1 h 30. Revenir à température ambiante puis refroidir le milieu réactionnel à 0 °C dans un bain de glace. Filtrer et laver le précipité avec de l'éthanol. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec l'éther diéthylique. Le produit est obtenu sous forme de cristaux de couleur orange avec un rendement de 55 %.

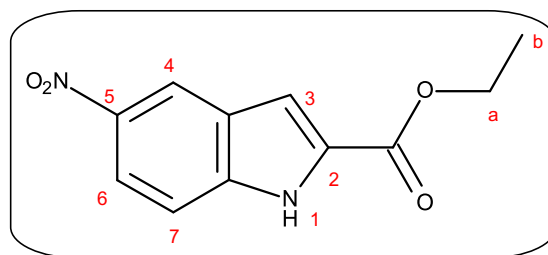
¹H RMN, (400 MHz, DMSO-d₆) : 1,32 (t, 3H, ³J = 7,2 Hz, H_b), 2,16 (s, 3H, H_c), 4,26 (q, 2H, ³J = 7,2Hz, H_a), 7,43 (d, 2H, ³J = 9,2 Hz, H₂ et H₆), 8,23 (d, 2H, ³J = 9,2 Hz, H₃ et H₅), 10,54 (s, 1H, NH)

5- nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle (2)



$$\text{MM} = 234,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$\text{Tf} = 220\text{-}221 \text{ }^\circ\text{C}$$



Introduire 2 g (7,96 mmol) de 2-(4-nitrophénylhydrazono)propanoate d'éthyle dans 22 g d'acide polyphosphorique (65 mmol). Mélanger et chauffer à 85 °C pendant 3 h 30. Revenir à température ambiante et ajouter de l'eau glacée au milieu réactionnel. Triturer pour obtenir une solution. Ajouter une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium pour ramener le pH à 9. Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et triturer le précipité avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre orange pâle avec un rendement de 57 %.

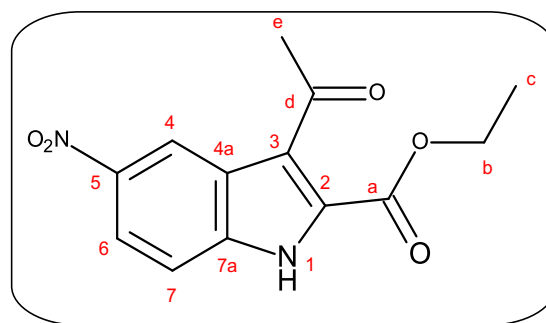
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6), δ ppm : 1,38 (t, 3H, $^3\text{J} = 7,2$ Hz, H_b), 4,40 (q, 2H, $^3\text{J} = 7,2$ Hz, H_a), 7,46 (s, 1H, H₃), 7,63 (d, 1H, $^3\text{J} = 9,2$ Hz, H₇), 8,15 (dd, 1H, $^3\text{J} = 9,2\text{Hz}$, $^4\text{J} = 2$ Hz, H₆), 8,75 (d, 1H, $^4\text{J} = 2$ Hz, H₄), 12,63 (s, 1H, NH)

3-acétyl-5-nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle (3)

$C_{13}H_{12}N_2O_5$

MM = 276,24 g.mol⁻¹

Tf = 197- 198 °C



Introduire 1 g (4,27 mmol) de 5-nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du CaCl₂ à 0°C. Ajouter 5,12 ml (5,12 mmol) de SnCl₄ dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 min. Ajouter ensuite 0,61 ml (8,52 mmol) de chlorure d'acétyle dilué dans 5 ml de dichlorométhane séché puis 10 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 3 h 30. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glace et extraire quatre fois avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et triturer le précipité avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. Le produit est obtenu sous forme de poudre beige avec un rendement de 87 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,43 (t, 3H, ³J = 7,2 Hz, H_c), 2,69 (s, 3H, H_e), 4,49 (q, 2H, ³J = 7,2 Hz, H_b), 7,73 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,23 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H₆), 8,9 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₄), 13,09 (s, 1H, NH)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 13,89 (C_c), 31,11 (C_e), 62,16 (C_b), 113,64 (C₇), 119,07 (C₃), 120,01 (C₆), 120,75 (C₄), 124,99 (C₂), 131,54 (C_{3a}), 138 (C_{7a}), 142,96 (C₅), 160,15 (C_a), 196,09 (C_d)

[M+H]⁺ : m/z = 277,1

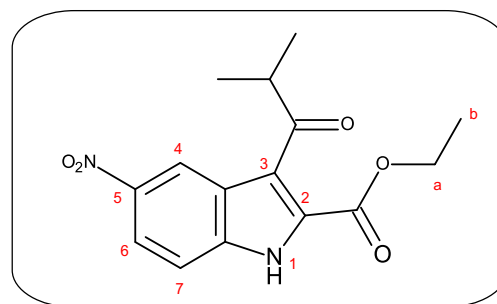
3-isobutyryl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle (4)

$C_{15}H_{16}N_2O_5$

MM = 304,30 g.mol⁻¹

Tf = 214- 215 °C

Rf = 0,18 (DCM)



Introduire 1 g (4,26 mmol) de 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du CaCl₂ à 0 °C. Ajouter 8,52 ml (8,52 mmol) de SnCl₄ dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 minutes. Ajouter ensuite 1,27 ml (12,78 mmol) de chlorure d'isobutyryle dilué dans 5 ml de dichlorométhane séché puis 15 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 5 h. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glace et extraire quatre fois avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et triturer le précipité avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. Le produit est obtenu sous forme de poudre beige avec un rendement de 81 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,15 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 1,40 (t, 3H, ³J = 7 Hz, H_b), 3,54 (sep, 1H, ³J = 6 Hz, H_{1'}), 4,47 (q, 2H, ³J = 8 Hz, H_a), 7,74 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,24 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H₆), 8,64 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₄), 13,07 (s, 1H, NH, H₁)

[M+H]⁺ : m/z = 305,1

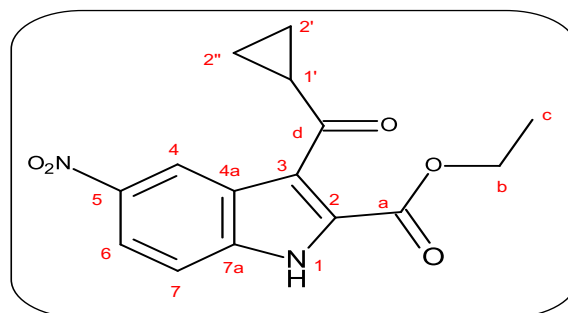
3-cyclopropane carbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle (5)

C₁₅H₁₄N₂O₅

MM = 302,28 g.mol⁻¹

Tf > 400° C

Rf = 0,18 (DCM)



Introduire 1 g (4,26 mmol) de 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du CaCl₂ à 0 °C. Ajouter 8,52 ml (8,52 mmol) de SnCl₄ dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 min. Ajouter ensuite 1,17 ml (12,78 mmol) de chlorure de cyclopropane carbonyle dilué dans 5 ml de dichlorométhane séché puis 15 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 1 h. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glace et extraire quatre fois avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et récupérer le résidu sec. Le produit est obtenu sous forme de poudre beige avec un rendement de 85 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,09-1,11 (m, 2H, H_{2'} ou H_{2''}), 1,17-1,20 (m, 2H, H_{2'} ou H_{2''}), 1,41 (t, 3H, ³J = 7,2 Hz, H_c, CH₃), 2,70- 2,76 (m, 1H, H_{1'}), 4,47 (q, 2H, ³J = 7 Hz, H_b, CH₂), 7,73 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,22 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₆), 8,73 (d, 1H, ⁴J = 2,4 Hz, H₄), 13,10 (s, 1H, NH, H₁)

[M+H]⁺ : m/z = 303,1

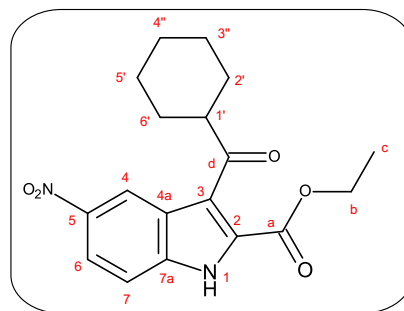
3-cyclohexane carbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle (6)

$C_{18}H_{20}N_2O_5$

MM = 344,36 g.mol⁻¹

Tf = 222- 223 °C

Rf = 0,13 (DCM)



Introduire 1 g (4,26 mmol) de 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du CaCl₂ à 0 °C. Ajouter 8,52 ml (8,52 mmol) de SnCl₄ dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 min. Ajouter ensuite 1,73 ml (12,78 mmol) de chlorure de cyclohexane carbonyle dilué dans 5 ml de dichlorométhane séché puis 15 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 6 h. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glace et extraire quatre fois avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et récupérer le résidu sec. Le produit est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 75 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,21- 1,35 (m, 3H, H_{3'} et H_{5'}), 1,40 (t, 3H, ³J = 7,2 Hz, H_c), 1,46 (d, 1H, ³J = 11,6 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 1,66 (dd, 1H, ³J = 12 Hz, ⁴J = 4,8 Hz, H_{4'}), 1,76 (dd, 2H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 3 Hz, H_{3'} et H_{5'}), 1,86 (dd, 1H, ²J = 14 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 3,27 (tt, 1H, ³J = 10,9 Hz, ⁴J = 3,2 Hz, H_{1'}), 4,47 (q, 2H, ³J = 7,2 Hz, H_b), 7,72 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,22 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 2,2 Hz, H₆), 8,62 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₄), 13,05 (s, 1H, NH)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 14,16 (C_c), 25,29 (C_{3'} et C_{5'}), 25,66 (C_{4'}), 28,78 (C_{2'} et C_{6'}), 50,21 (C_{1'}), 62,25 (C_b), 113,95 (C₇), 118,44 (C₄), 120,28 (C₆), 121,61 (C₃), 125,38 (C₂), 129,88 (C_{4a}), 138,53 (C_{7a}), 142,89 (C₅), 160,40 (C_a), 203,15 (C_d)

IR (cm⁻¹) : νNH : 3273 (NH), νCHaliph : 2928, 2854, νC=O (ester) : 1693, νC=O (cétone) = 1622, νNO₂ = 1537, 1335, νC-O (ester) = 1254

[M+H]⁺ : m/z = 345,2

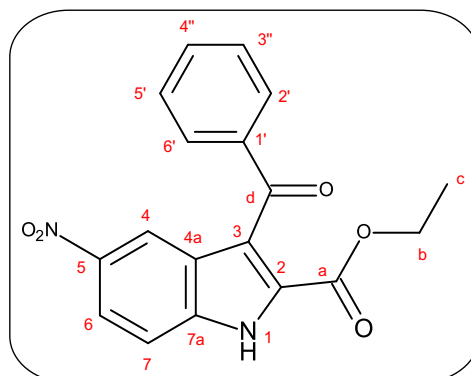
3-phénylcarbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle (7)

C₁₈H₁₄N₂O₅

MM = 338,32 g.mol⁻¹

Tf = 222- 224 °C

Rf = 0,13 (DCM)



Introduire 1 g (4,26 mmol) de 5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans un ballon contenant 15 ml de dichlorométhane préalablement séché sur du CaCl₂ à 0 °C. Ajouter 8,52 ml (8,52 mmol) de SnCl₄ dans le ballon sous atmosphère d'argon. Revenir à température ambiante et laisser sous agitation pendant 30 min. Ajouter ensuite 1,49 ml (12,78 mmol) de chlorure de benzoyle dilué dans 5 ml de dichlorométhane séché puis 15 ml de nitrométhane. Laisser sous agitation pendant 4 h. Verser le milieu réactionnel sur un mélange eau/glacé et extraire quatre fois avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane. Evaporer le solvant et récupérer le résidu sec. Le produit est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 77 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 0,84 (t, 3H, ³J = 7 Hz, H_c), 4,00 (q, 2H, ³J = 6,8 Hz, H_b), 7,57 (t, 2H, ³J = 7,6 Hz, H_{3'} et H_{5'}), 7,71 (t, 1H, ³J = 7,4 Hz, H_{4'}), 7,79 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 7,83 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 8,26 (d, 1H, ³J = 9,2Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H₆), 8,56 (d, 1H, H₄), 13,27 (s, 1H, NH)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 13,09 (C_c), 61,45 (C_b), 113,90 (C₇), 117,96 (C₄), 119,69 (C₃), 120,11 (C₆), 125,64 (C₂), 128,61 (C_{3'} et C_{5'}), 128,90 (C_{2'} et C_{6'}), 130,95 (C_{4a}), 133,16 (C_{4'}), 138,69 (C_{7a}), 138,79 (C_{1'}), 142,61 (C₅), 159,89 (C_a), 191,28 (C_d)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3252 (NH), νCHarom = 3161, 3099, 2854, νCHaliph = 2988, νC=O (ester) = 1687, νC=O (cétone) = 1645, νNO₂ = 1520, 1331, νC-O (ester) = 1263

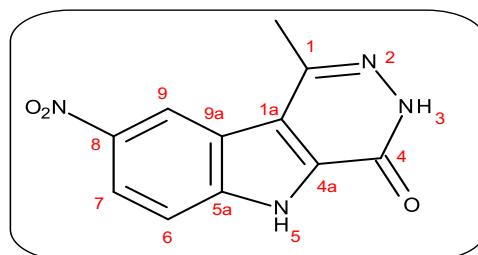
[M+H]⁺ : m/z = 339,1

1-méthyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (8)

$C_{11}H_8N_4O_3$

MM = 244,21 g.mol⁻¹

Tf = 350- 351 °C



Dissoudre 1 g (3,62 mmol) de 3-acétyl-5-nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle dans 30 ml d'éthanol absolu au reflux. Ajouter 0,36 ml (7,24 mmol) d'hydrazine monohydrate et agiter pendant 6 h. Laisser refroidir et filtrer. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 89 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 2,84 (s, 3H, CH₃), 7,83 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 8,23 (dd, 1H, ³J = 9,2Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,98 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 12,86 (s, 1H, NH, H₃), 13,49 (s, 1H, NH, H₅)

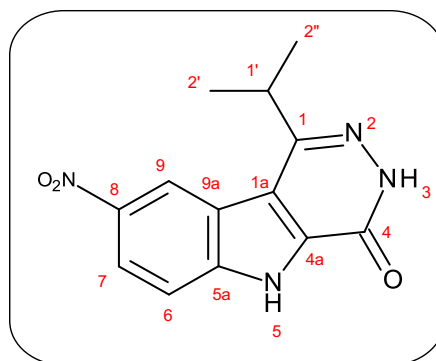
[M+H]⁺ : m/z = 245,1

1-isopropyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (9)

$C_{13}H_{12}N_4O_3$

MM = 272,26 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 1 g (3,28 mmol) de 3-isobutyryl-5-nitro-1*H*-indole-2-carboxylate d'éthyle dans 30 ml d'éthanol absolu à 80 °C. Ajouter 0,48 ml (9,86 mmol) d'hydrazine monohydrate et agiter pendant 19 h. Laisser refroidir et filtrer. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 97 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,76 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,84 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 8,42 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,94 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₉), 12,92 (s, 1H, NH, H₃), 13,53 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 20,60 (C_{2'} et C_{2''}), 31,07 (C_{1'}), 113,94 (C₆), 117,20 (C_{1a}), 119,11 (C₉), 119,93 (C_{9a}), 121,58 (C₇), 134,48 (C_{4a}), 141,95 (C_{5a}), 142,20 (C₈), 149,10 (C₁), 154,92 (C₄)

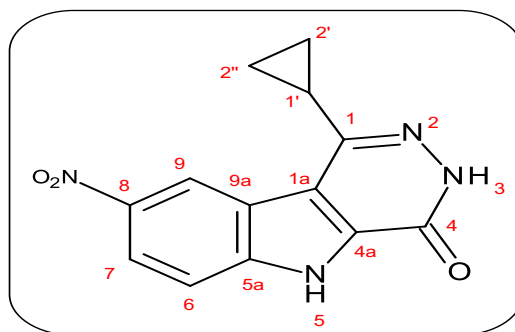
[M+H]⁺ : m/z = 273,1

1-cyclopropyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (10)

$C_{13}H_{10}N_4O_3$

MM = 270,24 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 1 g (3,31 mmol) de 3-cyclopropane carbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans 30 ml d'éthanol absolu à 110 °C. Ajouter 0,49 ml (9,92 mmol) d'hydrazine monohydrate et agiter pendant 19 h. Laisser refroidir et filtrer. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 97 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,00-1,04 (m, 2H, H_{2'} ou H_{2''}), 1,14-1,16 (m, 2H, H_{2'} ou H_{2''}), 2,46 (qn, 1H, ³J = 5 Hz, H_{1'}), 7,81 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 8,39 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 9,13 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₉), 12,80 (s, 1H, NH, H₃), 13,47 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 6,59 (C_{2'} et C_{2''}), 13,20 (C_{1'}), 113,96 (C₆), 118,79 (C_{1a}), 119,27 (C₉), 120,71 (C_{9a}), 121,77 (C₇), 134,11 (C_{4a}), 142,03 (C_{5a}), 142,28 (C₈), 145,08 (C₁), 155,10 (C₄)

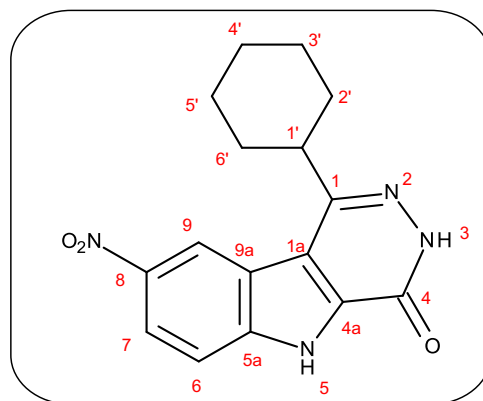
[M+H]⁺ : m/z = 271,1

1-cyclohexyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (11)

C₁₆H₁₆N₄O₃

MM = 312,32 g.mol⁻¹

Tf = 371-373 °C



Dissoudre 1 g (2,90 mmol) de 3-cyclohexane carbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans 30 ml d'éthanol absolu à 150 °C. Ajouter 0,43 ml (8,71 mmol) d'hydrazine monohydrate et agiter pendant 24 h. Laisser refroidir et filtrer. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 78 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,31 (s, 1H, H_{4'ax}), 1,56 (t, 4H, ³J_{ax-ax} = 9 Hz, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'} et H_{6'ax}), 1,82 (d, 1H, ²J = 12,4 Hz, H_{4'eq}), 1,89 (s, 2H, H_{3'} et H_{5'eq}), 2,07 (d, 2H, ³J = 6 Hz, H_{2'} et H_{6'eq}), 3,27 (s, 1H, H_{1'}), 7,75 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 8,34 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₇), 8,78 (s, 1H, H₉), 12,85 (s, 1H, NH, H₃), 13,44 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 25,75 (C_{4'}), 25,97 (C_{3'} et C_{5'}), 30,72 (C_{2'} et C_{6'}), 40,99 (C_{1'}), 113,88 (C₆), 117,12 (C_{1a}), 118,85 (C₉), 119,85 (C_{9a}), 121,46 (C₇), 134,44 (C_{4a}), 141,86 (C_{5a}), 142,07 (C₈), 148,41 (C₁), 154,87 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3288 (NH), νCH_{arom} = 3088, 3067, 3045, νCH_{aliph} = 2932, 2854, νC=O = 1662, νNO₂ = 1525, 1321

[M+H]⁺ : m/z = 313,1

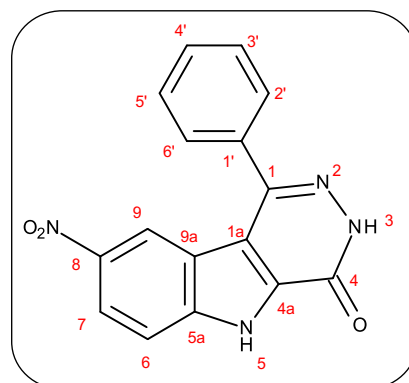
1-phényl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (12)

$C_{16}H_{10}N_4O_3$

MM = 306,28 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 1 g (2,89 mmol) de 3-phénylcarbonyl-5-nitro-1H-indole-2-carboxylate d'éthyle dans 30 ml d'éthanol absolu au reflux. Ajouter 0,43 ml (8,66 mmol) d'hydrazine monohydrate et agiter pendant 24 h. Laisser refroidir et filtrer. Laver le précipité avec de l'éthanol absolu et sécher. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 95 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 7,69 (d, 3H, ³J = 6 Hz, H_{2'}, H_{4'} et H_{6'}), 7,78- 7,81 (m, 2H, H_{3'} et H_{5'}), 7,82 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 8,36 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,39 (s, 1H, H₉), 13,28 (s, 1H, NH, H₃), 13,67 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 113,94 (C₆), 117,03 (C_{1a}), 118,57 (C₉), 120,19 (C_{9a}), 121,64 (C₇), 128,59 (2C, C_{3'} et C_{5'}), 128,76 (2C, C_{2'} et C_{6'}), 129,55 (C_{4'}), 134,73 (C_{4a}), 135,64 (C_{5a}), 141,72 (C₁), 142,07 (C_{1'}), 143,89 (C₈), 154,77 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3252 (NH), νCHarom = 3088, 3067, 3045, νCHaliph = 2932, 2854, νC=O = 1687, νNO₂ = 1578, 1331

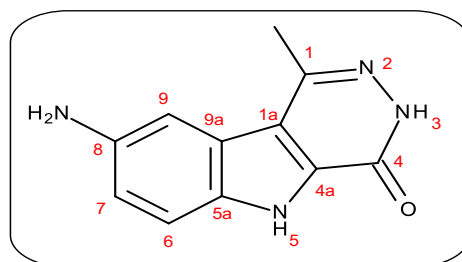
[M+H]⁺ : m/z = 307,1

8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (13)

C₁₁H₁₀N₄O

MM = 214,23 g.mol⁻¹

Tf = 335- 336 °C



Introduire 0,5 g (2,04 mmol) de 1-méthyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans un ballon contenant un mélange eau-acide chlorhydrique concentré (20 ml+ 20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 6,9 g (30,06 mmol) de SnCl₂. Mettre le mélange au reflux et agiter pendant 2 h 30. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 91 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 2,84 (s, 3H, CH₃), 7,83 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 8,23 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,98 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 12,86 (s, 1H, NH, H₃), 13,49 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 19,91 (CH₃), 103,4 (C₉), 113,16 (C₆), 115,99 (C_{1a}), 117,11 (C₇), 122,38 (C_{9a}), 130,67 (C_{4a}), 132,06 (C_{5a}), 141,8 (C₁), 143,62 (C₈), 155,38 (C₄)

[M+H]⁺ : m/z = 215,1

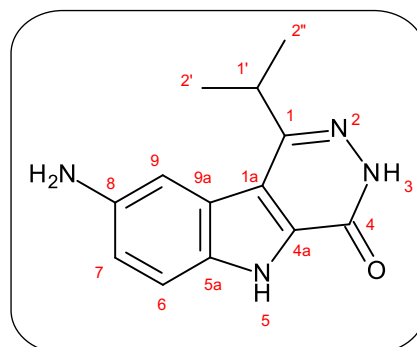
8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (14)

C₁₃H₁₄N₄O

MM = 242,28 g.mol⁻¹

Tf = 329-331 °C

Rf = 0,13 (DCM- MeOH 95/5)



Introduire 0,5 g (1,84 mmol) de 1-isopropyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans un ballon contenant un mélange eau-acide chlorhydrique concentré (20 ml+ 20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 6,21 g (27,54 mmol) de SnCl₂. Mettre le mélange au reflux et agiter pendant 2 h 30. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 92 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,34 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,54 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 4,98 (s, 2H, NH₂, H₁₀), 6,88 (dd, 1H, ³J = 8,6 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 7,19 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 7,35 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 12,27 (s, 1H, NH, H₃), 12,38 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 20,85 (C_{2'} et C_{2''}), 31,04 (C_{1'}), 103,78 (C₉), 113,29 (C₆), 114,91 (C_{1a}), 117,07 (C₇), 121,57 (C_{9a}), 131,12 (C_{4a}), 132,21 (C_{5a}), 143,79 (C₈), 149,65 (C₁), 155,36 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3454, 3337, νCharom = 3128, 3090, 3030, νChaliph = 2957, 2905, 2831, νCO = 1632, δNH = 1583, νCN = 1450, νCN = 1230

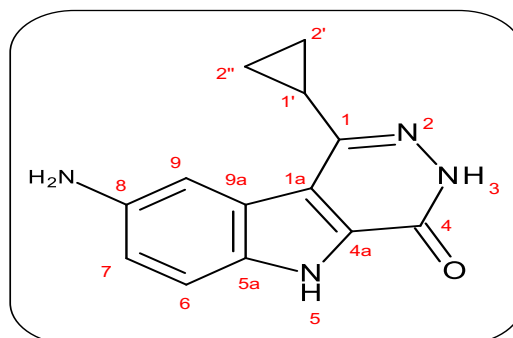
[M+H]⁺ : m/z = 243,1

8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (15)

$C_{13}H_{12}N_4O$

MM = 240,26 g.mol⁻¹

Tf = 336-337 °C



Introduire 0,5 g (1,85 mmol) de 1-cyclopropyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans un ballon contenant un mélange eau-acide chlorhydrique concentré (20 ml+ 20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 6,26 g (27,75 mmol) de SnCl₂. Mettre le mélange au reflux et poursuivre l'agitation pendant 3 h. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 95 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,64 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,46 (qn, 1H, ³J = 5,4 Hz, H_{1'}), 5,01 (s, 2H, NH₂), 6,94 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,38 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,45 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₉), 12,32 (s, 1H, NH, H₃), 12,37 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 6,71 (C_{2'} et C_{2''}), 13,39 (C_{1'}), 104,25 (C₉), 113,39 (C₆), 116,56 (C_{1a}), 117,39 (C₇), 122,46 (C_{9a}), 130,86 (C_{4a}), 132,44 (C_{5a}), 143,83 (C₈), 145,63 (C₁), 155,59 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3456, 3346, νCharom = 3024, νChaliph = 2986, 2947, 2891, 2820, νCO = 1628, δNH = 1581, νCN = 1413, νCN = 1232

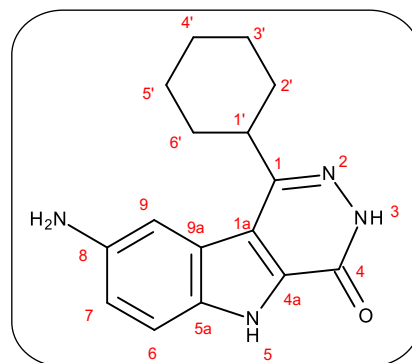
[M+H]⁺ : m/z = 241,1

8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (16)

C₁₆H₁₈N₄O

MM = 282,34 g.mol⁻¹

Tf = 348- 350 °C



Introduire 0,5 g (1,6 mmol) de 1-cyclohexyl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans un ballon contenant un mélange eau-acide chlorhydrique concentré (20 ml+ 20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 5,42 g (24,01 mmol) de SnCl₂. Mettre le mélange au reflux et agiter pendant 4 h. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 89 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 1,33 (dddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 11,3 Hz, ³J_{ax-eq} = 2,8 Hz, H_{4'ax}), 1,59 (dddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 10,4 Hz, ²J = 12,8 Hz, ³J_{ax-eq} = 2,4 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,82 (d, 1H, ²J = 13,6 Hz, H_{4'eq}), 1,90 (d, 2H, ³J = 10,8 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,08 (d, 2H, ³J = 10,8 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,20 (ddd, 1H, ³J = 9,4 Hz, ³J_{eq-eq} = 2,6 Hz, H_{1'}), 5,07 (s, 2H, NH₂, H₁₀), 6,92 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,13 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₉), 7,35 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 12,29 (s, 1H, NH, H₃), 12,41 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 26,01 (C_{4'}), 26,24 (C_{3'} et C_{5'}), 31,12 (C_{2'} et C_{6'}), 41,17 (C_{1'}), 103,67 (C₉), 113,51 (C₆), 115,14 (C_{1a}), 117,27 (C₇), 121,78 (C_{9a}), 131,31 (C_{4a}), 132,37 (C_{5a}), 143,96 (C₈), 149,43 (C₁), 155,53 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3389, νCharom = 3124, 3076, 3034, νCHaliph = 2930, 2853, νCO = 1628, δNH = 1583, νCN = 1435, νCN = 1228

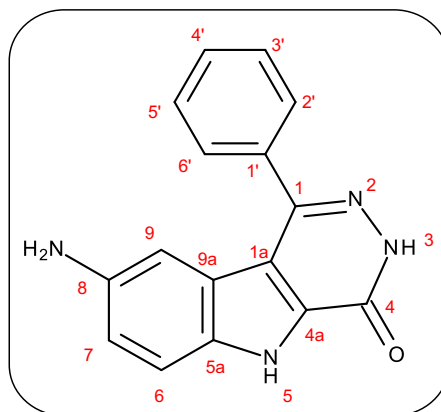
[M+H]⁺ : m/z = 282,2

8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (17)

C₁₆H₁₂N₄O

MM = 276,29 g.mol⁻¹

Tf = 368- 369 °C



Introduire 0,5 g (1,63 mmol) de 1-phényl-8-nitro-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans un ballon contenant un mélange eau-acide chlorhydrique concentré (20 ml+ 20 ml). Agiter pendant 5 min environ puis ajouter 5,55 g (24,48 mmol) de SnCl₂. Mettre le mélange au reflux sous agitation pendant 3 h. Refroidir le milieu réactionnel à 0 °C. Ramener le pH à 10 à l'aide d'une solution de soude (5M). Extraire plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 95 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 4,84 (s, 2H, NH₂), 6,59 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₉), 6,85 (dd, 1H, ³J = 8,6 Hz, ⁴J = 2,2 Hz, H₇), 7,34 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₆), 7,53- 7,60 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'} et H_{5'}), 7,66- 7,68 (m, 2H, H_{2'} et H_{6'}), 12,47 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 103,43 (C₉), 113,30 (C₆), 114,43 (C_{1a}), 117,58 (C₇), 121,78 (C_{9a}), 128,42 (2C, C_{3'} et C_{5'}), 128,56 (2C, C_{2'} et C_{6'}), 128,81 (C_{4'}), 131,42 (C_{4a}), 132,42 (C_{5a}), 136,73 (C_{1'}), 143,30 (C₈), 144,63 (C₁), 155,13 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3431, 3354, νCharom = 3113, 3062, νCHaliph = 2986, 2897, νCO = 1643, δNH = 1581, νCN = 1485, νCN = 1223

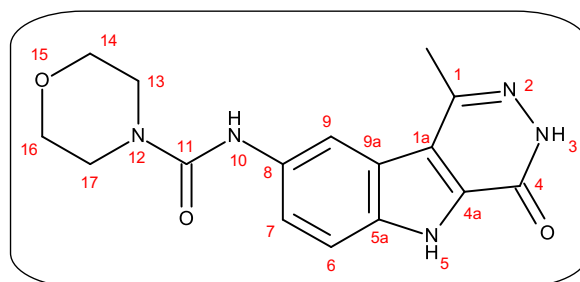
[M+H]⁺ : m/z = 277,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholinocarboxamide
(18)**

C₁₆H₁₇N₅O₃

MM = 327,35 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de diméthylformamide (DMF) à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de triéthylamine (TEA) puis 59 µl (0,5 mmol) de chlorure 4-morpholine carbonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 4 h. Filtrer et laver le précipité trois fois le précipité. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et laisser sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 46 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,72 (s, 3H, CH₃), 3,50 (t, 4H, ³J = 4,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 3,67 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,55 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,66 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,26 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 8,68 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,53 (s, 1H, NH, H₃), 12,63 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,88 (CH₃), 44,12 (C₁₃ et C₁₇), 66 (C₁₄ et C₁₆), 112,01 (C₆), 112,51 (C₉), 116,83 (C_{1a}), 121,19 (C_{9a}), 121,40 (C₇), 131,44 (C_{4a}), 134,54 (C_{5a}), 134,91 (C₈), 141,58 (C₁), 155,30 (C₄), 155,54 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3389, νCharom = 3070, 3105, νChaliph = 2964, 2854, νCO = 1632, δNH = 1502, νCN = 1404, νC-O-C = 1111, Comb NH/CN = 1261,

[M+H]⁺ : m/z = 328,1

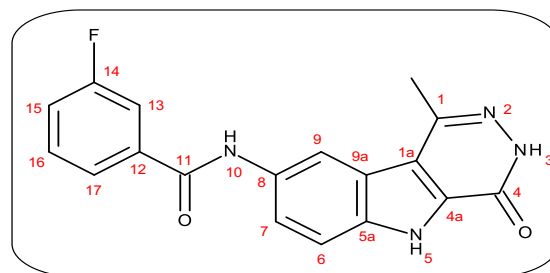
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-fluorobenzamide (19)**

C₁₈H₁₃FN₄O₂

MM = 336,33 g.mol⁻¹

Tf = 353- 354 °C

Rf = 0,46 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 60 µl (0,5 mmol) de chlorure de 3-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 26 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, CH₃), 7,50 (ddd, 1H, ³J_F = 8,6 Hz, ³J_H = 8,6 Hz, ⁴J_H = 2,4 Hz, H₁₅), 7,63 (d, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,66 (dd, ³J_H = 7,2 Hz, ⁴J_F = 4 Hz, H₁₆), 7,86 (d, 1H, ³J = 10 Hz, H₇), 7,91 (d, ³J_F = 8 Hz, H₁₃), 7,94 (dd, 2H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₁₇), 8,65 (s, 1H, H₉), 10,47 (s, 1H, H₁₀), 12,59 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,86 (CH₃), 112,90 (C₆), 113,01 (C₉), 114,52 (C₁₃, J_F = 23 Hz), 117,01 (C_{1a}), 118,48 (C₁₅, J_F = 20 Hz), 121,13 (C_{9a}), 121,17 (C₇), 123,78 (C₁₇), 130,60 (C₁₆, J_F = 8 Hz), 131,76 (C_{4a}), 133,08 (C_{5a}), 135,70 (C₈), 137,27 (C₁₂), 141,55 (C₁), 155,27 (C₄), 161,93 (C₁₄, J_F = 243 Hz), 163,95 (C₁₁)

IR ν cm⁻¹ : νNH = 3270, νCHarom = 3071, νCHaliph = 2982, 2920, νCO = 1647, δNH = 1527, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1269

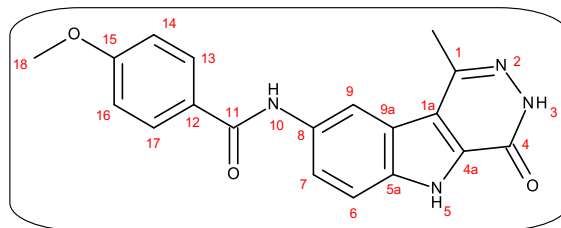
[M+H]⁺ : m/z = 337,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide (20)**

C₁₉H₁₆N₄O₃

MM = 348,37 g.mol⁻¹

Tf = 374-376 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 85,3 mg (0,5 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h 30. Filtrer le précipité et laver trois fois avec de l'eau. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant, triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige après filtration avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, CH₃), 3,88 (s, 3H, H₁₈), 7,11 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,63 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,93 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,05 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,64 (s, 1H, H₉), 10,25 (s, 1H, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,86 (CH₃), 55,40 (C₁₈), 112,78 (C₆ et C₉), 11,57 (C₁₄ et C₁₆), 117 (C_{1a}), 121,15 (C_{9a}), 121,24 (C₇), 127,01 (C₁₂), 129,48 (C₁₃ et C₁₇), 131,68 (C_{4a}), 133,56 (C_{5a}), 135,51 (C₈), 141,58 (C₁), 155,29 (C₄), 161,81 (C₁₅), 164,76 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3260, νCharom = 3078, νCHaliph = 2939, 2918, νCO = 1657, 1637, δNH = 1512, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1254, νC-O-C = 1178

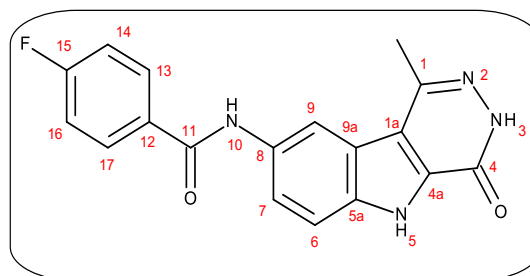
[M+H]⁺ : m/z = 349,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzamide (21)**

C₁₈H₁₃FN₄O₂

MM = 336,33 g.mol⁻¹

Tf = 396- 397 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 60 µl (0,5 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 7 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 10 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, CH₃), 7,43 (t, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,93 (dd, 1H, ³J = 10 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,13 (dd, 2H, ³J_H = 8,8 Hz, ⁴J_F = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,63 (s, 1H, H₉), 10,43 (s, 1H, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,75 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,86 (CH₃), 112,87 (C₆), 112,94 (C₉), 115,41 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 117,01 (C_{1a}), 121,14 (C_{9a}), 121,20 (C₇), 130,24 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,41 (C₁₂), 131,75 (C_{4a}), 133,26 (C_{5a}), 135,65 (C₈), 141,55 (C₁), 155,28 (C₄), 164 (C₁₅, J_F = 250 Hz), 164,27 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3258, ν_{Charom} = 3070, 3105, ν_{CHaliph} = 2985, 2924, ν_{CO} = 1657, 1639, δ_{NH} = 1525, ν_{CN} = 1481, Comb NH/CN = 1265

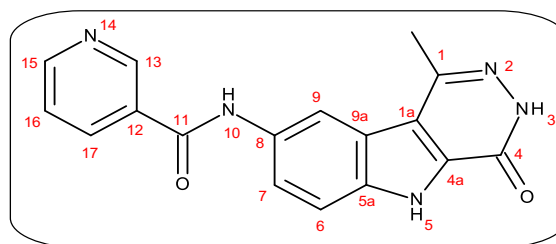
[M+H]⁺ : m/z = 337,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)nicotinamide (22)**

C₁₇H₁₃N₅O₂

MM = 319,31 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,20 ml de TEA puis 90 mg (0,5 mmol) de chlorure de chlorhydrate de nicotinoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 7 h. Filtrer et laver trois fois le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 75 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,73 (s, 3H, CH₃), 7,63 (m, 2H, H₆ et H₁₆), 7,90 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 8,35 (d, 1H, ³J = 6,8 Hz, H₁₇), 8,63 (s, 1H, H₉), 8,80 (s, 1H, H₁₅), 9,18 (s, 1H, H₁₃), 10,59 (s, 1H, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,75 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,05 (CH₃), 113,18 (C₆ et C₉), 117,23 (C_{1a}), 121,28 (C₇), 121,36 (C_{9a}), 123,7 (C₁₆), 130,83 (C₁₂), 132,02 (C_{4a}), 133,25 (C_{5a}), 135,57 (C₈), 135,96 (C₁₇), 141,76 (C₁), 148,84 (C₁₃), 155,23 (C₁₅), 155,48 (C₄), 164,09 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νCHarom = 3082, 3047, νCHaliph = 2980, 2829, νCO = 1659, δNH = 1526, νCN = 1465, Comb NH/CN = 1273

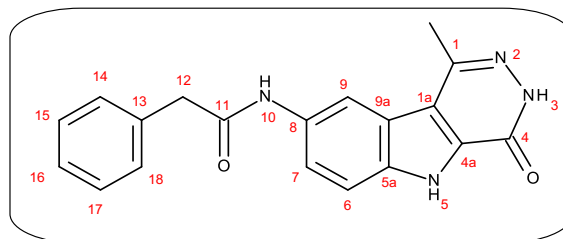
[M+H]⁺ : m/z = 320,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)phénylacétamide (23)**

C₁₇H₁₃N₅O₂

MM = 332,37 g.mol⁻¹

Tf = 355-357 °C



Dissoudre 200 mg (0,93 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 5 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,26 ml de TEA puis 0,13 ml (0,98 mmol) de chlorure phénylacétyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 3 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre jaune avec un rendement de 13 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,66 (s, 3H, CH₃), 3,67 (s, 2H, CH₂, H₁₂), 7,24 (d, 1H, ³J = 7,2 Hz, H₁₆), 7,30- 7,38 (m, 4H, H₁₄, H₁₅, H₁₇ et H₁₈), 7,55 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,67 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,51 (s, 1H, H₉), 10,36 (s, 1H, H₁₀), 12,51 (s, 1H, NH, H₃), 12,66 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,80 (CH₃), 43,32 (C₁₈), 111,27 (C₆), 113,03 (C₉), 116,92 (C_{1a}), 119,92 (C₇), 121,17 (C_{9a}), 126,47 (C₁₆), 128,26 (C₁₅ et C₁₇), 129,14 (C₁₄ et C₁₈), 131,66 (C_{4a}), 133,58 (C_{5a}), 135,28 (C₈), 136,09 (C₁₃), 141,55 (C₁), 155,27 (C₄), 168,94 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νCHarom = 3163, 3084, νCHaliph = 2920, νCO = 1651, δNH = 1529, νCN = 1463, Comb NH/CN = 1223

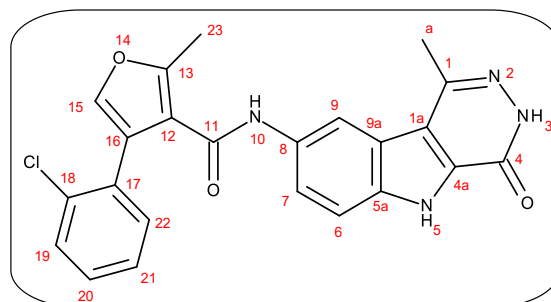
[M+H]⁺ : m/z = 333,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-(2-chlorophényl)-5-méthylisoxazole-4-carboxamide (24)**

C₂₂H₁₆ClN₅O₃

MM = 433,85 g.mol⁻¹

Tf = 317- 318 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*] indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,2 ml de TEA puis 130 mg (0,5 mmol) de chlorure 3-(2-chlorophényl)-5-méthylisoxazole-4-carboxyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 48 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Purifier le résidu sur colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle puis le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige après filtration avec un rendement de 9 %.

