Numéro d'ordre : DU 2518

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
(U.F.R. Recherche Scientifique et Technique)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° 807

THESE
présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Chimie Organique Biologique)

Par

Delphine VIVIER

Diplômée du Master de Recherche de l'Université Blaise Pascal

Vers de Nouveaux Antalgiques : Optimisation de Molécules Activatrices des Canaux Potassiques TREK-1

Soutenance publique le 5 décembre 2014, devant la Commission d'Examen :

Président :	
Alain Eschalier	Professeur Université d'Auvergne, Clermont Ferrand
Rapporteurs :	
Delphine Joseph	Professeur Université Paris-Sud, Paris
Laurent Désaubry	Directeur de recherche CNRS Université de pharmacie de Strasbourg, Illkirch
Pierre Francotte	Premier Assitant de recherche Université de Liège, Liège
Examinateurs :	
Khalil Bennis	Maître de conférences ENS de Chimie de Clermont Ferrand
Sylvie Ducki	Professeur ENS de Chimie de Clermont-Ferrand
Florian Lesage	Directeur de recherche CNRS IPMC, Valbonne
Jérôme Busserolles	Maître de conférences Université d'Auvergne, Clermont Ferrand

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Mr Khalil Bennis, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, pour sa patience à mon égard et la confiance qu'il a su placé en moi à la fin de mes années d'élève ingénieur, ce qui m'a permis de prendre rapidement de nombreuses initiatives dans mes recherches. Son humour a rendu ces trois années beaucoup plus légères. Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Sylvie Ducki pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Conception Et Synthèse de Molécules Antalgiques (CESMA) et pour m'avoir initiée à la chimie médicinale. Leurs conseils ont été précieux lors de la rédaction du manuscrit et de la préparation de l'oral.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Delphine Joseph, Professeur à l'Université Paris-Sud et à Messieurs Laurent Désaubry, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Pharmacie de Strasbourg et Pierre Francotte, Premier Assistant à l'Université de Liège, pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs. Leurs précieux conseils m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je remercie également le Professeur Alain Eschalier, Président du cluster Analgésia et qui est à l'origine de cette collaboration entre chimistes et biologistes pour avoir présidé lors de mon jury de thèse. Mes plus sincères remerciements vont aussi à Messieurs Florian Lesage, Directeur de Recherche CNRS à l'IPMC et Jérôme Busserolles, Maître de conférences à l'Université d'Auvergne, pour leur coopération dans ce projet et leur participation à ma soutenance de thèse en tant qu'examinateurs. Ils m'ont tous deux accueillie chaleureusement au sein de leur équipe afin que je puisse réaliser des tests biologiques, *in vivo* ou *in vitro* et j'ai beaucoup appris grâce à eux. Je tiens d'ailleurs à remercier tous les membres de ces équipes et plus particulièrement Franck Châtelain, Delphine Bichet et Sylvain Feliciangeli pour leur soutien lors de mon séjour à Nice. J'aimerais aussi exprimer ma gratitude au Docteur Ismail Ben Soussia, qui a réalisé les tests d'électrophysiologie durant ma dernière année de thèse, pour son implication très rapide dans le sujet et sa disponibilité lors de la rédaction. Je remercie également Laëtitia Prival, qui a participé à la plus grande partie des campagnes de tests *in vivo* et qui s'est toujours montrée enthousiaste. Je la remercie aussi pour la qualité et la clarté de ses rapports.

J'adresse également mes remerciements aux permanents de l'équipe CESMA, Messieurs Yves Troin et Pierre Chalard, pour leur soutien au cours de ces trois années. Je remercie particulièrement Isabelle Ripoche, dite Miniboss et Isabelle Thomas, ma binôme de sushis, pour leurs précieux conseils en synthèse organique, pour leur implication dans les commandes de produits et surtout pour leur bonne humeur grâce à laquelle nous avons passé des repas de midi animés ! Mes remerciements vont aussi à Safia, qui a partagé nos repas et sur laquelle on peut toujours compter si on manque de matériel !

Je remercie également les anciens du labo, en commençant par Naoual Bouzidi, ma super voisine de bureau, pour ses conseils et ses encouragements ; Aurélie, ma grande marraine, Nuno pour l'avancement des travaux et Alex, pour ses farces et retournements de bureau intempestifs !