¹H RMN(400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,69 (s, 3H, CH₃, H_a), 2,74 (s, 3H, CH₃, H₂₃), 7,53-7,65 (m, 6H, H₆, H₇, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂), 8,42 (s, 1H, H₉), 10,29 (s, 1H, H₁₀), 12,58 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 12,54 (C₂₃), 20,01 (CH₃, C_a), 112,53 (C₉), 113,28 (C₆), 114,86 (C₁₂), 117,12 (C_{1a}), 120,75 (C₇), 121,34 (C_{9a}), 127,56 (C₂₁), 127,72 (C₁₇), 129,84 (C₂₂), 131,73 (C₁₉), 132,01 (C₁₈ et C₂₀), 132,58 (C_{4a}), 133,12 (C_{5a}), 135,91 (C₈), 141,72 (C₁), 155,47 (C₄), 159,57 (C₁₆), 160,16 (C₁₁), 169,82 (C₁₃)

IR (cm⁻¹): νNH = 3240, νCHarom = 3107, 3059, νCHaliph = 2984, 2918, νCO = 1649, δNH = 1529, νCN = 1454, νC-O-C = 1116, Comb NH/CN = 1284

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 434,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 436,1

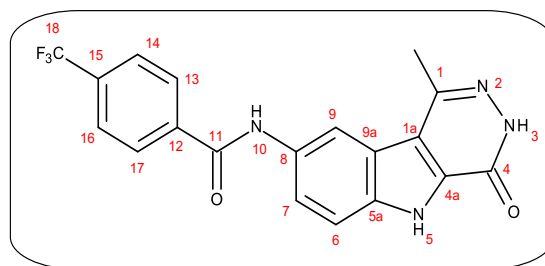
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-trifluorométhybenzamide
(25)**

C₁₉H₁₃F₃N₄O₂

MM = 386,33 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,33 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de (TEA) puis 75 µl (0,5 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de magnésium anhydre. Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique et filtrer. Purifier sur une colonne en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 24 %

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,76 (s, 3H, CH₃), 7,67 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,95 (dd, 1H, ³J = 8,2 Hz, ³J = 2 Hz, H₇), 7,97 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,24 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,66 (s, 1H, H₉), 10,64 (s, 1H, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,05 (CH₃), 113,17 (C₆), 113,26 (C₉), 117,24 (C_{1a}), 121,36 (C₇ et C_{9a}), 124,13 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 125,56 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 4 Hz), 128,73 (C₁₃ et C₁₇), 131,48 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,03 (C_{4a}), 133,23 (C_{5a}), 136,00 (C₈), 139,03 (C₁₂), 141,76 (C₁), 155,50 (C₄), 164,41 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3223, νCharom = 3111, 3068, νCHaliph = 2987, 2920, νCO = 1656, 1639, δNH = 1526, νCN = 1408, Comb NH/CN = 1269

[M+H]⁺ : m/z = 387,1

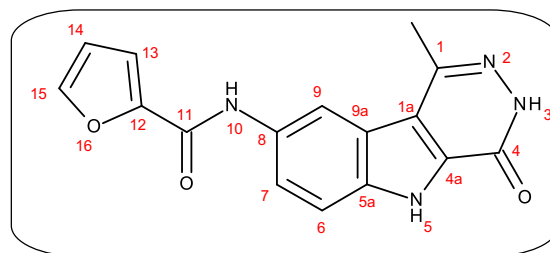
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-2-furoyl carboxamide (26)**

C₁₆H₁₂N₄O₃

MM = 308,29 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,54 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,20 ml de TEA puis 60 µl (0,6 mmol) de chlorure de 2-furoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle puis le mélange dichlorométhane- méthanol (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 20 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, CH₃), 6,76 (dd, 1H, ³J₁₄₋₁₅ = 1,6 Hz, ³J₁₄₋₁₃ = 3,6 Hz, H₁₄), 7,38 (d, 1H, ³J₁₃₋₁₄ = 3,2 Hz, H₁₃), 7,63 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 7,99 (s, 1H, H₁₅), 8,61 (s, 1H, H₉), 10,36 (s, 1H, H₁₀), 12,58 (s, 1H, NH, H₃), 12,75 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,83 (CH₃), 112,13 (C₁₄), 112,86 (C₆), 112,98 (C₉), 114,46 (C₁₃), 116,99 (C_{1a}), 121,11 (C₇), 121,15 (C_{9a}), 131,76 (C_{4a}), 132,68 (C_{5a}), 135,64 (C₈), 141,55 (C₁), 145,57 (C₁₅), 147,68 (C₁₂), 155,28 (C₄), 156,19 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3295, νCharom = 3107, 3065, νCHaliph = 2981, 2920, νCO = 1661, 1645, δNH = 1527, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1265, νC-O-C = 1119

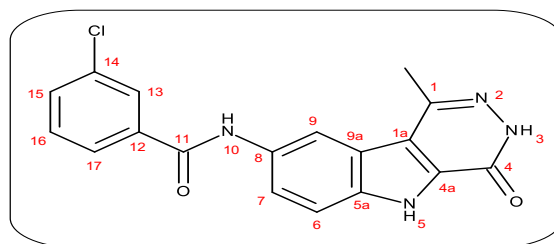
[M+H]⁺ : m/z = 309,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-chlorobenzamide (27)**

C₁₈H₁₃ClN₄O₂

MM = 352,78 g.mol⁻¹

Tf = 338- 340 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,20 ml de TEA puis 64 µl (0,5 mmol) de chlorure de 3-chlorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 3 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 44 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,74 (s, 3H, CH₃), 7,60 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₆), 7,70 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₅), 7,93 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,99 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₁₇), 8,08 (s, 1H, H₁₃), 8,63 (s, 1H, H₉), 10,50 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,85 (CH₃), 112,91 (C₆), 113,01 (C₉), 117,02 (C_{1a}), 121,13 (C_{9a} et C₇), 126,41 (C₁₇), 127,33 (C₁₃), 130,40 (C₁₆), 131,30 (C_{4a}), 131,79 (C₁₅), 133,07 (C_{5a}), 133,19 (C₁₄), 135,74 (C₈), 136,96 (C₁₂), 141,55 (C₁), 155,28 (C₄), 163,88 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3252, νCharom = 3065, νCHaliph = 2966, 2922, νCO = 1662, 1645, δNH = 1527, νCN = 1485, 1469, Comb NH/CN = 1265

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 353,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 355,1

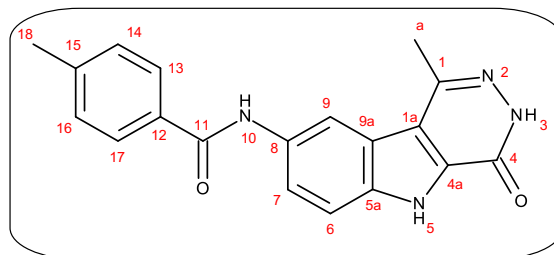
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthylbenzamide (28)**

C₁₉H₁₆N₄O₂

MM = 332,36 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,52 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,20 ml de TEA puis 67 µl (0,5 mmol) de chlorure de paratoluoyle et agiter à température ambiante pendant 6 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle puis le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 31 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,39 (s, 3H, CH₃, H₁₈), 2,71 (s, 3H, CH₃, H_a), 7,35 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,59 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,91 (dd, 1H, ³J = 7,6 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,92 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,60 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 10,29 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,53 (s, 1H, NH, H₃), 12,70 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,86 (C_a), 20,99 (C₁₈), 112,80 (C₆ et C₉), 117,01 (C_{1a}), 121,15 (C_{9a}), 121,19 (C₇), 127,60 (C₁₃ et C₁₇), 128,88 (C₁₄ et C₁₆), 131,71 (C_{4a}), 132,11 (C₁₂), 133,47 (C_{5a}), 135,56 (C₈), 141,44 (C₁₅), 141,57 (C₁), 155,29 (C₄), 165,18 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3295, νCharom = 3103, 3072, νCHaliph = 2981, 2918, νCO = 1657, 1639, δNH = 1527, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1263

[M+H]⁺ : m/z = 333,1

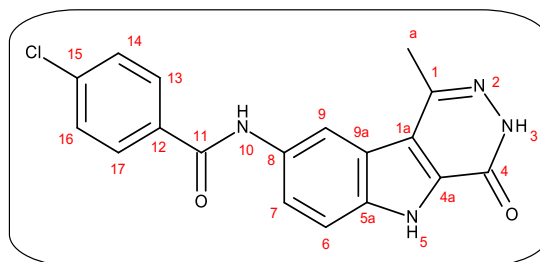
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzamide (29)**

C₁₈H₁₃ClN₄O₂

MM = 352,72 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,50 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,2 ml de TEA puis 64 μ l (0,5 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 4 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique sur du sulfate de magnésium anhydre. Evaporer le solvant et purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane- méthanol (9/5) puis (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 47 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, CH₃), 7,64 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₆), 7,66 (d, 2H, ³J = 7,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,93 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,07 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,63 (s, 1H, H₉), 10,48 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,05 (CH₃), 113,09 (C₆), 113,18 (C₉), 117,21 (C_{1a}), 121,33 (C_{9a}), 121,38 (C₇), 128,64 (C₁₄ et C₁₆), 129,75 (C₁₃ et C₁₇), 131,94 (C_{4a}), 133,37 (C₁₂), 133,88 (C_{5a}), 135,89 (C₈), 136,49 (C₁₅), 141,75 (C₁), 155,48 (C₄), 164,46 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): ν NH = 3284, ν CHarom = 3063, ν CHaliph = 2982, 2922, ν CO = 1657, 1639, δ NH = 1523, ν CN = 1481, Comb NH/CN = 1267

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 353,0 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 355,0

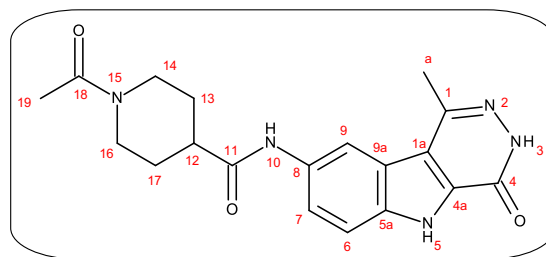
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*] indol-8-yl) (1-acétyl) pipéridin-4-carboxamide (30)**

C₁₉H₂₁N₅O₃

MM = 367,4 g.mol⁻¹

Tf = 344- 346 °C

Rf = 0,05 (acétate d'éthyle- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino-[4,5-*b*] indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 95 mg (0,5 mmol) de chlorure de 1-acétylpipéridine-4-carbonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 5 h. Evaporer le solvant et purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/5) puis (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 26 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,51 (dddd, 1H, ³J = 12 Hz, ³J = 4 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,66 (dddd, 1H, ³J = 12 Hz, ³J = 4 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,87 (t, 2H, ³J = 12 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 2,06 (s, 3H, H₁₉), 2,61- 2,67 (m, 2H, H₁₂ et H₁₄ ou H₁₆), 2,72 (s, 3H, H_a), 3,12 (t, 1H, ³J = 12 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 3,92 (d, 1H, ³J = 12 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 4,47 (d, 1H, ³J = 12 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 7,55 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,67 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,51 (s, 1H, H₉), 10,06 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,52 (s, 1H, NH, H₃), 12,66 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,04 (C_a), 21,55 (C₁₉), 28,40 (C₁₃ ou C₁₇), 29,05 (C₁₃ ou C₁₇), 40,60 (C₁₄ ou C₁₆), 42,94 (C₁₂), 45,49 (C₁₄ ou C₁₆), 111,52 (C₆), 113,19 (C₉), 117,14 (C_{1a}), 120,25 (C₇), 121,40 (C_{9a}), 131,87 (C_{4a}), 133,83 (C_{5a}), 135,45 (C₈), 141,79 (C₁), 155,52 (C₄), 168,27 (C₁₁), 173,05 (C₁₈)

IR (cm⁻¹): νC_{arom} = 3178, 3095, νC_{aliph} = 2906, 2874, νCO = 1660, 1614, δNH = 1564, νCN = 1467, Comb NH/CN = 1257

[M+H]⁺ : m/z = 368,2

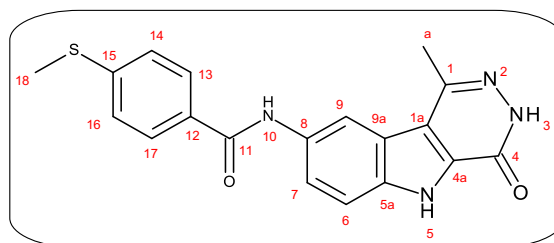
***N*-(méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(méthylthio)benzamide
(31)**

C₁₉H₁₆N₄O₂S

MM= 364,42 g.mol⁻¹

Tf = 376- 378 °C

Rf = 0,47 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 129 mg (0,69 mmol) de chlorure de 4-(méthylthio)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 15 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle puis le mélange acétate d'éthyle-méthanol (95/5) puis acétate d'éthyle-méthanol (9/1) puis dichlorométhane- méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 45 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,59 (s, 3H, H₁₈), 2,76 (s, 3H, H_a), 7,44 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₇), 8,01 (d, 2H, ³J = 6,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,65 (s, 1H, H₉), 10,36 (s, 1H, H₁₀), 12,58 (s, 1H, NH, H₃), 12,75 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 14,33 (C₁₈), 20,11(C_a), 113,05 (C₆), 113,09 (C₉), 117,24 (C_{1a}), 121,38 (C₇), 121,47 (C_{9a}), 125,08 (C₁₄ et C₁₆), 128,33 (C₁₃ et C₁₇), 131,07 (C₁₂), 131,94 (C_{4a}), 133,64 (C_{5a}), 135,82 (C₈), 141,81 (C₁), 143,19 (C₁₅), 155,53 (C₄), 164,98 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νCHarom = 3178, 3096, νCHaliph = 2906, 2874, νCO = 1660, 1614, δNH = 1531, νCN = 1467, Comb NH/CN = 1236

[M+H]⁺ : m/z = 365,1

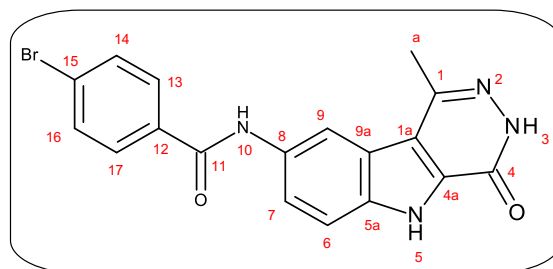
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-bromobenzamide (32)**

C₁₈H₁₃BrN₄O₂

MM = 397,05 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,38 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 101 mg (0,46 mmol) de chlorure de 4-bromobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec du dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 17 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,72 (s, 3H, CH₃), 7,61 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,67 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,90 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 7,96 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,60 (s, 1H, H₉), 10,45 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,07 (CH₃), 113,12 (C₆), 113,20 (C₉), 117,23 (C_{1a}), 121,36 (C_{9a}), 121,40 (C₇), 125,46 (C₁₅), 129,95 (C₁₃ et C₁₇), 131,61 (C₁₄ et C₁₆), 131,99 (C_{4a}), 133,37 (C₁₂), 134,27 (C_{5a}), 135,92 (C₈), 141,78 (C₁), 155,50 (C₄), 164,60 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3290, νCharom = 3070, νCHaliph = 2980, 2893, νCO = 1641, δNH = 1537, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1265

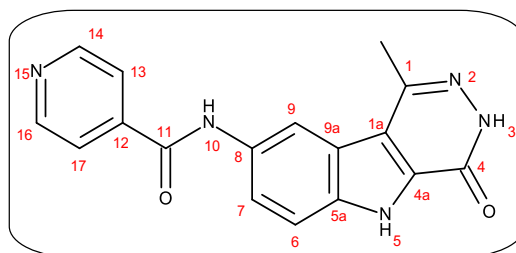
[M+H]⁺ (⁷⁹Br) : m/z = 399,0, [M+H]⁺ (⁸¹Br) : m/z = 400,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)isonicotinamide (33)**

C₁₇H₁₃N₅O₂

MM = 319,32 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dans un ballon de 50 ml, introduire 3 ml de DMF, 130 mg (0,8 mmol) de carbonyldiimidazole (CDI), 62 mg (0,5 mmol) d'acide isonicotinique et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et agiter à température ambiante pendant 21 h. Filtrer et laver trois fois le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 74 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,71 (s, 3H, CH₃), 7,63 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,89 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 7,91 (dd, 2H, ³J = 4,4 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,62 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₉), 8,80 (dd, 2H, ³J = 4,6 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,63 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,84 (CH₃), 113,01 (C₆), 113,12 (C₉), 117,03 (C_{1a}), 121,13 (C₇ et C_{9a}), 121,52 (C₁₃ et C₁₇), 131,85 (C_{4a}), 132,78 (C_{5a}), 135,85 (C₈), 141,53 (C₁), 141,99 (C₁₂), 150,26 (C₁₄ et C₁₆), 155,27 (C₄), 163,78 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3302, νCHarom = 3103, 3072, νCHaliph = 2989, 2961, νCO = 1643, δNH = 1531, νCN = 1462, Comb NH/CN = 1271

[M+H]⁺ : m/z = 320,1

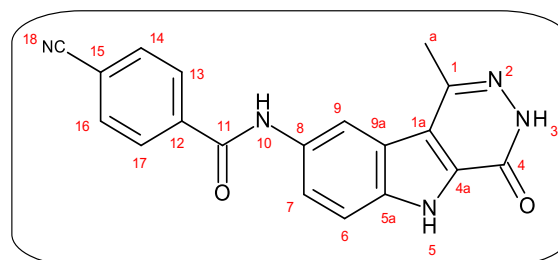
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-cyanobenzamide (34)**

C₁₉H₁₃N₅O₂

MM = 343,34 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,30 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 4 ml de DMF, introduire 130 mg (0,8 mmol) de CDI et 74 mg (0,5 mmol) d'acide 4-cyanobenzoïque et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et continuer l'agitation pendant 24 h à température ambiante. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre jaune avec un rendement de 11 %.

¹H RMN, (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,76 (s, 3H, H_a), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,09 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,20 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,66 (s, 1H, H₉), 10,67 (s, 1H, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,07 (C_a), 113,21 (C₆), 113,28 (C₉), 113,98 (C₁₈), 117,25 (C_{1a}), 118,55 (C₁₅), 121,35 (C₇ et C_{9a}), 128,68 (C₁₃ et C₁₇), 132,05 (C_{4a}), 132,69 (C₁₄ et C₁₆), 133,16 (C_{5a}), 136,03 (C₈), 139,24 (C₁₂), 141,77 (C₁), 155,50 (C₄), 164,18 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3387, 3286, νCHarom = 3053, 3003, νCHaliph = 2989, 2961, νC≡N = 2230, νCO = 1659, 1639, δNH = 1535, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1259

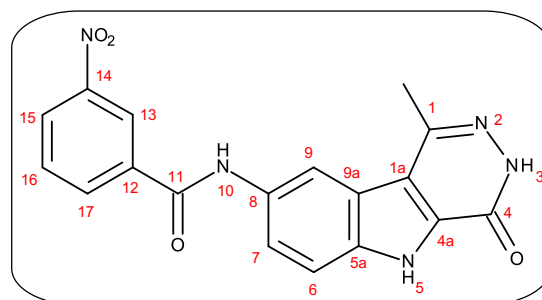
[M+H]⁺ : m/z = 344,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-nitrobenzamide (35)**

C₁₈H₁₃N₅O₄

MM = 363, 33 g.mol⁻¹

Tf = 372- 373 °C



Dans un ballon contenant 6 ml de DMF, introduire 244 mg (1,5 mmol) de CDI et 168 mg (1 mmol) d'acide 3-nitrobenzoïque et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 200 mg (0,93 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et continuer l'agitation pendant 24 h à température ambiante. Filtrer, laver le précipité à l'eau et triturer avec de l'éther diisopropylique. On obtient une poudre jaune avec un rendement de 51 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,77 (s, 3H, H_a), 7,68 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,90 (t, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₆), 7,95 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 8,49 (dd, 1H, ³J = 8,2 Hz, ⁴J = 2,6 Hz, H₁₇), 8,50 (dd, 1H, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₁₅), 8,65 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₉), 8,88 (t, 1H, ⁴J = 1,8 Hz, H₁₃), 10,76 (s, 1H, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,07 (C_a), 113,19 (C₆), 113,45 (C₉), 117,24 (C_{1a}), 121,35 (C_{9a}), 121,46 (C₇), 122,54 (C₁₃), 126,28 (C₁₅), 130,38 (C₁₆), 132,05 (C_{4a}), 133,06 (C_{5a}), 134,30 (C₁₇), 136,07 (C₁₂), 136,57 (C₈), 141,75 (C₁), 147,97 (C₁₄), 155,49 (C₄), 163,39 (C₁₁)

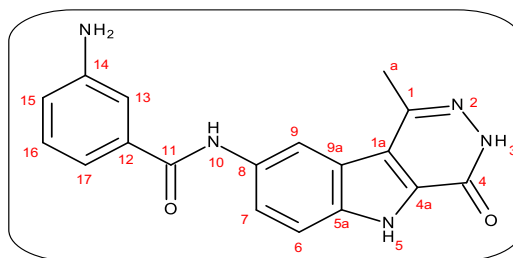
[M+H]⁺ : m/z = 364,1

N-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)-3-aminobenzamide (36)

$C_{18}H_{13}N_5O_2$

MM = 333,35 g.mol⁻¹

Tf = 310 -311 °C



Dans un ballon, introduire 100 mg (0,275 mmol) de N-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)-3-nitrobenzamide, 15 mg de Pd/C à 10 %, 10 ml d'éthanol et 1 ml de cyclohexène. Agiter le milieu réactionnel à 110 °C pendant 27 h. Filtrer et laver le résidu plusieurs fois avec du méthanol et de l'acétone. Evaporer le filtrat. Dissoudre le résidu dans un mélange méthanol-acétone et filtrer sur du papier filtre. Evaporer le solvant et récupérer le résidu sec. On obtient une poudre beige avec un rendement de 100 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 2,75 (s, 3H, H_a), 5,36 (s, 2H, NH₂), 6,79 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₁₅), 7,14- 7,22 (m, 3H, H₁₃, H₁₆ et H₁₇), 7,62 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,96 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 8,63 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 10,24 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 20,03 (C_a), 112,85 (C₉), 112,94 (C₆), 113,15 (C₁₃), 114,86 (C₁₇), 116,88 (C₁₅), 117,20 (C_{1a}), 121,27 (C₇), 121,36 (C_{9a}), 128,93 (C₁₆), 131,88 (C_{4a}), 133,86 (C_{5a}), 135,69 (C₈), 136,21 (C₁₂), 141,78 (C₁), 148,94 (C₁₄), 155,50 (C₄), 163,43 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νCHarom = 3155, νCHaliph = 2957, 2922, νCO = 1645, δNH = 1529, νCN = 1423, Comb NH/CN = 1242

[M+H]⁺ : m/z = 334,2

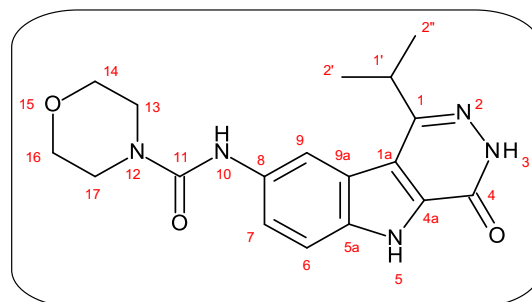
***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholinoyl
carboxamide (37)**

C₁₈H₂₁N₅O₃

MM = 355,39 g.mol⁻¹

Tf = 360-362 °C

Rf = 0,33 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 49 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-morpholine carbonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 5 h 30. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle puis le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 48 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,45 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 3,57 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 3,63 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,51 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,62 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 8,22 (s, 1H, H₉), 8,64 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,52 (s, 1H, NH, H₃), 12,62 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 21,0 (C_{2'} et C_{2''}), 31,31 (C_{1'}), 44,33 (C₁₃ et C₁₇), 66,22 (C₁₄ et C₁₆), 112,47 (C₆), 112,82 (C₉), 115,93 (C_{1a}), 120,59 (C₇), 121,46 (C_{9a}), 132,06 (C_{4a}), 134,88 (C_{5a}), 135,20 (C₈), 149,61 (C₁), 155,46 (C₄), 155,77 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νCHarom = 3178, 3086, νCHaliph = 2964, 2929, νCO = 1633, δNH = 1554, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1242, νC-O-C = 1115,

[M+H]⁺ : m/z = 356,2

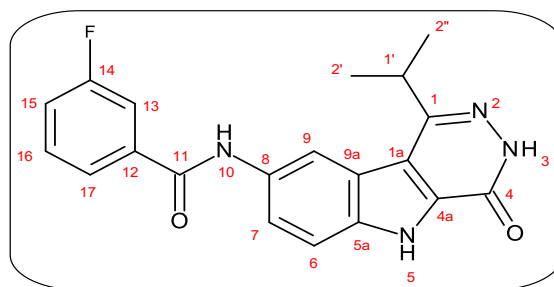
***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-fluorobenzamide (38)**

C₂₀H₁₇FN₄O₂

MM = 364,38 g.mol⁻¹

Tf = 366-367 °C

Rf = 0,54 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 49 µl (0,42 mmol) de chlorure de 3-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 60 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,40 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,63 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,47 (ddd, 1H, ³J_F = 8,3 Hz, ³J_H = 8,3 Hz, ⁴J_H = 2,4 Hz, H₁₅), 7,60 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₆), 7,63 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₁₆), 7,83 (dd, 1H, ³J = 9,8 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₁₇), 7,88 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₃), 7,92 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,62 (s, 1H, H₉), 10,46 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,85 (C_{2'} et C_{2''}), 31,28 (C_{1'}), 113,06 (C₆), 113,37 (C₉), 114,5 (C₁₃, J_F = 24 Hz), 115,97 (C_{1a}), 118,43 (C₁₅, J_F = 19 Hz), 120,40 (C_{9a}), 121,03 (C₇), 123,90 (C₁₇), 130,6 (C₁₆, J_F = 7 Hz), 132,25 (C_{4a}), 133,27 (C_{5a}), 135,87 (C₈), 137,4 (C₁₂, J_F = 8 Hz), 149,40 (C₁), 155,26 (C₄), 161,97 (C₁₄, J_F = 242 Hz), 164,08 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3286, νCharom = 3107, 3082, νChaliph = 2930, νCO = 1655, δNH = 1545, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1250

[M+H]⁺ : m/z = 365,1

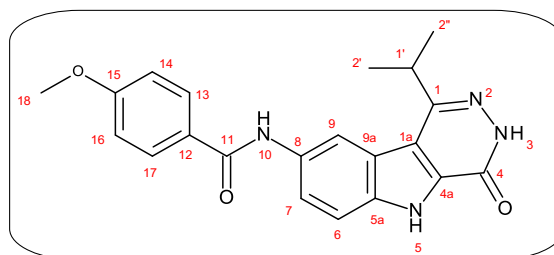
***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide (39)**

C₂₁H₂₀N₄O₃

MM = 376,41 g.mol⁻¹

Tf = 369-371 °C

Rf = 0,42 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 72 mg (0,42 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 59 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,40 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,63 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 3,86 (s, 1H, H₁₈), 7,09 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,61 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,92 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 8,02 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,61 (s, 1H, H₉), 10,23 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,59 (s, 1H, NH, H₃), 12,72 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,99 (C_{2'} et C_{2''}), 31,36 (C_{1'}), 113,09 (C₆), 113,29 (C₉), 113,79 (C₁₄ et C₁₆), 116,11 (C_{1a}), 120,56 (C_{9a}), 121,28 (C₇), 127,27 (C₁₂), 129,73 (C₁₃ et C₁₇), 132,32 (C_{4a}), 133,92 (C_{5a}), 135,81 (C₈), 149,61 (C₁), 155,46 (C₄), 162,05 (C₁₅), 165,04 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νCHarom = 3194, 3072, νCHaliph = 2968, νCO = 1651 δNH = 1510, νCN = 1473, Comb NH/CN = 1250

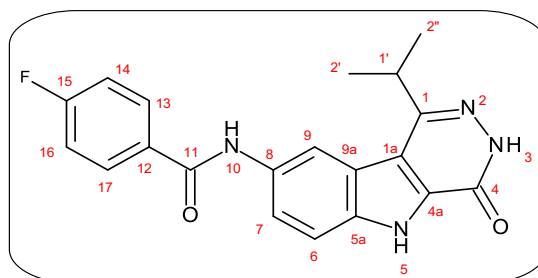
[M+H]⁺ : m/z = 377,1

***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzamide (40)**

C₂₀H₁₇FN₄O₂

MM = 364,38 g.mol⁻¹

Tf = 360-362 °C



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 49 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Filtrer et laver le résidu sec avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 70 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,63 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,43 (t, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,66 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,95 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,13 (dd, 2H, ³J_H = 8,4 Hz, ⁴J_F = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,64 (s, 1H, H₉), 10,45 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,65 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,99 (C_{2'} et C_{2''}), 31,37 (C_{1'}), 113,18 (C₆), 113,46 (C₉), 115,52 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 116,12 (C_{1a}), 120,56 (C_{9a}), 121,24 (C₇), 130,55 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,69 (C₁₂, J_F = 2 Hz), 132,40 (C_{4a}), 133,64 (C_{5a}), 135,96 (C₈), 149,60 (C₁), 155,46 (C₄), 164,23 (C₁₅, J_F = 248 Hz), 164,57 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3225, νCharom = 3084, νCHaliph = 2939, 2872, νCO = 1657, 1637, δNH = 1504, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1263

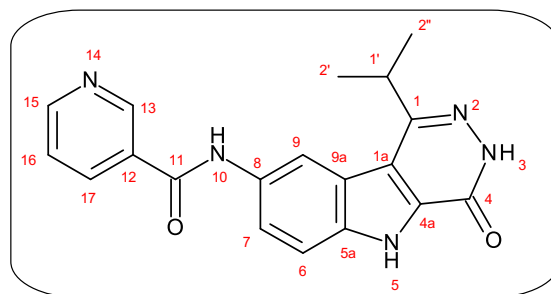
[M+H]⁺ : m/z = 365,2

***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl) nicotinamide (41)**

C₁₉H₁₇N₅O₂

MM = 347,37 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,18 ml de TEA puis 73 mg (0,41 mmol) de chlorure de chlorhydrate de nicotinoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 49 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,65 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,61-7,68 (m, 2H, H₁₆ et H₆), 7,96 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,38 (dd, 1H, ³J = 7,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₁₇), 8,67 (s, 1H, H₉), 8,82 (dd, 1H, ³J = 4,6 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₁₅), 9,02 (s, 1H, H₁₃), 10,62 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,65 (s, 1H, NH, H₃), 12,81 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,81 (C_{2'} et C_{2''}), 31,2 (C_{1'}), 113,12 (C₆), 113,27 (C₉), 115,95 (C_{1a}), 120,38 (C_{9a}), 120,95 (C₇), 123,53 (C₁₆), 130,72 (C₁₂), 132,29 (C_{4a}), 133,26 (C_{5a}), 135,48 (C₈), 135,87 (C₁₇), 148,69 (C₁₃), 149,40 (C₁), 152,09 (C₁₅), 155,27 (C₄), 164 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3204, νCharom = 3109, 3088, νCHaliph = 2960, νCO = 1657, δNH = 1555, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1265

[M+H]⁺ : m/z = 348,2

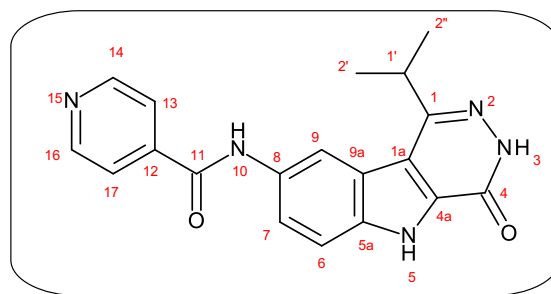
***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl) isonicotinamide (42)**

C₁₉H₁₇N₅O₂

MM = 347,37 g.mol⁻¹

Tf = 366- 368 °C

Rf = 0,18 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,18 ml de TEA puis 75 mg (0,42 mmol) de chlorure du chlorhydrate d'isonicotinoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1). Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,39 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,62 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,91 (dd, 1H, ³J = 7,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,92 (dd, 2H, ³J = 4 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,63 (s, 1H, H₉), 8,81 (dd, 2H, ³J = 5,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,64 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 20,81 (C_{2'} et C_{2''}), 31,2 (C_{1'}), 113,14 (C₆), 113,44 (C₉), 115,96 (C_{1a}), 120,36 (C_{9a}), 120,95 (C₇), 121,61 (C₁₃ et C₁₇), 132,31 (C_{4a}), 132,98 (C_{5a}), 135,97 (C₈), 142,08 (C₁₂), 149,38 (C₁), 150,29 (C₁₄ et C₁₆), 155,26 (C₄), 163,88 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3204, νCHarom = 3109, 3090, νCHaliph = 2957, νCO = 1651, δNH = 1554, νCN = 1470, Comb NH/CN = 1263

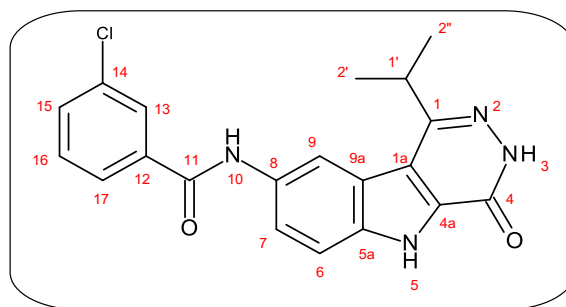
[M+H]⁺ : m/z = 348,2

***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-chlorobenzamide (43)**

C₂₀H₁₇ClN₄O₂

MM = 380,83 g.mol⁻¹

Tf = 348- 349 °C



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 53 µl (0,41 mmol) de chlorure de 3-chlorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 14 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,61- 7,73 (m, 3H, H₆, H₁₅ et H₁₆), 7,95 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,00 (d, 1H, ³J = 9,8 Hz, H₁₇), 8,10 (s, 1H, H₁₃), 8,64 (s, 1H, H₉), 10,53 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,65 (s, 1H, NH, H₃), 12,81 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 21,02 (C_{2'} et C_{2''}), 31,4 (C_{1'}), 113,26 (C₆), 113,55 (C₉), 116,15 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 121,23 (C₇), 126,71 (C₁₇), 127,60 (C₁₃), 130,64 (C₁₆), 131,56 (C_{4a}), 132,44 (C₁₅), 133,42 (C_{5a}), 133,46 (C₁₄), 136,06 (C₈), 137,25 (C₁₂), 149,61 (C₁), 155,47 (C₄), 164,19 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3240, νCHarom = 3111, 3086, νCHaliph = 2961, 2928, νCO = 1656, δNH = 1543, νCN = 1470, Comb NH/CN = 1244

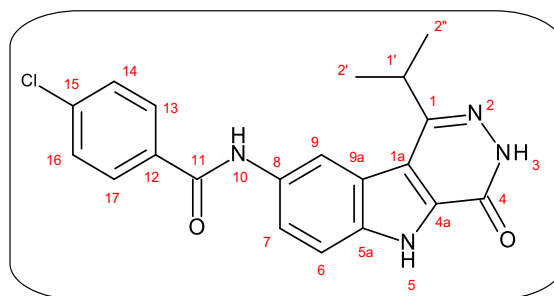
[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 381,1, [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 383,1

***N*-(isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzamide (44)**

C₂₀H₁₇ClN₄O₂

MM = 380,83 g.mol⁻¹

Tf = 378- 379 °C



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,18 ml de TEA puis 53 µl (0,41 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 68 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,66 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,67 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,95 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,08 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,64 (s, 1H, H₉), 10,50 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,65 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 21,01 (C_{2'} et C_{2''}), 30,97 (C_{1'}), 113,22 (C₆), 113,49 (C₉), 116,12 (C_{1a}), 120,56 (C_{9a}), 121,21 (C₇), 128,67 (C₁₄ et C₁₆), 129,83 (C₁₃ et C₁₇), 132,42 (C_{4a}), 133,55 (C₁₂), 133,96 (C_{5a}), 136,01 (C₈), 136,53 (C₁₅), 149,59 (C₁), 155,45 (C₄), 164,56 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3207, νCHarom = 3111, 3086, νCHaliph = 2964, 2932, νCO = 1657, 1643, δNH = 1552, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1261

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 381,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 383,1

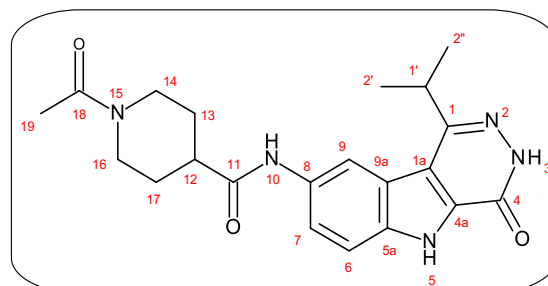
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-(1-acétyl)pipéridin-4-carboxamide (45)**

C₁₉H₂₁N₅O₃

MM = 395,46 g.mol⁻¹

Tf = 344- 346 °C

Rf = 0,10 (acétate d'éthyle- MeOH 9/1)



Dissoudre 100mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 59 mg (0,5 mmol) de chlorure de 1-acétylpipéridine-4-carboxyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane- méthanol (95/5) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 24 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,41 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 1,51 (dddd, 1H, ³J = 12,6 Hz, ³J = 4,1 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,66 (dddd, 1H, ³J = 11,8 Hz, ³J = 4,1 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,88 (t, 2H, ³J = 11,4 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 2,06 (s, 3H, H₁₉), 2,64 (dd, 2H, ³J = 10,8 Hz, ³J = 4,4 Hz, H₁₂ et H₁₄ ou H₁₆), 3,12 (t, 1H, ³J = 12 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 3,61 (sep, 1H, ³J = 6,7 Hz, H_{1'}), 3,93 (d, 1H, ³J = 14 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 4,47 (d, 1H, ³J = 13,2 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 7,59 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,72 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,56 (s, 1H, H₉), 10,10 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,98 (C_{2'} et C_{2''}), 21,52 (C₁₉), 28,40 (C₁₃ ou C₁₇), 29,03 (C₁₃ ou C₁₇), 31,39 (C_{1'}), 40,62 (C₁₄ ou C₁₆), 43,01 (C₁₂), 45,52 (C₁₄ ou C₁₆), 111,84 (C₉), 113,28 (C₆), 116,03 (C_{1a}), 120,07 (C₇), 120,58 (C_{9a}), 132,28 (C_{4a}), 133,99 (C_{5a}), 135,54 (C₈), 149,60 (C₁), 155,46 (C₄), 168,25 (C₁₁), 173,03 (C₁₈)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3246, νCharom = 3107, 3090, νCHaliph = 2962, 2932, νCO = 1643, 1624, δNH = 1554, νCN = 1446, Comb NH/CN = 1221

[M+H]⁺ : m/z = 396,2

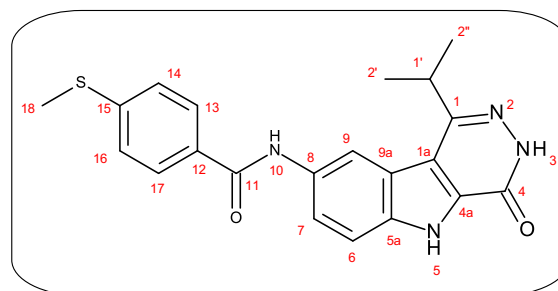
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(méthylthio)benzamide
(46)**

C₂₁H₂₀N₄O₂S

MM = 392,48 g.mol⁻¹

Tf = 369- 371 °C

Rf = 0,45 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 115 mg (0,62 mmol) de chlorure de 4-(méthylthio)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 15 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 56 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 2,59 (s, 3H, H₁₈), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,44 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,65 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,95 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,01 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,66 (s, 1H, H₉), 10,36 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,63 (s, 1H, NH, H₃), 12,77 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 14,32 (C₁₈), 20,97 (C_{2'} et C_{2''}), 31,34 (C_{1'}), 113,10 (C₆), 113,36 (C₉), 116,10 (C_{1a}), 120,55 (C_{9a}), 121,24 (C₇), 125,08 (C₁₄ et C₁₆), 128,32 (C₁₃ et C₁₇), 131,11 (C₁₂), 132,34 (C_{4a}), 133,74 (C_{5a}), 135,87 (C₈), 143,13 (C₁₅), 149,58 (C₁), 155,43 (C₄), 165,00 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νCHarom = 3182, 3055, νCHaliph = 2974, 2932, νCO = 1649, δNH = 1533, νCN = 1473, Comb NH/CN = 1254

[M+H]⁺ : m/z = 393,1

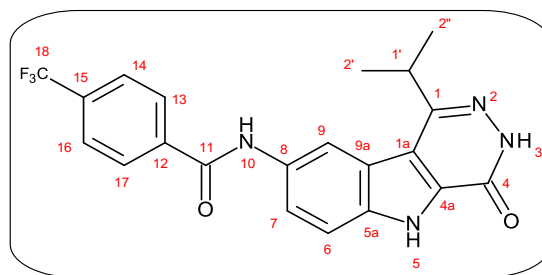
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide (47)**

C₂₁H₁₇F₃N₄O₂

MM = 414,38 g.mol⁻¹

Tf = 389- 390 °C

Rf = 0,43 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 63 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une petite colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 51 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,44 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,68 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,98 (d, 3H, ³J = 8 Hz, H₇, H₁₄ et H₁₆), 8,24 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,67 (s, 1H, H₉), 10,66 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,66 (s, 1H, NH, H₃), 12,83 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,98 (C_{2'} et C_{2''}), 31,38 (C_{1'}), 113,27 (C₆), 113,55 (C₉), 116,13 (C_{1a}), 120,55 (C₇), 121,16 (C_{9a}), 124,18 (C₁₈, J_F = 277 Hz), 125,59 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 4 Hz), 128,78 (C₁₃ et C₁₇), 131,48 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,46 (C_{4a}), 133,40 (C_{5a}), 136,08 (C₈), 139,02 (C₁₂), 149,57 (C₁), 155,45 (C₄), 164,48 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3217, νCharom = 3107, 3082, νChaliph = 2984, νCO = 1655, δNH = 1541, νCN = 1471, Comb NH/CN = 1248

[M+H]⁺ : m/z = 415,1

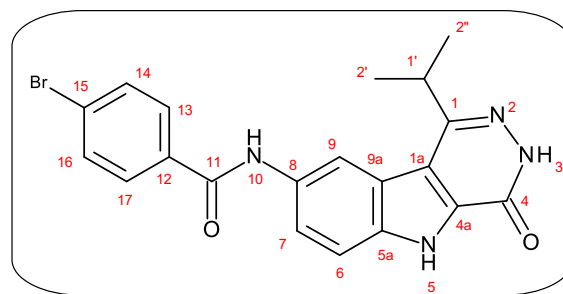
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-bromobenzamide (48)**

C₂₀H₁₇BrN₄O₂

MM = 425,28 g.mol⁻¹

Tf = 386- 388 °C

Rf = 0,43 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 90 mg (0,41 mmol) de chlorure de 4-bromobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 15 min. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 50 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,66 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,81 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,95 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₇), 8,00 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,64 (s, 1H, H₉), 10,49 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,63 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,96 (C_{2'} et C_{2''}), 31,35 (C_{1'}), 113,18 (C₆), 113,48 (C₉), 116,10 (C_{1a}), 120,54 (C_{9a}), 121,19 (C₇), 125,43 (C₁₅), 129,96 (C₁₃ et C₁₇), 131,58 (C₁₄ et C₁₆), 132,40 (C_{4a}), 133,50 (C_{5a}), 134,30 (C₁₂), 135,98 (C₈), 149,56 (C₁), 155,42 (C₄), 164,64 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3233, νCharom = 3113, 3086, νChaliph = 2968, νCO = 1649, δNH = 1543, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1255

[M+H]⁺ (⁷⁹Br) : m/z = 427,1 , [M+H]⁺ (⁸¹Br) : m/z = 428,0

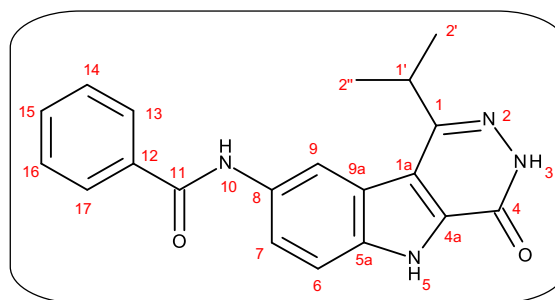
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)benzamide (49)**

C₂₀H₁₈N₄O₂

MM = 346,38 g.mol⁻¹

Tf = 357- 359 °C

Rf = 0,43 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,12 ml de TEA puis 49 μ l (0,42 mmol) de chlorure de benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Evaporer le solvant et laver le résidu sec à l'eau. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane- méthanol (95/5). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 20 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,40 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,63 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,53-7,60 (m, 3H, H₁₄, H₁₅ et H₁₆), 7,62 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,93 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 8,01 (d, 2H, ³J = 7,2 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,62 (s, 1H, H₉), 10,38 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,58 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,78 (C_{2'} et C_{2''}), 31,15 (C_{1'}), 112,93 (C₆), 113,18 (C₉), 115,92 (C_{1a}), 120,37 (C_{9a}), 121,00 (C₇), 127,61 (C₁₃ et C₁₇), 128,36 (C₁₄ et C₁₆), 131,46 (C₁₅), 132,18 (C_{4a}), 133,55 (C_{5a}), 135,08 (C₁₂), 135,72 (C₈), 149,39 (C₁), 155,25 (C₄), 165,45 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): ν NH = 3238, ν CHarom = 3111, 3082, ν CHaliph = 2959, 2926, ν CO = 1657, δ NH = 1541, ν CN = 1412, Comb NH/CN = 1248

[M+H]⁺ : m/z = 347,1

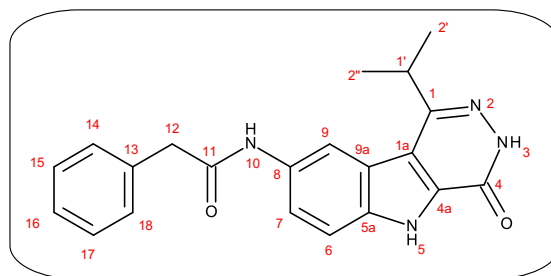
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)phénylacétamide (50)**

C₂₁H₂₀N₄O₂

MM = 360,41 g.mol⁻¹

Tf = 328- 330 °C

Rf = 0,26 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,12 ml de TEA puis 56 µl (0,42 mmol) de chlorure phénylacétyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec à l'eau. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 41 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,56 (sep, 1H, ³J = 6,6 Hz, H_{1'}), 3,68 (s, 2H, H₁₂), 7,26 (d, 1H, ³J = 6,8 Hz, H₁₆), 7,32- 7,36 (m, 4H, H₁₄, H₁₅, H₁₇ et H₁₈), 7,57 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,66 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,53 (s, 1H, H₉), 10,30 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,68 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,73 (C_{2'} et C_{2''}), 31,14 (C_{1'}), 43,36 (C₁₂), 111,61 (C₉), 113,15 (C₆), 115,82 (C_{1a}), 119,77 (C₇), 120,38 (C_{9a}), 126,50 (C₁₆), 128,29 (C₁₅ et C₁₇), 129,19 (C₁₄ et C₁₈), 132,11 (C_{4a}), 133,71 (C_{5a}), 135,39 (C₁₃), 136,08 (C₈), 149,35 (C₁), 155,23 (C₄), 168,945 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3248, νCharom = 3118, 3066, νCHaliph = 2976, νCO = 1659, 1647, δNH = 1519, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1232

[M+H]⁺ : m/z = 361,1

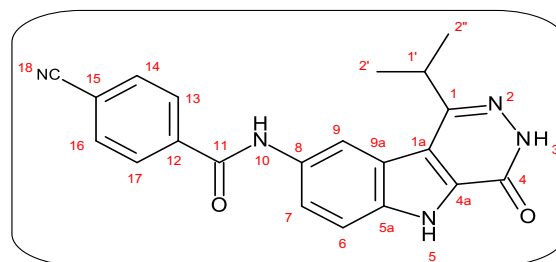
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-cyanobenzamide (51)**

$C_{21}H_{17}N_5O_2$

MM = 371,40 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,44 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 4 ml de DMF, introduire 130 mg (0,8 mmol) de CDI et 74 mg (0,5 mmol) d'acide 4-cyanobenzoïque et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation pendant 22 h à température ambiante. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre jaune avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,43 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,66 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,67 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,95 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,09 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,20 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,66 (s, 1H, H₉), 10,67 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,64 (s, 1H, NH, H₃), 12,81 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 21,02 (C_{2'} et C_{2''}), 31,54 (C_{1'}), 113,27 (C₆), 113,58 (C₉), 113,96 (C₁₈), 116,12 (C_{1a}), 118,58 (C₁₅), 120,54 (C_{9a}), 121,14 (C₇), 128,69 (C₁₃ et C₁₇), 132,45 (C_{4a}), 132,67 (C₁₄ et C₁₆), 133,29 (C_{5a}), 136,11 (C₈), 139,26 (C₁₂), 149,53 (C₁), 155,43 (C₄), 164,22 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3202, νCharom = 3078, νCHaliph = 2982, 2964, νC≡N = 2224, νCO = 1659, δNH = 1549, νCN = 1471, Comb NH/CN = 1254

[M+H]⁺ : m/z = 372,2

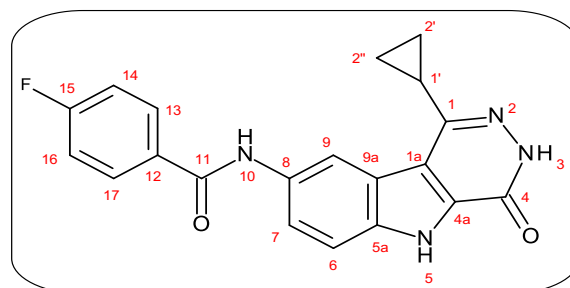
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzamide
(52)**

C₂₀H₁₅FN₄O₂

MM = 362,36 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,58 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 50 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,05 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{2'} ou H_{2''}), 1,12 (d, 2H, ³J = 7,6 Hz, H_{2'} ou H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 7,43 (t, 2H, ³J_F = ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,66 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 8,12 (dd, 2H, ³J_H = 8,4 Hz, ⁴J_F = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,82 (s, 1H, H₉), 10,44 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,77 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,66 (C_{2'} et C_{2''}), 13,99 (C_{1'}), 113,07 (C₆), 113,75 (C₉), 115,52 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 117,54 (C_{1a}), 121,22 (C_{9a}), 121,49 (C₇), 130,52 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,68 (C₁₂), 131,90 (C_{4a}), 133,46 (C_{5a}), 135,98 (C₈), 145,34 (C₁), 155,46 (C₄), 164,21 (C₁₅, J_F = 247 Hz), 164,54 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3281, νCharom = 3107, 3049, νChaliph = 2970, νCO = 1661, 1637, δNH = 1545, νCN = 1481, Comb NH/CN = 1234

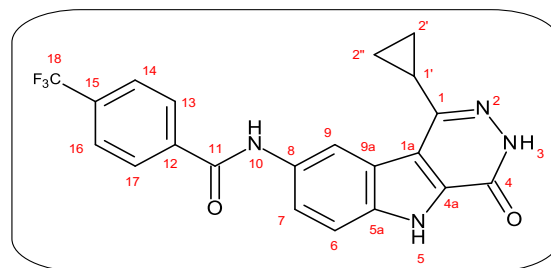
[M+H]⁺ : m/z = 363,1

***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide (53)**

C₂₁H₁₅F₃N₄O₂

MM = 412,37 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 63 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 59 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,07-1,15 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,50 (s, 1H, H_{1'}), 7,68 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,96 (dd, 1H, ³J = 7,2 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H₇), 7,97 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,24 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,85 (s, 1H, H₉), 10,65 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,65 (C_{2'} et C_{2''}), 13,40 (C_{1'}), 113,16 (C₆), 113,84 (C₉), 117,56 (C_{1a}), 121,22 (C₇), 121,49 (C_{9a}), 124,15 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 125,59 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 3 Hz), 128,76 (C₁₃ et C₁₇), 131,47 (C₁₅, J_F = 31 Hz), 131,96 (C_{4a}), 133,23 (C_{5a}), 136,10 (C₈), 139,10 (C₁₂), 145,33 (C₁), 155,46 (C₄), 164,47 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3236, νCharom = 3107, 3064, νChaliph = 2970, νCO = 1659, 1643, δNH = 1543, νCN = 1481, Comb NH/CN = 1269

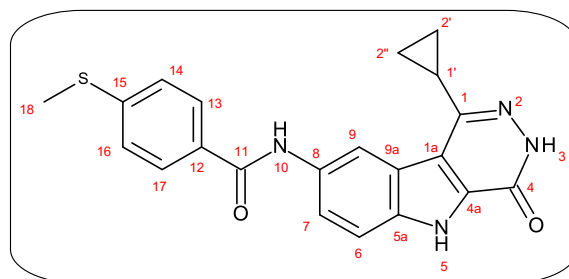
[M+H]⁺ : m/z = 413,1

***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(méthylthio)benzamide (54)**

C₂₁H₁₈N₄O₂S

MM = 390,46 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 94 mg (0,5 mmol) de chlorure de 4-(méthylthio)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 15 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane - méthanol (9/1). Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 15 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,12-1,15 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 2,59 (s, 3H, H₁₈), 7,44 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,65 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,94 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 8,00 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,83 (s, 1H, H₉), 10,36 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,69 (C_{2'} et C_{2''}), 13,38 (C_{1'}), 14,38 (C₁₈), 113,02 (C₆), 113,65 (C₉), 117,52 (C_{1a}), 121,22 (C₇), 121,49 (C_{9a}), 125,08 (C₁₄ et C₁₆), 128,32 (C₁₃ et C₁₇), 131,11 (C₁₂), 131,86 (C_{4a}), 133,60 (C_{5a}), 135,90 (C₈), 143,13 (C₁₅), 145,35 (C₁), 155,45 (C₄), 164,99 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3236, νCharom = 3107, 3072, νCHaliph = 2970, 2928, νCO = 1659, 1635, δNH = 1537, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1265

[M+H]⁺ : m/z = 391,1

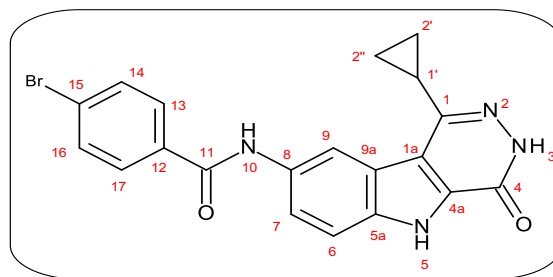
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-bromobenzamide
(55)**

C₂₀H₁₅BrN₄O₂

MM = 423,27 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,60 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 93 mg (0,42 mmol) de chlorure de 4-bromobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 47 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,03-1,13 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 7,66 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,80 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 8,00 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,82 (s, 1H, H₉), 10,49 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,67 (C_{2'} et C_{2''}), 13,39 (C_{1'}), 113,10 (C₆), 113,78 (C₉), 117,54 (C_{1a}), 121,22 (C₇), 121,45 (C_{9a}), 125,43 (C₁₅), 129,96 (C₁₃ et C₁₇), 131,60 (C₁₄ et C₁₆), 131,92 (C_{4a}), 133,35 (C_{5a}), 134,32 (C₁₂), 136,02 (C₈), 145,34 (C₁), 155,45 (C₄), 164,64 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3238, νCHarom = 3107, 3069, νCHaliph = 2972, 2964, νCO = 1659, 1639, δNH = 1518, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1267

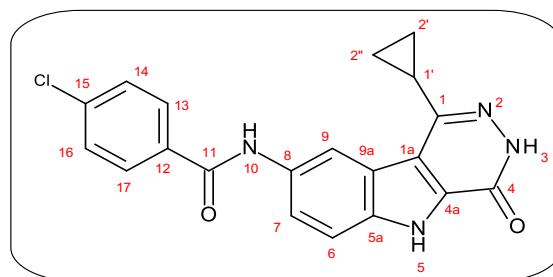
[M+H]⁺ (⁷⁹Br) : m/z = 425,0, [M+H]⁺ (⁸¹Br) : m/z = 426,1

***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzamide
(56)**

C₂₀H₁₅ClN₄O₂

MM = 378,81 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 54 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 46 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,03-1,13 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 7,67 (d, 3H, ³J = 8 Hz, H₆, H₁₄ et H₁₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 8,07 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,82 (s, 1H, H₉), 10,49 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,66 (C_{2'} et C_{2''}), 13,39 (C_{1'}), 113,09 (C₆), 113,78 (C₉), 117,53 (C_{1a}), 121,21 (C_{9a}), 121,46 (C₇), 128,66 (C₁₄ et C₁₆), 129,77 (C₁₃ et C₁₇), 131,91 (C_{4a}), 133,36 (C_{5a}), 133,95 (C₁₂), 136,01 (C₈), 136,49 (C₁₅), 145,33 (C₁), 155,44 (C₄), 164,52 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3240, νCHarom = 3107, 3076, νCHaliph = 2970, νCO = 1657, 1639, δNH = 1520, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1267

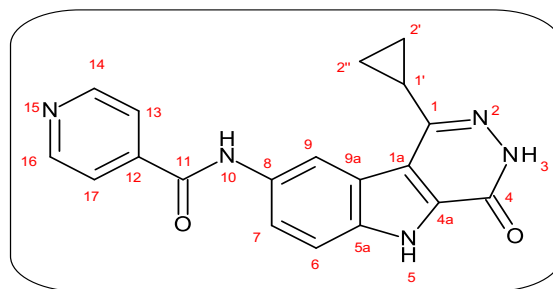
[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 379,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 381,1

***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl) isonicotinamide (57)**

C₁₉H₁₅N₅O₂

MM = 345,36 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,18 ml de TEA puis 77 mg (0,43 mmol) de chlorure de chlorhydrate d'isonicotinoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 39 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,07-1,14 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 7,68 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,95 (d, 1H, ³J = 7,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,95 (dd, 2H, ³J = 4,4 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,84 (dd, 2H, ³J = 5,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,85 (s, 1H, H₉), 10,67 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,62 (C_{2'} et C_{2''}), 13,38 (C_{1'}), 113,19 (C₆), 113,91 (C₉), 117,55 (C_{1a}), 121,21 (C_{9a}), 121,37 (C₇), 121,74 (C₁₃ et C₁₇), 131,99 (C_{4a}), 132,97 (C_{5a}), 136,17 (C₈), 142,25 (C₁₂), 145,30 (C₁), 150,45 (C₁₄ et C₁₆), 155,43 (C₄), 164,02 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3236, νCharom = 3105, 3047, νChaliph = 2968, 2895, νCO = 1641, δNH = 1518, νCN = 1416, Comb NH/CN = 1269

[M+H]⁺ : m/z = 346,1

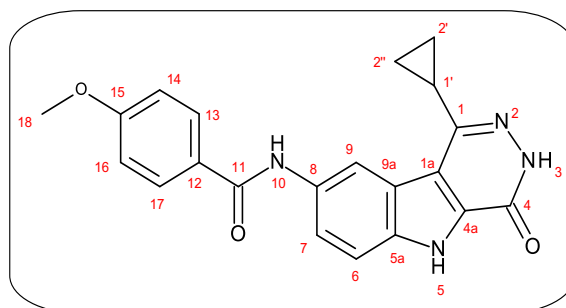
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide**

(58)

C₂₁H₁₈N₄O₃

MM = 374,39 g.mol⁻¹

Tf = 389- 391 °C



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 72 mg (0,42 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Triturer le résidu avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 53 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,04- 1,14 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 3,89 (s, 1H, H₁₈), 7,11 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,94 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,05 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,82 (s, 1H, H₉), 10,25 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,53 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,67 (C_{2'} et C_{2''}), 13,35 (C_{1'}), 112,96 (C₆), 113,57 (C₉), 113,77 (C₁₄ et C₁₆), 117,51 (C_{1a}) ; 121,21 (C₇), 121,50 (C_{9a}), 127,27 (C₁₂), 129,69 (C₁₃ et C₁₇), 131,82 (C_{4a}), 133,74 (C_{5a}), 135,83 (C₈), 145,34 (C₁), 155,44 (C₄), 162,00 (C₁₅), 165,01 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3252, νCHarom = 3113, 3080, νCHaliph = 2964, 2935, νCO = 1651, 1639, δNH = 1512, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1254

[M+H]⁺ : m/z = 375,2

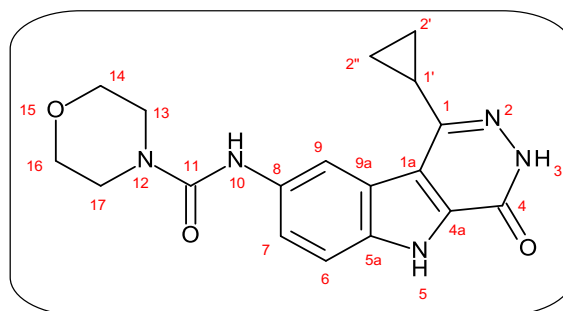
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholinoyl
carboxamide (59)**

C₁₈H₁₉N₅O₃

MM = 353,38 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,38 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 50 µl (0,42 mmol) de chlorure de 4-morpholine carbonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 4 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). On obtient une poudre beige avec un rendement de 53 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,06- 1,10 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,48 (qn, 1H, ³J = 4,8 Hz, H_{1'}), 3,49 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 3,67 (t, 4H, ³J = 4,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,55 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,66 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₇), 8,44 (s, 1H, H₉), 8,65 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,48 (s, 1H, NH, H₃), 12,62 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,74 (C_{2'} et C_{2''}), 13,29 (C_{1'}), 44,33 (C₁₃ et C₁₇), 66,20 (C₁₄ et C₁₆), 112,70 (C₆), 112,80 (C₉), 117,32 (C_{1a}), 121,23 (C_{9a}), 121,71 (C₇), 131,58 (C_{4a}), 134,71 (C_{5a}), 135,24 (C₈), 145,36 (C₁), 155,44 (C₄), 155,79 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νCharom = 3105, νCHaliph = 2960, 2918, νCO = 1649, 1634, δNH = 1525, νCN = 1479, Comb NH/CN = 1246, νC-O-C = 1112

[M+H]⁺ : m/z = 354,1

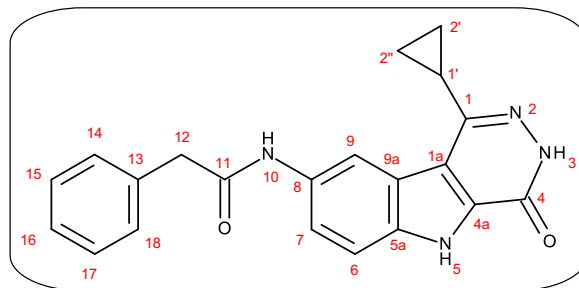
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)phénylacétamide (60)**

C₂₁H₁₈N₄O₂

MM = 358,40 g.mol⁻¹

Tf = 349- 351 °C

Rf = 0,55 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,12 ml de TEA puis 59 µl (0,44 mmol) de chlorure phénylacétyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 17 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec à l'eau. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle puis avec le mélange acétate d'éthyle-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 19 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,96- 1,04 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,42 (s, 1H, H_{1'}), 3,68 (s, 2H, CH₂, H₁₂), 7,25 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₆), 7,34 (d, 4H, ³J = 7,2 Hz, H₁₄, H₁₅, H₁₇ et H₁₈), 7,56 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₆), 7,67 (d, 1H, ³J = 7,2 Hz, H₇), 8,73 (s, 1H, H₉), 10,32 (s, 1H, H₁₀), 12,47 (s, 1H, NH, H₃), 12,66 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 6,37 (2C, C_{2'} et C_{2''}), 13,13 (C_{1'}), 43,33 (C₁₂), 111,81 (C₉), 112,99 (C₆), 117,23 (C_{1a}), 119,93 (C₇), 121,03 (C_{9a}), 126,46 (C₁₆), 128,26 (2C, C₁₅ et C₁₇), 129,15 (2C, C₁₄ et C₁₈), 131,60 (C_{4a}), 133,57 (C_{5a}), 135,38 (C₁₃), 136,09 (C₈), 145,07 (C₁), 155,21 (C₄), 168,91 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3250, νCharom = 3105, 3069, νChaliph = 2968, 2926, νCO = 1649, δNH = 1525, νCN = 1483, Comb NH/CN = 1232

[M+H]⁺ : m/z = 359,1

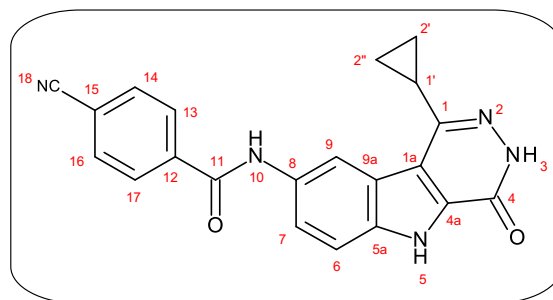
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-cyanobenzamide (61)**

C₂₁H₁₅N₅O₂

MM = 369,38 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,70 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 4 ml de DMF, introduire 130 mg (0,8 mmol) de CDI et 74 mg (0,5 mmol) d'acide 4-cyanobenzoïque et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation pendant 22 h à température ambiante. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 45 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,97-1,11 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,54 (s, 1H, H_{1'}), 7,67 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,94 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 8,09 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,19 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,84 (s, 1H, H₉), 10,66 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,64 (C_{2'} et C_{2''}), 13,40 (C_{1'}), 113,18 (C₆), 113,86 (C₉), 113,96 (C₁₈), 117,56 (C_{1a}), 118,55 (C₁₅), 121,21 (C_{9a}), 121,39 (C₇), 128,70 (C₁₃ et C₁₇), 131,98 (C_{4a}), 132,68 (C₁₄ et C₁₆), 133,13 (C_{5a}), 136,14 (C₈), 139,30 (C₁₂), 145,31 (C₁), 155,44 (C₄), 164,22 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3240, νCharom = 3103, 3053, νChaliph = 2968, 2926, νC≡N = 2228, νCO = 1664, 1637, δNH = 1517, νCN = 1419, Comb NH/CN = 1269

[M+H]⁺ : m/z = 370,2

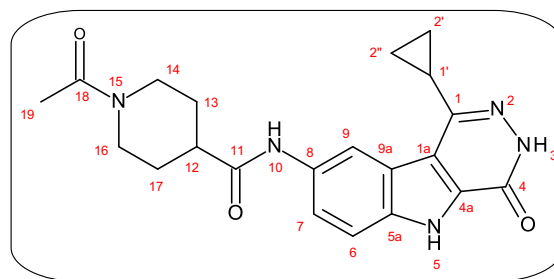
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-(1-acétyl)pipéridin-4-carboxamide (62)**

C₂₁H₂₃N₅O₃

MM = 393,44 g.mol⁻¹

Tf = 364- 365 °C

Rf = 0,29 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 3 ml de DMF, introduire 136,5 mg (0,84 mmol) de CDI et 86 mg (0,5 mmol) d'acide 1-acétylpipéridine-4-carboxylique et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation pendant 24 h. Extraire avec de l'acétate d'éthyle après avoir ajouté de l'eau. Sécher sur du sulfate de magnésium anhydre et purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 19 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,95- 1,07 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 1,23 (s, 1H, H₁₃ ou H₁₇), 1,48 (dddd, 1H, ³J = 12,2 Hz, ⁴J = 3,6 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,62 (dddd, 1H, ³J = 12 Hz, ³J = 2,8 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,84 (t, 2H, ³J = 11,4 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 2,06 (s, 3H, H₁₉), 2,43 (qn, 1H, ³J = 4,8 Hz, H_{1'}), 2,56- 2,65 (m, 2H, H₁₂ et H₁₄ ou H₁₆), 3,08 (t, 1H, ³J = 12 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 3,88 (d, 1H, ³J = 12,8 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 4,42 (d, 1H, ³J = 12,8 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 7,55 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,69 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,71 (s, 1H, H₉), 10,06 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,47 (s, 1H, NH, H₃), 12,65 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,39 (C_{2'} et C_{2''}), 13,17 (C_{1'}), 21,28 (C₁₉), 28,18 (C₁₃ ou C₁₇), 28,83 (C₁₃ ou C₁₇), 40,37 (C₁₄ ou C₁₆), 42,73 (C₁₂), 45,28 (C₁₄ ou C₁₆), 111,86 (C₉), 112,93 (C₆), 117,25 (C_{1a}), 120,03 (C₇), 121,04 (C_{9a}), 131,58 (C_{4a}), 133,64 (C_{5a}), 135,34 (C₈), 145,10 (C₁), 155,24 (C₄), 168,01 (C₁₁), 172,78 (C₁₈)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3242, νCHarom = 3105, 3063, νCHaliph = 2957, 2926, νCO = 1664, 1643, 1630, δNH = 1517, νCN = 1419, Comb NH/CN = 1225

[M+H]⁺ : m/z = 394,2

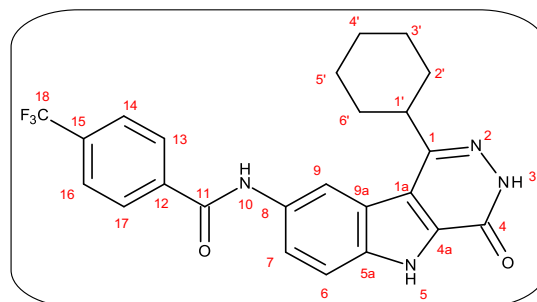
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide (63)**

C₂₄H₂₁F₃N₄O₂

MM = 454,45 g.mol⁻¹

Tf = 370- 372 °C

Rf = 0,55 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 54 µl (0,36 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5). Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 38 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 12,2 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,6 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 12 Hz, ²J = 13,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 11,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,15 (d, 2H, ³J = 11,2 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,29 (t, 1H, ³J = 9,8 Hz, H_{1'}), 7,67 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,87 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 7,97 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,23 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,76 (s, 1H, H₉), 10,66 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,67 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,95 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 31,08 (C_{2'} et C_{6'}), 41,37 (C_{1'}), 112,96 (C₉), 113,33 (C₆), 116,20 (C_{1a}), 120,54 (C_{9a}), 121,00 (C₇), 124,14 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 125,56 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 4 Hz), 128,81 (C₁₃ et C₁₇), 131,41 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,42 (C_{4a}), 133,49 (C_{5a}), 135,98 (C₈), 139,27 (C₁₂), 149,13 (C₁), 155,42 (C₄), 164,65 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3269, νCharom = 3138, 3111, νChaliph = 2939, 2860, νCO = 1649, δNH = 1531, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1273

[M+H]⁺ : m/z = 455,2

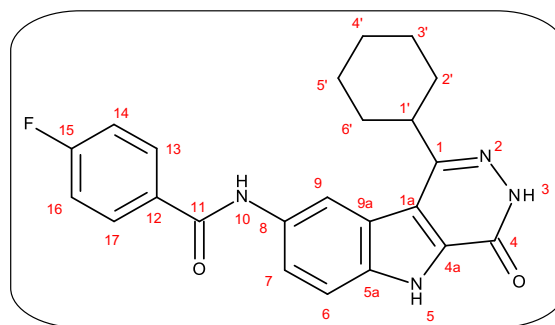
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzamide (64)**

C₂₃H₂₁FN₄O₂

MM = 404,44 g.mol⁻¹

Tf = 368- 370 °C

Rf = 0,56 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 43 μ l (0,36 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 28 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,33 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 11,4 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 11,6 Hz, ²J = 13,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,83 (d, 1H, ²J = 13,2 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 11,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ³J = 10,8 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,28 (t, 1H, ³J = 9,4 Hz, H_{1'}), 7,42 (t, 2H, ³J_F = ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,65 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,86 (dd, 1H, ³J = 8,2 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 8,11 (dd, 2H, ³J_H = 8,8 Hz, ⁴J_F = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,72 (s, 1H, H₉), 10,45 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,96 (C_{4'}), 26,22 (C_{3'} et C_{5'}), 31,09 (C_{2'} et C_{6'}), 41,35 (C_{1'}), 112,90 (C₉), 113,24 (C₆), 115,49 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 116,19 (C_{1a}), 120,55 (C_{9a}), 121,10 (C₇), 130,57 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,89 (C₁₂, J_F = 3 Hz), 132,37 (C_{4a}), 133,73 (C_{5a}), 135,87 (C₈), 149,16 (C₁), 155,44 (C₄), 164,17 (C₁₅, J_F = 248 Hz), 164,73 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): ν NH = 3227, ν Charom = 3159, ν Chaliph = 2928, 2852, ν CO = 1643, δ NH = 1504, ν CN = 1477, Comb NH/CN = 1234

[M+H]⁺ : m/z = 405,2

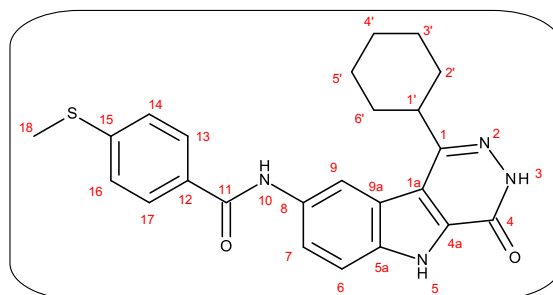
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthylthiobenzamide
(65)**

C₂₄H₂₄N₄O₂S

MM = 432,54 g.mol⁻¹

Tf = 341- 342 °C

Rf = 0,65 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 100 mg (0,54 mmol) de chlorure de 4-méthylthiobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 4 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5). Triturer le résidu sec avec l'éther diisopropylique puis filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 48 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,35 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 8,8 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,4 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 11,6 Hz, ²J = 13,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,85 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ³J = 11,2 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 2,59 (s, 3H, H₁₈), 3,29 (ddd, 1H, ³J = 9,8 Hz, ³J_{eq-eq} = 2,4 Hz, H_{1'}), 7,44 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,86 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,00 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,72 (s, 1H, H₉), 10,37 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,74 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 14,35 (C₁₈), 25,96 (C_{4'}), 26,20 (C_{3'} et C_{5'}), 31,08 (C_{2'} et C_{6'}), 41,33 (C_{1'}), 112,82 (C₉), 113,18 (C₆), 116,17 (C_{1a}), 120,55 (C_{9a}), 121,12 (C₇), 125,11 (C₁₄ et C₁₆), 128,38 (C₁₃ et C₁₇), 131,32 (C₁₂), 132,32 (C_{4a}), 133,84 (C_{5a}), 135,79 (C₈), 143,04 (C₁₅), 149,15 (C₁), 155,42 (C₄), 165,17 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3265, νCharom = 3109, 3082, νChaliph = 2925, 2854, νCO = 1649, δNH = 1524, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1257

[M+H]⁺ : m/z = 433,2

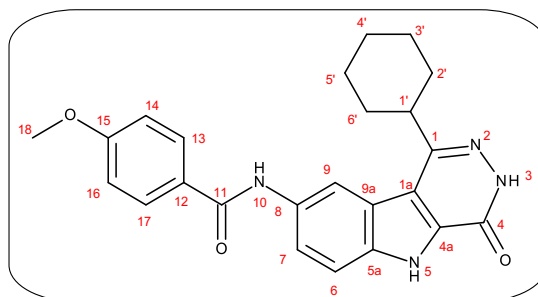
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide
(66)**

C₂₄H₂₄N₄O₃

MM = 416,48 g.mol⁻¹

Tf = 340- 342 °C

Rf = 0,46 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 62 mg (0,36 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 3 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 69 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 12 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 10,8 Hz, ²J = 12 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,85 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 9,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,15 (d, 2H, ³J = 10,4 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,29 (t, 1H, ³J = 10,4 Hz, H_{1'}), 3,89 (s, 3H, H_a), 7,12 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,63 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,86 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 8,03 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,71 (s, 1H, H₉), 10,28 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,73 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,96 (C_{4'}), 26,20 (C_{3'} et C_{5'}), 31,08 (C_{2'} et C_{6'}), 41,32 (C_{1'}), 55,60 (C₁₈), 112,76 (C₉), 113,13 (C₆), 113,76 (C₁₄ et C₁₆), 116,16 (C_{1a}), 120,55 (C_{9a}), 121,15 (C₇), 127,47 (C₁₂), 129,76 (C₁₃ et C₁₇), 132,29 (C_{4a}), 134,00 (C_{5a}), 135,72 (C₈), 149,16 (C₁), 155,42 (C₄), 161,97 (C₁₅), 165,19 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3300, νCHarom = 3107, 3074, νChaliph = 2932, 2851, νCO = 1657, 1643, δNH = 1537, νCN = 1473, Comb NH/CN = 1240, νC-O-C = 1172

[M+H]⁺ : m/z = 417,1

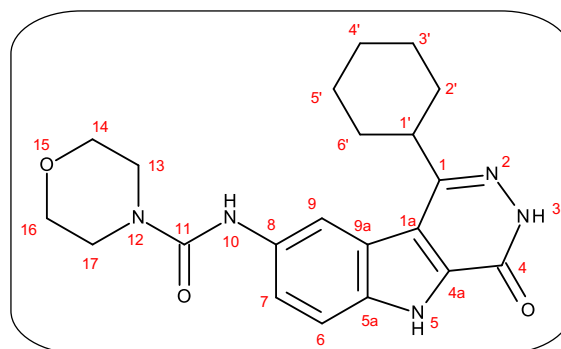
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholinoyl
carboxamide (67)**

$C_{21}H_{25}N_5O_3$

MM = 395,47 g.mol⁻¹

Tf = 381- 383 °C

Rf = 0,58 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 0,14 ml de TEA puis 42 μ l (0,36 mmol) de chlorure de 4-morpholine carbonyle et agiter à température ambiante pendant 6 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1). Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 54 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,32 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 9,6 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,6 Hz, H_{4'ax}), 1,60 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 9,8 Hz, ²J = 12,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,83 (d, 1H, ²J = 13,6 Hz, H_{4'eq}), 1,90 (d, 2H, ³J = 11,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,11 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,23 (t, 1H, ³J = 8 Hz, H_{1'}), 3,50 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 3,67 (t, 4H, ³J = 4,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,54 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,60 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 8,31 (s, 1H, H₉), 8,68 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,62 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,95 (C_{4'}), 26,18 (C_{3'} et C_{5'}), 31,06 (C_{2'} et C_{6'}), 41,24 (C_{1'}), 44,40 (C₁₃ et C₁₇), 66,20 (C₁₄ et C₁₆), 111,95 (C₉), 112,86 (C₆), 116,01 (C_{1a}), 120,60 (C_{9a}), 121,37 (C₇), 132,04 (C_{4a}), 134,91 (C_{5a}), 135,12 (C₈), 149,17 (C₁), 155,44 (C₄), 155,79 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): ν NH = 3327, ν Charom = 3146, 3124, ν CHaliph = 2930, 2853, ν CO = 1661, 1634, δ NH = 1537, ν CN = 1427, Comb NH/CN = 1232, ν C-O-C = 1109

[M+H]⁺ : m/z = 396,2

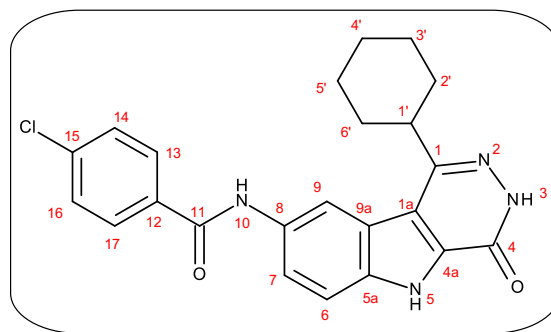
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzamide (68)**

C₂₃H₂₁ClN₄O₂

MM = 420,89 g.mol⁻¹

Tf = 370- 372 °C

Rf = 0,64 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 46 µl (0,36 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 47 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,35 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 12,4 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,4 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (dddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 12,4 Hz, ²J = 12,8 Hz, ³J_{eq-eq} = 2,8 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 13,2 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ³J = 11,2 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,28 (t, 1H, ³J = 9,6 Hz, H_{1'}), 7,65 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,67 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,85 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₇), 8,06 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,73 (s, 1H, H₉), 10,51 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,77 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,96 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 31,08 (C_{2'} et C_{6'}), 41,35 (C_{1'}), 112,90 (C₉), 113,26 (C₆), 116,19 (C_{1a}), 120,54 (C_{9a}), 121,06 (C₇), 128,63 (C₁₃ et C₁₇), 129,84 (C₁₄ et C₁₆), 132,38 (C_{4a}), 133,63 (C_{5a}), 134,13 (C₁₂), 135,90 (C₈), 136,41 (C₁₅), 149,14 (C₁), 155,42 (C₄), 164,70 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3242, νCHarom = 3169, νCHaliph = 2930, 2854, νCO = 1645, δNH = 1524, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1257

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 421,1, [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 423,1

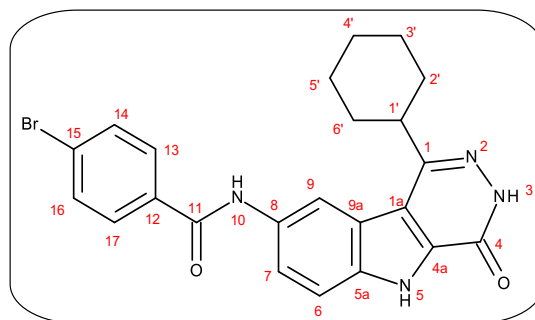
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-bromobenzamide (69)**

C₂₃H₂₁BrN₄O₂

MM = 465,35 g.mol⁻¹

Tf = 370- 372 °C

Rf = 0,62 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 62 mg (0,36 mmol) de chlorure de 4-bromobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 62 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 12 Hz, ³J_{ax-eq} = 4,4 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (dddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 12,4 Hz, ²J = 14 Hz, ³J_{eq-eq} = 2 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 13,2 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ²J = 14,4 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,28 (ddd, 1H, ³J = 10,6 Hz, ³J_{eq-eq} = 2,8 Hz, H_{1'}), 7,65 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,81 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,85 (dd, 1H, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,99 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,73 (s, 1H, H₉), 10,50 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,95 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 31,08 (C_{2'} et C_{6'}), 41,35 (C_{1'}), 112,91 (C₉), 113,26 (C₆), 116,19 (C_{1a}), 120,54 (C_{9a}), 121,05 (C₇), 125,33 (C₁₅), 130,02 (C₁₃ et C₁₇), 131,57 (C₁₄ et C₁₆), 132,38 (C_{4a}), 133,62 (C_{5a}), 134,49 (C₁₂), 135,90 (C₈), 149,14 (C₁), 155,42 (C₄), 164,81 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3264, νCharom = 3134, νCHaliph = 2927, 2849, νCO = 1643, δNH = 1524, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1259

[M+H]⁺ (⁷⁹Br) : m/z = 466,1, [M+H]⁺ (⁸¹Br) : m/z = 468,1

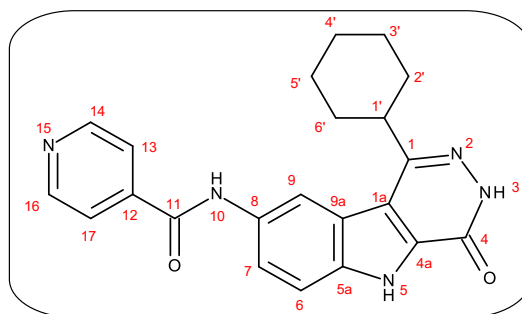
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl) isonicotinamide (70)**

C₂₂H₂₁N₅O₂

MM = 387,44 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,48 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 65 mg (0,36 mmol) de chlorhydrate du chlorure d'isonicotinoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le DCM puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 30 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,35 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 12 Hz, ³J_{ax-eq} = 3,6 Hz, H_{4'ax}), 1,63 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 11,6 Hz, ²J = 13,2 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 13,2 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ³J = 10,8 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,28 (ddd, 1H, ³J = 9,6 Hz, ³J_{eq-eq} = 2,4 Hz, H_{1'}), 7,67 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,86 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 7,94 (d, 2H, ³J = 6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,75 (s, 1H, H₉), 8,84 (d, 2H, ³J = 5,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,69 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,62 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,95 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 31,07 (C_{2'} et C_{6'}), 41,36 (C_{1'}), 113,02 (C₉), 113,38 (C₆), 116,20 (C_{1a}), 120,53 (C_{9a}), 120,96 (C₇), 121,83 (C₁₃ et C₁₇), 132,46 (C_{4a}), 133,27 (C_{5a}), 136,05 (C₈), 142,44 (C₁₂), 149,11 (C₁), 150,43 (C₁₄ et C₁₆), 155,41 (C₄), 164,23 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3443, νCHarom = 3090, 3038, νCHaliph = 2926, 2849, νCO = 1649, δNH = 1531, νCN = 1473, Comb NH/CN = 1252

[M+H]⁺ : m/z = 388,1

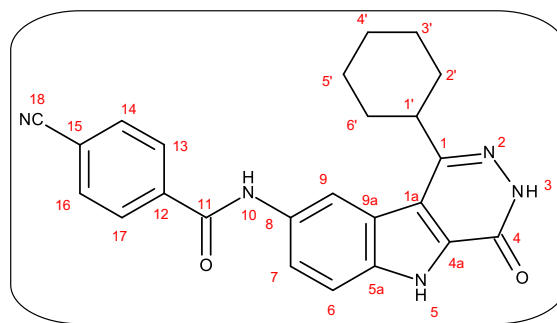
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-cyanobenzamide (71)**

C₂₄H₂₁N₅O₂

MM= 411,46 g.mol⁻¹

Tf= 384 - 386 °C

Rf= 0,60 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 4 ml de DMF, introduire 65 mg (0,4 mmol) de CDI et 59 mg (0,4 mmol) d'acide 4-cyanobenzoïque et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 24 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le DCM puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 25 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,32 (ddd, 1H, ³J_{ax-ax} = 12 Hz, ³J_{ax-eq} = 4,4 Hz, H_{4'ax}), 1,60 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 12,8 Hz, ²J = 14 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 13,6 Hz, H_{4'eq}), 1,92 (d, 2H, ³J = 12 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,14 (d, 2H, ³J = 10,8 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,28 (ddd, 1H, ³J = 10,8 Hz, ³J_{eq-eq} = 3,6 Hz, H_{1'}), 7,66 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,86 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,08 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,19 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,75 (s, 1H, H₉), 10,68 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,63 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,94 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 31,07 (C_{2'} et C_{6'}), 41,36 (C_{1'}), 112,98 (C₉), 113,34 (C₆), 113,87 (C₁₈), 116,19 (C_{1a}), 118,53 (C₁₅), 120,52 (C_{9a}), 120,98 (C₇), 128,75 (C₁₃ et C₁₇), 132,42 (C_{4a}), 132,64 (C₁₄ et C₁₆), 133,40 (C_{5a}), 136,00 (C₈), 139,48 (C₁₂), 149,12 (C₁), 155,41 (C₄), 164,40 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3273, νCHarom = 3148, 3128, νCHaliph = 2932, 2854, νC≡N = 2226, νCO = 1645, δNH = 1543, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1252

[M+H]⁺ : m/z = 412,2

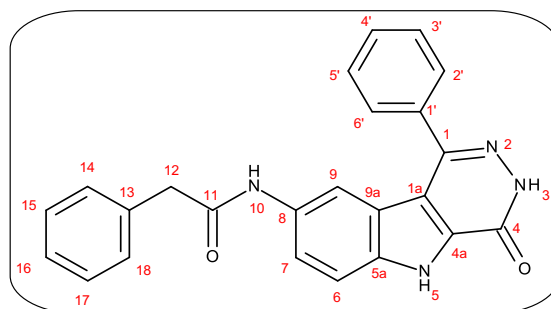
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)phénylacétamide (72)**

C₂₄H₁₈N₄O₂

MM = 394,43 g.mol⁻¹

Tf = 328- 329 °C

Rf = 0,46 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,12 ml de TEA puis 49 µl (0,37 mmol) de chlorure phénylacétyle et agiter à température ambiante pendant 17 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec à l'eau. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 18 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 3,59 (s, 2H, CH₂, H₁₂), 7,23- 7,30 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇ et H₁₈), 7,58- 7,70 (m, 7H, H₆, H₇, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} et H_{6'}), 7,92 (s, 1H, H₉), 10,11 (s, 1H, H₁₀), 12,87 (s, 1H, NH, H₃), 12,93 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 43,18 (C₁₂), 112,03 (C₉), 113,06 (C₆), 115,41 (C_{1a}), 120,62 (C₇ et C_{9a}), 126,42 (C₁₆), 128,25 (C₁₅ et C₁₇), 128,50 (C_{3'} et C_{5'}), 128,54 (C_{2'} et C_{6'}), 128,99 (C_{4'}, C₁₄ et C₁₈), 132,49 (C_{4a}), 133,08 (C_{5a}), 135,74 (C_{1'}), 136,12 (C₁₃), 136,28 (C₈), 144,34 (C₁), 155,02 (C₄), 168,64 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3225, νCharom = 3146, 3066, νChaliph = 2901, νCO = 1666, 1641, δNH = 1514, νCN = 1477, Comb NH/CN = 1265

[M+H]⁺ : m/z = 395,1

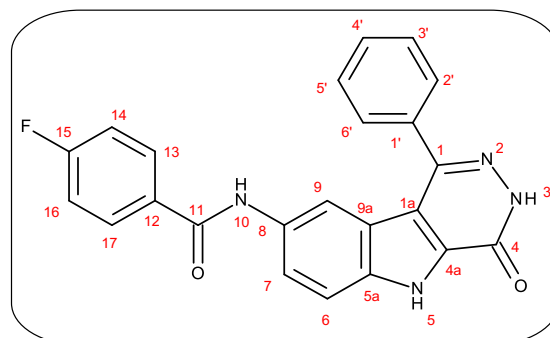
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzamide (73)**

C₂₃H₁₅FN₄O₂

MM = 398,39 g.mol⁻¹

Tf = 375- 376 °C

Rf = 0,53 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,12 ml de TEA puis 44 µl (0,37 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 23 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,34 (t, 2H, ³J_F = ³J_H = 8,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,56- 7,60 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'} et H_{5'}), 7,63 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,74 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 7,77 (dd, 1H, ³J = 10 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,98 (dd, 2H, ³J_H = 8,4 Hz, ⁴J_H = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,07 (s, 1H, H₉), 10,28 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,92 (s, 1H, NH, H₃), 12,96 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 112,95 (C₆), 113,66 (C₉), 115,20 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 115,52 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 122,00 (C₇), 128,54 (C_{3'} et C_{5'}), 128,57 (C_{2'} et C_{6'}), 129,02 (C_{4'}), 130,28 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,46 (C₁₂, J_F = 2 Hz), 132,56 (C_{4a}), 132,76 (C_{5a}), 136,08 (C_{1'}), 136,29 (C₈), 144,35 (C₁), 155,04 (C₄), 163,92 (C₁₅, J_F = 247 Hz), 164,22 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3234, νCHarom = 3115, 3074, νCHaliph = 2991, 2903, νCO = 1661, 1632, δNH = 1537, νCN = 1446, Comb NH/CN = 1225

[M+H]⁺ : m/z = 399,1

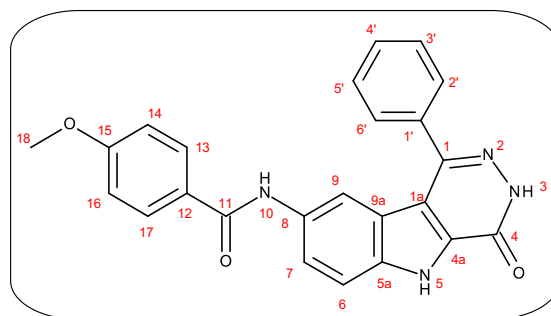
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino-[4,5-*b*] indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide (74)**

C₂₄H₁₈N₄O₃

MM = 410,43 g.mol⁻¹

Tf = 355- 356 °C

Rf = 0,42 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,12 ml de TEA puis 64 mg (0,37 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Ajouter de l'eau et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre et évaporer sous pression. Purifier sur une colonne chromatographique en éluant avec le DCM puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 23 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 3,83 (s, 3H, H₁₈), 7,03 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,59 (d, 3H, ³J = 7,2 Hz, H_{3'}, H_{4'} et H_{5'}), 7,61 (d, 1H, ³J = 10,4 Hz, H₆), 7,74 (d, 2H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 7,76 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₇), 7,91 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,05 (s, 1H, H₉), 10,10 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,90 (s, 1H, NH, H₃), 12,95 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 55,38 (C₁₈), 112,86 (C₆), 113,50 (C₁₄ et C₁₆), 113,65 (C₉), 115,50 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 122,16 (C₇), 127,06 (C₁₂), 128,55 (C_{3'} et C_{5'}), 128,57 (C_{2'} et C_{6'}), 129,01 (C_{4'}), 129,48 (C₁₃ et C₁₇), 132,50 (C_{4a}), 133,03 (C_{5a}), 135,97 (C_{1'}), 136,31 (C₈), 144,37 (C₁), 155,05 (C₄), 161,73 (C₁₅), 164,70 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3255, νCHarom = 3146, 3070, νCHaliph = 2968, νCO = 1664, 1637, δNH = 1510, νCN = 1470, Comb NH/CN = 1261, νC-O-C = 1101

[M+H]⁺ : m/z = 411,1

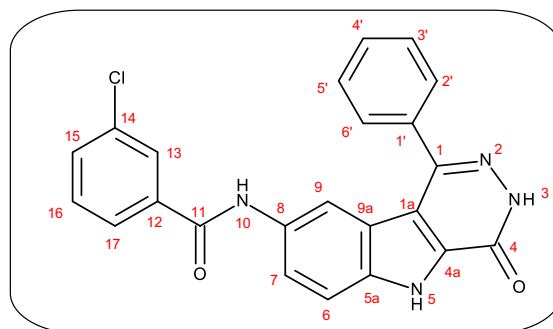
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-chlorobenzamide (75)**

C₂₃H₁₅ClN₄O₂

MM = 414,85 g.mol⁻¹

Tf = 358- 359 °C

Rf = 0,45 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,12 ml de TEA puis 48 µl (0,37 mmol) de chlorure de 3-chlorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre et purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane- méthanol (9/1). Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 63 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,52- 7,65 (m, 6H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H₆, H₁₅, et H₁₆), 7,73- 7,78 (m, 3H, H_{2'}, H_{6'} et H₇), 7,87 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₁₇), 7,95 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₁₃), 8,09 (s, 1H, H₉), 10,37 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,95 (s, 1H, NH, H₃), 12,98 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,02 (C₆), 113,66 (C₉), 115,54 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 121,91 (C₇), 126,41 (C₁₇), 127,34 (C₁₃), 128,55 (C_{3'} et C_{5'}), 128,60 (C_{2'} et C_{6'}), 129,05 (C_{4'}), 130,33 (C₁₆), 131,19 (C₁₅), 133,60 (C_{4a} et C_{5a}), 133,12 (C₁₄), 136,15 (C_{1'}), 136,28 (C₈), 137,02 (C₁₂), 144,35 (C₁), 155,04 (C₄), 163,85 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3306, νCHarom = 3146, 3070, νCHaliph = 2982, 2855, νCO = 1664, δNH = 1514, νCN = 1473, Comb NH/CN = 1263

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 415,1, [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 417,1

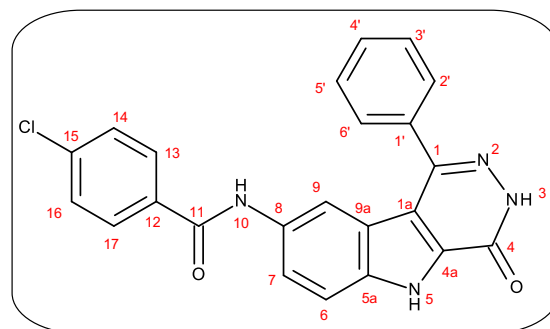
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzamide (76)**

C₂₃H₁₅ClN₄O₂

MM = 414,85 g.mol⁻¹

Tf = 398- 400 °C

Rf = 0,40 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 48 µl (0,37 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 54 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,58- 7,62 (m, 5H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H₁₄ et H₁₆), 7,63 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,73- 7,78 (m, 3H, H_{2'}, H_{6'} et H₇), 7,93 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,08 (s, 1H, H₉), 10,33 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,94 (s, 1H, NH, H₃), 12,97 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 112,99 (C₆), 113,65 (C₉), 115,53 (C_{1a}), 120,58 (C_{9a}), 121,95 (C₇), 128,37 (C₁₄ et C₁₆), 128,55 (C_{3'} et C_{5'}), 128,59 (C_{2'} et C_{6'}), 129,04 (C_{4'}), 129,56 (C₁₃ et C₁₇), 132,38 (C_{4a}), 133,63 (C_{5a}), 134,13 (C₁₂), 135,90 (C₁₅), 136,29 (C_{1'}), 136,41 (C₈), 144,36 (C₁), 155,05 (C₄), 164,22 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3250, νCharom = 3140, 3061, νCHaliph = 2984, 2901, νCO = 1661, 1641, δNH = 1519, νCN = 1471, Comb NH/CN = 1265

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 415,1 ; [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 417,0

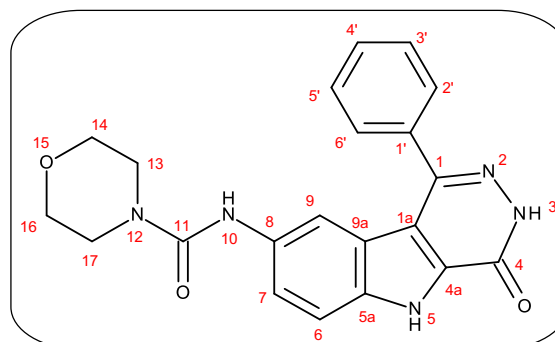
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholinoyl carboxamide (77)**

C₂₁H₁₉N₅O₃

MM = 389,41 g.mol⁻¹

Tf = 214- 216 °C

Rf = 0,45 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 0,12 ml de TEA puis 54 µl (0,46 mmol) de chlorure de 4-morpholine carbonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 26 h. Ajouter de l'eau, filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur une colonne chromatographique en éluant le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 16 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 3,37 (s, 4H, H₁₃ et H₁₇), 3,58 (s, 4H, H₁₄ et H₁₆), 7,52-7,72 (m, 8H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}, H₆, H₇ et H₉), 8,51 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,81 (s, 1H, NH, H₃), 12,92 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 44,14 (C₁₃ et C₁₇), 65,96 (C₁₄ et C₁₆), 112,60 (C₆), 113,01 (C₉), 115,29 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 122,60 (C₇), 128,54 (C_{2'}, C_{3'}, C_{5'} et C_{6'}), 129,00 (C_{4'}), 132,28 (C_{4a}), 134,07 (C_{5a}), 135,44 (C_{1'}), 136,42 (C₈), 144,35 (C₁), 155,04 (C₄), 155,61 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3321, νCHarom = 3086, νCHaliph = 2984, 2862, νCO = 1641, δNH = 1522, νCN = 1452, Comb NH/CN = 1257, νC-O-C = 1119

[M+H]⁺ : m/z = 390,2

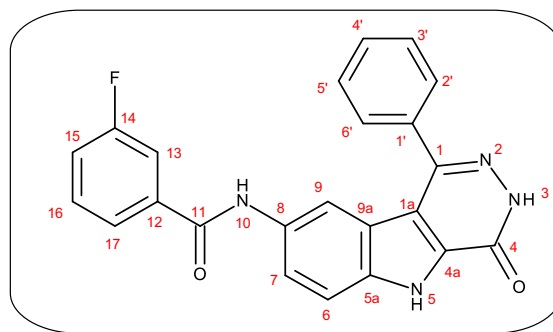
N-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indol-8-yl)-3-fluorobenzamide (78)

$C_{23}H_{15}FN_4O_2$

MM= 398,39 g.mol⁻¹

Tf= 382- 384 °C

Rf = 0,38 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,12 ml de TEA puis 45 µl (0,37 mmol) de chlorure de 3-fluorobenzoyl et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 2 h 30. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et filtrer le précipité. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 25 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 7,42 (dd, 1H, ³J_H = 8 Hz, ⁴J_F = 6,8 Hz, H₁₅), 7,54- 7,61 (m, 4H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} et H₁₆), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,70- 7,78 (m, 5H, H_{2'}, H_{6'}, H₇, H₁₃ et H₁₇), 8,08 (s, 1H, H₉), 10,33 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,94 (s, 1H, NH, H₃), 12,97 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 113,01 (C₆), 113,71 (C₉), 114,40 (C₁₃, J_F = 23 Hz), 115,54 (C_{1a}), 118,25 (C₁₅, J_F = 21 Hz), 120,57 (C_{9a}), 121,96 (C₇), 123,82 (C₁₇, J_F = 3 Hz), 128,55 (C_{3'} et C_{5'}), 128,60 (C_{2'} et C_{6'}), 129,05 (C_{4'}), 130,49 (C₁₆, J_F = 8 Hz), 132,60 (C_{4a} et C_{5a}), 136,16 (C_{1'}), 136,28 (C₈), 137,36 (C₁₂, J_F = 7 Hz), 144,36 (C₁), 155,05 (C₄), 161,87 (C₁₄, J_F = 243 Hz), 163,95 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3296, ν_{Charom} = 3148, ν_{Chaliph} = 2980, 2881, ν_{CO} = 1660, δ_{NH} = 1545, ν_{CN} = 1477, Comb NH/CN = 1261

[M+H]⁺ : m/z = 399,1

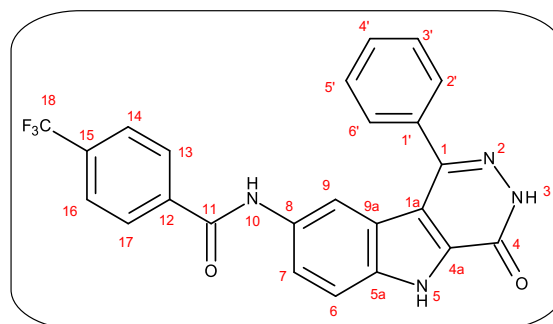
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide (79)**

C₂₄H₁₅F₃N₄O₂

MM = 448,40 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter ensuite 0,14 ml de TEA puis 55 µl (0,37 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzoyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30 . Ajouter de l'eau au précipité, filtrer et laver avec de l'eau. Purifier sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,57- 7,62 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 7,64 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,75 (dd, 2H, ³J = 6,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 7,79 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,89 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,10 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,11 (s, 1H, H₉), 10,48 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,95 (s, 1H, NH, H₃), 12,98 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,06 (C₆), 113,64 (C₉), 115,55 (C_{1a}), 120,58 (C_{9a}), 121,84 (C₇), 123,93 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 125,31 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 4 Hz), 128,55 (C_{2'}, C_{3'} et C_{5'} et C_{6'}), 128,60 (C₁₃ et C₁₇), 129,04 (C_{4'}), 131,18 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,56 (C_{4a}), 132,63 (C_{5a}), 136,19 (C_{1'}), 136,28 (C₈), 138,88 (C₁₂), 144,35 (C₁), 155,05 (C₄), 164,17 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3250, νCHarom = 3109, 3069, νCHaliph = 2930, 2853, νCO = 1661, 1643, δNH = 1535, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1267

[M+H]⁺ : m/z = 449,1

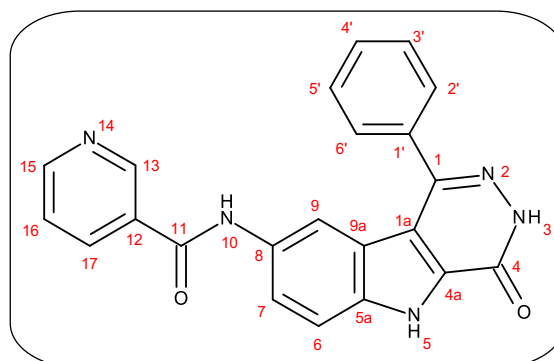
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)nicotinamide (80)**

C₂₂H₁₅N₅O₂

MM = 381,39 g.mol⁻¹

Tf = 379- 380 °C

Rf = 0,51 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon de 50 ml, introduire 3 ml de DMF, 117 mg (0,72 mmol) de CDI, 50 mg (0,4 mmol) d'acide nicotinique et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 44 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire le **produit désiré** avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier sur colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1) et évaporer le solvant. Evaporer le solvant, triturer avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 19 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 7,53- 7,62 (m, 4H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} et H₁₆), 7,65 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,75 (d, 2H, ³J = 7,6 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 7,79 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,10 (s, 1H, H₉), 8,24 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₇), 8,74 (dd, 1H, ³J = 4,6 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₁₅), 9,05 (d, 1H, ⁴J = 2 Hz, H₁₃), 10,46 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,95 (s, 1H, NH, H₃), 12,97 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 113,05 (C₆), 113,54 (C₉), 115,54 (C_{1a}), 120,58 (C_{9a}), 121,78 (C₇), 123,41 (C₁₆), 128,53 (C_{3'} et C_{5'}), 128,59 (C_{2'} et C_{6'}), 130,70 (C₁₂), 132,57 (C_{4a}), 132,61 (C_{5a}), 135,37 (C₁₇), 136,15 (C_{1'}), 136,26 (C₈), 144,34 (C₁), 148,58 (C₁₃), 151,90 (C₁₅), 155,03 (C₄), 163,83 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3300, νCharom = 3148, 3061, νChaliph = 2980, 2887, νCO = 1660, δNH = 1547, νCN = 1475, Comb NH/CN = 1263

[M+H]⁺ : m/z = 382,1

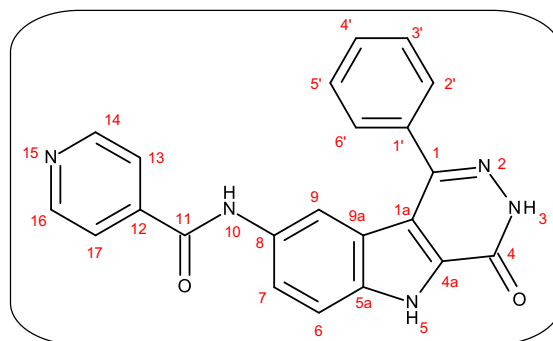
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)isonicotinamide (81)**

$C_{22}H_{15}N_5O_2$

MM = 381,39 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C

Rf = 0,40 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon de 50 ml, introduire 3 ml de DMF, 117 mg (0,72 mmol) de CDI, 61,5 mg (0,5 mmol) d'acide isonicotinique et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 25 h. Filtrer et laver le précipité avec de l'eau. Purifier sur colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 68 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,59 (d, 3H, ³J = 6,8 Hz, H_{3'}, H_{4'} et H_{5'}), 7,65 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,74 (d, 2H, ³J = 6 Hz, H_{2'} et H_{6'}), 7,79 (dd, 1H, ³J = 11,6 Hz, H₇), 7,81 (d, 2H, ³J = 5,6 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,11 (s, 1H, H₉), 8,76 (d, 2H, ³J = 5,6 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,51 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,96 (s, 1H, NH, H₃), 12,98 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,10 (C₆), 113,68 (C₉), 115,55 (C_{1a}), 120,57 (C_{9a}), 121,54 (C₁₃ et C₁₇), 121,77 (C₇), 128,54 (C_{3'} et C_{5'}), 128,59 (C_{2'} et C_{6'}), 129,04 (C_{4'}), 132,33 (C_{4a}), 132,66 (C_{5a}), 136,25 (C_{1'} et C₈), 142,05 (C₁₂), 144,34 (C₁), 150,17 (C₁₄ et C₁₆), 155,03 (C₄), 163,75 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3254, νCharom = 3078, νCHaliph = 2986, 2889, νCO = 1661, 1651, δNH = 1518, νCN = 1415, Comb NH/CN = 1271

[M+H]⁺ : m/z = 382,1

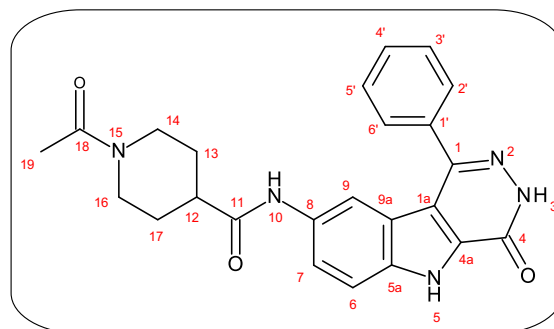
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-(1-acétyl) pipéridin-4-carboxamide (82)**

C₂₄H₂₃N₅O₃

MM = 429,47 g.mol⁻¹

Tf = 365- 367 °C

Rf = 0,59 (DCM- MeOH 9/1)



Dans un ballon contenant 3 ml de DMF, introduire 117 mg (0,72 mmol) de CDI et 79 mg (0,46 mmol) d'acide 1-acétylpipéridine-4-carboxylique et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter ensuite 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole et poursuivre l'agitation pendant 26 h à température ambiante. Extraire avec de l'acétate d'éthyle après avoir ajouté de l'eau. Sécher sur du sulfate de magnésium anhydre et purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) puis (9/1). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 76 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,40 (q, 1H, ³J = 11,2 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,55 (q, 1H, ³J = 11,4 Hz, H₁₃ ou H₁₇), 1,75 (s, 2H, ³J = 11,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 2,00 (s, 3H, H₁₉), 2,57 (s, 2H, ³J = 10,8 Hz, ³J = 4,4 Hz, H₁₂ et H₁₄ ou H₁₆), 3,03 (t, 1H, ³J = 12,2 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 3,84 (d, 1H, ³J = 13,2 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 4,39 (d, 1H, ³J = 13,2 Hz, H₁₄ ou H₁₆), 7,55- 7,70 (m, 7H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}, H₆ et H₇), 7,93 (s, 1H, H₉), 9,89 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,86 (s, 1H, NH, H₃), 12,94 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 21,27 (C₁₉), 28,15 (C₁₃ ou C₁₇), 28,74 (C₁₃ ou C₁₇), 40,33 (C₁₄ ou C₁₆), 42,53 (C₁₂), 45,24 (C₁₄ ou C₁₆), 111,92 (C₉), 113,01 (C₆), 115,41 (C_{1a}), 120,62 (C₇ et C_{9a}), 128,53 (C_{3'} et C_{5'}), 128,56 (C_{2'} et C_{6'}), 129,00 (C_{4'}), 132,47 (C_{4a}), 133,22 (C_{5a}), 135,66 (C₁'), 136,30 (C₈), 144,36 (C₁), 155,04 (C₄), 167,97 (C₁₁), 172,54 (C₁₈)

IR (cm⁻¹) : νNH = νCHarom = 3182, 3105, νCHaliph = 2941, νCO = 1637, 1614, δNH = 1556, νCN = 1446, Comb NH/CN = 1223, νC-O-C = 1109

[M+H]⁺ : m/z = 430,2

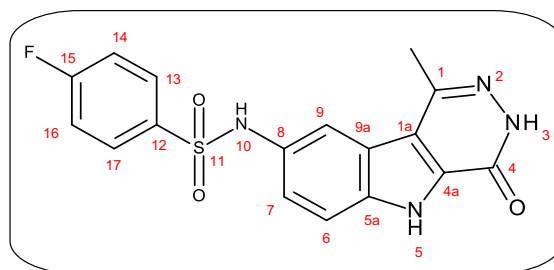
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzène sulfonamide (83)**

C₁₇H₁₃FN₄O₃S

MM = 372,38 g.mol⁻¹

Tf = 312- 314 °C

Rf = 0,24 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 90 mg (0,46 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec de l'acétate d'éthyle. On obtient une poudre beige avec un rendement de 20 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,63 (s, 3H, CH₃), 7,25 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,40 (t, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,54 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,77- 7,82 (m, 3H, H₉, H₁₃ et H₁₇), 10,25 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,59 (s, 1H, NH, H₃), 12,78 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,93 (CH₃), 113,89 (C₆), 114,85 (C₉), 116,56 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 23 Hz), 116,94 (C_{1a}), 121,56 (C_{9a}), 122,47 (C₇), 130,06 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,36 (C_{4a}), 132,18 (C_{5a}), 135,84 (C₁₂, J_F = 3 Hz), 136,55 (C₈), 141,53 (C₁), 155,38 (C₄), 164,44 (C₁₅, J_F = 251 Hz)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3240, νCHarom = 3124, 3107, 3070, νCHaliph = 2972, νCO = 1657, νSO₂ = 1332, 1149

[M+H]⁺ : m/z = 373,1

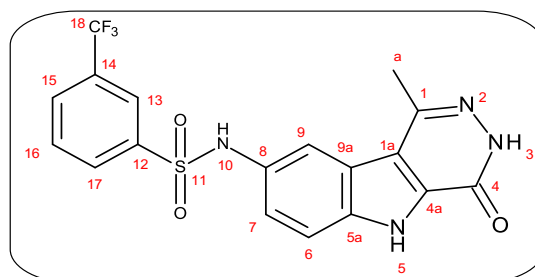
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-(trifluorométhyl)benzène sulfonamide (84)**

C₁₈H₁₃F₃N₄O₃S

MM = 422,33 g.mol⁻¹

Tf = 356- 358 °C

Rf = 0,32 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 50 mg (0,23 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 39 mg (0,46 mmol) de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) et laisser dissoudre puis 38 µl (0,23 mmol) de chlorure de 3-(trifluorométhyl)benzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique flash en éluant avec le mélange acétate d'éthyle-cyclohexane (50/50) puis (60/40) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 14 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,58 (s, 3H, CH₃), 7,27 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 7,56 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,71 (s, 1H, H₉), 7,79 (t, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₁₆), 7,99 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₁₇), 8,04 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₁₅), 8,07 (s, 1H, H₁₃), 10,39 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,81 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,76 (CH₃, H_a), 113,98 (C₆), 115,41 (C₉), 116,88 (C_{1a}), 121,51 (C_{9a}), 122,14 (C₇), 123,49 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 123,53 (C₁₃, J_F = 4 Hz), 129,74 (C₁₅, J_F = 4 Hz), 129,92 (C₁₄, J_F = 32 Hz), 130,83 (C_{4a}), 131,07 (C₁₆ et C₁₇), 132,24 (C_{5a}), 136,75 (C₈), 140,51 (C₁₂), 141,39 (C₁), 155,34 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3250, νCharom = 3111, 3063, νChaliph = 2957, 2916, 2851, νCO = 1659, νSO₂ = 1885, 1163

[M+H]⁺ : m/z = 423,1

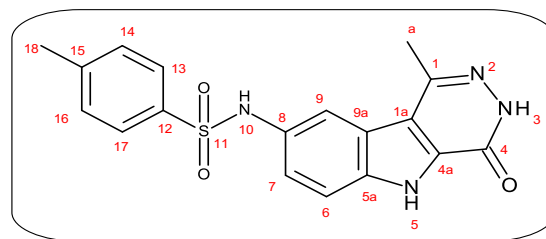
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino-[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthylbenzène sulfonamide (85)**

C₁₈H₁₆N₄O₃S

MM = 368,41 g.mol⁻¹

Tf = 320- 322 °C

Rf= 0,31 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante puis 0,14 ml de TEA et 178 mg (0,93 mmol) de chlorure de paratoluène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique flash en éluant avec le mélange acétate d'éthyle-cyclohexane (50/50) puis (60/40) et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 11 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,29 (s, 3H, H₁₈), 2,58 (s, 3H, H_a), 7,22 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 7,30 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,48 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,61 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,73 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 10,13 (s, 1H, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,71 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 19,92 (C₁₈), 21,10(C_a), 113,82 (C₆), 114,26 (C₉), 116,95 (C_{1a}), 121,55 (C_{9a}), 122,17 (C₇), 127,1 (C₁₃ et C₁₇), 129,78 (C₁₄ et C₁₆), 131,78 (C_{4a}), 132,12 (C_{5a}), 136,36 (C₈), 136,71 (C₁₂), 141,56 (C₁), 143,32 (C₁₅), 155,43 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3244, νCharom = 3119, 3067, νChaliph = 2986, 2897, νCO = 1687, νSO₂ = 1331, 1153

[M+H]⁺ : m/z = 369,2

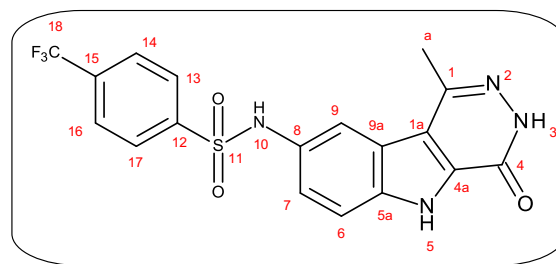
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzène sulfonamide (86)**

$C_{18}H_{13}F_3N_4O_3S$

MM = 422,33 g.mol⁻¹

Tf = 355- 356 °C

Rf = 0,66 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3,5 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 78 mg (0,92 mmol) de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) et laisser dissoudre puis 122 mg (0,5 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 57 %.

¹H RMN, (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 2,60 (s, 3H, H_a), 7,26 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 7,56 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,75 (s, 1H, H₉), 7,96 (t, 4H, ³J = 9,4 Hz, H₁₃, H₁₄, H₁₆ et H₁₇), 10,46 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,60 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN, (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 19,83 (C_a), 113,98 (C₆), 115,27 (C₉), 116,92 (C_{1a}), 121,55(C_{9a}), 122,71 (C₇), 123,54 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 126,62 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 4 Hz), 128,02 (C₁₃ et C₁₇), 130,86 (C_{4a}), 132,24 (C_{5a}), 132,63 (C₁₅, J_F = 33 Hz), 136,71 (C₈), 141,46 (C₁), 143,40 (C₁₂), 155,35 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3248, νCharom = 3080, 3065, νChaliph = 2870, 2849, νCO = 1622, νSO₂ = 1323, 1157

[M+H]⁺ : m/z = 423,1

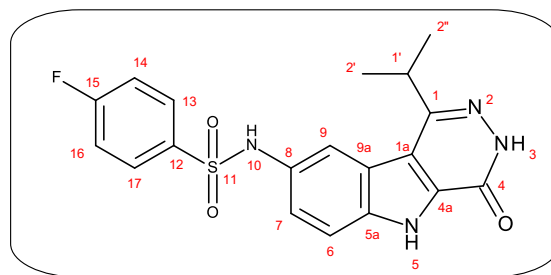
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzène sulfonamide (87)**

C₁₉H₁₇FN₄O₃S

MM = 400,43 g.mol⁻¹

Tf = 283- 285°C

Rf = 0,66 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 0,14 ml de TEA puis 80 mg (0,41 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzène sulfonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 45 min. Evaporer le solvant et purifier le résidu sur une colonne chromatographique flash en éluant avec le mélange acétate d'éthyle-cyclohexane (50/50) et évaporer. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 14 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,27 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,59 (sep, 1H, ³J = 6,4 Hz, H_{1'}), 7,24 (dd, 1H, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,36 (t, 2H, ³J_H = 8,8 Hz, ³J_F = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,52 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,63 (s, 1H, H₉), 7,73 (dd, 2H, ³J_H = 8,8 Hz, ⁴J_F = 5,2 Hz, H₁₃ et H₁₇), 10,16 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,59 (s, 1H, NH, H₃), 12,76 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 20,69 (C_{2'} et C_{2''}), 31,39 (C_{1'}), 113,97 (C₆), 115,73 (C₉), 115,82 (C_{1a}), 116,54 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 23 Hz), 120,65 (C_{9a}), 122,93 (C₇), 130,02 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,35 (C_{4a}), 132,59 (C_{5a}), 135,74 (C₁₂, J_F = 4 Hz), 136,75 (C₈), 149,23 (C₁), 155,31 (C₄), 164,46 (C₁₅, J_F = 250 Hz)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3246, νCharom = 3107, 3072, νChaliph = 2972, 2932, νCO = 1643, νSO₂ = 1377, 1153

[M+H]⁺ : m/z = 401,1

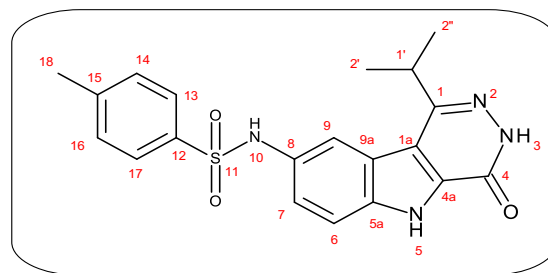
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthylbenzène sulfonamide (88)**

C₂₀H₂₀N₄O₃S

MM = 396,47 g.mol⁻¹

Tf = 321-323 °C

Rf = 0,44 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante puis 0,14 ml de TEA et 158 mg (0,82 mmol) de chlorure de paratoluènesulfonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 1 h 30. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 64 %

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,28 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 2,29 (s, 1H, H₁₈), 3,33 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 7,25 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 7,30 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,50 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,59 (d, 2H, ³J = 8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,65 (s, 1H, H₉), 10,08 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,59 (s, 1H, NH, H₃), 12,74 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,69 (C_{2'} et C_{2''}), 21,07 (C₁₈), 31,38 (C_{1'}), 113,85 (C₆), 115,12 (C₉), 115,79 (C_{1a}), 120,61 (C_{9a}), 122,59 (C₇), 127,03 (C₁₃ et C₁₇), 129,72 (C₁₄ et C₁₆), 131,75 (C_{4a}), 132,49 (C_{5a}), 136,53 (C₈), 136,58 (C₁₂), 143,29 (C₁₅), 149,24 (C₁), 155,31 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3246, νCHarom = 3178, νCHaliph = 2972, 2928, 2878, νCO = 1651, νSO₂ = 1377, 1159

[M+H]⁺ : m/z = 473,1

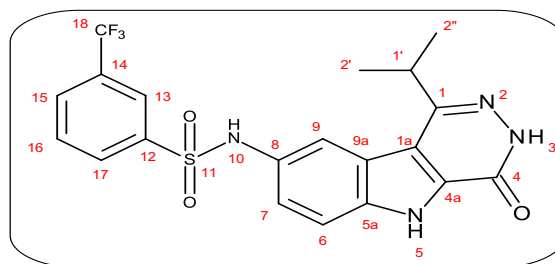
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-(trifluorométhyl)benzène sulfonamide (89)**

C₂₀H₁₇F₃N₄O₃S

MM = 450,44 g.mol⁻¹

Tf = 295- 297 °C

Rf = 0,36 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 4 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 69 mg (0,82 mmol) de bicarbonate de sodium et laisser dissoudre puis 66 µl (0,41 mmol) de chlorure de 3-(trifluorométhyl)benzène sulfonyle et poursuivre l'agitation à température ambiante pendant 30 min. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique flash en éluant avec le mélange acétate d'éthyle-cyclohexane (50/50) et évaporer. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 29 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,25 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,59 (sep, 1H, ³J = 6,4 Hz, H_{1'}), 7,31 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 7,58 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, H₉), 7,62 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,76 (t, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₁₆), 7,94- 7,99 (m, 3H, H₁₃, H₁₅ et H₁₇), 10,34 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,61 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,92 (C_{2'} et C_{2''}), 31,76 (C_{1'}), 114,63 (C₆), 116,39 (C₉), 116,53 (C_{1a}), 120,94 (C_{9a}), 123,86 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 123,87 (C₇), 123,97 (C₁₃, J_F = 4 Hz), 130,29 (C₁₆), 130,45 (C₁₄, J_F = 32 Hz), 131,24 (C_{4a}), 131,51 (C₁₅, J_F = 3Hz), 131,53 (C₁₇), 132,77 (C_{5a}), 137,27 (C₈), 140,56 (C₁₂), 150,03 (C₁), 155,69 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3256, νCHarom = 3117, 3076, νCHaliph = 2970, νCO = 1645, νSO₂ = 1325, 1157

[M+H]⁺ : m/z = 451,1

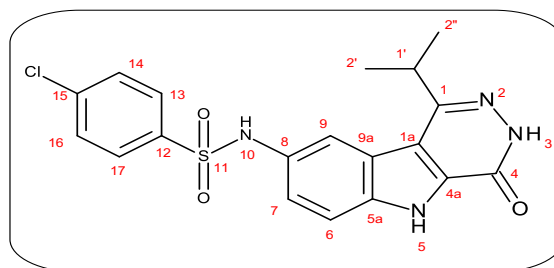
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzène sulfonamide (90)**

C₁₉H₁₇ClN₄O₃S

MM = 416,89 g.mol⁻¹

Tf = 320- 322 °C

Rf = 0,60 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 69 mg (0,82 mmol) de NaHCO₃ et laisser dissoudre. Introduire ensuite dans le milieu réactionnel 87 mg de chlorure de 4-chlorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 30 min. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sec par chromatographie flash en éluant avec le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (60/40) et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 50 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,30 (d, 6H, ³J = 6,4 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,37 (sep, 1H, ³J = 6,4 Hz, H_{1'}), 7,28 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₇), 7,57 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,63 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,64 (s, 1H, H₉), 7,71 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 10,25 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,64 (s, 1H, NH, H₃), 12,82 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,65 (C_{2'} et C_{2''}), 31,37 (C_{1'}), 113,98 (C₆), 115,79 (C_{1a}), 115,92 (C₉), 120,62 (C_{9a}), 123,05 (C₇), 128,91 (C₁₃ et C₁₇), 129,48 (C₁₄ et C₁₆), 131,15 (C_{4a}), 132,59 (C_{5a}), 136,80 (C₈), 137,89 (C₁₅), 138,20 (C₁₂), 149,19 (C₁), 155,28 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3267, νCharom = 3088, νCHaliph = 2970, 2874, νCO = 1643, νSO₂ = 1329, 1153

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 417,0 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 419,0

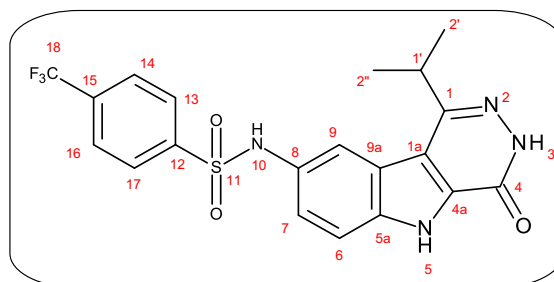
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzène sulfonamide (91)**

C₂₀H₁₇F₃N₄O₃S

MM = 450,44 g.mol⁻¹

Tf = 304- 306 °C

Rf = 0,52 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 69 mg (0,82 mmol) de NaHCO₃ et laisser dissoudre puis 111 mg (0,45 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 52 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,26 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,63 (sep, 1H, ³J = 6 Hz, H_{1'}), 7,32 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 7,59 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,60 (s, 1H, H₉), 7,91 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,96 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,38 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,63 (s, 1H, NH, H₃), 12,83 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,55 (C_{2'} et C_{2''}), 31,32 (C_{1'}), 114,06 (C₆), 115,77 (C_{1a}), 116,25 (C₉), 119,47 (C_{9a}), 123,36 (C₇), 123,53 (C₁₈, J_F = 272 Hz), 126,60 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 3 Hz), 127,98 (C₁₃ et C₁₇), 130,82 (C_{4a}), 132,62 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,63 (C_{5a}), 136,93 (C₈), 143,20 (C₁₂), 149,13 (C₁), 155,27 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3271, νCharom = 3090, νCHaliph = 2970, 2932, 2878, νCO = 1643, νSO₂ = 1321, 1157

[M+H]⁺ : m/z = 451,1

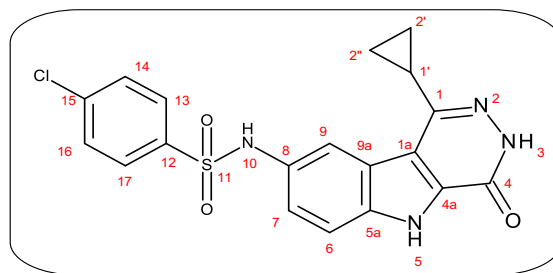
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzène sulfonamide (92)**

C₁₉H₁₅ClN₄O₃S

MM = 414,87 g.mol⁻¹

Tf = 363- 365 °C

Rf = 0,62 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante. Ajouter 71 mg (0,84 mmol) de NaHCO₃ et laisser dissoudre. Introduire ensuite dans le milieu réactionnel 89 mg (0,42 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 30 min. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 34 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,99-1,05 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,27 (qn, 1H, ³J = 4,8 Hz, H_{1'}), 7,27 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 7,56 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,64 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,74 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,93 (s, 1H, H₉), 10,28 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,17 (C_{2'} et C_{2''}), 13,43 (C_{1'}), 113,87 (C₆), 115,74 (C₉), 117,32 (C_{1a}), 121,39 (C_{9a}), 122,84 (C₇), 128,97 (C₁₃ et C₁₇), 129,52 (C₁₄ et C₁₆), 131,10 (C_{4a}), 132,10 (C_{5a}), 136,72 (C₈), 137,88 (C₁₅), 138,33 (C₁₂), 144,95 (C₁), 155,34 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3242, νCharom = 3126, 3093, νHaliph = 2961, νCO = 1649, νSO₂ = 1383, 1165

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 415,0 ; [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 417,1

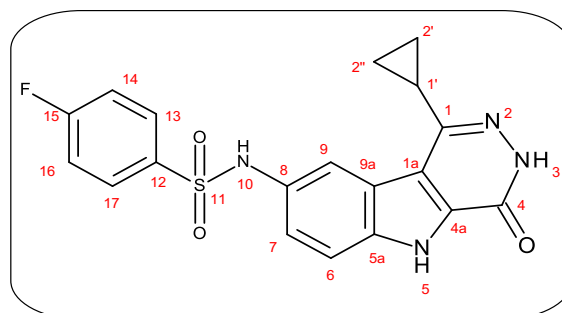
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzène sulfonamide (93)**

C₁₉H₁₅FN₄O₃S

MM = 398,41 g.mol⁻¹

Tf = 326- 328 °C

Rf = 0,43 (acétate d'éthyle)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 71 mg (0,84 mmol) de NaHCO₃. Après 5 minutes, ajouter 82 mg (0,42 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 64 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,03-1,07 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,29 (qn, 1H, ³J = 5 Hz, H_{1'}), 7,27 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,40 (t, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,55 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,80 (dd, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ⁴J_H = 5,2 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,95 (s, 1H, H₉), 10,23 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,77 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,16 (C_{2'} et C_{2''}), 13,41 (C_{1'}), 113,81 (C₆), 115,55 (C₉), 116,51 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 22 Hz), 117,31 (C_{1a}), 121,39 (C_{9a}), 122,68 (C₇), 130,04 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 10 Hz), 131,28 (C_{4a}), 132,07 (C_{5a}), 135,86 (C₁₂, J_F = 3 Hz), 136,64 (C₈), 144,95 (C₁), 155,33 (C₄), 164,43 (C₁₅, J_F = 250 Hz)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3231, νCHarom = 3109, 3070, νCHaliph = 2974, νCO = 1649, νSO₂ = 1389, 1166

[M+H]⁺ : m/z = 399,1

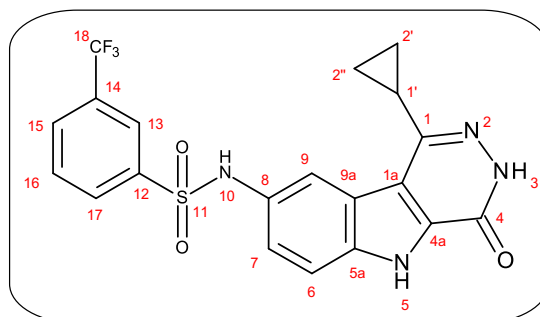
***N*-(1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-(trifluorométhyl)benzènesulfonamide (94)**

C₂₀H₁₅F₃N₄O₃S

MM = 448,42 g.mol⁻¹

Tf = 347- 349 °C

Rf = 0,50 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,42 mmol) de 8-amino-1-cyclopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 71 mg de NaHCO₃ puis 68 µl (0,42 mmol) de chlorure de 3-(trifluorométhyl)benzènesulfonyle et agiter à température ambiante pendant 20 min. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier le résidu sur une colonne chromatographique en éluant le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 11 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,98-1,02 (m, 4H, H_{2'} et H_{2''}), 2,23 (qn, 1H, ³J = 5 Hz, H_{1'}), 7,29 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 7,57 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,79 (t, 1H, ³J = 7,8 Hz, H₁₆), 7,91 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, H₉), 7,98 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₇), 8,03 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₅), 8,07(s, 1H, H₁₃), 10,37 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,55 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 6,04 (C_{2'} et C_{2''}), 13,33 (C_{1'}), 113,93 (C₆), 115,98 (C₉), 117,26 (C_{1a}), 121,36 (C_{9a}), 122,99 (C₇), 123,48 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 123,50 (C₁₃, J_F = 4 Hz), 129,70 (C₁₅, J_F = 3 Hz), 129,89 (C₁₄, J_F = 33 Hz), 130,81 (C_{4a}), 131,03 (C₁₆), 131,07 (C₁₇), 132,13 (C_{5a}), 136,83 (C₈), 140,53 (C₁₂), 144,86 (C₁), 155,30 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3252, νCHarom = 3195, 3061, νCHaliph = 2993, 2885, νCO = 1660, νSO₂ = 1331, 1124

[M+H]⁺ : m/z = 449,1

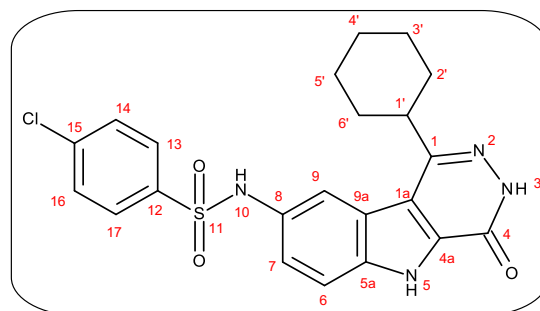
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzène sulfonamide (95)**

C₂₂H₂₁ClN₄O₃S

MM = 456,95 g.mol⁻¹

Tf = 218- 220 °C

Rf = 0,63 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter ensuite 76 mg (0,36 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 30 min. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le DCM puis le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 53 %.

¹H RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,32 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 8,4 Hz, H_{4'ax}), 1,45-1,56 (m, 4H, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,82-1,93 (m, 5H, H_{4'eq} et H_{2'} ou H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 3,00 (s, 1H, H_{1'}), 7,33 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₇), 7,57-7,68 (m, 6 H, H₆, H₉, H₁₃, H₁₄ et H₁₆), 10,26 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,62 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,91 (C_{4'}), 26,21 (C_{3'} et C_{5'}), 30,85 (C_{2'} et C_{6'}), 41,36 (C_{1'}), 114,01 (C₆), 115,51 (C₉), 115,83 (C_{1a}), 120,64 (C_{9a}), 123,01 (C₇), 128,80 (C₁₃ et C₁₇), 129,42 (C₁₄ et C₁₆), 131,28 (C_{4a}), 132,59 (C_{5a}), 136,78 (C₈), 137,86 (C₁₅), 138,00 (C₁₂), 148,78 (C₁), 155,28 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3248, νCharom = 3076, νCHaliph = 2927, 2856, νCO = 1641, νSO₂ = 1334, 1163

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 457,0 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 459,1

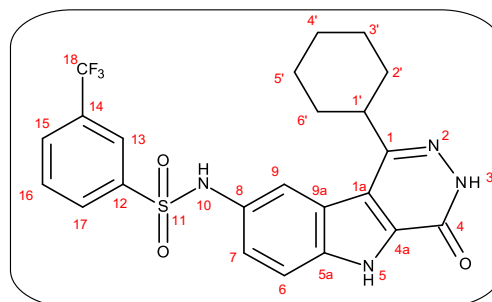
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-(trifluorométhyl)benzènesulfonamide (96)**

C₂₃H₂₁F₃N₄O₃S

MM = 490,50 g.mol⁻¹

Tf = 253- 255 °C

Rf = 0,63 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter 58 µl (0,36 mmol) de chlorure de 3-(trifluorométhyl)benzènesulfonyle et agiter à température ambiante pendant 30 min. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le dichlorométhane puis le mélange dichlorométhane- méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 58 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,30 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 9,2 Hz, H_{4'ax}), 1,50 (ddd, 4H, ³J_{ax-ax} = 10,2 Hz, ²J = 12,8 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,79 (s, 1H, H_{4'eq}), 1,86 (d, 2H, ³J = 9,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 1,94 (d, 2H, ³J = 9,2 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,00 (t, 1H, ³J = 8 Hz, H_{1'}), 7,35 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₇), 7,59 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, H₆), 7,63 (s, 1H, H₉), 7,78 (t, 1H, ³J = 7,8 Hz, H₁₆), 7,93-8,02 (m, 3H, H₁₃, H₁₅ et H₁₇), 10,43 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,62 (s, 1H, NH, H₃), 12,80 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,86 (C_{4'}), 26,13 (C_{3'} et C_{5'}), 30,82 (C_{2'} et C_{6'}), 41,35 (C_{1'}), 114,13 (C₆), 115,24 (C₉), 115,79 (C_{1a}), 120,64 (C_{9a}), 122,79 (C₇), 123,44 (C₁₈, J_F = 271 Hz), 123,45 (C₁₃, J_F = 4 Hz), 129,76 (C₁₅, J_F = 3 Hz), 129,84 (C₁₄, J_F = 32 Hz), 130,88 (C₁₆), 130,97 (C₁₇), 131,08 (C_{4a}), 132,63 (C_{5a}), 136,81 (C₈), 140,21 (C₁₂), 148,75 (C₁), 155,27 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3258, νCharom = 3128, 3086, νChaliph = 2930, 2856, νCO = 1645, νSO₂ = 1325, 1159

[M+H]⁺ : m/z = 491,1

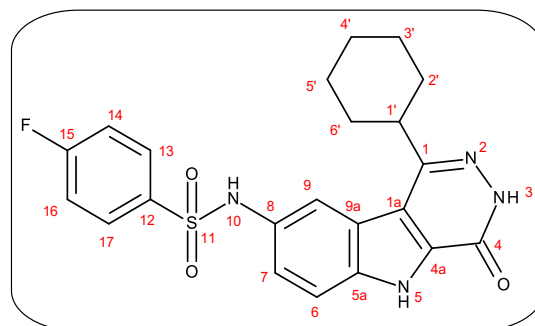
***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzène sulfonamide (97)**

C₂₂H₂₁FN₄O₃S

MM = 422,51 g.mol⁻¹

Tf = 260- 262 °C

Rf = 0,63 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter ensuite 71 mg (0,36 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 30 min. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec le DCM puis le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 54 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,33 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 10 Hz, H_{4'ax}), 1,52 (td, 4H, ³J_{ax-ax} = 10,2 Hz, ²J = 13,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,82-1,96 (m, 5H, H_{4'eq} et H_{2'} ou H_{3'} et H_{6'} ou H_{5'}), 3,01 (t, 1H, ³J = 9,8 Hz, H_{1'}), 7,32 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 7,38 (t, 2H, ³J_F = ³J_H = 9 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,57 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,63 (s, 1H, H₉), 7,74 (dd, 2H, ³J_H = 8,8 Hz, ⁴J_F = 5,2 Hz, H₁₃ et H₁₇), 10,23 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,62 (s, 1H, NH, H₃), 12,79 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,89 (C_{4'}), 26,20 (C_{3'} et C_{5'}), 30,85 (C_{2'} et C_{6'}), 41,36 (C_{1'}), 113,97 (C₆), 115,30 (C₉), 115,83 (C_{1a}), 116,44 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 23 Hz), 120,64 (C_{9a}), 122,85 (C₇), 129,89 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 131,45 (C_{4a}), 132,56 (C_{5a}), 135,54 (C₁₂), 136,70 (C₈), 148,78 (C₁), 155,28 (C₄), 164,4 (C₁₅, J_F = 250 Hz)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3300, νCHarom = 3109, 3065, νCHaliph = 2934, 2852, νCO = 1641, νSO₂ = 1317, 1147

[M+H]⁺ : m/z = 441,1

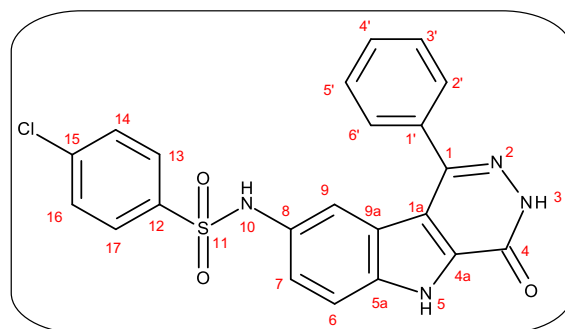
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-chlorobenzène sulfonamide (98)**

C₂₂H₁₅ClN₄O₃S

MM = 450,90 g.mol⁻¹

Tf = 342- 344 °C

Rf = 0,50 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter ensuite 79 mg (0,37 mmol) de chlorure de 4-chlorobenzène sulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau et sécher. Purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 59 %.

¹H RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,18- 7,20 (m, 2H, H₇ et H₉), 7,50-7,60 (m, 10H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}, H₆, H₁₃, H₁₄, H₁₆ et H₁₇), 10,11 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,93 (s, 1H, NH, H₃), 12,95 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,74 (C₆), 114,98 (C₉), 115,37 (C_{1a}), 120,73 (C_{9a}), 122,94 (C₇), 128,35 (C₁₃ et C₁₇), 128,55 (C_{2'}, C_{3'}, C_{5'} et C_{6'}), 129,02 (C_{4'}), 129,17 (C₁₄ et C₁₆), 130,71 (C_{4a}), 132,69 (C_{5a}), 136,09 (C_{1'}), 136,69 (C₈), 137,56 (C₁₅), 137,94 (C₁₂), 144,14 (C₁), 154,94 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3257, νCHarom = 3111, 3065, νCHaliph = 2976, 2883, νCO = 1659, νSO₂ = 1375, 1165

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 451,0 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 453,0

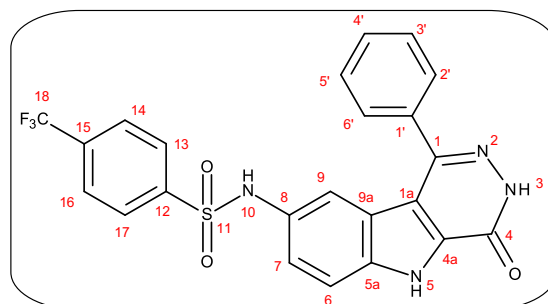
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzènesulfonamide (99)**

C₂₃H₁₅F₃N₄O₃S

MM = 484,45 g.mol⁻¹

Tf = 315- 316 °C

Rf = 0,64 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter 98 mg (0,4 mmol) de chlorure de 4-(trifluorométhyl)benzènesulfonyle et agiter à température ambiante pendant 1 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Sécher sur du sulfate de sodium anhydre et purifier le résidu sec sur une colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle. Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 40 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,20 (s, 1H, H₉), 7,22 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,50- 7,61 (m, 6H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'} et H₆), 7,74 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₃ et H₁₇), 7,90 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 10,27 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,95 (s, 1H, NH, H₃), 12,96 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,82 (C₆), 115,23 (C₉), 115,36 (C_{1a}), 120,73 (C_{9a}), 123,01 (C₇), 123,36 (C₁₈, J_F = 272 Hz), 126,31 (C₁₄ et C₁₆), 127,60 (C₁₃ et C₁₇), 128,33 (C_{3'} et C_{5'}), 128,51 (C_{2'} et C_{6'}), 129,01 (C_{4'}), 130,41 (C_{4a}), 132,32 (C₁₅, J_F = 32 Hz), 132,73 (C_{5a}), 136,04 (C_{1'}), 136,79 (C₈), 143,03 (C₁₂), 144,10 (C₁), 154,93 (C₄)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3250, νCharom = 3134, νCHaliph = 2949, 2895, νCO = 1643, νSO₂ = 1323, 1163

[M+H]⁺ : m/z = 485,1

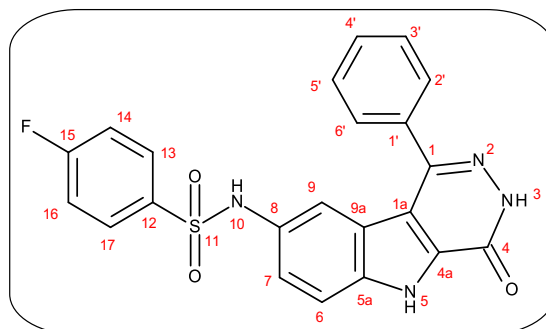
***N*-(1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-fluorobenzène-sulfonamide (100)**

$C_{22}H_{15}FN_4O_3S$

MM = 434,45 g.mol⁻¹

Tf = 285- 286 °C

Rf = 0,42 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,36 mmol) de 8-amino-1-phényl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter ensuite 61 mg de NaHCO₃. Ajouter ensuite 72 mg (0,37 mmol) de chlorure de 4-fluorobenzènesulfonyle et agiter à température ambiante pendant 2 h. Evaporer le solvant et laver le résidu avec de l'eau et sécher. Purifier sur une colonne chromatographique en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (95/5). Evaporer le solvant, triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre beige avec un rendement de 24 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 7,19 (dd, 1H, ³J = 9,8 Hz, ⁴J = 2 Hz, H₇), 7,22 (s, 1H, H₉), 7,32 (t, 2H, ³J_F = 8,8 Hz, ³J_H = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,53 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 7,57-7,60 (m, 7H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}, H₁₃ et H₁₇), 10,07 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,95 (s, 2H, NH, H₃ et H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 113,69 (C₆), 114,78 (C₉), 115,37 (C_{1a}), 116,18 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 23 Hz), 120,73 (C_{9a}), 122,79 (C₇), 128,37 (C_{3'} et C_{5'}), 128,56 (C_{2'} et C_{6'}), 129,01 (C_{4'}), 129,65 (C₁₃ et C₁₇, J_F = 9 Hz), 130,89 (C_{4a}), 132,66 (C_{5a}), 135,48 (C₁₂, J_F = 2 Hz), 136,10 (C_{1'}), 136,61 (C₈), 144,16 (C₁), 154,94 (C₄), 164,14 (C₁₅, J_F = 249 Hz)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3257, νCharom = 3124, 3080, νChaliph = 2966, 2893, νCO = 1657, νSO₂ = 1327, 1145

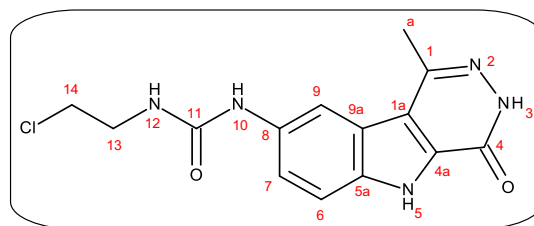
[M+H]⁺ : m/z = 435,1

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole)-*N'*-2-chloroéthylurée (101)**

C₁₄H₁₄ClN₅O₂

MM = 319,75 g.mol⁻¹

Tf = 331- 334 °C



Dissoudre 100 mg (0,46 mmol) de 8-amino-1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 40 µl (0,47 mmol) de 2-chloroéthylisocyanate. Continuer l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 58 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 2,71 (s, 3H, H_a), 3,48 (q, 2H, ³J = 5,7 Hz, H₁₃), 3,71 (t, 2H, ³J = 6 Hz, H₁₄), 6,45 (t, 1H, ³J = 5,4 Hz, H₁₂), 7,47 (dd, 1H, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H₇), 7,54 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 8,31 (s, 1H, H₉), 8,80 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,51 (s, 1H, NH, H₃), 12,59 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,04 (C_a), 41,47 (C₁₃), 44,62 (C₁₄), 109,93 (C₉), 113,19 (C₆), 116,97 (C_{1a}), 119,71 (C_{9a}), 121,66 (C₇), 131,64 (C_{4a}), 134,69 (C_{5a}), 134,80 (C₈), 141,83 (C₁), 155,51 (C₁₁), 155,58 (C₄)

IR (cm⁻¹): νNH = 3302, νCharom = 3115, 3067, νCHaliph = 2962, 2924, νCO = 1664, 1634, δNH = 1524, νCN = 1460, Comb NH/CN = 1228

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 320,1, [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 322,1

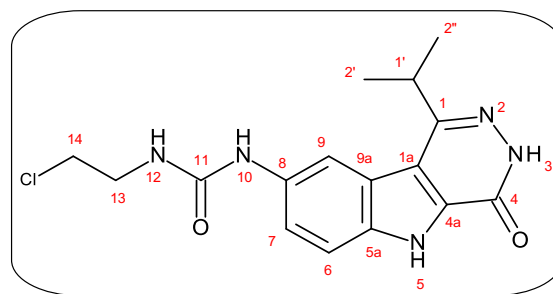
***N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée (102)**

C₁₆H₁₈ClN₅O₂

MM = 347,80 g.mol⁻¹

Tf = 287- 288 °C

Rf = 0,5 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,41 mmol) de 8-amino-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 36 μ l (0,42 mmol) de 2-chloroéthylisocyanate. Continuer l'agitation à température ambiante pendant 2 h. Après ajout de l'eau au milieu réactionnel, il se forme un précipité. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Purifier sur colonne chromatographique en éluant avec l'acétate d'éthyle puis le mélange acétate d'éthyle-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique, filtrer et sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 43 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,40 (d, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{2'} et H_{2''}), 3,49 (q, 2H, ³J = 5,7 Hz, H₁₃), 3,61 (sep, 1H, ³J = 6,8 Hz, H_{1'}), 3,71 (t, 2H, ³J = 6,2 Hz, H₁₄), 6,44 (t, 1H, ³J = 5,6 Hz, H₁₂), 7,46 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,4 Hz, H₇), 7,55 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 8,33 (s, 1H, H₉), 8,82 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃), 12,62 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,93 (C_{2'} et C_{2''}), 31,31 (C_{1'}), 41,45 (C₁₃), 44,65 (C₁₄), 110,25 (C₉), 113,29 (C₆), 115,85 (C_{1a}), 119,57 (C₇), 120,83 (C_{9a}), 132,05 (C_{4a}), 134,78 (C_{5a}), 134,92 (C₈), 149,62 (C₁), 155,45 (C₁₁), 155,59 (C₄)

IR (cm⁻¹): ν NH = 3246, ν Charom = 3117, 3076, ν Chaliph = 2964, 2878, ν CO = 1659, δ NH = 1556, ν CN = 1469, Comb NH/CN = 1248

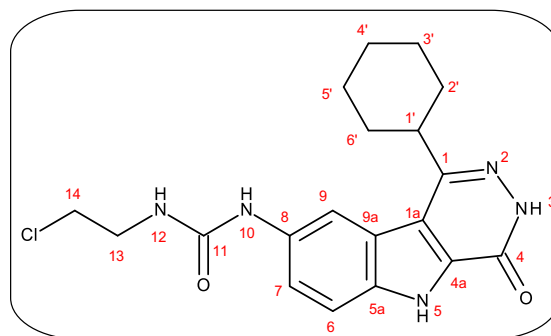
[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 348,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 350,1

***N*-(1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée (103)**

C₁₉H₂₂ClN₅O₂

MM = 387,87 g.mol⁻¹

Tf = 288- 289 °C



Dissoudre 100 mg (0,354 mmol) de 8-amino-1-cyclohexyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole dans 3 ml de DMF à température ambiante et ajouter 35 µl (0,4 mmol) de 2-chloroéthyleisocyanate. Agiter à température ambiante pendant 2 h. Filtrer, laver le précipité avec de l'eau et sécher. Triturer le résidu sec avec l'éther diisopropylique, filtrer puis sécher. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 16 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,34 (t, 1H, ³J_{ax-ax} = 11,8 Hz, H_{4'ax}), 1,60 (td, 4H, ³J_{ax-ax} = 9,2 Hz, ²J = 12,6 Hz, H_{2'} et H_{3'} ou H_{5'} / ou H_{6'} et H_{3'} ou H_{5'}), 1,84 (d, 1H, ²J = 12,8 Hz, H_{4'eq}), 1,91 (d, 2H, ³J = 11,6 Hz, H_{3'} ou H_{5'}), 2,11 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H_{2'} ou H_{6'}), 3,23 (t, 1H, ³J = 8,8 Hz, H_{1'}), 3,50 (q, 2H, ³J = 6 Hz, H₁₃), 3,73 (t, 2H, ³J = 6 Hz, H₁₄), 6,43 (t, 1H, ³J = 5,6 Hz, NH, H₁₂), 7,44 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 7,54 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₆), 8,31 (s, 1H, H₉), 8,81 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,54 (s, 1H, NH, H₃), 12,59 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 25,96 (C_{4'}), 26,22 (C_{3'} et C_{5'}), 31,03 (C_{2'} et C_{6'}), 41,32 (C_{1'}), 41,44 (C₁₃), 44,75 (C₁₄), 109,74 (C₉), 113,32 (C₆), 115,90 (C_{1a}), 119,34 (C₇), 120,85 (C_{9a}), 132,03 (C_{4a}), 134,69 (C_{5a}), 135,01 (C₈), 149,18 (C₁), 155,44 (C₄), 155,52 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3306, νCharom = 3165, νCHaliph = 2920, 2849, νCO = 1659, 1620, Comb NH/CN = 1234

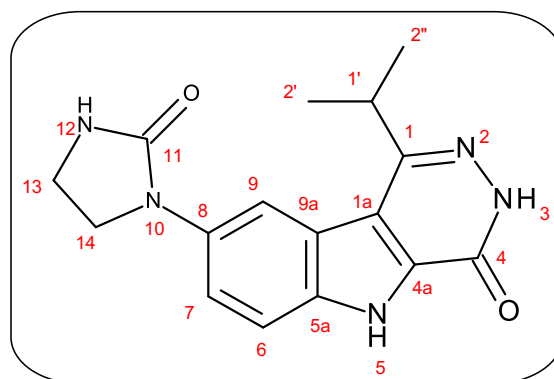
[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 388,1 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 390,1

8-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole (104)

C₁₆H₁₇N₅O₂

MM = 311,34 g.mol⁻¹

Tf > 400 °C



Dans un ballon contenant 4 ml de tétrahydrofurane (THF) fraîchement distillé, introduire 133 mg (0,38 mmol) de *N*-(1-isopropyl-4-oxo-3,4-dihydro)-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-*N'*-2-chloroéthylurée sous atmosphère d'azote. Après quelques minutes d'agitation à 0 °C, ajouter 46 mg de NaH (1,15 mmol) et 1 ml de DMF anhydre. Après 2 h d'agitation sous atmosphère d'azote, ajouter de l'eau et filtrer. Laver le précipité avec de l'eau, de l'acétone et du méthanol successivement. On obtient une poudre beige avec un rendement de 68 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 1,36 (s, 6H, H_{2'} et H_{2''}), 3,42 (s, 2H, H₁₄), 3,60 (s, 1H, H_{1'}), 3,96 (s, 2H, H₁₃), 6,88 (s, 1H, H₁₂), 7,57- 8,07 (m, 3H, H₆, H₇ et H₉), 12,57 (s, 1H, NH, H₃), 12,62 (s, 1H, NH, H₅)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 20,68 (C_{2'} et C_{2''}), 31,09 (C_{1'}), 36,68 (C₁₄), 45,23 (C₁₃), 109,95 (C₉), 112,90 (C₆), 115,75 (C_{1a}), 118,63 (C₇), 120,47 (C_{9a}), 132,04 (C_{4a}), 134,73 (C_{5a}), 135,39 (C₈), 149,43 (C₁), 155,25 (C₄), 159,36 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3307, νCHarom = 3099, 3053, νCHaliph = 2959, 2899, νCO = 1691, 1643, νCN = 1454, 1431, Comb NH/CN = 1269,

[M+H]⁺ : m/z = 312,2

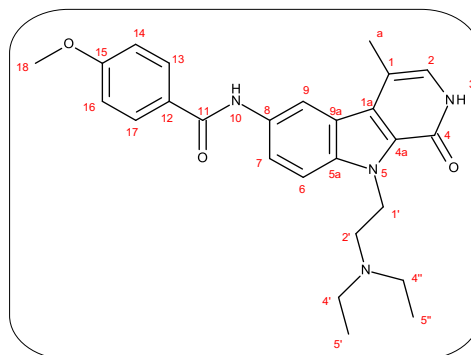
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide (105)**

C₂₅H₂₉N₅O₃

MM = 447,53 g.mol⁻¹

Tf = 243- 244 °C

Rf = 0,29 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 100 mg (0,28 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide dans 5 ml de DMF à 80 °C. Ajouter 60 mg (0,56 mmol) de carbonate de sodium (Na₂CO₃) et laisser dissoudre. Ajouter ensuite 49 mg (0,28 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter à 80 °C pendant 2 h. Evaporer le solvant, reprendre le résidu sec avec de l'eau et extraire trois fois avec du dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Triturer le résidu sec dans de l'éther diéthylique et filtrer. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 35 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 0,78 (t, 6H, ³J_H = 7 Hz, H_{5'} et H_{5''}), 2,46 (q, 4H, ³J_H = 7 Hz, H_{4'} et H_{4''}), 2,71 (s, 3H, CH₃), 2,77 (t, 2H, ³J_H = 6,2 Hz, H_{2'}), 3,86 (s, 3H, H₁₈), 4,83 (t, 2H, ³J = 6,4 Hz, CH₂, H_{1'}), 7,09 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₄ et H₁₆), 7,78 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,96 (dd, 1H, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1,8 Hz, H₇), 8,02 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,63 (s, 1H, H₉), 10,25 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,50 (s, 1H, NH, H₃)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 11,98 (C_{5'} et C_{5''}), 19,97 (C_a), 42,78 (C_{1'}), 46,69 (C_{4'} et C_{4''}), 52,64 (C_{2'}), 55,41 (C₁₈), 111,43 (C₆), 112,82 (C₉), 113,80 (C₁₄ et C₁₆), 116,80 (C_{1a}), 120,30 (C_{9a}), 121,05 (C₇), 126,99 (C₁₂), 129,49 (C₁₃ et C₁₇), 130,12 (C_{4a}), 133,77 (C_{5a}), 136,26 (C₈), 141,51 (C₁), 155,64 (C₄), 161,83 (C₁₅), 164,81 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3308, νCharom = 3099, 3053, νCHaliph = 2958, 2899, 2872, νCO = 1691, 1643, νCN = 1454, 1431, Comb NH/CN = 1269

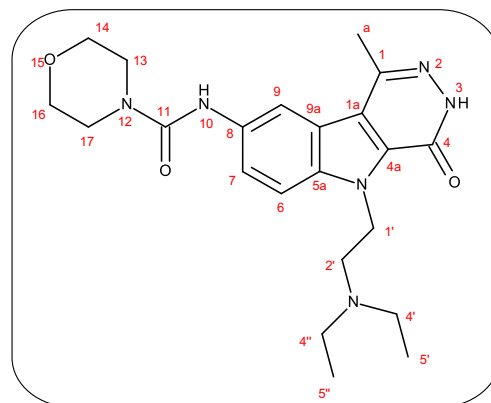
[M+H]⁺ : m/z = 448,2

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-morpholine-4-carboxamide (106)**

C₂₂H₃₀N₆O₃

MM = 426,51 g.mol⁻¹

R_f = 0,07 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 25 mg (0,076 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholine carboxamide dans 2 ml de DMF à 80 °C. Ajouter 17 mg (0,16 mmol) de carbonate de sodium et laisser dissoudre. Ajouter ensuite 14 mg (0,08 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter au reflux pendant 3 h. Ajouter de l'eau au milieu réactionnel et extraire avec de l'acétate d'éthyle. Sécher la phase organique avec du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. On obtient une huile. Purifier sur colonne en éluant avec le mélange dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 56 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,77 (t, 6H, ³J = 6,6 Hz, H_{5'} et H_{5''}), 2,45 (s, 4H, H_{4'} et H_{4''}), 2,66 (s, 1H, CH₃, Ha), 2,73 (s, 2H, H_{2'}), 3,47 (s, 4H, H₁₃ et H₁₇), 3,63 (s, 4H, H₁₄ et H₁₆), 4,78 (s, 2H, H_{1'}), 7,64-7,71 (m, 2H, H₆, H₇), 8,25 (s, 1H, H₉), 8,73 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,44 (s, 1H, NH, H₃)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 11,99 (C_{5'} et C_{5''}), 20,00 (CH₃), 42,71 (C_{1'}), 44,17 (C₁₃ et C₁₇), 46,70 (C_{4'} et C_{4''}), 52,64 (C_{2'}), 66,03 (C₁₄ et C₁₆), 111,07 (C₆), 112,04 (C₉), 116,64 (C_{1a}), 120,36 (C_{9a}), 121,22 (C₇), 129,86 (C_{4a}), 134,84 (C_{5a}), 135,64 (C₈), 141,52 (C₁), 155,55 (C₄), 155,66 (C₁₁)

[M+H]⁺ : m/z = 427,3

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diethylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)**

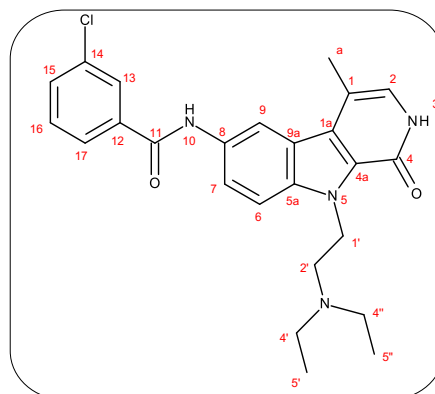
-3-chlorobenzamide (107)

C₂₄H₂₆ClN₅O₂

MM = 451,95 g.mol⁻¹

Tf = 111-113°C

Rf = 0,23 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 97 mg (0,28 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-chlorobenzamide dans 5 ml de DMF à 80 °C. Ajouter 58 mg (0,55 mmol) de Na₂CO₃ et laisser dissoudre, puis 72 mg (0,42 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter toute une nuit. Evaporer le solvant et laver le résidu sec avec de l'eau. Purifier sur colonne en éluant avec dichlorométhane-méthanol (9/1) et évaporer le solvant. On obtient une poudre beige avec un rendement de 53 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 0,83 (t, 6H, ³J = 6,8 Hz, H_{5'} et H_{5''}), 2,53 (s, 4H, H_{4'} et H_{4''}), 2,74 (s, 1H, CH₃, H_a), 2,82 (s, 2H, CH₂, H_{2'}), 4,86 (t, 2H, ³J = 6 Hz, CH₂, H_{1'}), 7,63 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, H₆), 7,71 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₆), 7,99 (dd, 1H, ³J = 7,4 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H₁₇), 8,01 (d, 1H, ³J = 6,4 Hz, H₇), 8,10 (s, 1H, NH, H₁₃), 8,65 (s, 1H, H₉), 10,54 (s, 1H, NH, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm : 11,87 (C_{5'} et C_{5''}), 19,99 (C_a), 42,74 (C_{1'}), 46,72 (C_{4'} et C_{4''}), 52,54 (C_{2'}), 111,52 (C₆), 113,06 (C₉), 116,86 (C_{1a}), 120,29 (C₇), 120,98 (C_{9a}), 126,46 (C₁₇), 127,38 (C₁₃), 130,22 (C₁₆), 130,44 (C_{4a}), 131,36 (C₁₅), 133,25 (C_{5a}), 133,33 (C₁₄), 136,47 (C₈), 136,97 (C₁₂), 141,53 (C₁), 155,65 (C₄), 163,96 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νCHarom = 3167, 3067, νCHaliph = 2968, 2935, 2824, νCO = 1643, δNH = 1526, νCN = 1468, Comb NH/CN = 1257

[M+H]⁺ (³⁵Cl) : m/z = 452,2 , [M+H]⁺ (³⁷Cl) : m/z = 454,2

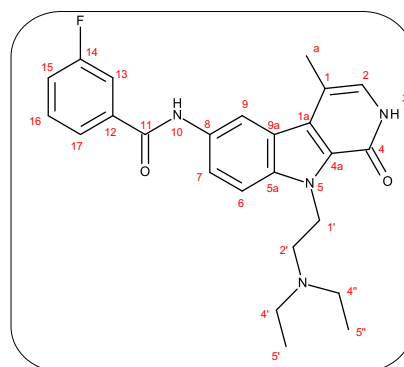
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-fluorobenzamide (108)**

C₂₄H₂₆FN₅O₂

MM = 435,49 g.mol⁻¹

Tf = 230- 232 °C

Rf = 0,22 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 149 mg (0,44 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-3-fluorobenzamide dans 5ml de DMF à 80 °C. Ajouter 94 mg (0,88 mmol) de Na₂CO₃ et agiter pendant 15 min puis 77 mg (0,44 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et poursuivre l'agitation pendant 3 h 30. Evaporer le solvant et ajouter de l'eau au résidu et extraire avec du dichlorométhane. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. Purifier sur une colonne en éluant avec dichlorométhane-méthanol (95/5). Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 33 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 0,81 (s, 6H, H_{5'} et H_{5''}), 2,53 (s, 4H, H_{4'} et H_{4''}), 2,75 (s, 3H, CH₃, Ha), 2,80 (s, 2H, CH₂, H_{2'}), 4,87 (s, 2H, CH₂, H_{1'}), 7,53 (ddd, 1H, ³J_F = 8,3 Hz, ³J_H = 8,3 Hz, ⁴J_H = 2 Hz, H₁₅), 7,66 (dd, 1H, ³J_H = 7,8 Hz, ⁴J_F = 6 Hz, H₁₆), 7,83-7,92 (m, 3H, H₆, H₁₃, H₁₇), 8,00 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, H₇), 8,67 (s, 1H, H₉), 10,52 (s, 1H, H₁₀), 12,57 (s, 1H, NH, H₃)

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 12,18 (C_{5'} et C_{5''}), 20,18 (Ca), 42,95 (C_{1'}), 46,91 (C_{4'} et C_{4''}), 52,81 (C_{2'}), 111,78 (C₆), 113,27 (C₉), 114,63 (C₁₃, J_F = 23 Hz), 117,07 (C_{1a}), 118,63 (C₁₅, J_F = 21 Hz), 120,51 (C_{9a}), 121,22 (C₇), 124,03 (C₁₇, J_F = 2 Hz), 130,43 (C_{4a}), 130,81 (C₁₆, J_F = 8 Hz), 133,52 (C_{5a}), 136,67 (C₈), 137,49 (C₁₂, J_F = 6 Hz), 141,73 (C₁), 155,85 (C₄), 162,15 (C₁₄, J_F = 243 Hz), 164,25 (C₁₁)

IR (cm⁻¹): νNH = 3273, νCharom = 3065, νChaliph = 2978, 2941, 2808, νCO = 1664, 1626, δNH = 1527, νCN = 1462, Comb NH/CN = 1280

[M+H]⁺ : m/z = 436,3

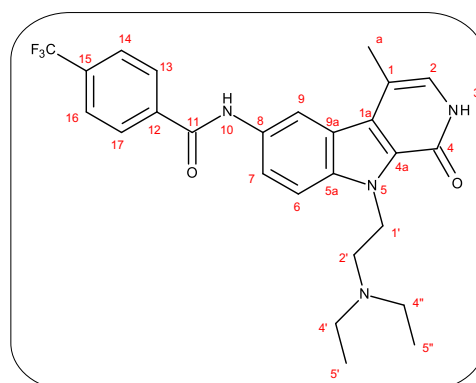
***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide (109)**

C₂₅H₂₆F₃N₅O₂

MM = 485,51 g.mol⁻¹

Tf = 277- 279 °C

Rf = 0,17 (DCM- MeOH 9/1)



Dissoudre 195 mg (0,5 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-(trifluorométhyl)benzamide dans 7 ml de DMF à 80 °C. Ajouter 106 mg (1 mmol) de Na₂CO₃ et agiter pendant 15 min puis 77 mg (0,44 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle. Laisser sous agitation à 80 °C toute la nuit. Evaporer le solvant et ajouter laver le résidu avec de l'eau. Purifier sur une colonne en éluant avec le dichlorométhane-méthanol (9/1). Evaporer le solvant et triturer le résidu sec avec de l'éther diisopropylique. On obtient une poudre blanche avec un rendement de 48 %.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 0,81 (s, 6H, H_{5'} et H_{5''}), 2,54 (s, 4H, H_{4'} et H_{4''}), 2,75 (s, 3H, CH₃), 2,81 (s, 2H, CH₂, H_{2'}), 4,87 (s, 2H, CH₂, H_{1'}), 7,84 (d, 1H, ³J = 9,2 Hz, H₆), 7,98 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, H₁₄ et H₁₆), 8,00 (d, 1H, ³J = 9,6 Hz, H₇), 8,24 (d, 1H, ³J = 8 Hz, H₁₃ et H₁₇), 8,68 (s, 1H, H₉), 10,66 (s, 1H, H₁₀), 12,56 (s, 1H, NH, H₃)

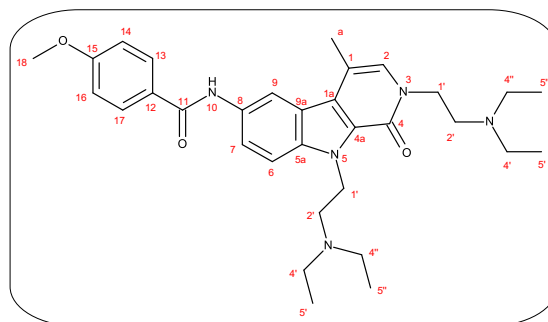
¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ ppm : 12,16 (C_{5'} et C_{5''}), 20,14 (C_a), 43,01 (C_{1'}), 46,90 (C_{4'} et C_{4''}), 52,83 (C_{2'}), 111,79 (C₆), 113,29 (C₉), 117,03 (C_{1a}), 120,49 (C_{9a}), 121,15 (C₇), 124,17 (C₁₈, J_F = 278 Hz), 125,57 (C₁₄ et C₁₆, J_F = 3 Hz), 128,72 (C₁₃ et C₁₇), 130,45 (C_{4a}), 131,49 (C₁₅, J_F = 31 Hz), 133,42 (C_{5a}), 136,71 (C₈), 138,99 (C₁₂), 141,67 (C₁), 155,82 (C₄), 164,44 (C₁₁)

IR (cm⁻¹) : νNH = 3277, νCharom = 3165, 3086, νCHaliph = 2968, 2933, 2873, 2829, νCO = 1659, δNH = 1531, νCN = 1469

[M+H]⁺ : m/z = 486,2

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-2,5-bis-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide (110)**

MM = 546,71 g.mol⁻¹



Dissoudre 100 mg (0,28 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-méthoxybenzamide dans 5 ml de DMF au reflux à 130 °C. Ajouter 154 mg (0,86 mmol) de carbonate de potassium (K₂CO₃) et laisser dissoudre. Ajouter ensuite 97 mg (0,56 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter au reflux pendant 1 h. Filtrer et évaporer le milieu réactionnel. Ajouter de l'eau au résidu et extraire avec le dichlorométhane. Sécher la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et évaporer le solvant. On obtient une huile avec un rendement de 39 %.

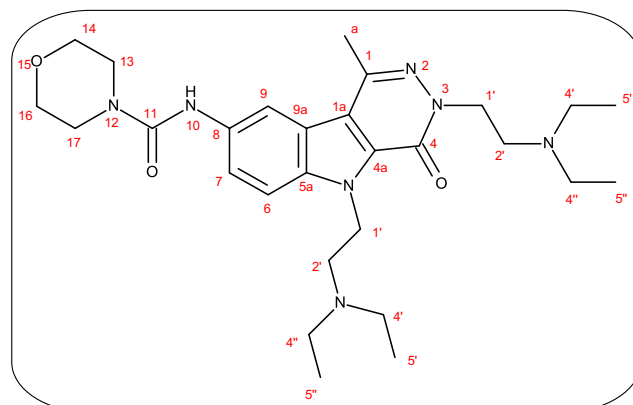
IR ν cm⁻¹: ν NH = 3290, ν CHaliph = 2966, 2935, 2814, ν CO = 1641, δ NH = 1528, 1508, ν CN = 1469, Comb NH/CN = 1254, ν C-O-C = 1173

[M-H]⁺: m/z = 545,5

***N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-2,5-bis-[2-(diéthylamino)éthyl]-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-morpholine-4-carboxamide (111)**

$C_{28}H_{43}N_7O_3$

MM = 525,69 g.mol⁻¹



Dissoudre 90 mg (0,27 mmol) de *N*-(1-méthyl-4-oxo-3,4-dihydro-5*H*-pyridazino[4,5-*b*]indol-8-yl)-4-morpholine carboxamide dans 5 ml de DMF au reflux. Ajouter 147 mg (0,82 mmol) de carbonate de potassium (K₂CO₃) et laisser dissoudre. Ajouter ensuite 46 mg (0,27 mmol) de chlorure du chlorhydrate de 2-diéthylaminoéthyle et agiter au reflux pendant 2 h 30. Filtrer pour éliminer le K₂CO₃ et extraire le filtrat avec de l'acétate d'éthyle après addition d'eau. Sécher la phase organique sur du sulfate de magnésium anhydre et évaporer le solvant. On obtient une huile. Purifier sur colonne en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Laisser cristalliser l'huile. On obtient une poudre beige avec un rendement de 26 %.

DEUXIEME PARTIE : EXTRACTION DE PRODUITS D'ORIGINE VEGETALE

Chapitre I : PARTIE THEORIQUE

I- Généralités

La deuxième partie de ce travail repose sur l'étude de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise : *Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia diffusa* et *Combretum paniculatum*. Le choix de ces plantes a été orienté par les données recueillies auprès des tradithérapeutes ainsi que les données issues de la revue bibliographique.

En effet, différentes plantes sont utilisées en médecine pour le traitement de diverses pathologies. C'est au début des années 1950 que les recherches de produits anticancéreux à partir des plantes ont connu un essor avec la découverte et le développement des alcaloïdes de vinca (vinblastine, vincristine) et l'isolement de la podophyllotoxine. Ces travaux ont permis l'identification de différentes molécules d'origine naturelle (paclitaxel, camptothécine, podophyllotoxine...) pour la chimiothérapie anticancéreuse (189). De nouvelles molécules actives d'origine naturelle ont aussi été identifiées au cours de ces dernières décennies. Malheureusement, pour certaines, le développement en médicament n'a pas été poursuivi en raison de leur faible efficacité et ou des effets toxiques inacceptables observés lors des essais cliniques (maytansine, brucéantine...). En vue d'améliorer les activités et de diminuer les potentiels effets indésirables de certaines molécules d'origine naturelle, de nouveaux dérivés sont obtenus par synthèse et par modification structurale de ces dernières (vinorelbine, vindésine, topotécan, irinotécan, étoposide, téniposide...) (189). Actuellement, plusieurs molécules d'origine naturelle ainsi que leurs dérivés sont encore en phase d'essai préclinique ou clinique (phosphate ou diphosphate de combrestatine A4, diflomotécan...) (189,190).

Les résultats encourageants obtenus avec certaines substances d'origine naturelle en thérapeutique justifient le choix de ces plantes (*Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia diffusa* et *Combretum paniculatum*) utilisées en médecine traditionnelle. Ces différentes plantes ont été récoltées dans la zone d'Abomey-Calavi au mois d'Août. Les drogues végétales ont été extraites et les différents extraits sont séparés par chromatographie de séparation liquide-liquide. Les tests phytochimiques ont permis d'identifier les principaux groupes de métabolites contenus dans ces plantes. Par la suite, les

189. Cragg GM, *et al.* J Ethnopharmacol. 2005; 100 : 72-9.

190. Mishra BB, *et al.* Eur J Med Chem. 2011; 46 (10) : 4769-807.

différentes fractions obtenues suite au fractionnement des extraits totaux ont été testées sur différentes kinases.

II-Combretum paniculatum

A- Description botanique et usage en médecine traditionnelle

C'est une plante de la famille des Combretaceae. Le genre *Combretum* comporte environ 370 espèces (191). Les Combretaceae sont largement répandues en Afrique où elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses pathologies.

Combretum paniculatum est une liane vigoureuse sempervirente ou caducifoliée atteignant 10 à 20 mètres de long ou parfois un arbuste buissonnant atteignant 3 mètres de haut. Les écorces sont grises ou grisâtre-noires. Les feuilles sont opposées, simples et entières. Les inflorescences sont des panicules terminaux ou axillaires. Les fruits sont des nucules dont le contour est presque circulaire ou oblong- elliptique (192).

Les feuilles et les écorces des différentes espèces du genre *Combretum* sont les plus fréquemment utilisées. Les fruits quant à eux ne sont pas utilisés en raison de leur toxicité pour l'homme ainsi que pour les animaux (193). Les feuilles de *Combretum paniculatum* sont utilisées en médecine traditionnelle seules ou en mixture avec celles d'autres plantes (*Anogeissus leiocarpus*) comme anti-diarrhéique et anticancéreux (194–196).

Le screening phytochimique a montré que les feuilles renferment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des composés phénoliques, des saponosides, des stéroïdes et des tanins (196,197).

B- Propriétés pharmacologiques

Les extraits aqueux, acétonique et éthylacétatique des feuilles de *Combretum paniculatum* ont une activité anti-inflammatoire, antihelminthique et anti-schistosomiale (198,199).

-
191. Lawrence GHM. Macmillan. New York : 823 p.
192. Gurib-Fakim A, *et al.* 2013; Fondation PROTA : 418 p.
193. Rodgers CB, *et al.* 1996, University of Zimbabwe publications : 121-41
194. Desta B. J Ethnopharmacol. 1993; 39 (2) : 129-39.
195. Fyhrquist P, *et al.* J Ethnopharmacol. 2002 ; 79 (2) : 169-77.
196. Kabran GRM, *et al.* Eur J Sci Res. 2012 ; 68 (2) : 182-90.
197. Osuagwu GGE. *et al.* IOSR J Pharm Biol Sci. 2014; 9 (1) : 58-65.
198. McGaw LJ, *et al.* J Ethnopharmacol. 2001; 75 (1) : 45-50.
199. De Morais Lima GR, *et al.* Molecules. 2012; 17 (12) : 9142-206.

L'extrait acétonique de feuilles possède aussi une activité anti-rétrovirale sur les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) 1 et 2 (199,200).

L'extrait de feuilles a une action antimicrobienne, anti-oxydante, ainsi qu'une activité cytotoxique sur les lignées cancéreuses des cellules HeLa (adénocarcinome cervical), des cellules MCF-7 (cancer du sein) et HT29 (cancer du côlon) (194,197,201–203).

Les extraits méthanoliques et aqueux des écorces possèdent une activité antibactérienne (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*) (204).

III-Amaranthus spinosus

A- Description botanique et usage en médecine traditionnelle

Amaranthus spinosus (encore appelée amarante épineuse) est une plante dicotylédone de la famille des Amaranthaceae retrouvée dans les régions tropicales et subtropicales. C'est une plante herbacée épineuse annuelle pouvant atteindre 1 mètre. Les feuilles sont alternes, simples et dépourvues de stipules. Les inflorescences sont terminales et axillaires. Les fruits sont ovoïdes. Les graines sont brillantes, noires ou grisâtres de 1 mm de diamètre environ (205).

La plante a des propriétés médicinales et est utilisée pour le traitement de diverses pathologies (bronchite, troubles digestifs, nausée, infections génitales et urinaires, lèpre, ulcère, gonorrhée, eczéma, infections cutanées, arthrite, rhumatismes, morsures de serpent, troubles psychiatriques, douleurs dentaires, convulsion, hémorroïde, douleur auriculaire). Elle est aussi utilisée comme fébrifuge, antipyrétique, laxatif et diurétique (205,206).

Le screening phytochimique a montré que la plante renferme des alcaloïdes, des tanins catéchiques, des stéroïdes, des terpénoïdes, des saponosides, des flavonoïdes, des

-
200. Asres K, *et al.* *Phytother Res.* 2001; 15 (1) : 62-69.
201. Asres K, *et al.* *Phytother Res.* 2001; 15 (4) : 323-6.
202. Sowemimo A, *et al.* *Afr. J. Trad. CAM.* 2009; 6 (4): 526-28
203. Sowemimo A, *et al.* *J Med Plants Res.* 2011; 5 (11) : 2442-4.
204. Steenkamp V, *et al.* *Fitoterapia.* 2007; 78 : 561-4.
205. Kumar RP., *et al.* *Int J Res Pharm Chem.* 2014; 4 (3) : 643-53.
206. Agra M de F, *et al.* *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17 (1) : 114-40.

polyuronides, des lipides, des caroténoïdes, des bétalaïnes, des huiles essentielles, des amines et acides aminés, des acides organiques et des acides phénoliques. Diverses molécules ont été isolées de la plante (spinoside, β -D- ribofuranosyl adénine, β -sistéroline, β -xanthine, gomphréline, bétanine, trigonelline, amaranthoside, amaricine, β -carotène, hentriacontane, octacosanoïde, acide oléanique, amaranthine, hydroxycinnamates, isoamaranthine, quercétine ...) (205,207).

B-Propriétés pharmacologiques

L'extrait aqueux de feuilles possède une activité immunostimulante par stimulation de la prolifération des lymphocytes B et T (208). Les extraits hydro-alcooliques des feuilles et de la plante entière possèdent une activité hépatoprotectrice (209,210). L'extrait méthanolique de feuilles a une action anti-oxydante, une activité inhibitrice de l'alpha-amylase et une activité antipyrétique (211,212).

Les extraits chloroformique, hexanique et éthylacétatique des feuilles ont une activité antibactérienne, cytotoxique et anti-oxydante (205,213). L'extrait éthanolique des feuilles a une activité anti-tumorale (214).

L'extrait méthanolique de la plante entière a un effet anti-dépresseur chez les rats *Wistar* (215). L'extrait hydro-alcoolique de la plante entière à une action anti-nociceptive et anti-inflammatoire, anti-diarrhéique, spasmolytique et bronchodilatatrice (216–218). L'extrait aqueux de la plante entière a aussi une action diurétique, un effet anti-helminthique (219,220).

-
207. Hilou A, *et al.* J Ethnopharmacol. 2006; 103 (2) : 236-40.
208. Lin B-F, *et al.* Int Immunopharmacol. 2005; 5 (4) : 711-22.
209. Zeashan H, *et al.* Food Chem Toxicol. 2008; 46 (11) : 3417-21.
210. Zeashan H, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 125 (2) : 364-6.
211. Kumar BSA, *et al.* Asian Pac J Trop Med. 2010; 3 (9) : 702-6.
212. Ashok Kumar BS, *et al.* Saudi J Biol Sci. 2011; 18 (1) : 1-5.
213. Ishrat, *et al.* Int J PharmTech Res. 2011; 3 (3) : 1675-80.
214. Joshua, *et al.* Pharm Lett. 2010; 2 (2) : 10-5.
215. Kumar BSA, *et al.* Basic Clin Neurosci. 2014; 5 (1) : 11.
216. Zeashan H, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 122 (3) : 492-6.
217. Hussain Z, *et al.* Pharm Biol. 2009; 47 (10) : 932-9.
218. Chaudhary MA, *et al.* BMC Complement Altern Med. 2012 ;12 : 166.
219. Amuthan A, *et al.* J Ethnopharmacol. 2012; 140 (2) : 424-7.
220. Baral M, *et al.* Int J Appl Biol Pharm Technol. 2011; 2 (1) : 41-7.

L'extrait méthanolique des écorces a montré une action anti-diabétique, anti-hyperlipidémiant et spermatogène chez les rats diabétiques (221). L'extrait aqueux d'écorce possède une action anti-plasmodiale (207).

IV-Boerhaavia diffusa

A-Description botanique et usage en médecine traditionnelle

Plante de la famille des Nyctagynaceae, *Boerhaavia diffusa* est une plante à tiges annuelles glabres, ascendantes. Les feuilles sont ovales, aiguës au sommet, arrondies à la base avec parfois un bord ondulé et 3 à 4 paires de nervures latérales déprimées. Les fleurs sont groupées en panicules terminaux rouges ou violets avec des étamines à filets longs de 1 à 1,5 mm. Les fruits sont ovoïdes glutineux. Le nom « Punarnava » en indien provient de la faculté de la plante à rester sèche et au repos pendant l'été et de se régénérer à partir de la vieille racine pendant la saison des pluies (222).

Différentes parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle. Les feuilles sont consommées comme des légumes au Nigéria, au Bénin et en Inde. La plante est utilisée pour le traitement de différentes affections : cancer, ictère, dyspepsie, inflammation, diabète, leucorrhées, douleurs abdominales, asthme, gonococcie, rétention urinaire, affections hépatiques, rhumatisme, insuffisance rénale, anémie, ascite, œdème, abcès, convulsions, épilepsie, toux, constipation, fièvre, dyspepsie, cataracte, choléra, hémorragies du post-partum, hémorragies abdominales, parasitoses intestinales. La plante est aussi utilisée en cas de morsure de serpent et comme laxatif (223–225).

Les études phytochimiques ont révélé la présence d'alcaloïdes, des composés phénoliques (acides phénoliques, glycosides, flavonoïdes et roténoïdes), des terpènes et des saponosides (226–228).

Les principales molécules isolées de la plante sont répertoriées dans le tableau 25.

-
221. Sangameswaran B, *et al.* J Nat Med. 2007; 62 (1) : 79-82.
222. Pousset Jean-Louis. Edisud; 2004 ; 287 p.
223. Olaleye MT, *et al.* Food Chem Toxicol. 2010; 48 : 2200-5.
224. Mahesh AR, *et al.* Res J Pharm Sci. 2012; 1 (1) : 28-36.
225. Nayak P, *et al.* J Phytopharm. 2016; 5 (2) : 83-92.
226. Sreeja S, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 126 (2) : 221-5.
227. Pereira DM, *et al.* Food Chem Toxicol. 2009; 47 (8) : 2142-9.
228. Patil KS, *et al.* J Ethnopharmacol. 2016; 182 : 200-20.

Tableau 25 : Principales molécules isolées de la plante

Partie de la plantes	Molécules identifiées
Racines	<p>-Boerhavone: 5,7-dihydroxy-6-8-diméthoxy flavones (229,230)</p> <p>-Boeravinone A, boeravinone B, boeravinone C, boeravinone D, boeravinone E et boeravinone F (231–233).</p> <p>-Boerhavisterol : 9,10-seco-stigmast-5,8 (9)-dièn-3β-ol, boerhadiffusène : 1-(2',6',6'-triméthylcyclohex-1'-ényl)-11-(3''-3''-diméthylcyclohexyl)-4,8-diméthyl-undéc-1-ène, diffusarotenoïde: 4,9-dihydroxy-10-méthyl-6a-déhydrorotenoïd-6-pentanoate, benzoate de boerhavianastényle: 27-O-(4'-benzoyl-β-D-glucopyranosyl) 9-β-lanost-5-èn-3-one (234)</p> <p>-Punarnavoside: 2-glucopyrano-4-hydroxy-5-(p-hydroxyphényl) propionyl-diphénylméthane (235)</p> <p>-Hentriacontane, β-sitostérol, acide ursolique (236,237)</p> <p>3-O-β-D-galactopyranoside (1\rightarrow2)-β-D-glucopyranoside eupalitine, 3,3',5-trihydroxy-7-méthoxyflavone, 4',7-dihydroxy-3'-méthylflavone, 3,4-diméthoxyphényl-1-O-β-D-apiofuranosyl-(1''\rightarrow3')-O-β-D-glucopyranoside (235,238)</p> <p>Borhavine : 3,10-dihydro-11-hydroxy-1-méthoxy-4,6-diméthyl-10-oxo-1H-furo [3,4-b] xanthènes-3-carboxylate de méthyle (229)</p> <p>Punarnavine-I et punarnavine-II (239).</p> <p>-Quercétine, kaempférol, eupalitine, acide cafféoyltartarique, quercétin 3-O-rhamnosyl (1-6) galactoside (quercitin 3-O-robinobioside), 3-O-galactosyl (1-2) glucoside eupalitine, 3-O-(2''-rhamnosyl)-robinobioside kaempférol, 3-O-robinobioside kaempférol, 3-O-galactoside eupalitine (227,240)</p>

229. Ahmed B, *et al.* Phytochemistry. 1992; 31 (12) : 4382-4.
 230. Gupta DR, *et al.* Indian J Chem Sect B Org Incl Med. 1984; 23 (7) : 682-4.
 231. Kadota S, *et al.* Chem Pharm Bull. 1989; 37 (12) : 3214-20.
 232. Lami N, *et al.* Chem Pharm Bull. 1991; 39 (6) : 1551-5.
 233. Borrelli F, *et al.* J Nat Prod. 2006; 69 (6) : 903-6.
 234. Gupta J, *et al.* Indian J Chem. 1998; 9 (37) : 912-7.
 235. Agrawal B., *et al.* Asian Journal Appl Sci. 2011 ;4 (7) : 663-84.
 236. Misra AN, *et al.* Phytochemistry. 1971; 10 (12) : 3318-9.
 237. Seth RKRK, *et al.* Indian Drugs. 1986 ; 23 : 583-584.
 238. Maurya R, *et al.* Nat Prod Res. 2007; 21 (2) : 126-34.
 239. Nandi RP, *et al.* Indian J Exp Biol. 1974; 12 (6) : 509-11.
 240. Ferreres F, *et al.* Phytochem Anal. 2005; 16 (6) : 451-8.

Ecorces	-Punarnavine-I et punarnavine-II (239).
Feuilles	-Punarnavine-I et punarnavine-II (239). 3-acétoxy- α -amyrine, sophorophénolone, N-trans-féruloyl-3-méthyl-dopamine, (+)-zédolactone A, ciwujiatone, 1- β -D-glucopyranosyloxy-3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzène, 1- β -D-glucopyranosyloxy-3,4-diméthoxybenzène, 1- β -D-glucopyranosyloxy-1-phenylméthane, 1- β -D-glucopyranosyloxy-2-phenyl-léthane, 1- β -D-glucopyranosyloxy-2-méthoxy-4-éthanoylbenzène, boeravinone P, allantoïne, boeravinone Q (3',5-dihydroxy-2-hydroxy-méthyl-7-méthoxy-6-méthylisoflavone 2'-O- β -D-glucopyranoside), (aS)- et (aR)-3',5-dihydroxy-2-hydroxyméthyl-7-méthoxy-6-méthylisoflavone 2'-O- β -D-glucopyranoside, 4,10-dihydroxy-8-méthoxyguai-7(11)-èn-8,12-olide, acide boerhaavique (241)

B-Propriétés pharmacologiques

L'extrait méthanolique de la plante entière a une action antiproliférative et anti-oestrogénique sur la lignée mammaire cancéreuse MCF-7 (226). L'extrait éthanolique de la plante quant à elle a une action anti-lymphoproliférative (242). Les alcaloïdes totaux des racines ainsi que l'extrait méthanolique possèdent une action immunomodulatrice (243,244). L'extrait aqueux de racines possède une action diurétique (245).

L'extrait aqueux de feuilles de *Boerhaavia diffusa* a une action hypoglycémiant et antihyperglycémiant chez les rats diabétiques (246). L'extrait éthanolique ainsi que l'extrait aqueux possède une activité anti-oxydante et hépatoprotectrice (223,247). Le suc de feuilles fraîches possède une action anti-nociceptive (248).

241. Do TML, *et al.* Phytochem Lett. 2013; 6 (4) : 544-51.

242. Mehrotra S, *et al.* Exp Mol Pathol. 2002; 72 (3) : 236-42.

243. Mungantiwar AA, *et al.* J Ethnopharmacol. 1999; 65 (2) : 125-31.

244. Mehrotra S, *et al.* Int Immunopharmacol. 2002; 2 (7) : 987-96.

245. Madhuri S, *et al.* Int J Pharma Bio Sci. 2013; 4 (4) : 843-8.

246. Pari L, *et al.* J Ethnopharmacol. 2004; 91 (1) : 109-13.

247. Rawat AKS, *et al.* J Ethnopharmacol. 1997; 56 (1) : 61-6.

248. Hiruma-Lima CA, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000; 71 : 267-74.

L'extrait hydro-méthanolique de la plante a montré une action anti-métastatique sur les cellules B16F-10 du mélanome (249). Cette propriété est due à la punarnavine, un alcaloïde isolé de la plante (250). En effet, la punarnavine (ou lunamarine) inhibe l'angiogénèse *in vivo* et *in vitro* sur les cellules endothéliales humaines (251).

L'extrait méthanolique de racines possède une action spasmolytique et une action anticonvulsivante (224,233).

Les purvanosides extraites de la plante possèdent une activité antifibrinolytique (237).

V-Boerhaavia erecta

A-Description botanique et usage en médecine traditionnelle

Boerhaavia erecta est une plante de la famille des Nyctagynaceae. Il s'agit d'une plante annuelle à vivace courte atteignant parfois 1 mètre de haut. Les tiges sont ramifiées et partent de la base de la plante. Les feuilles sont simples et opposées. Les racines sont épaisses et parfois pivotantes. Les inflorescences sont des ombelles axillaires rassemblées en une panicule diffuse. Les fleurs, blanches à rose claires ou tachetées de rouge, sont bisexuées et tombent rapidement. Les fruits sont des akènes et les graines sont obovoïdes marron claires. La plante préfère les endroits ensoleillés et un climat saisonnier avec une saison sèche marquée.

En médecine traditionnelle, les racines sont utilisées pour leurs propriétés diurétiques, antihelminthique, cardiotonique, expectorante, antipyrétique, laxative, émétique, purgative, hépatoprotectrice, anti-inflammatoire, aphrodisiaque, anti-asthmatique, cicatrisante et anti-infectieuse. La plante entière est utilisée comme vermifuge et anticonvulsivant chez les enfants. Le décocté de la plante entière est utilisé dans le traitement de l'infertilité, des troubles gastro-intestinaux et hépatiques. Broyée et mélangée avec de l'huile, la plante entière est utilisée en application locale pour le traitement des rhumatismes et de la gale. Les cendres de la plante entière sont appliquées sur la tête et la peau pour le traitement des infections fongiques. Les feuilles quant à elles sont utilisées

249. Leyon PV, *et al.* Life Sci. 2005; 76 (12) : 1339-49.

250. Manu KA, *et al.* Immunobiology. 2009; 214 (4) : 245-55.

251. Saraswati S, *et al.* Chem Biol Interact. 2013; 206 (2) : 204-13.

pour le traitement de la diarrhée. Le jus exprimé des feuilles est utilisé en instillation sur l'œil pour le traitement des conjonctivites (252).

Le screening phytochimique a montré que la plante contient des tanins, des alcaloïdes, des saponosides, de la cellulose, des composés phénoliques et des flavonoïdes. Les feuilles sont riches en flavonoïdes et en composés phénoliques (253–256).

B-Propriétés pharmacologiques

Les feuilles de *B. erecta* possèdent une activité anti-bactérienne, anti-malariale, anti-oxydante et une action anti-mutagène (207,253–255,257,258).

VI-Momordica charantia

A-Description botanique et usage en médecine traditionnelle

Momordica charantia est une plante rampante annuelle de la famille des Cucurbitaceae pouvant atteindre 5 m de long. Le fruit est oblong et ressemble à un petit concombre. Le fruit immature est vert et devient orange quand il est mûr. La plante résiste bien aux variations climatiques et est retrouvée dans les régions tropicales de l'Asie, l'Amazonie, l'Afrique et les Caraïbes (259,260).

Différentes parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète, des troubles gastro-intestinaux, des infections virales, de la fièvre, du paludisme, des rhumatismes, des affections cutanées. La plante est aussi utilisée pour le traitement de certaines affections gynécologiques (206,261,262).

Le screening phytochimique a montré que la plante contient des glucosides, des tanins, des flavonoïdes, des mucilages, des dérivés anthracéniques, des saponosides, des alcaloïdes, des acides gras, des triterpènes, des glycosides, des protéines, des acides aminés,

-
252. Schmelzer GH. *et al.* Fondation PROTA. 2008 ; 869 p.
253. Rajeswari P., *et al.* J Pharm Sci Res. 2010; 2 (11) : 728-33.
254. Petrus, AJ, *et al.* J Pharm Sci Res. 2012; 4 (7) : 1856-61.
255. Govindan P, *et al.* J Acute Med. 2013; 3 (3) : 103-9.
256. Thite SV. *Et al.* Int J Pharm Chem Biol Sci. 2013; 3 (1) : 87-90.
257. Perumal SR, *et al.* J Ethnopharmacol. 1999; 66 (2) : 235-40.
258. Ramos A, *et al.* J Ethnopharmacol. 2003; 87 : 241-6.
259. Grover JK, *et al.* J Ethnopharmacol. 2004; 93 (1) : 123-32.
260. Chabi China TF, J Drug Deliv Ther. 2014 ; 4 (5) : 87-105.
261. Beloin N, *et al.* J Ethnopharmacol. 2005; 96 : 49-55.
262. Grover JK, *et al.* J Ethnopharmacol. 2002; 81 (1) : 81-100.

des stéroïdes, des huiles essentielles, des vitamines et des minéraux (fer, cuivre, magnésium, manganèse, zinc...) (263–269).

B-Propriétés pharmacologiques

Plusieurs études ont permis de confirmer les propriétés antidiabétique, antibactérienne, antivirale, anti-cancéreuse, anti-ulcérogène, androgénique, anti-spermatogénique, anti-helminthique, analgésique, anti-inflammatoire et anti-oxydante de *Momordica charantia* (262,268,270–293).

-
263. Assubaie NF, *et al.* J Biol Sci. 2004; 4 (5) : 628-30.
 264. Raman A, *et al.* Phytomedicine. 1996; 2 (4) : 349-62.
 265. Braca A, *et al.* Fitoterapia. 2008; 79 (2) : 123-5.
 266. Husain J, *et al.* FEBS Lett. 1994; 342 (2) : 154-8.
 267. Yuan X, *et al.* Food Chem. 2008; 111 (2) : 415-20.
 268. Ahmad Z, *et al.* Molecules. 2012; 17 (8) : 9631-40.
 269. Johnson RC, *et al.* J Appl Biosci. 2016; 106 : 10249-57
 270. Ahmed I, *et al.* Diabetes Res Clin Pract. 1998 ; 40 (3) : 145-51.
 271. Ahmed I, *et al.* Diabetes Res Clin Pract. 2001 ; 51 (3) : 155-61.
 272. Sitasawad SL, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000 ; 73 : 71-9.
 273. Coutinho HDM, *et al.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010; 33 (6) : 467-71.
 274. Welihinda J, *et al.* J Ethnopharmacol. 1986; 17 (3) : 277-82.
 275. Shih C-C, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 123 (1) : 82-90.
 276. Jayasooriya AP, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000; 72 : 331-6.
 277. Kumar R, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 126 (3) : 533-7.
 278. Fuangchan A, *et al.* J Ethnopharmacol. 2011; 134 (2) : 422-8.
 279. Rathi SS, *et al.* Phytother Res. 2002; 16 (8) : 774-7.
 280. Omoregbe RE, *et al.* Afr J Med Med Sci. 1996 ; 25 (4) : 373-5.
 281. Au T, *et al.* FEBS Lett. 2000; 471 : 169-72.
 282. Jiratchariyakul W, *et al.* Planta Med. 2001; 67 (4) : 350-3.
 283. Sun Y, *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2001; 287 (4) : 983-94.
 284. Basch E, *et al.* Am J Health Syst Pharm. 2003; 60 (4) : 356-9.
 285. Takemoto DJ, . Biochem Biophys Res Commun. 1980; 94 (1) : 332-9.
 286. Alam S, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 123 (3) : 464-9.
 287. Gürbüz İ, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000; 71 : 77-82.
 288. Naseem MZ, *et al.* J Ethnopharmacol. 1998; 61 (1) : 9-16.
 289. Muñoz V, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000; 69 (2) : 139-55.
 290. Biswas AR, *et al.* J Ethnopharmacol. 1991; 31 (1) : 115-8.
 291. Choi J, *et al.* Arch Pharm Res. 2002; 25 (3) : 336-42.
 292. Lii C-K, *et al.* J Ethnopharmacol. 2009; 122 (2) : 227-33.
 293. Scartezzini P, *et al.* J Ethnopharmacol. 2000 ; 71 : 23-43.

Chapitre II : TRAVAUX SUR LES PLANTES : EXTRACTION ET EVALUATION D'ACTIVITE SUR LES KINASES

I-Récolte des matières végétales, extraction et fractionnement

A-Récolte des plantes

Les différentes plantes utilisées sont récoltées au niveau du jardin des plantes de l'université d'Abomey-Calavi et dans les environs, au mois d'Août 2013. Les plantes ont été identifiées à l'Herbier National du Bénin et authentifiées.

Les matières végétales sont séchées à température de laboratoire dans un endroit aéré et ventilé pendant 3 à 4 semaines. Les drogues végétales sèches sont ensuite pulvérisées et conservées dans des bocaux ambrés adaptés à l'abri de l'humidité et de l'air.

B-Extraction des différentes drogues végétales

La décoction des poudres est réalisée avec de l'éthanol à 65 °C. Le décocté est filtré deux fois et le solvant évaporé sous pression réduite à 40 °C. Les résidus obtenus sont ensuite séchés à température de laboratoire et conservés au réfrigérateur.

C-Fractionnement des extraits totaux

L'extrait total sec est fractionné selon le schéma 19. Les différentes fractions sont séchées et conservées au réfrigérateur.

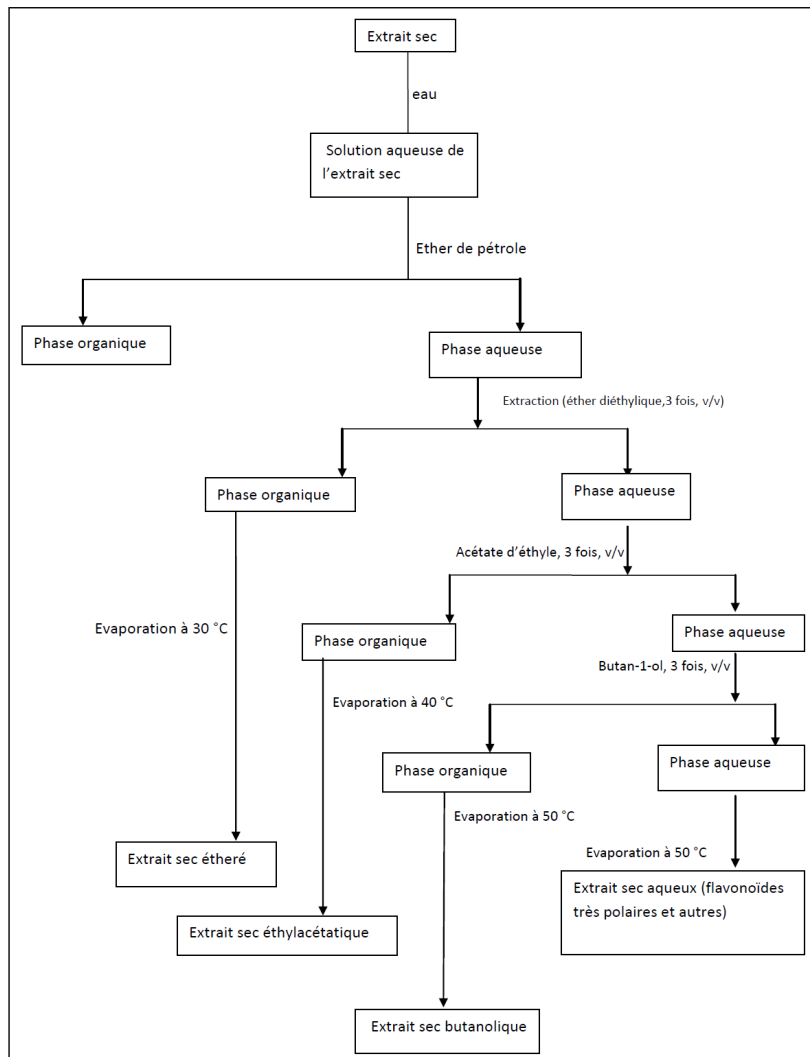


Schéma 19 : Schéma de fractionnement des extraits totaux

II- Mise en œuvre des tests phytochimiques sur les extraits éthanoliques des plantes

Le screening phytochimique est basé sur les réactions (coloration et précipitation) différentielles des principaux groupes de composés chimiques contenus dans les plantes selon la méthode de Houghton et Raman (294).

A-Protocoles

1- Recherche des alcaloïdes

Un extrait sulfurique est préparé à partir de 10 g de la drogue végétale et de 50 ml d'acide sulfurique concentré dilué à 10 % dans un erlenmeyer de 250 ml. Le mélange est

294. Houghton PJ, *et al.* Springer US. 1998 ; 205 p.

macéré pendant 24 h à la température ambiante après agitation. Le macéré est ensuite filtré et le volume du filtrat est ramené à 50 ml. 1 ml du filtrat est introduit dans deux tubes à essai pour la réalisation des tests de mise en évidence de la présence d'alcaloïde. Cette recherche est faite grâce à deux tests :

- Révélation par le réactif de Mayer

Dans le tube n°1, introduire 5 gouttes du réactif de Mayer (10 g de KI et 2,70 g de HgCl_2 dissous dans 20 ml d'eau). En présence d'alcaloïdes, il se forme un précipité blanc ou blanc jaune.

- Révélation par le réactif de Bouchardat

Dans le tube n°2, mettre 5 gouttes du réactif de Bouchardat (solution de 2 g d'iode bisublimé ou I_2 et 2 g de KI dans 100 ml d'eau distillée). En présence d'alcaloïdes, il se forme un précipité brun-noir, brun terne ou jaune-brun.

2- Recherche des composés réducteurs

Pour la recherche des composés réducteurs, une décoction à 10 % de la drogue végétale dans de l'eau distillée est réalisée. A 5 ml du décocté, ajouter 1 ml de la liqueur de Fehling (sulfate de cuivre et tartatre double de Na et K) et chauffer dans un bain-marie. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

3- Recherche des tanins

Dans 100 ml d'eau bouillante, introduire 5 g de poudre et laisser le mélange sous agitation continue pendant 15 minutes et filtrer. A 2 ml du filtrat, quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 % sont ajoutées. L'observation d'une coloration bleu foncée, verte ou noire indique la présence de tanins.

- Recherche des tanins catéchiques

A 30 ml du filtrat précédemment obtenu, 15 ml du réactif de Stiasny sont ajoutés et le mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité rose indique la présence des tanins catéchiques.

- **Recherche des tanins galliques**

Après récupération du précédent filtrat, celui-ci est saturé avec de l'acétate d'éthyle et additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 %. Une teinte bleue ou noire indique la présence de tanins galliques.

4- Recherche des flavonoïdes

Dans 100 ml d'eau bouillante, introduire 5 g de poudre et laisser le mélange sous agitation continue pendant 15 minutes et filtrer. A 5 ml du filtrat ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique et une pincée de poudre de magnésium : c'est la réaction de la cyanidine, dite de Shinoda. L'apparition d'une coloration orangée, rouge ou violette indique la présence de flavonoïdes.

5- Recherche des anthocyanes

Pour la recherche des anthocyanes, 5 g de poudre sont introduits dans 100 ml d'eau bouillante. Le mélange est laissé 15 minutes sous agitation continue puis filtré. A 1 ml du filtrat, quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 5 % sont ajoutées. Ce mélange est ensuite alcalinisé par addition de quelques gouttes d'ammoniaque à 50 %. Une coloration rouge qui s'accroît et vire au bleu-violacé ou au vert indique la présence d'anthocyane.

6- Recherche de leuco-anthocyanes

Pour la recherche des leuco-anthocyanes, 5 g de poudre sont aussi introduits dans 100 ml d'eau bouillante. A 5 ml du filtrat sont ajoutés 5 ml d'alcool chlorhydrique. Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes au bain-marie à 90 °C. L'observation d'une coloration rouge cerise ou violacée indique la présence de leuco-anthocyane.

7- Recherche de mucilages

Les mucilages sont des polyholosides hétérogènes dont la propriété est de gonfler au contact de l'eau avec laquelle ils donnent des masses gélatineuses ou des solutions colloïdales. Ils sont formés d'oses et d'acides uroniques.

Pour la recherche des mucilages, introduire 1 ml de décocté à 10 % dans un tube à essai auquel est ajouté 5 ml d'alcool absolu. L'apparition d'un précipité floconneux après une dizaine de minutes indique la présence de mucilage.

8- Recherche des coumarines

Pour la recherche des coumarines, 1 g de poudre est macéré pendant 24 h dans 20 ml d'éther. Au bout de 24 h, le macéré est filtré et le volume du filtrat ajusté à 20 ml avec de l'éther. 5 ml du filtrat sont prélevés et évaporés dans une capsule à l'air libre. Au résidu obtenu, il est ajouté 2 ml d'eau chaude et la solution est répartie dans deux tubes à essai. Dans l'un des tubes est ajouté 0,5 ml d'ammoniaque à 25 % est ajouté. Le second tube représente le témoin. Le contenu des deux tubes est observé sous une lumière UV à 356 nm. Une fluorescence intense dans le tube test indique la présence de coumarines.

9- Recherche des anthraquinones

• Vérification de la présence d'anthraquinones

A 1 g de la drogue végétale en poudre est ajouté 10 ml de chloroforme. Le mélange est chauffé prudemment pendant 3 minutes au bain-marie. Après filtration à chaud, le filtrat est complété à 10 ml si nécessaire avec du chloroforme. A 2 ml de ce filtrat, ajouter du KOH aqueux à 10 % (v/v). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

• Anthraquinones libres

A 1 ml de l'extrait chloroformique précédemment préparé est ajouté 1 ml de NH_4OH dilué à 50 % dans un tube à essai. Après agitation, l'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

• Anthraquinones combinés

A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, 10 ml d'eau et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutés. Maintenir le tube à essai dans le bain-marie bouillant pendant 15 min puis refroidir sous un courant d'eau, filtrer et compléter à 10 ml avec de l'eau.

- O-hétérosides

Prélever 5 ml de l'hydrolysat et agiter avec 5 ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. Soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai. Ajouter à la phase

organique 1 ml de NH_4OH dilué à 50 % puis agiter. La présence d'O-hétéroside est révélée par une coloration rouge plus ou moins intense.

- O-hétérosides à génines réduites

Prélever 5 ml d'hydrolysate et ajouter 3 à 4 gouttes de chlorure ferrique à 1 %. Chauffer pendant 5 minutes au bain-marie et refroidir sous un courant d'eau. Agiter le mélange avec 5 ml de chloroforme et soutirer la phase chloroformique. Introduire la phase chloroformique dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthranones, la coloration rouge est plus intense que précédemment (c'est-à-dire sans addition de chlorure ferrique).

- C-hétérosides

Reprendre la phase aqueuse précédemment obtenue par 10 ml d'eau et ajouter 1 ml de chlorure ferrique à 10 %. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Refroidir sous un courant d'eau, agiter avec 5 ml de chloroforme et soutirer la phase chloroformique. A la phase chloroformique, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué à 50 % et agiter. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de C-hétérosides.

10- Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes

Pour cette recherche, à 1 g de poudre est ajouté 10 ml d'alcool éthylique à 70 %. A ce mélange sont ajoutés 10 ml d'eau distillée et 2 ml d'acétate de plomb à 10 % (v/v). Après 15 minutes, 2 ml de solution aqueuse de soude à 10 % sont ajoutés au filtrat. Après décantation (environ 15 min), le filtrat est extrait trois fois avec 5 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont séchées sur du sulfate de sodium puis réparties en deux portions et évaporées au bain-marie.

- **Recherche des triterpénoïdes**

La première portion obtenue précédemment est solubilisée par quelques gouttes d'acide acétique. Au mélange obtenu, 3 ml d'un mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique sont ajoutés. Une coloration violette, bleue ou verte indique la présence de triterpénoïdes.

- **Recherche des stérols**

Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1N sont additionnées à la deuxième portion précédemment obtenue. L'apparition d'une coloration rouge pourpre ou rouge au vin indique la présence de stéroïdes.

11- Recherche des saponosides

La présence de saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse qui est le degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de poudre sont mis en ébullition pendant 30 min dans 100 ml d'eau. Après le refroidissement et filtration, le volume du filtrat est réajusté à 100 ml. Cette solution mère est répartie dans 10 tubes avec 1, 2, 3... 10 ml. Le volume final des neuf premiers tubes est ramené à 10 ml. Tous les tubes sont bouchés et agités vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes. Ensuite, ils sont débouchés et laissés au repos en position verticale pendant 15 min. La hauteur de la mousse persistante en cm est mesurée au niveau de chaque tube.

12- Recherche de protéines

Les protéines sont détectées par le test du Biuret. Dans un tube à essai, une petite quantité d'extrait aqueux est reprise dans 2 mL de NaOH aqueux à 20 % (m/v) à laquelle sont additionnées deux gouttes d'une solution aqueuse à 2 % (m/v) de sulfate cuivrique (CuSO_4). L'apparition d'une coloration violette ou rougeâtre indique une réaction positive.

B-Résultats

Le screening phytochimique effectué sur les drogues végétales nous a permis d'identifier les différents métabolites secondaires présents dans les plantes. Les résultats sont consignés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Résultats du screening phytochimique

Métabolites secondaires		Plantes étudiées				
		<i>Amaranthus spinosus</i>	<i>Momordica charantia</i>	<i>Boerhaavia erecta</i>	<i>Boerhaavia diffusa</i>	<i>Combretum paniculatum</i>
Tanins	galliques	+	+	+	+	+
	catéchiques	+	+	+	+	+
Flavonoïdes		+	+	+	+	+
Mucilages		-	-	-	-	-
Anthocyanes		-	-	-	-	+
Leucoanthocyanes		-	-	-	-	+
Composés réducteurs		-	-	-	-	+
Anthraquinones		-	-	-	-	-
Alcaloïdes		-	-	-	-	-
Saponosides		+	+	+	+	-
Protéines		+	+	+	-	-
Stérols et terpènes		-	-	-	-	-
Coumarines		+	-	+	+	+

III-Mise en œuvre des tests de toxicité limite chez les rats

A-Matériel animal

Le matériel animal est constitué de rat albinos de souche *Wistar* âgés de 8 à 12 semaines. Ces rats sont acclimatés aux conditions ambiantes d'élevage de l'animalerie de l'Unité d'Enseignement et de Recherches de Biologie Humaine de la Faculté des Sciences de la Santé (FSS) de Cotonou. L'élevage est effectué dans une salle d'environ 40 m² bien aérée, avec un rythme nuit-jour de 12 h. Les rats sont gardés dans des cages métalliques grillagées de dimension (50 x 30 x 20 cm). Ces cages sont équipées de petites mangeoires et d'abreuvoirs. Le fond des cages est muni d'un système de tiroir mobile garni de copeaux de bois recueillant les féces et les urines au travers d'une base en treillis.

Les animaux ont un libre accès à l'eau et à la nourriture. Ils sont approvisionnés en eau potable de robinet et leur alimentation quotidienne est faite d'un mélange d'aliments sous forme de croquettes et commercialisé par Vetto Service.

B-Evaluation de la toxicité aigüe

L'essai de toxicité a été réalisé selon les recommandations des lignes directrices de l'Organisation de Coopération et Développement Economique (OCDE) pour les essais de produits chimiques (295).

Les substances sont testées selon un processus séquentiel dans lequel trois animaux notamment des femelles nullipares et non gravides pesant entre 150 et 200 g sont utilisés à chaque étape. La dose initiale est choisie parmi les quatre doses suivantes : 5, 50, 300 et 2000 mg/kg de poids corporel. La dose choisie est celle pour laquelle on estime pouvoir induire une mortalité chez les animaux traités par la substance.

Pour notre essai, nous avons choisi la dose de 2000 mg/kg (dose maximale). Les extraits totaux des différentes plantes ont été dissous dans de l'eau distillée et administrés en prise unique par voie orale. Suite à l'administration des produits, les animaux sont observés les quatre premières heures puis quotidiennement pendant 14 jours. Les animaux sont pesés au début du test et par la suite chaque semaine. Les animaux sont sacrifiés à la fin du test et une étude histologique est effectuée sur certains organes (foie et reins).

Le test de toxicité effectué n'a révélé aucun signe de toxicité (décès, troubles du comportement, troubles neurologiques) durant les 14 jours qui ont suivi l'administration des extraits totaux des plantes.

295. http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-420-toxicite-orale-aigue-methode-de-la-dose-predeterminee_9789264070950-fr. Consulté le 12-2016

TROISIEME PARTIE: ETUDE BIOLOGIQUE

Introduction

L'évaluation biologique des différents composés synthétisés et celle des différents extraits de plantes sont réalisées sur les kinases. En outre, certains composés ont fait l'objet d'évaluation sur des lignées cellulaires cancéreuses : NSCLC-L16 (cancer pulmonaire non à petites cellules, lignée cultivée par le laboratoire du Pr. C. Roussakis, Nantes) et lignée A549 (cancer pulmonaire, lignée NCI).

I-Evaluation des composés sur des lignées cellulaires cancéreuses

A-Protocole expérimental

Les études de cytotoxicité sont réalisées sur les cellules NSCLC-L16 et A549. Les cellules NSCLC-L16 sont des cellules d'origine humaine de type épidermoïde classées T2N0M0 issues du carcinome bronchopulmonaire. Elles sont partiellement différenciées et rarement kératinisées. Les cellules A549 quant à elles sont des cellules provenant d'un adénocarcinome humain (cellules de l'épithélium alvéolaire) appartenant à la collection de référence de l'ATTC (American Type Culture Collection). Les cellules NSCLC-L16 et A549 sont cultivées dans un milieu de culture composé de : RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), 5 % de sérum de veau fœtal, 100 UI de pénicilline par millilitre, 100 µg de streptomycine par millilitre et 2 mM de glutamine à 37 °C sous une atmosphère air/dioxyde de carbone (95 : 5 v/v) (296). Les tests sont réalisés dans des microplaques de 96 puits contenant les cellules ($5 \cdot 10^4$ cellules/ml pour les cellules NSCLC-L16 et 10^4 cellules/ml pour les cellules A549). Ces cellules sont incubées dans ces microplaques pendant 72 h en présence ou non des produits à tester. Le milieu de culture est ensuite éliminé et les cellules lavées avec du PBS pH 7,4 (phosphate-buffered saline) pour éliminer toute trace des produits à tester. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans chaque micropuit avec 100 µl de milieu de culture et la viabilité cellulaire est évaluée par le test colorimétrique de Mosman au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) permet d'évaluer la croissance cellulaire (296,297). La CI_{50} (en µg/mL ou µM) est la dose d'un produit permettant d'inhiber 50 % de la prolifération cellulaire par rapport à un témoin cultivé dans

296. Moreau D et al. Int J Cancer. 2008 ; 123 (11) : 2676-83.

297. Mosmann T. J Immunol Methods. 1983 ; 65 (1-2) : 55-63.

les mêmes conditions. Après 3 heures de contact avec les cellules et plus particulièrement avec les déshydrogénases mitochondriales, des cristaux violets (ou cristaux de formazan) sont formés par réduction du MTT. Ces cristaux intracellulaires sont dissous et révélés par lecture de la densité optique. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

B-Résultats

Quinze composés sont actuellement évalués sur les deux lignées cellulaires cancéreuses (NSCLC-L16 et A549) au laboratoire de biologie cellulaire de l'Université de Nantes. Parmi ceux-ci, tous les composés sont actifs sur la lignée cellulaire NSCLC-L16 sauf composé 22. Le composé **110** a exhibé la meilleure CI_{50} sur les deux lignées cellulaires.

Tableau 27 : Résultats des évaluations de certains composés synthétisés sur lignée cellulaire cancéreuse

Composés	CI_{50} (mM)	
	NSCLC-L16	A549
18	62.9	73.9
19	<9.8	23.8
20	>86	>86
21	>89	>89
22	inactif	>93
23	>90	>90
24	9.7	<6.9 (7.6)
25	>77	9.5 (9.059)
26	26.3	21.1
27	62.2 (69.164)	29.8
29	>85	69.4
28	10.8	<9.9
33	56.7	>93
105	13.4	8.9
110	<5.5 (6.036)	<5.5(6.036)

II- Evaluation de l'activité des composés sur les kinases

A-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 μ M d'ATP marqué ([γ -³³P] ATP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) dans un volume final de 30 μ l (298). 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).

1- Les solutions tampons

Différentes solutions tampons de composition variées sont utilisées:

- Tampon A

Il est composé de 10 mM de MgCl₂, 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 μ 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 MgCl₂, 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 -glycérolphosphate, 25 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA (éthylène diamine tétraacétique) et 0,25 mM de DTT.

298. Bach S, *et al.* J Biol Chem. 2005; 280 (35) : 31208-19.

- Tampon H

Il est composé de MOPS 25 mM pH 7,5 et 10 mM MgCl₂.

- Tampon K

Il est composé de Tris (2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) 50 mM pH 7,5, 20 mM MgCl₂ et 2 mM MnCl₂.

- Tampon R

Il contient 5 mM MOPS pH 7,2; 2,5 mM β-glycérophosphate, 4 mM MgCl₂, 2,5 mM MnCl₂, 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA, 50 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumine) et 0,05 mM DTT.

2- Les kinases

Les évaluations biologiques ont été faites sur différentes kinases.

- *HsRIPK3*

Il s'agit d'une protéine kinase recombinante d'origine humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) et purifiée par chromatographie d'affinité. Le test est réalisé dans le tampon R en présence de 0,1 µg/µl de MBP (maltose binding protein) comme substrat. Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, la réaction est arrêtée et le milieu collecté 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 (299).

- *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 minutes 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 (299).

299. Lawson M, *et al.* Eur J Med Chem. 2016;123:105-14.

- *HsHaspin-kd*

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 minutes 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 (299).

- *HsCDK2/Cycline A (cyclin-dependent kinase-2)*

D'origine humaine, cette kinase est fournie par le Dr. A. Echalié-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 µg/µl de l'histone H1. Après 10 minutes 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 minutes chaque fois) dans une solution d'acide phosphorique à 1 % et la radioactivité mesurée (300).

- *HsCDK9/CyclinT*

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 (YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) comme substrat. Après 30 minutes 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 minutes chaque fois) avec une solution d'acide phosphorique à 1 % suivi de la mesure de la radioactivité (299).

- *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.

300. Meijer L, *et al.* Eur J Biochem. 1997; 243 : 527-36.

Après 30 minutes 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 minutes chaque fois) avec une solution d'acide phosphorique 1 % suivi de la mesure de la radioactivité (298).

- *HsAurora B*

C'est une protéine kinase recombinante d'origine humaine exprimée par baculovirus dans des cellules d'insecte Sf9 (SignalChem, product #A31-10G). Le test est effectué dans le milieu D avec 0,2 µg/µl de MBP comme substrat. Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, 25 µl du surnageant sont transférés 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.

- *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 minutes 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 (298).

- *LmCK1*

Il s'agit d'une protéine recombinante obtenue à partir de *Leishmania major*. Le test est effectué dans le tampon B (pH ajusté à 8) avec 0,028 mg/ml avec comme substrat spécifique le peptide RRKHAAGSpAYSITA. 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 (301).

- *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: RRKHAAGSpAYSITA (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 (298).

301. Reinhardt J, *et al.* Protein Expr Purif. 2007 ; 54 (1) : 101-9.

- *RnDyrk1A-kd*

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 mg/mL de BSA, 0,23 mg/ml de DTT et 0,033 µg/µl du peptide KKISGRLSPIMTEQ comme substrat. 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 avant la mesure de l'activité (298).

- *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 0,027µg/µl du peptide GRSRSRSRSRSR. Après 30 minutes 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 (299).

- *LdTLK* (tousled-like kinase)

Elle est obtenue à partir de *Leishmania donovani*. Le test est effectué dans le tampon K avec 0,6 µg/µl de caséine déphosphorylée provenant du lait de vache (Sigma #C4032). Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, 25 µl du surnageant sont transférés est transféré sur un filtre P81 en phosphocellulose. Le papier filtre est lavé avec une solution d'acide polyphosphorique 1 % suivi de la mesure de la radioactivité. (299).

B-Evaluation des dérivés du pyridazino-indole : résultats biologiques et discussion

Les différents dérivés du pyridazino-indole ont été testés sur un panel de kinases (Haspin, CLK1, DYRK1A, Aurora B, RIPK3 et CK1). Tous les composés testés sont inactifs sur les kinases RIPK3 et CK1. Les composés synthétisés sont considérés comme étant inactifs lorsque les valeurs de concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) sont supérieures à 10 µM. Les résultats sont exprimés en µM (Tableau 28).

Tableau 28 : Evaluation des composés synthétisés sur différentes kinases

Composés	Hs_Haspin	Mm_CLK1	Rn_DYRK1A	Hs_AURKB/INCENP
18	3,1	0,38	1,9	> 10
19	0,7	0,16	4,1	> 10
20	1	0,14	1,1	> 10
21	0,64	0,08	2,4	> 10
22	0,72	0,15	3,7	> 10
23	0,06	0,3	0,9	7
24	0,23	0,22	3,2	2,2
25	0,45	1,10	> 10	> 10
26	0,16	0,045	1,8	> 10
27	0,3	0,26	> 10	> 10
28	0,27	0,15	1,4	> 10
29	0,31	0,17	6	> 10
30	1	1	8	> 10
31	> 10	ND	> 10	> 10
32	> 10	> 10	4	> 10
33	ND	ND	ND	ND
34	> 10	ND	> 10	> 10
35	ND	ND	ND	ND
36	0,85	0,055	> 10	> 10
37	2	3	7	> 10
38	> 10	> 10	> 10	> 10
39	3	> 10	> 10	> 10
40	0,8	0,65	> 10	> 10
41	0,5	0,9	> 10	> 10
42	> 10	0,35	> 10	> 10
43	> 10	4,5	> 10	> 10
44	4	2,4	> 10	> 10
45	> 10	4,5	> 10	> 10
46	> 10	ND	> 10	> 10

47	> 10	ND	> 10	> 10
48	> 10	ND	> 10	> 10
49	1	0,07	> 10	> 10
50	0,095	0,15	> 10	> 10
51	> 10	ND	> 10	> 10
52	> 10	ND	> 10	> 10
53	> 10	ND	> 10	> 10
54	> 10	ND	> 10	> 10
55	> 10	ND	> 10	> 10
56	> 10	ND	> 10	> 10
57	> 10	ND	> 10	> 10
58	> 10	ND	> 10	> 10
59	> 10	ND	> 10	> 10
60	> 10	> 10	> 10	> 10
61	> 10	ND	> 10	> 10
62	> 10	> 10	> 10	> 10
63	> 10	ND	> 10	> 10
64	> 10	ND	> 10	> 10
65	> 10	ND	> 10	> 10
66	> 10	ND	> 10	> 10
67	> 10	ND	> 10	> 10
68	> 10	ND	> 10	> 10
69	> 10	ND	> 10	> 10
70	> 10	ND	7	> 10
71	> 10	ND	> 10	> 10
72	1,5	3	> 10	> 10
73	> 10	2,1	> 10	> 10
74	> 10	> 10	> 10	> 10
75	> 10	0,7	> 10	> 10
76	> 10	> 10	> 10	> 10
77	> 10	> 10	> 10	> 10

78	> 10	> 10	> 10	> 10
79	> 10	> 10	> 10	> 10
80	> 10	> 10	> 10	> 10
81	> 10	0,6	> 10	> 10
82	> 10	> 10	> 10	> 10
83	5	3,5	> 10	> 10
84	> 10	> 10	> 10	> 10
85	> 10	> 10	> 10	> 10
86	> 10	ND	> 10	6
87	2	> 10	> 10	> 10
88	> 10	> 10	> 10	> 10
89	> 10	> 10	> 10	> 10
90	> 10	ND	> 10	0,2
91	> 10	> 10	> 10	> 10
92	> 10	ND	> 10	> 10
93	> 10	ND	> 10	2,2
94	> 10	ND	> 10	> 10
95	> 10	ND	> 10	> 10
96	7,5	ND	> 10	> 10
97	> 10	ND	> 10	2,3
98	> 10	> 10	> 10	0,45
99	> 10	> 10	> 10	> 10
100	> 10	2,5	> 10	0,1
101	0,21	0,18	6	> 10
102	0,95	0,8	> 10	> 10
103	> 10	4,1	> 10	> 10
104	ND	ND	ND	ND
105	ND	ND	ND	ND
106	> 10	> 10	> 10	> 10
107	> 10	> 10	> 10	> 10
108	> 10	> 10	6,7	> 10

109	> 10	ND	> 10	> 10
110	ND	ND	ND	ND
111	ND	ND	ND	ND

ND : non déterminée

Au terme de ces évaluations sur kinases, les meilleures activités inhibitrices sont observées sur les kinases Haspin et CLK1. Sur 102 composés testés sur Haspin, DYRK1A et Aurora B, 27 sont actifs sur Haspin, 16 sur DYRK1A et 8 sur Aurora B. Trente-deux composés sont actifs parmi les 69 composés testés sur CLK1. Les composés **23** et **50** possèdent les meilleures concentrations inhibitrices sur la kinase Haspin avec de Cl_{50} de 0,06 et 0,095 respectivement. Les composés **21**, **26**, **36** et **49** sont les plus actifs sur CLK1 avec de Cl_{50} de 0,08 ; 0,045 ; 0,055 et 0,07 respectivement. Les meilleures Cl_{50} sur Aurora B sont obtenues avec les composés **90**, **98** et **100** et sont respectivement de 0,2 ; 0,45 et 0,1 μ M. Seul le composé **23** possède une activité inhibitrice simultanée sur les Haspin, CLK1, Dyrk1A et Aurora B avec des Cl_{50} de 0,06 ; 0,3 ; 0,9 et 7 μ M respectivement.

La Cl_{50} obtenue pour le composé **23** est proche de celle de l'inhibiteur de Haspin LDN-209929 (55 nM) et cette valeur est supérieure à celle des autres inhibiteurs identifiés actuellement (CHR-6494 et 5-Itu) (71,78).

En comparaison avec les composés des séries précédentes, JM11-002, JM11-001, JM10-008 dont les valeurs de la Cl_{50} sont respectivement de 0,22 μ M, 3 μ M et 6 μ M, le composé **23** possède aussi une meilleure activité inhibitrice sur la kinase DYRK1A (Figure 31) (115).

D'une manière générale, les composés comportant un groupement méthyle en position 1 du pyridazino-indole figurent parmi les composés actifs sur les trois kinases (Haspin, CLK1 et DYRK1A). Le remplacement du groupement méthyle par le groupement isopropyle améliore les caractéristiques physico-chimiques des molécules mais n'entraîne pas une amélioration de l'activité inhibitrice sur les kinases.

Les sulfonamides quant à eux présentent une faible activité inhibitrice sur les différentes kinases malgré leurs meilleures propriétés physico-chimiques.

L'étude des relations structure-activité est difficile à ce stade de l'analyse en raison de la faible solubilité de certains des produits synthétisés.

C-Evaluation des fractions de plantes sur les kinases : résultats biologiques et discussion

Parmi les plantes étudiées, seules les fractions de *Combretum paniculatum* ont été testées sur treize kinases (Tableau 29). Les différents extraits des quatre autres plantes sont en cours d'évaluation. Les résultats des CI_{50} sont exprimés en microgramme par ml ($\mu\text{g/ml}$). Les fractions sont considérées comme inactives lorsque les valeurs de CI_{50} sont supérieures à 50 $\mu\text{g/ml}$. La fraction CPF4 est inactive sur toutes les kinases. Le manque d'activité de cette fraction pourrait s'expliquer par l'absence de molécules possédant une activité inhibitrice sur ces kinases. Par ailleurs, aucune fraction n'est active sur les kinases CDK2/Cycline A (Cyclin-dependent kinase 2), CDK5/p25 (Cyclin-dependent kinase 5), TLK (Tousled-like kinase), RIPK3 (receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3) et DYRK1A.

La fraction CPF2 possède la meilleure activité inhibitrice sur les kinases GSK3, *Lm*_CK1 et *Ssc*_CK1 avec des valeurs de CI_{50} de 1,5 ; 7 et 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Pour la fraction CPF1, nous avons obtenu les meilleures CI_{50} sur les kinases Pim1, Haspin et Aurora B respectivement de 1 ; 10 et 2,8 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 29 : Evaluation des fractions de *Combretum paniculatum* sur les kinases

Fraction	Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK5/ p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Ssc_GSK3	Hs_PIM1	Lm_CK1	Ld_TLK	Hs_RIPK3	Hs_Haspin	Hs_AuroraB	Mm_CLK1	Rn_Dyrk1A	Ssc_CK1
CPF1	ND	ND	13,0	4,0	1,0	> 50	> 50	> 50	10,0	2,8	0,41	> 50	7,5
CPF2	> 50	> 50	> 50	1,5	3,0	7,0	ND	> 50	38,0	11,0	0,7	> 50	2,0
CPF3	> 50	> 50	ND	6,5	20,0	50,0	> 50	> 50	27,0	3,0	7,0	ND	11,0
CPF4	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

Les différentes activités inhibitrices obtenues sur certaines des kinases utilisées seraient probablement liées à la présence de flavonoïdes dans cette plante. En effet, les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés anti-oxydante et anticancéreuse (202,203). Notons par ailleurs, que Sowemimo et *al.* ont isolé de la plante deux tétrapyrroles

intermédiaires de la dégradation de la chlorophylle (phéophorbide et son ester) qui ont une activité cytotoxique *in vitro* sur les cellules HeLa, MCF-7 et HT-29. (302)

Conclusion

Les mesures de viabilité cellulaire sur deux lignées cellulaires cancéreuses NSCLC-L16 (cancer pulmonaire non à petites cellules) et A549 (cancer pulmonaire) sont réalisées sur 15 composés (**18** à **29**, **33**, **105** et **110**). Dans les deux cas, c'est le composé **110** (composé substitué en position 3 et 5 par la chaîne diéthylaminoéthyle) qui a montré la meilleure activité inhibitrice sur ces lignées. Cette meilleure activité serait probablement due à l'amélioration des caractéristiques physicochimiques de ce dernier en comparaison du composé **20** qui est son analogue non substitué en position 3 et 5.

Les composés synthétisés ont aussi été testés sur Haspin, DYRK1A et Aurora B, CLK1, RIPK3, CK1δ/ε. Tous les composés sont inactifs sur RIPK3 et CK1δ/ε. Parmi les composés actifs, 27 le sont sur Haspin, 16 sur DYRK1A, 8 sur Aurora B et 32 sur CLK1. D'une manière générale, le nombre de composés actifs sur CLK1 est supérieur à celui de ceux qui sont actifs sur Haspin. Les meilleures Cl_{50} sont obtenues pour les composés **23** et **26** avec des valeurs de 0,06 et 0,160 μ M respectivement sur la kinase Haspin. Les composés **21**, **26**, **36** et **49** quant à eux sont les plus actifs sur CLK1 avec des valeurs de Cl_{50} de 0,08 ; 0,045 ; 0,055 et 0,07 μ M respectivement. Les composés les plus actifs sur la kinase Aurora B sont les composés **90**, **98** et **100** et avec des Cl_{50} de 0,2 ; 0,45 et 0,1 μ M respectivement. Un seul composé (composé **23**) possède une activité inhibitrice simultanée sur les quatre kinases (Haspin, CLK1, Dyrk1A et Aurora B avec des Cl_{50} de 0,06 ; 0,3 ; 0,9 et 7 μ M respectivement). Ce dernier pourrait présenter un intérêt particulier en raison de son action sur plusieurs cibles. En effet, les composés « multitargeted » sont moins affectés par les problèmes de résistance.

Enfin, les différentes fractions obtenues après le fractionnement de l'extrait éthanolique des feuilles de *Combretum paniculatum* sont aussi testées sur différentes kinases (CDK2/Cycline A, CDK5/p25, CDK9/Cycline T, GSK3, PIM1, CK1, TLK, RIPK3, Haspin, Aurora B, CLK1, Dyrk1A). Aucune activité inhibitrice n'est observée pour la fraction CPF4. Par ailleurs, toutes les fractions sont inactives sur les kinases CDK2/Cycline A, CDK5/p25, TLK,

302. Sowemimo A, *et al.* Afr J Biotechnol. 2012 ; 11 (20) : 4631-5.

RIPK3 et DYRK1A. La fraction CPF2 possède la meilleure activité inhibitrice sur les kinases GSK3, Lm_CK1 et Ssc_CK1. Pour la fraction CPF1, nous avons obtenu les meilleures CI_{50} sur les kinases Pim1, Haspin et Aurora B. Ceci serait probablement lié à la présence dans cette fraction de molécules ayant une action inhibitrice sur ces kinases.

Les différentes activités observées pour ces fractions pourraient justifier l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle pour le traitement du cancer ainsi que l'activité cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses : HeLa, MCF-7 et HT29 rapportées par Sowemimo *et al.* (202,203)

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail est la valorisation des structures d'origine naturelle dans une application anti-proliférative ou immunomodulatrice potentielles. Ce travail de thèse s'articule autour de deux axes principaux :

- la première partie de ce travail est principalement axée autour d'un travail de pharmacomodulation de structure connue en vue d'améliorer les caractéristiques physico-chimiques ainsi que l'activité biologique. Le modèle utilisé est inspiré du *scaffold* fourni par les grossularines A et B extraites d'un tunicier marin (*Dendrodoa grossularia*). Le but de ce travail est de concevoir de nouveaux analogues de la pyradizano-indole inhibiteurs potentiels de protéines kinases (en particulier Haspin). Au total, 111 composés ont été synthétisés. Parmi ces composés, dix-huit sont des composés intermédiaires utilisés pour la synthèse des composés finaux (composés **1** à **17** ainsi que le composé **35**). Les quatre vingt-treize autres composés sont des produits finaux (amides, sulfonamides ou urées). Un total de soixante-quatre nouveaux amides est synthétisé par deux méthodes. La première consiste à mettre en réaction l'amine et différents chlorure d'acides commerciaux et la deuxième méthode consiste à faire réagir l'amine et un acide carboxylique en présence d'un agent de couplage. Les différents amides synthétisés ont une faible solubilité dans les solvants usuels. Ils sont purifiés sur colonne chromatographique ou par lavage avec différents solvants. Dix-sept sulfonamides sont aussi synthétisés à partir des différentes amines et des chlorures de sulfonyles commerciaux en présence de la triéthylamine ou de l'hydrogencarbonate de sodium. Ces sulfonamides ont une meilleure solubilité en comparaison des amides précédemment synthétisés. De plus, différentes urées sont aussi synthétisées à partir des amines. Le nombre de dérivé d'urée synthétisé a été limité par la difficulté de purification de ces composés. En raison de la difficulté de solubilisation des amides finaux, nous avons envisagé l'introduction d'une chaîne diéthylaminoéthyle en position 5 et/ou 3. L'introduction de cette chaîne augmente la lipophilie des composés tout en améliorant leurs caractéristiques physico-chimiques.

- la deuxième partie de ce travail repose sur l'étude de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise : *Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*,

Boerhaavia diffusa et *Combretum paniculatum*. Le choix de ces plantes a été orienté par les données recueillies auprès des tradithérapeutes ainsi que les données de la revue bibliographique. Les drogues végétales sont séchées, pulvérisées et extraites avec de l'éthanol. Les tests phytochimiques ont permis d'identifier les différents groupes de métabolites contenus dans ces plantes (tanins, flavonoïdes, anthocyanes, leucoanthocyanes, composés réducteurs, saponosides, protéines et coumarines). Le test de toxicité effectué n'a révélé aucun signe de toxicité (décès, troubles du comportement, troubles neurologiques) durant les 14 jours qui ont suivi l'administration des extraits totaux de chaque plante. L'extrait total de *Combretum paniculatum* a été séparé par chromatographie de séparation liquide-liquide. Quatre fractions ont été obtenues à partir des feuilles de l'extrait total.

Dans un premier temps, les mesures de viabilité cellulaire sur deux lignées cancéreuses NSCLC-L16 (cancer pulmonaire non à petites cellules) et A549 (cancer pulmonaire) sont réalisées pour certains composés synthétisés. Dans les deux cas, c'est le composé **110** (composé substitué en position 3 et 5 par la chaîne diéthylaminoéthyle) qui a montré la meilleure activité inhibitrice sur ces deux lignées (probablement due aux meilleures caractéristiques physicochimiques de ce dernier).

Par la suite, l'activité inhibitrice des différents composés synthétisés est évaluée sur les kinases Haspin, CLK1, CK1, DYRK1A, Aurora B et RIPK3. Au total, 88 composés sont testés sur Haspin, DYRK1A et Aurora B et 55 sur CLK1. Parmi ces composés 27 sont actifs sur Haspin, 16 sur DYRK1A et 8 sur Aurora B et 32 sur CLK1. De manière générale, les meilleures Cl_{50} ont été obtenues pour les kinases CLK1 et Haspin. Les composés **23** et **26** possèdent les meilleures activités inhibitrices sur la kinase Haspin avec des Cl_{50} de 0,06 et 0,160 respectivement. Les composés **21**, **26**, **36** et **49** quant à eux sont les plus actifs sur la kinase CLK1 avec des valeurs de Cl_{50} de 0,08 ; 0,045 ; 0,055 et 0,07 μ M respectivement. Les composés **90**, **98** et **100** sont les plus actifs sur la kinase Aurora B avec des valeurs de Cl_{50} de 0,2 ; 0,45 et 0,1 μ M respectivement. Seul le composé **23** possède une activité inhibitrice simultanée sur les Haspin, CLK1, Dyrk1A et Aurora B avec des valeurs de Cl_{50} de 0,06 ; 0,3 ; 0,9 et 7 μ M respectivement. L'ajout d'une chaîne lipophile (diéthylaminoéthyle) en position 5 et/ou 3 sur le pyridazino-indole entraîne une amélioration des caractéristiques physicochimiques des différents produits mais en retour, une baisse voire une perte totale de l'activité sur les kinases est observée en comparaison avec les produits initiaux. Les travaux

ultérieurs doivent viser dans un premier temps, à améliorer la solubilité des composés (par la synthèse de maléate ou chlorhydrate). Par la suite, ces composés seront réévalués sur les différentes kinases. Les mesures de viabilité cellulaire sur les deux lignées cancéreuses doivent aussi être poursuivies pour toutes les molécules synthétisées.

Enfin, les quatre fractions de *Combretum paniculatum* obtenues après la séparation liquide-liquide sont testées sur les kinases (CDK2/Cycline A, CDK5/p25, CDK9/Cycline T, GSK3, PIM1, CK1, TLK, RIPK3, Haspin, AuroraB, CLK1, Dyrk1A). La fraction CPF4 est inactive sur ces kinases. Les meilleures activités sont obtenues avec les fractions CPF2 (meilleures CI_{50} sur les kinases GSK3, Lm_CK1 et Ssc_CK1) et CPF1 (meilleures CI_{50} sur les kinases Pim1, Haspin et Aurora B). Avec ces résultats préliminaires encourageants obtenus pour certaines fractions, il serait intéressant de poursuivre les travaux en procédant à un fractionnement bioguidé et une purification des molécules actives en vue de leur identification. L'activité des extraits des quatre autres plantes sera aussi évaluée sur les mêmes kinases. En fonction des résultats, le fractionnement bioguidé ainsi que la purification et l'identification des molécules actives seront envisagées. Par ailleurs, tous les extraits feront l'objet d'une étude de cytotoxicité sur différentes lignées cancéreuses.

Enfin, à plus long terme des études *in vivo* pourront être initiées pour les molécules ayant les meilleures activités inhibitrices.

BIBLIOGRAPHIE

1. Graham LP. An introduction to medicinal chemistry. 5ème édition. Oxford: Oxford University Press, 2012: 798.
2. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med*. 2012; 18 (9): 509-15.
3. Desany B, Zhang Z. Bioinformatics and cancer target discovery. *Drug Discov Today*. 2004; 9 (18): 795-802.
4. Schmit TL, Ahmad N. Regulation of mitosis via mitotic kinases: new opportunities for cancer management. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6 (7): 1920-31.
5. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007; 302 (1): 1-12.
6. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*. 2012; 81 (4): 303-11.
7. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006; 5: 60.
8. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4 (3): 177-83.
9. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17 (1): 60-5.
10. Pihan GA, Doxsey SJ. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999; 9 (4): 289-302.
11. Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol*. 2003; 4 (12): 721-9.
12. Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today*. 2003;8(2): 67-77.
13. Espinosa E, Zamora P, Feliu J, González Barón M. Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(6):515-23.
14. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol*. 2009; 625: 41-54.
15. Los M. New, exciting developments in experimental therapies in the early 21st century. *Eur J Pharmacol*. 2009; 625 (1-3): 1-5.
16. Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 2001; 11 (11): S22-6.

17. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. Cancer: a systems biology disease. *Biosystems*. 2006; 83 (2-3): 81-90.
18. Hanks SK, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 1995; 9 (8): 576-96.
19. Higgins JMG. Haspin-like proteins: A new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci*. 2001; 10 (8): 1677-84.
20. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27 (10): 514-20.
21. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298 (5600): 1912-34.
22. Miranda-Saavedra D, Barton GJ. Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2007; 68 (4): 893-914.
23. Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol*. 2003; 4: 111.
24. Martin DMA, Miranda-Saavedra D, Barton GJ. Kinomer v. 1.0: a database of systematically classified eukaryotic protein kinases. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (S1): D244-50.
25. Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV. Novel families of putative protein kinases in Bacteria and Archaea: evolution of the « Eukaryotic » Protein Kinase Superfamily. *Genome Res*. 1998; 8 (10): 1038-47.
26. Higgins JMG. Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60 (3): 446-62.
27. Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 2002; 109 (3): 275-82.
28. Hunter T, Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22 (1): 18-22.
29. Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol*. 2004; 339 (5): 1025-39.
30. Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*. 2004; 15 (5): 661-75.
31. Tanaka H, Yoshimura Y, Nishina Y, Nozaki M, Nojima H, Nishimune Y. Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett*. 1994; 355 (1): 4-10.

32. Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M, Yomogida K, Tsuchida J, Tosaka Y, Habu T, Nakanishi T, Okada M, Mojima H, Nishimune Y. Identification and characterization of a Haploid Germ Cell-specific Nuclear Protein Kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem.* 1999; 274 (24): 17049-57.
33. Higgins JMG. The Haspin gene: location in an intron of the Integrin α E gene, associated transcription of an Integrin α E-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene.* 2001; 267 (1): 55-69.
34. Higgins JMG. Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma.* 2009; 119 (2): 137-47.
35. Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, De Marco A, Mattevi A, Musacchio A. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106 (48): 20204-9.
36. Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, Wang F, Stein RL, Murray JW, Higgins JMG, Knapp S. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106 (48): 20198-203.
37. Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 2005; 19 (4): 472-88.
38. Dai J, Higgins JMG. Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle.* 2005; 4 (5): 665-8.
39. Polioudaki H, Markaki Y, Kourmouli N, Dialynas G, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett.* 2004; 560 (1-3): 39-44.
40. Maiolica A, de Medina-Redondo M, Schoof EM, Chaikuad A, Villa F, Gatti M, Jeganathan S, Lou HJ, Novy K, Hauri S, Toprak UH, Herzog F, Meraldi P, Penengo L, Turk BE, Knapp S, Linding R, Aebersold R. Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13 (7): 1724-40.
41. Qian J, Lesage B, Beullens M, Van Eynde A, Bollen M. PP1/Repo-Man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal Aurora B targeting. *Curr Biol.* 2011; 21 (9): 766-73.
42. Trinkle-Mulcahy L, Andersen J, Lam YW, Moorhead G, Mann M, Lamond AI. Repo-Man recruits PP1 γ to chromatin and is essential for cell viability. *J Cell Biol.* 2006; 172 (5): 679-92.
43. Vagnarelli P, Ribeiro S, Sennels L, Sanchez-Pulido L, de Lima Alves F, Verheyen T, Kelly DA, Ponting CP, Rappsilber J, Earnshaw WC. Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Dev Cell.* 2011; 21 (2): 328-42.

44. Vader G, Maia AF, Lens SM. The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div.* 2008; 3 (1): 1-9.
45. Wang F, Ulyanova NP, van der Waal MS, Patnaik D, Lens SMA, Higgins JMG. A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr Biol.* 2011; 21 (12): 1061-9.
46. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell.* 2007; 131 (2): 230-1.
47. Lens SMA, Rodriguez JA, Vader G, Span SW, Giaccone G, Medema RH. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol Biol Cell.* 2006; 17 (4): 1897-909.
48. Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 2007; 131 (2): 271-85.
49. Sun C, Nettlesheim D, Liu Z, Olejniczak ET. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry (Mosc).* 2005; 44 (1): 11-7.
50. Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K, Watanabe Y. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science.* 2010; 327 (5962): 172-7.
51. Tsukahara T, Tanno Y, Watanabe Y. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature.* 2010; 467 (7316): 719-23.
52. Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ, Zierhut C, Kimura H, Funabiki H. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science.* 2010; 330 (6001): 235-9.
53. Jeyaprakash AA, Basquin C, Jayachandran U, Conti E. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone H3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure.* 2011; 19 (11): 1625-34.
54. Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC, Carmena M. Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.* 2001; 153 (4): 865-80.
55. Bishop JD, Schumacher JM. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem.* 2002; 277 (31): 27577-80.
56. Honda R, Körner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003; 14 (8): 3325-41.

57. Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, Tarricone C, Areces LB, Schneider TR, Stukenberg PT, Musacchio A. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell*. 2005; 18 (3): 379-91.
58. Klein UR, Nigg EA, Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of borealin, survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell*. 2006; 17 (6): 2547-58.
59. Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21 (6): 796-805.
60. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (10): 798-812.
61. Xu Z, Ogawa H, Vagnarelli P, Bergmann JH, Hudson DF, Ruchaud S, Fukagawa T, Earnshaw WC, Samejima K. INCENP–aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J Cell Biol*. 2009; 187 (5): 637-53.
62. Dai J, Sullivan BA, Higgins JMG. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell*. 2006; 11 (5): 741-50.
63. Ghenoiu C, Wheelock MS, Funabiki H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell*. 2013; 52 (5): 734-45.
64. Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep*. 2014; 15 (3): 273-81.
65. Peng A, Lewellyn AL, Schiemann WP, Maller JL. Repo-Man controls a protein phosphatase 1-dependent threshold for DNA damage checkpoint activation. *Curr Biol*. 2010; 20 (5): 387-96.
66. Pérez de Castro I, de Cárcer G, Montoya G, Malumbres M. Emerging cancer therapeutic opportunities by inhibiting mitotic kinases. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (4): 375-83.
67. Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer*. 2010; 126 (1): 2-10.
68. Tan DS-W, Gerlinger M, Teh B-T, Swanton C. Anti-cancer drug resistance: Understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. *Eur J Cancer*. 2010; 46 (12): 2166-77.
69. Ma X, Wang Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov Today*. 2009; 14 (23-24): 1136-42.
70. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8 (7): 547-66.

71. Balzano D, Santaguida S, Musacchio A, Villa F. A general framework for inhibitor resistance in protein kinases. *Chem Biol.* 2011; 18 (8): 966-75.
72. Broxterman HJ, Georgopapadakou NH. Anticancer therapeutics: « addictive » targets, multi-targeted drugs, new drug combinations. *Drug Resist Updat.* 2005; 8 (4): 183-97.
73. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol Cell.* 2015; 60 (4): 524-36.
74. Dai J, Kateneva AV, Higgins JMG. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci.* 2009; 122 (22): 4168-76.
75. Wotring LL, Townsend LB. Study of the cytotoxicity and metabolism of 4-amino-3-carboxamido-1-(β -d-ribofuranosyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine using inhibitors of adenosine kinase and adenosine deaminase. *Cancer Res.* 1979; 39 (8): 3018-23.
76. Fedorov O, Marsden B, Pogacic V, Rellos P, Müller S, Bullock AN, Schwaller J, Sundström M, Knapp S. A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (51): 20523-8.
77. de Antoni A, Stefano Maffini, Knapp S, Musacchio A, Santaguida S. A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol.* 2012; 199 (2): 269-84.
78. Huertas D, Soler M, Moreto J, Villanueva A, Martinez A, Vidal A, Charlton M, Moffat D, Patel S, McDermott J, Owen J, Brotherton D, Krige D, Cuthill S, Esteller M. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene.* 2012; 31 (11): 1408-18.
79. Patnaik D, Xian J, Glicksman MA, Cuny GD, Stein RL, Higgins JMG. Identification of small molecule inhibitors of the mitotic kinase Haspin by high-throughput screening using a homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *J Biomol Screen.* 2008; 13 (10): 1025-34.
80. Cuny GD, Robin M, Natalia P. Ulyanova, Patnaik D, Pique V, Casano G, Liu J-F, Xian J, Lin X, Glicksman MA, Stein RL, Higgins JMG. Structure–activity relationship study of acridine analogs as haspin and DYRK2 kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20 (12): 3491-4.
81. Cuny GD, Ulyanova NP, Patnaik D, Liu J-F, Lin X, Auerbach K, Ray SS, Xian J, Glicksman MA, Stein RL, Higgins JMG. Structure–activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22 (5): 2015-9.
82. Uri A, Lust M, Vaasa A, Lavogina D, Viht K, Enkvist E. Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804 (3): 541-6.

83. Lavogina D, Enkvist E, Uri A. Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications. *ChemMedChem*. 2010; 5 (1): 23-34.
84. Enkvist E, Lavogina D, Raidaru G, Vaasa A, Viil I, Lust M, Viht M, Uri A. Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *J Med Chem*. 2006; 49 (24): 7150-9.
85. Enkvist E, Raidaru G, Vaasa A, Pehk T, Lavogina D, Uri A. Carbocyclic 3'-deoxyadenosine-based highly potent bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; 17 (19): 5336-9.
86. Enkvist E, Kriisa M, Roben M, Kadak G, Raidaru G, Uri A. Effect of the structure of adenosine mimic of bisubstrate-analog inhibitors on their activity towards basophilic protein kinases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19 (21): 6098-101.
87. Kestav K, Lavogina D, Raidaru G, Chaikuad A, Knapp S, Uri A. Bisubstrate inhibitor approach for targeting mitotic kinase Haspin. *Bioconjug Chem*. 2015; 26 (2): 225-34.
88. Moriwaki K, Chan FKM. Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25 (2): 167-74.
89. Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, Lich JD, Finger J, Kasparcova V, Votta B, Ouellette M, King BW, Wisnoski D, Lakdawala AS, DeMartino MP, Casillas LN, Haile PA, Sehon CA, Marquis RW, Upton J, Daley-Bauer LP, Roback L, Ramia N, Dovey CM, Carette JE, Chan FK-M, Bertin J, Gough PJ, Mocarski ES, Kaiser WJ. Rip3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Mol Cell*. 2014; 56 (4): 481-95.
90. Newton K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol*. 2015; 25 (6): 347-53.
91. Abbassi R, Johns TG, Kassiou M, Munoz L. DYRK1A in neurodegeneration and cancer: Molecular basis and clinical implications. *Pharmacol Ther*. 2015; 151: 87-98.
92. Blanco-Aparicio C, Collazo AMG, Oyarzabal J, Leal JF, Albarán MI, Lima FR, Pequeño B, Ajenjo N, Becerra M, Alfonso P, Reymundo MI, Palacios I, Mateos G, Quiñones H, Corriero A, Carnero A, Pevarello P, Lopez AR, Fominaya J, Pastor J, Bischoff JR. Pim 1 kinase inhibitor ETP-45299 suppresses cellular proliferation and synergizes with PI3K inhibition. *Cancer Lett*. 2011; 300 (2): 145-53.
93. Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahljianian M, Lau L-F, Duff K. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*. 2003; 38 (4): 555-65.
94. Tsai L-H, Lee M-S, Cruz J. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1697 (1-2): 137-42.

95. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 2012; 22 (3): 169-75.
96. Mitra J, Enders GH. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene.* 2004; 23 (19): 3361-7.
97. de Boer L, Oakes V, Beamish H, Giles N, Stevens F, Somodevilla-Torres M, DeSouza C, Gabrielli B. Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene.* 2008; 27 (31): 4261-8.
98. Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK. CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev.* 2002; 16 (16): 2135-46.
99. Bellan C, De Falco G, Lazzi S, Micheli P, Vicidomini S, Schürfeld K, Amato T, Palumbo A, Bagella L, Sabattini E, Bartolommei S, Hummel M, Pileri S, Tosi P, Leoncini L, Giordano A. CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation. *J Pathol.* 2004; 203 (4): 946-52.
100. Garriga J, Graña X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene.* 2004; 337: 15-23.
101. Radhakrishnan SK, Gartel AL. CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. *Cell Cycle.* 2006; 5 (5): 519-21.
102. Leucci E, de Falco G, Onnis A, Cerino G, Cocco M, Luzzi A, Crupi D, Tigli C, Bellan C, Tosi P, Leoncini L, Giordano A. The role of the Cdk9/Cyclin T1 complex in T cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2007; 412: 411-5.
103. Mott BT, Tanega C, Shen M, Maloney DJ, Shinn P, Leister W, Marugan JJ, Inglese J, Austin CP, Misteli T, Auld DS, Thomas CJ. Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Clk). *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19 (23): 6700-5.
104. Bullock AN, Das S, Debreczeni JÉ, Rellos P, Fedorov O, Niesen FH, Guo K, Papagrigoriou E, Amos AL, Cho S, Turk BE, Ghosh G, Knapp S. Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation. *Structure.* 2009; 17 (3): 352-62.
105. Fedorov O, Huber K, Eisenreich A, Filippakopoulos P, King O, Bullock AN, Szklarczyk D, Jensen LJ, Fabbro D, Trappe J, Rauch U, Bracher F, Knapp S. Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing. *Chem Biol.* 2011; 18 (1): 67-76.
106. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal.* 2005; 17 (6): 675-89.
107. Cheong JK, Virshup DM. Casein kinase 1: complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43 (4): 465-9.

108. Krause DR, Jonnalagadda JC, Gatei MH, Sillje HH, Zhou B-B, Nigg EA, Khanna K. Suppression of Tousled-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1. *Oncogene*. 2003; 22 (38): 5927-37.
109. Carrera P, Moshkin YM, Grönke S, Silljé HHW, Nigg EA, Jäckle H, Karch F. Tousled-like kinase functions with the chromatin assembly pathway regulating nuclear divisions. *Genes Dev*. 2003; 17 (20): 2578-90.
110. Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ito S, Nagino M, Hamaguchi M, Senga T. Silencing of Tousled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Cancer Lett*. 2010; 296 (1): 27-34.
111. Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3 (6): 479-87.
112. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015; 148: 114-31.
113. Delest B, Tisserand J-Y, Robert J-M, Nourrisson M-R, Pinson P, Duflos M, Le Baut G, Renard P, Pfeiffer B. Synthesis of 1-benzyl-8,9-dihydroimidazo[4,5-c]pyrrolo[3,2-g]quinolin-4(5H)-one via palladium-catalyzed intramolecular arylation. *Tetrahedron*. 2004; 60 (29): 6079-83.
114. Bruel A, Logé C, Tauzia M-L de, Ravache M, Le Guevel R, Guillouzo C, Lohier J-F, Oliveira Santos JS, Lozach O, Meijer L, Ruchaud S, Bénédicti H, Robert J-M. Synthesis and biological evaluation of new 5-benzylated 4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indoles as PI3K α inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012; 57: 225-33.
115. Bruel A, Bénéteau R, Chabanne M, Lozach O, Le Guevel R, Ravache M, Bénédicti H, Meijer L, Logé C, Robert J-M. Synthesis of new pyridazino[4,5-b]indol-4-ones and pyridazin-3(2H)-one analogs as DYRK1A inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24 (21): 5037-40.
116. Vega AM, Aldana I, Parrado P, Font M, Alvarez EF. Antihypertensive agents: Pyridazino(4, 5-b)indole derivatives. *J Pharm Sci*. 1982; 71 (12): 1406-8.
117. Monge A, Parrado P, Font M, Fernandez-Alvarez E. Selective thromboxane synthetase inhibitors and antihypertensive agents. New derivatives of 4-hydrazino-5H-pyridazino[4,5-b]indole, 4-hydrazinotriazino[4,5-a]indole, and related compounds. *J Med Chem*. 1987; 30 (6): 1029-35.
118. Frechilla D, Bernedo E, Castiella E, Lasheras B, Cenarruzabeitia E, Monge A, Aldana I, Alvarez T, Losa MJ, Font M. Antihypertensive and vasodilator effect of A-80b, a new pyridazino indole derivative. *Eur J Pharmacol*. 1992; 219 (3-4): 409-14.
119. Monge A, Navarro M-E, Font M, Santiago E, Alberdi E, Martínez-Irujo J-J. New indole and pyridazinoindole analogs- Synthesis and study as inhibitors of phosphodiesterases and as inhibitors of blood platelet aggregation. *Arch Pharm (Weinheim)*. 1995; 328 (10): 689-98.

120. Font M, Monge A, Cuartero A, Elorriaga A, Martínez-Irujo JJ, Alberdi E, Santiago E, Prieto I, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás F. Indoles and pyridazino[4,5-b]indoles as nonnucleoside analog inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Eur J Med Chem.* 1995; 30 (12): 963-71.
121. Avan I, Guven A, Guven K. Synthesis and antimicrobial investigation of some 5*H*-pyridazino[4,5-b]indoles. *Turk J Chem.* 2013; 37 (2): 271-91.
122. Vin V, Leducq N, Bono F, Herbert JM. Binding characteristics of SSR180575, a potent and selective peripheral benzodiazepine ligand. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310 (3): 785-90.
123. Li RD, Zhai X, Zhao YF, Gong P. Design, synthesis and antiproliferative activities of novel 5*H*-pyridazino[4,5-b]indoles. *Chin Chem Lett.* 2007; 18 (10): 1191-4.
124. Cheung Y-Y, Buck JR, Nickels ML, Tang D, Manning HC. Preclinical evaluation of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3(6-[¹⁸F]fluoropyridin-2-yl)-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide: A novel pyridazinoindole ligand for PET imaging of TSPO in cancer. *Cancer Res.* 2014; 74 (19S): 110.
125. Patel K, Gadewar M, Tripathi R, Prasad S, Patel DK. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid « Harmine ». *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2 (8): 660-4.
126. Horiuchi T, Chiba J, Uoto K, Soga T. Discovery of novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of Cyclin D1-CDK4: Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19 (2): 305-8.
127. Robinson B. The Fischer indole synthesis. *Chem Rev.* 1963; 63 (4): 373-401.
128. Humphrey, Guy R., Kuethe, Jeffrey T. Practical methodologies for the synthesis of indoles. *Chem Rev.* 2006; 106 (7): 2875-911.
129. Kissman H. M., Farnsworth D. W., Witkop B. Fischer indole synthesis with polyphosphoric acid. *J Am Chem Soc.* 1952; 74 (15): 3948-9.
130. Benincori T, Sannicolo F. New access to 2-(aryloxy)-, 2-(arylhydrazo)-, and 2-aminoindoles, -benzofurans, and -thianaphthenes. *J Org Chem.* 1988; 53 (6): 1309-12.
131. Okauchi T, Itonaga M, Minami T, Owa T, Kitoh K, Yoshino H. A general method for acylation of indoles at the 3-position with acyl chlorides in the presence of dialkylaluminum chloride. *Org Lett.* 2000; 2 (10): 1485-7.
132. Ottoni O, Neder A de VF, Dias AKB, Cruz RPA, Aquino LB. Acylation of indole under Friedel-Crafts conditions- An improved method to obtain 3-acylindoles regioselectively. *Org Lett.* 2001; 3 (7): 1005-7.
133. Zhungietu GI, Zorin LM, Gorgos VI, Rekhter MA. Synthesis of 5*H*-pyridazo[4,5-b]indoles by condensation of 2-acylindole-3-carboxylic acids with hydrazine. *Chem Heterocycl Compd.* 1982; 18 (8): 811-3.

134. Braude EA, Linstead RP, Wooldridge KH. Hydrogen transfer. Part VII. Metal-catalysed transfer-hydrogenation of nitro-compounds. *J Chem Soc Resumed*. 1954; 3586-3595.
135. Brieger G, Nestruck TJ. Catalytic transfer hydrogenation. *Chem Rev*. 1974; 74 (5): 567-80.
136. Entwistle ID, Jackson AE, Johnstone RAW, Telford RP. Reduction of nitro-compounds. *J Chem Soc*. 1977; (4): 443-4.
137. Ram S, Ehrenkauf RE. A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent. *Tetrahedron Lett*. 1984; 25 (32): 3415-8.
138. Lauwiner M, Rys P, Wissmann J. Reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide hydroxide catalyst. I. The reduction of monosubstituted nitrobenzenes with hydrazine hydrate in the presence of ferrihydrite. *Appl Catal Gen*. 1998; 172 (1): 141-8.
139. Anderluh M, Cesar J, Štefanič P, Kikelj D, Janeš D, Murn J, Nadrah K, Tominc M, Addicks E, Giannis A, Stegnar M, Dolenc MS. Design and synthesis of novel platelet fibrinogen receptor antagonists with 2*H*-1,4-benzoxazine-3(4*H*)-one scaffold. A systematic study. *Eur J Med Chem*. 2005; 40 (1): 25-49.
140. Fu L, Gribble GW. Reductive acylation of 2- and 3-nitropyrroles- efficient syntheses of pyrrolylamides and pyrrolylimides. *Tetrahedron Lett*. 2007; 48 (52): 9155-8.
141. Pogorelić I, Filipan-Litvić M, Merkaš S, Ljubić G, Capanec I, Litvić M. Rapid, efficient and selective reduction of aromatic nitro compounds with sodium borohydride and Raney nickel. *J Mol Catal Chem*. 2007; 274 (1-2): 202-7.
142. Chaubal NS, Sawant MR. Nitro compounds reduction via hydride transfer using mesoporous mixed oxide catalyst. *J Mol Catal Chem*. 2007; 261 (2): 232-41.
143. Wahba AE, Peng J, Hamann MT. Reductive amidation of nitroarenes: a practical approach for the amidation of natural products. *Tetrahedron Lett*. 2009; 50 (27): 3901-4.
144. Wen H, Yao K, Zhang Y, Zhou Z, Kirschning A. Catalytic transfer hydrogenation of aromatic nitro compounds in presence of polymer-supported nano-amorphous Ni-B catalyst. *Catal Commun*. 2009; 10 (8): 1207-11.
145. Quinn JF, Bryant CE, Golden KC, Gregg BT. Rapid reduction of heteroaromatic nitro groups using catalytic transfer hydrogenation with microwave heating. *Tetrahedron Lett*. 2010; 51 (5): 786-9.
146. Huber D, Andermann G, Leclerc G. Selective reduction of aromatic / aliphatic nitro groups by sodium sulfide. *Tetrahedron Lett*. 1988; 29 (6): 635-8.

147. Banik BK, Mukhopadhyay C, Venkatraman MS, Becker FF. A facile reduction of aromatic nitro compounds to aromatic amines by samarium and iodine. *Tetrahedron Lett.* 1998; 39 (40): 7243-6.
148. Dračinský M, Sejbal J, Rygerová B, Stiborová M. An efficient modification of ellipticine synthesis and preparation of 13-hydroxyellipticine. *Tetrahedron Lett.* 2007; 48 (39): 6893-5.
149. Pehlivan L, Méta y E, Laval S, Dayoub W, Demonchaux P, Mignani G, Lemaire M. Iron-catalyzed selective reduction of nitro compounds to amines. *Tetrahedron Lett.* 2010; 51 (15): 1939-41.
150. Pehlivan L, Méta y E, Laval S, Dayoub W, Demonchaux P, Mignani G, Lemaire M. Alternative method for the reduction of aromatic nitro to amine using TMDS-iron catalyst system. *Tetrahedron.* 2011; 67 (10): 1971-6.
151. Bellamy FD, Ou K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* 1984; 25 (8): 839-42.
152. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005; 61 (46): 10827-52.
153. Zhang L, Wang X, Wang J, Grinberg N, Krishnamurthy D, Senanayake CH. An improved method of amide synthesis using acyl chlorides. *Tetrahedron Lett.* 2009; 50 (24): 2964-6.
154. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc.* 2012; 16 (2): 97-116.
155. Carpino LA, Ionescu D, El-Faham A. Peptide coupling in the presence of highly hindered tertiary amines. *J Org Chem.* 1996; 61 (7): 2460-5.
156. Park J-H, Chang J-S, El-Gamal MI, Choi W-K, Lee WS, Chung HJ, Kim H-I, Cho Y-J, Lee BS, Jeon H-R, Lee YS, Choi YW, Lee J, Oh C-H. Novel amides and esters prodrugs of olmesartan: Synthesis, bioconversion, and pharmacokinetic evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010; 20 (19): 5895-9.
157. Maren TH. Relations between structure and biological activity of sulfonamides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1976; 16 (1): 309-27.
158. Yoshino H, Ueda N, Nijjima J, Sugumi H, Kotake Y, Koyanagi N, Yoshimatsu K, Asada M, Watanabe T. Novel sulfonamides as potential, systemically active antitumor agents. *J Med Chem.* 1992; 35 (13): 2496-7.
159. Skulnick HI, Johnson PD, Howe WJ, Tomich PK, Chong K-T, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Dolak LA, McGrath JP. Structure-based design of sulfonamide-substituted non-peptidic HIV protease inhibitors. *J Med Chem.* 1995; 38 (26): 4968-71.

160. Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Aristoff PA, Johnson PD, Skulnick HI, Dolak LA, Seest EP, Tomich PK, Bohanon MJ, Horng M-M, Lynn JC, Chong K-T, Hinshaw RR, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Thaisrivongs S. Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. *J Med Chem.* 1998; 41 (18): 3467-76.
161. Owa T, Yoshino H, Okauchi T, Yoshimatsu K, Ozawa Y, Sugi NH, Nagasu T, Koyanagi N, Kitoh K. Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle. *J Med Chem.* 1999; 42 (19): 3789-99.
162. Gadad AK, Mahajanshetti CS, Nimbalkar S, Raichurkar A. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanylhydrazone/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives†. *Eur J Med Chem.* 2000; 35 (9): 853-7.
163. Selvam P, Chandramohan M, De Clercq E, Witvrouw M, Pannecouque C. Synthesis and anti-HIV activity of 4-[(1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene) amino]-N(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-benzene sulfonamide and its derivatives. *Eur J Pharm Sci.* déc 2001;14(4):313-6.
164. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med Res Rev.* 2003; 23 (5): 535-58.
165. Mohan R, Banerjee M, Ray A, Manna T, Wilson L, Owa T, Bhattacharyya B, Panda D. Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry.* 2006; 45 (17): 5440-9.
166. Özbek N, Katircioğlu H, Karacan N, Baykal T. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15 (15): 5105-9.
167. Zhao Z, Wolkenberg SE, Lu M, Munshi V, Moyer G, Feng M, Carella AV, Ecto LT, Gabryelski LJ, Lai M-T, Prasad SG, Yan Y, McGaughey GB, Miller MD, Lindsley CW, Hartman GD, Vaccaa JP, Williams TM. Novel indole-3-sulfonamides as potent HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18 (2): 554-9.
168. Lopez M, Paul B, Hofmann A, Morizzi J, Wu QK, Charman SA, Innocenti A, Vullo D, Supuran CT, Poulsen S-A. S-glycosyl primary sulfonamides—A new structural class for selective inhibition of cancer-associated carbonic anhydrases. *J Med Chem.* 2009; 52 (20): 6421-32.
169. Chohan ZH, Youssoufi MH, Jarrahpour A, Ben Hadda T. Identification of antibacterial and antifungal pharmacophore sites for potent bacteria and fungi inhibition: Indolenyl sulfonamide derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010; 45 (3): 1189-99.
170. Fortin S, Wei L, Moreau E, Lacroix J, Côté M-F, Petitclerc É, Kotra LP, Gaudreault RC. Substituted phenyl 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzenesulfonamides as antimitotics. Antiproliferative, antiangiogenic and antitumoral activity, and quantitative structure-activity relationships. *Eur J Med Chem.* 2011; 46 (11): 5327-42.

171. Keche AP, Hatnapure GD, Tale RH, Rodge AH, Kamble VM. Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of novel 1-acetyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro (1*H*) pyrazole derivatives bearing urea, thiourea and sulfonamide moieties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012; 22 (21): 6611-5.
172. Shah SSA, Rivera G, Ashfaq M. Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. *Mini Rev Med Chem*. 2013; 13 (1): 70-86.
173. Bajare S, Anthony J, Nair A, Marita R, Damre A, Patel D, Rao C, Sivaramakris H, Deka N. Synthesis of *N*-(5-chloro-6-(quinolin-3-yloxy)pyridin-3-yl) benzenesulfonamide derivatives as non-TZD peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist. *Eur J Med Chem*. 2012; 58: 355-60.
174. Natarajan A, Guo Y, Harbinski F, Fan Y-H, Chen H, Luus L, Diercks J, Aktas H, Chorev M, Halperin JA. Novel arylsulfoanilide-oxindole hybrid as an anticancer agent that inhibits translation initiation. *J Med Chem*. 2004; 47 (21): 4979-82.
175. Laconde G, Depreux P, Berthelot P, Pommery N, Hénichart J-P. New antiproliferative benzoindolothiazepines derivatives. *Eur J Med Chem*. 2005; 40 (2): 167-72.
176. Purushottamachar P, Khandelwal A, Vasaitis TS, Bruno RD, Gediya LK, Njar VCO. Potent anti-prostate cancer agents derived from a novel androgen receptor down-regulating agent. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16 (7): 3519-29.
177. Manley PW, Breitenstein W, Brügggen J, Cowan-Jacob SW, Furet P, Mestan J, Meijer T. Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004; 14 (23): 5793-7.
178. Nakamura K, Taguchi E, Miura T, Yamamoto A, Takahashi K, Bichat F, Guilbaud N, Hasegawa K, Kubo K, Fujiwara Y, Suzuki R, Kubo K, Shibuya M, Isoe T. KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties. *Cancer Res*. 2006; 66 (18): 9134-42.
179. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelly S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5 (10): 835-44.
180. Dai Y, Hartandi K, Ji Z, Ahmed AA, Albert DH, Bauch JL, Bouska JJ, Bousquet PF, Cunha GA, Glaser KB, Harris CM, Hickman D, Guo J, Li J, Marcotte PA, Marsh KC, Moskey MD, Martin RL, Olson AM, Osterling DJ, Pease LJ, Soni NB, Stewart KD, Stoll VS, Tapang P, Reuter DR, Davidsen SK, Michaelides MR. Discovery of *N*-(4-(3-amino-1*H*-indazol-4-yl)phenyl)-*N*'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Med Chem*. 2007; 50 (7): 1584-97.

181. Cao P, Huang X-F, Ding H, Ge H-M, Li H-Q, Ruan B-F, Zhu H-L. Synthesis and cytotoxic evaluation of substituted urea derivatives as inhibitors of human-leukemia K562 cells. *Chem Biodivers*. 2007; 4 (5): 881-6.
182. Ling S, Xin Z, Zhong J, Jian-xin F. Synthesis, structure, and biological activity of novel 4,5-disubstituted thiazolyl urea derivatives. *Heteroat Chem*. 2008; 19 (1): 2-6.
183. Song D-Q, Wang Y, Wu L-Z, Yang P, Wang Y-M, Gao L-M, Li Y, Qu J-R, Wang Y-H, Du N-N, Han Y-X, Zhang Z-P, Jiang J-D. Benzoylurea derivatives as a novel class of antimitotic agents: synthesis, anticancer activity, and structure–activity relationships. *J Med Chem*. 2008; 51 (11): 3094-103.
184. Song D-Q, Wang Y-M, Du N-N, He W-Y, Chen K-L, Wang G-F, Yang P, Wu L-Z, Zhang X-B, Jiang J-D. Synthesis and activity evaluation of benzoylurea derivatives as potential antiproliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19 (3): 755-8.
185. Song D-Q, Du N-N, Wang Y-M, He W-Y, Jiang E-Z, Cheng S-X, Wang Y-X, Li Y-H, Wang Y-P, Li X, Jiang J-D. Synthesis and activity evaluation of phenylurea derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17 (11): 3873-8.
186. Li H-Q, Zhu T-T, Yan T, Luo Y, Zhu H-L. Design, synthesis and structure–activity relationships of antiproliferative 1,3-disubstituted urea derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009; 44 (2): 453-9.
187. Zhang B, Zhao Y, Zhai X, Wang L, Yang J, Tan Z, Gong P. Design, synthesis and anticancer activities of diaryl urea derivatives bearing *N*-acylhydrazone moiety. *Chem Pharm Bull*. 2012; 60 (8): 1046-54.
188. El-Kashef H, Farghaly AA, Floriani S, Haider N. Synthesis of 3-azaharman and other new azacarbolines of the pyridazino[4,5-*b*]indole type. *Arkivoc*. 2003; 14: 198-209.
189. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100 (1-2): 72-9.
190. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem*. 2011; 46 (10): 4769-807.
191. Lawrence GHM. *Taxonomy of vascular plants*. New York: Macmillan, 1951: 823.
192. Gurib-Fakim A, Schmelzer GH. *Ressources Végétales de l’Afrique tropicale 11 (2). Plantes médicinales 2*. Wageningen: Fondation PROTA, 2013: 418.
193. Rodgers CB, Verotta L. Chemistry and biological properties of the African Combretaceae. Dans: Hostettmann K, Chinyanganya F, Maillard M, Wolfender J-L eds. *Chemistry, biological and pharmacological properties of African medicinal plants*. Harare: University of Zimbabwe Publications, 1996: 121-41.
194. Desta B. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1993; 39 (2): 129-39.

195. Fyhrquist P, Mwasumbi L, Hæggström C-A, Vuorela H, Hiltunen R, Vuorela P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79 (2): 169-77.
196. Kabran GRM, Ambeu NC, Mamyrbékova-Békro JA, Békro Y-A. Total phenols and flavonoids in organic extracts of ten plants used in traditional therapy of breast cancer in Côte d'Ivoire. *Eur J Sci Res.* 2012; 68 (2): 182-90.
197. Osuagwu GGE, Nwoko N. The phytochemical screening and antibacterial activity of the leaves of *Combretum Paniculatum* (Vent), *Solanum Macrocarpon* (L) and *Catharanthus Roseus* (L) G. Don. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2014; 9 (1): 58-65.
198. McGaw LJ, Rabe T, Sparg SG, Jäger AK, Eloff JN, van Staden J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. *J Ethnopharmacol.* 2001; 75 (1): 45-50.
199. de Morais Lima GR, de Sales IRP, Caldas Filho MRD, de Jesus NZT, de Sousa Falcão H, Barbosa-Filho JM, Cabral AG, Souto AL, Tavares JF, Batista LM. Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. *Molecules.* 2012; 17 (12): 9142-206.
200. Asres K, Bucar F, Kartnig T, Witvrouw M, Pannecouque C, De Clercq E. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. *Phytother Res.* 2001; 15 (1): 62-69.
201. Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Kartnig T, Höger G, Thiel W. Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytother Res.* 2001; 15 (4): 323-6.
202. Sowemimo A, Van de Venter M, Baatjies L, Koekemoer T. Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2009; 6 (4): 526-8.
203. Sowemimo A, Van de Venter M, Baatjies L, Koekemoer T. Cytotoxicity evaluation of selected Nigerian plants used in traditional cancer treatment. *J Med Plants Res.* 2011; 5 (11): 2442-4.
204. Steenkamp V, Fernandes AC, van Rensburg CE. Antibacterial activity of Venda medicinal plants. *Fitoterapia.* 2007; 78 (7-8): 561-4.
205. Kumar RP., Shamma J, Nitin G, Rinu R. An inside review of *Amaranthus spinosus* Linn: a potential medicinal plant of India. *Int J Res Pharm Chem.* 2014; 4 (3): 643-53.
206. Agra M de F, de Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17 (1): 114-40.
207. Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR. *In vivo* antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J Ethnopharmacol.* 2006; 103 (2): 236-40.

208. Lin B-F, Chiang B-L, Lin J-Y. *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes *in vitro*. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5 (4): 711-22.
209. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46 (11): 3417-21.
210. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao CV. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Amaranthus spinosus* against CCl₄ induced toxicity. *J Ethnopharmacol*. 2009; 125 (2): 364-6.
211. Kumar BSA, Lakshman K, Jayaveera K, Shekar DS, Kumar AA, Manoj B. Antioxidant and antipyretic properties of methanolic extract of *Amaranthus spinosus* leaves. *Asian Pac J Trop Med*. 2010; 3 (9): 702-6.
212. Kumar BSA, Lakshman K, Nandeesh R, Arun Kumar PA, Manoj B, Kumar V, Shekar DS. *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi J Biol Sci*. 2011; 18 (1): 1-5.
213. Bulbul IJ, Nahar L, Ripa FA, Haque O. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of chloroform, n-hexane and ethyl acetate extract of plant *Amaranthus spinosus*. *Int J PharmTech Res*. 2011; 3 (3): 1675-80.
214. Joshua, LS, Pal VC, Kumar K LS, Sahu RK, Roy A. Antitumor activity of the ethanol extract of *Amaranthus spinosus* leaves against EAC bearing swiss albino mice. *Pharm Lett*. 2010; 2 (2): 10-5.
215. Kumar BSA, Lakshman K, Velmurugan C, Sridhar SM, Gopisetty S. Antidepressant activity of methanolic extract of *Amaranthus spinosus*. *Basic Clin Neurosci*. 2014; 5 (1): 11-7.
216. Zeashan H, Amresh G, Rao CV, Singh S. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2009; 122 (3): 492-6.
217. Hussain Z, Amresh G, Singh S, Rao CV. Antidiarrheal and antiulcer activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Pharm Biol*. 2009; 47 (10): 932-9.
218. Chaudhary MA, Imran I, Bashir S, Mehmood MH, Rehman N, Gilani A-H. Evaluation of gut modulatory and bronchodilator activities of *Amaranthus spinosus* Linn. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:166.
219. Amuthan A, Chogtu B, Bairy KL, Sudhakar, Prakash M. Evaluation of diuretic activity of *Amaranthus spinosus* Linn. aqueous extract in *Wistar* rats. *J Ethnopharmacol*. 2012; 140 (2): 424-7.
220. Baral M, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty P. Pharmacognostic studies on stem and leaves of *Amaranthus spinosus* Linn. *Int J Appl Biol Pharm Technol*. 2011; 2 (1): 41-7.

221. Sangameswaran B, Jayakar B. Anti-diabetic, anti-hyperlipidemic and spermatogenic effects of *Amaranthus spinosus* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Med.* 2007; 62 (1): 79-82.
222. Pousset J-L. *Plantes médicinales d'Afrique, Comment les reconnaître et les utiliser?* Aix-en-Provence: Edisud, 2004: 287.
223. Olaleye MT, Akinmoladun AC, Ogunboye AA, Akindahunsi AA. Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extracts of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48 (8-9): 2200-5.
224. Mahesh AR, Kumar H, Ranganath MK, Devkar RA. Detail study on *Boerhaavia diffusa* plant for its medicinal importance-A review. *Res J Pharm Sci.* 2012; 1 (1): 28-36.
225. Nayak P, Thirunavoukkarasu M. A review of the plant *Boerhaavia diffusa*: its chemistry, pharmacology and therapeutical potential. *J Phytopharm.* 2016; 5 (2): 83-92.
226. Sreeja S, Sreeja S. An *in vitro* study on antiproliferative and antiestrogenic effects of *Boerhaavia diffusa* L. extracts. *J Ethnopharmacol.* 2009; 126 (2): 221-5.
227. Pereira DM, Faria J, Gaspar L, Valentão P, Andrade PB. *Boerhaavia diffusa*: metabolite profiling of a medicinal plant from Nyctaginaceae. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47 (8): 2142-9.
228. Patil KS, Bhalsing SR. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacological properties of the genus *Boerhavia*. *J Ethnopharmacol.* 2016; 182: 200-20.
229. Ahmed B, Yu C-P. Borhavine, a dihydroisofuranoxanthone from *Boerhaavia diffusa*. *Phytochemistry.* 1992; 31 (12): 4382-4.
230. Gupta DR, Ahmed B. A new C-methylflavone from *Boerhaavia diffusa* Linn. roots. *Indian J Chem Sect B Org Incl Med.* 1984; 23 (7): 682-4.
231. Kadota S, Lami N, Tezuka Y, Kikuchi T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. I. Examination of sterols and structures of new rotenoids, boeravinones A and B. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37 (12): 3214-20.
232. Lami N, Kadota S, Kikuchi T, Momose Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. III. Identification of Ca²⁺ channel antagonistic compound from the methanol extract. *Chem Pharm Bull.* 1991; 39 (6): 1551-5.
233. Borrelli F, Ascione V, Capasso R, Izzo AA, Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O. Spasmolytic effects of nonprenylated rotenoid constituents of *Boerhaavia diffusa* roots. *J Nat Prod.* 2006; 69 (6): 903-6.
234. Gupta J, Ali M. Chemical constituents of *Boerhavia diffusa* Linn roots. *Indian J Chem.* 1998; 9 (37): 912-7.

235. Agrawal B, Das S, Pandey A. *Boerhaavia diffusa* Linn.: a review on its phytochemical and pharmacological profile. Asian Journal Appl Sci. 2011; 4 (7): 663-84.
236. Misra AN, Tiwari HP. Constituents of roots of *Boerhaavia diffusa*. Phytochemistry. 1971; 10 (12): 3318-9.
237. Seth RKRK, Khamala, M, Chaudhury M, Singh S, Sarin JPS. Estimation of punarnavosides, a new antifibrinolytic compound from *Boerhaavia diffusa*. Indian Drugs. 1986; 23: 583-4.
238. Maurya R, Sathiamoorthy B, Deepak M. Flavonoids and phenol glycosides from *Boerhaavia diffusa*. Nat Prod Res. 2007; 21 (2): 126-34.
239. Nandi RP, Chatterjee SK. Occurrence of punarnavines in *Boerhaavia repens* Linn. Indian J Exp Biol. 1974; 12 (6): 509-11.
240. Ferreres F, Sousa C, Justin M, Valentão P, Andrade PB, Llorach R, Rodrigues A, Seabra RM, Leitão A. Characterisation of the phenolic profile of *Boerhaavia diffusa* L. by HPLC-PAD-MS/MS as a tool for quality control. Phytochem Anal. 2005; 16 (6): 451-8.
241. Do TML, Truong AV, Vo TN, Pinnock TG, Pratt LM, Guillaume D, Nguyen KPP. New derivatives from the aerial parts of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae). Phytochem Lett. 2013; 6 (4): 544-51.
242. Mehrotra S, Singh VK, Agarwal SS, Maurya R, Srimal RC. Antilymphoproliferative activity of ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. Exp Mol Pathol. 2002; 72 (3): 236-42.
243. Mungantiwar AA, Nair AM, Shinde UA, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, Sainis KB. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. J Ethnopharmacol. 1999; 65 (2): 125-31.
244. Mehrotra S, Mishra KP, Maurya R, Srimal RC, Singh VK. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. Int Immunopharmacol. 2002; 2 (7): 987-96.
245. Madhuri S, Kalasker V, Sreekantha R. Evaluation of diuretic activity of aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* roots in rats. Int J Pharma Bio Sci. 2013; 4 (4): 843-8.
246. Pari L, Satheesh MA. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes. J Ethnopharmacol. 2004; 91 (1): 109-13.
247. Rawat AKS, Mehrotra S, Tripathi SC, Shome U. Hepatoprotective activity of *Boerhaavia diffusa* L. roots - a popular Indian ethnomedicine. J Ethnopharmacol. 1997; 56 (1): 61-6.
248. Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Bighetti EJB, Germónsén Robineou L, Souza Brito ARM. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. J Ethnopharmacol. 2000; 71 (1-2): 267-74.

249. Leyon PV, Lini CC, Kuttan G. Inhibitory effect of *Boerhaavia diffusa* on experimental metastasis by B16F10 melanoma in C57BL/6 mice. *Life Sci.* 2005; 76 (12): 1339-49.
250. Manu KA, Kuttan G. Anti-metastatic potential of punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* Linn. *Immunobiology.* 2009; 214 (4): 245-55.
251. Saraswati S, Alhaider AA, Agrawal SS. Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* exhibits anti-angiogenic activity via downregulation of VEGF in vitro and *in vivo*. *Chem Biol Interact.* 2013; 206 (2): 204-13.
252. Schmelzer GH, Gurib-Fakim A. *Plant Resources of Tropical Africa 11 (1) Medicinal plants 1.* Wageningen: PROTA, 2008: 869.
253. Rajeswari P, Krishnakumari S. *Boerhaavia erecta* - A potential source for phytochemicals and antioxidants. *J Pharm Sci Res.* 2010; 2 (11): 728-33.
254. Petrus AJA, Hemalatha, SS, Suguna G. Isolation and characterisation of the antioxidant phenolic metabolites of *Boerhaavia erecta* L. leaves. *J Pharm Sci Res.* 2012; 4 (7): 1856-61.
255. Govindan P, Muthukrishnan S. Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhaavia erecta*. *J Acute Med.* 2013; 3 (3): 103-9.
256. Thite SV, Chavan YR, Aparadh VT, Kore BA. Preliminary phytochemical screening of some medicinal plants. *Int J Pharm Chem Biol Sci.* 2013; 3 (1): 87-90.
257. Samy RP, Ignacimuthu S, Raja DP. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66 (2): 235-40.
258. Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87 (2-3): 241-6.
259. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93 (1): 123-32.
260. Chabi China TF, Olounlade PA, Salifou S. Monographic study of plant species most used for treatment of common diseases of Somba cattle in Benin. *J Drug Deliv Ther.* 2014; 4 (5): 87-105.
261. Beloin N, Gbeassor M, Akpagana K, Hudson J, de Soussa K, Koumaglo K, Arnason JT. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96 (1-2): 49-55.
262. Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81 (1): 81-100.
263. Assubaie NF, El-Garawany MM. Evaluation of some important chemical constituents of *Momordica charantia* cultivated in Hofuf, Saudi Arabia. *J Biol Sci.* 2004; 4 (5): 628-30.

264. Raman A, Lau C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*. 1996; 2 (4): 349-62.
265. Braca A, Siciliano T, D'Arrigo M, Germanò MP. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 2008; 79 (2): 123-5.
266. Husain J, Tickle IJ, Wood SP. Crystal structure of momordin, a type I Ribosome Inactivating Protein from the seeds of *Momordica charantia*. *FEBS Lett*. 1994; 342 (2): 154-8.
267. Yuan X, Gu X, Tang J. Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica Charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. *Food Chem*. 2008; 111 (2): 415-20.
268. Ahmad Z, Zamhuri KF, Yaacob A, Siong CH, Selvarajah M, Ismail A, Hakim MN. *In vitro* anti-diabetic activities and chemical analysis of polypeptide-k and oil isolated from seeds of *Momordica charantia* (bitter gourd). *Molecules*. 2012; 17 (8): 9631-40.
269. Johnson RC, Houéto EE, Boni G, Kpètèhoto WH, Dougnon V, Pognon E, Assogba F, Loko F, Boko M, Gbénou J. Etude ethnobotanique et phytochimique de *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) à Cotonou au Bénin. *J Appl Biosci*. 2016; 106: 10249-57.
270. Ahmed I, Adeghate E, Sharma AK, Pallot DJ, Singh J. Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998; 40 (3): 145-51.
271. Ahmed I, Lakhani MS, Gillett M, John A, Raza H. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001; 51 (3): 155-61.
272. Sitasawad SL, Shewade Y, Bhonde R. Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state *in vivo* and *in vitro*. *J Ethnopharmacol*. 2000; 73 (1-2): 71-9.
273. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010; 33 (6): 467-71.
274. Welihinda J, Karunanayake EH, Sheriff MHH, Jayasinghe KSA. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacol*. 1986; 17 (3): 277-82.
275. Shih C-C, Lin C-H, Lin W-L, Wu J-B. *Momordica charantia* extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *J Ethnopharmacol*. 2009; 123 (1): 82-90.
276. Jayasooriya AP, Sakono M, Yukizaki C, Kawano M, Yamamoto K, Fukuda N. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in

- rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72 (1-2): 331-6.
277. Kumar R, Balaji S, Uma TS, Sehgal PK. Fruit extracts of *Momordica charantia* potentiate glucose uptake and up-regulate Glut-4, PPAR γ and PI3K. *J Ethnopharmacol.* 2009; 126 (3): 533-7.
278. Fuangchan A, Sonthisombat P, Seubnukarn T, Chanouan R, Chotchaisuwat P, Sirigulsatien V, et al. Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *J Ethnopharmacol.* 2011; 134 (2): 422-8.
279. Rathi SS, Grover JK, Vikrant V, Biswas NR. Prevention of experimental diabetic cataract by Indian Ayurvedic plant extracts. *Phytother Res.* 2002; 16 (8): 774-7.
280. Omoregbe RE, Ikuebe OM, Ihimire IG. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *Afr J Med Med Sci.* 1996; 25 (4): 373-5.
281. Au T, Collins R, Lam T, Ng T, Fong W, Wan DCC. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett.* 2000; 471 (2-3): 169-72.
282. Jiratchariyakul W, Wiwat C, Vongsakul M, Somanabandhu A, Leelamanit W, Fujii I, Suwannaroj N, Ebizuka Y. HIV inhibitor from Thai bitter gourd. *Planta Med.* 2001; 67 (4): 350-3.
283. Sun Y, Huang PL, Li JJ, Huang YQ, Zhang L, Huang PL, Lee-Huang S. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma-associated virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287 (4): 983-94.
284. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *Am J Health Syst Pharm.* 2003; 60 (4): 356-9.
285. Takemoto DJ, Kresie R, Vaughn D. Partial purification and characterization of a guanylate cyclase inhibitor with cytotoxic properties from the bitter melon (*Momordica charantia*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1980; 94 (1): 332-9.
286. Alam S, Asad M, Asdaq SMB, Prasad VS. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123 (3): 464-9.
287. Gürbüz İ, Akyüz Ç, Yeşilada E, Şener B. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71 (1-2): 77-82.
288. Naseem MZ, Patil SR, Patil SR, Ravindra, Patil SB. Antispermatogetic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 1998; 61 (1): 9-16.
289. Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in

- Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69 (2): 139-55.
290. Biswas AR, Ramaswamy S, Bapna JS. Analgesic effect of *Momordica charantia* seed extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 1991; 31 (1): 115-8.
 291. Choi J, Lee K-T, Jung H, Park H-S, Park H-J. Anti-rheumatoid arthritis effect of the *Kochia scoparia* fruits and activity comparison of momordin Ic, its prosapogenin and sapogenin. *Arch Pharm Res.* 2002; 25 (3): 336-42.
 292. Lii C-K, Chen H-W, Yun W-T, Liu K-L. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122 (2): 227-33.
 293. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71 (1-2): 23-43.
 294. Houghton PJ, Raman A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts Boston, MA: Springer US, 1998: 205
 295. http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-420-toxicite-orale-aigue-methode-de-la-dose-predeterminee_9789264070950-fr. Consulté le 22 décembre 2016. Graham LP. An introduction to medicinal chemistry. 5ème édition. Oxford: Oxford University Press; 2012. 798 p.
 296. Moreau D, Jacquot C, Tsita P, Chinou I, Tomasoni C, Juge M, Antoniadou-Vyza E, Martignat L, Pineau A, Roussakis C. Original triazine inductor of new specific molecular targets, with antitumor activity against nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2008; 123 (11): 2676-83.
 297. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55-63.
 298. Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn PS, Tang L, Tao Jiang, Liang D-C, Galons H, Dierick J-F, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schaëchtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem.* 2005; 280 (35): 31208-19.
 299. Lawson M, Rodrigo J, Baratte B, Robert T, Delehouzé C, Lozach O, Ruchaud S, Bach S, Brion J-D, Alami M, Hamze A. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of imidazo[1,2-a]pyridines derivatives as protein kinase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2016; 123: 105-14.
 300. Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JPJ, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros J-G, Moulinoux J-P. Biochemical and cellular effects of Roscovitine, a potent and selective inhibitor of the Cyclin-Dependent Kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem.* 1997; 243 (1-2): 527-36.

301. Reinhardt J, Ferandin Y, Meijer L. Purification of CK1 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr Purif.* 2007; 54 (1): 101-9.
302. Sowemimo A, van de Venter M, Baatjies L, Koekemoer T, Adesanya S, Lin W. Cytotoxic compounds from the leaves of *Combretum paniculatum* Vent. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11 (20): 4631-5.

Thèse de Doctorat

Nathalie Gisèle AMOUSSOU

Conception, synthèse, extraction phytochimique et étude biologique d'inhibiteurs potentiels de kinases à visée anticancéreuse

Design, synthesis, phytochemistry and biological studies of kinases inhibitors as potential anti-cancer agents

Résumé

Les protéines kinases constituent un groupe d'enzymes jouant un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. La kinase Haspin est une sérine/thréonine kinase appartenant au groupe des protéines kinases atypiques. A ce jour, son seul substrat connu est l'histone H3. Elle joue un rôle important au cours de la mitose notamment dans la cohésion des chromosomes. Du fait de ce rôle primordial, la kinase Haspin constitue une cible de choix dans la thérapie anticancéreuse.

Ce travail a pour objectif principal la valorisation des structures d'origine naturelle dans une application anti-proliférative ou immunomodulatrice potentielle. Elle est organisée en deux parties:

-la première partie est constituée d'un travail de pharmacomodulation d'une structure connue pour améliorer ses caractéristiques physico-chimiques ainsi que son activité biologique. Le modèle utilisé, une structure 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole, est inspiré du scaffold fourni par les grossularines A et B. Les nouveaux analogues synthétisés ont été testés sur un panel de kinases et sur deux lignées cancéreuses.

-la deuxième partie repose sur l'étude d'extraits éthanoliques de cinq plantes de la pharmacopée traditionnelle béninoise : *Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia diffusa* et *Combretum paniculatum*. Les tests phytochimiques réalisés ont permis d'identifier les différents groupes de métabolites contenus dans ces plantes. Un test de toxicité aiguë a aussi été réalisé avec ces extraits. Après fractionnement de l'extrait total de *Combretum paniculatum*, les différentes fractions ont été testées sur un panel de kinases.

Mots clés

8-amino-4-oxo-3,4-5H-pyridazino[4,5-b]indole – sérine/thréonine kinase – Haspin – CLK1 – DYRK1A – Aurora B – inhibiteur – produits naturels

Abstract

Proteins kinases constitute a large group of enzymes that catalyze that play an essential role in the several cellular processes. Haspin, a serine/threonine kinase, is often classified as an atypical member of eukaryotic protein kinase family. The only substrate of Haspin identified to date is histone H3. Haspin plays an important role during mitosis and appears to be vital for maintaining chromosome cohesion. Due to its important role during mitosis, Haspin may have therapeutic utility in treating cancer.

The aim of this work was to identify and valorize natural product as effective anti-cancer agents. This work is divided in two parts:

- Firstly, we modulated a known structure to improve physico-chemical characteristics as well as biological activity. 8-amino-4-oxo-3,4-dihydro-5H-pyridazino[4,5-b]indole scaffold based on the grossularines A and B structure was designed. These new analogs were tested against many kinases and also evaluated against two human cancer cell lines.

- In the second part, we studied five Beninese traditional medicine plants extracts: *Amaranthus spinosus*, *Momordica charantia*, *Boerhaavia erecta*, *Boerhaavia diffusa* and *Combretum paniculatum*. Phytochemical studies revealed that these plants have several active constituents. Acute toxicity studies were performed with plants extracts. After fractionation of the total extract of *Combretum paniculatum*, the various fractions were tested against many kinases.

Key Words

8-amino-4-oxo-3,4-5H-pyridazino[4,5-b]indole – serine/threonine kinase – Haspin – CLK1 – DYRK1A – Aurora B – inhibitor – natural products