J'exprime ma plus grande gratitude à « mes petits », qui ont participé à ce projet de recherche, pour leur bonne humeur et leur implication : Arnaud, Srikanth, Romain C., Aurélien, Etienne, Mathieu. Je remercie plus particulièrement Guillaume, qui m'a supporté pendant 6 mois et avec qui j'ai revisité les tubes de Manau et autres dans le labo ! Je remercie aussi Nishanth (mon presque-petit) pour avoir été mon acolyte pendant plusieurs congrès ; Geoffrey, le DJ attitré du labo 3, qui m'a soutenue pendant la rédaction et qui s'est arraché les cheveux sur les sucres ; Romain J., kéké du 42 et le plus fervent supporteur de l'ASSE, qui a partagé mon bureau ces derniers mois et puis Gary, mon premier « petit », mon binôme de shopping, de matchs de l'ASM, de voyages, de craquages (grand jeté, grand jeté, petit pas petit pas… Ye peux ondule mais yé pas envie!) et de soirées!

Je tiens aussi à remercier les autres stagiaires, doctorants et post-doctorants avec lesquels nous avons passés des soirées mémorables : Clémentine, Nadia, Muriel, Pierre J., Skippy, Michela, Houssein, Magali, Carlos, Audrey, Egon, Nadège, Camille, Arthur, Ombeline, Quentin, Jayden, Steven, Li, Cosmin, Roxana, Oana, Livia.

Ensuite j'adresse mes remerciements aux « filles de la danse » (Sabrina, Marion, Laëtitia, Solène, Sophie, Elodie, Clara, Emilie, Emma, Audrey, Laura) et à ma super prof Cryslaine qui m'a tout appris sur les posters de petits chats et de coucher de soleil ! Merci de m'avoir supportée et soutenue pendant ces trois ans, de m'avoir fait rire (et même pleurer de rire) et d'avoir été présentes à chaque instant, notamment pour arroser mes nombreux anniversaires !! Une mention spéciale à ma Sab, partenaire de danse, de pole, de soirées, de vacances, qui est devenue tout simplement indispensable pendant ces trois ans : une véritable amie en fait !

J'adresse aussi un grand merci à Laëtitia M., amie de toujours, qui est restée fidèle au poste malgré mon manque de temps.

Finalement, je voudrais remercier ma famille (les Déchelotte, les Roux, Les Vivier, Les Foret et Domi), venue en nombre m'encourager le jour de la soutenance, et plus particulièrement mes parents et ma sœur, pour m'avoir permis de réaliser ses longues années d'étude et pour avoir eu confiance en moi. Je remercie bien sûr Pierre, le meilleur anti-stress au monde, pour son soutien infaillible et sa présence pendant la période de rédaction et surtout d'avant soutenance !

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS 9

ABREVIATIONS 15

GLOSSAIRE 17

CHAPITRE 1 LA DOULEUR 23

1.1 INTRODUCTION 23
1.2 DIFFERENTS TYPES DE DOULEUR 25
1.2.1 DOULEUR AIGUË – DOULEUR CHRONIQUE 25
1.2.2 LES DOULEURS PAR EXCES DE STIMULATIONS NOCICEPTIVES 26
1.2.3 LES DOULEURS NEUROPATHIQUES 26
1.2.4 LES DOULEURS PSYCHOGENES 26
1.3 LE MECANISME DE LA DOULEUR 27
1.4 BESOIN DE NOUVEAUX ANTALGIQUES 29

CHAPITRE 2 LES CANAUX IONIQUES 30

2.1 GENERALITES 30
STRUCTURE GENERALE 31
2.2 LES CANAUX IONIQUES ET LA DOULEUR 32
2.2.1 LA TRANSDUCTION 34
2.2.2 LA PROPAGATION DU MESSAGE NOCICEPTIF 38
2.2.3 LA TRANSMISSION ET LA MODULATION DU SIGNAL NOCICEPTIF 39
2.3 LES CANAUX POTASSIQUES 40
2.3.1 TYPOLOGIE DES CANAUX POTASSIQUES 41
2.3.2 VERS DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES 43

CHAPITRE 3 LE CANAL TREK-1 45

3.1 STRUCTURE ET FONCTION 45
3.1.1 LES CANAUX K_{2P} 45
3.1.2 LES CANAUX TREK-1 46
3.2 TREK-1 EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE 49
3.3 TREK-1 ET DOULEUR 50
3.3.1 IMPLICATION DU CANAL TREK-1 DANS LE MECANISME D'ACTION DE LA MORPHINE 50
3.3.2 INTERET DU CANAL TREK-1 51
3.4 MODULATEURS DU CANAL TREK-1 52
3.5 BILAN DES TRAVAUX ANTERIEURS 54
3.6 OBJECTIFS 56

CHAPITRE 4 CARACTERISATION DES MOLECULES « *LEAD* » 61

4.1 SYNTHESE DU CDC 8 ET DES MOLECULES 11-13 61
4.2 CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES 63
4.2.1 LE TEST D'IRWIN 64

4.2.2 LE TEST AU FORMOL (*FORMALIN ASSAY*) 64
4.2.3 LE TEST DE LA PLAQUE CHAUDE (*HOT PLATE ASSAY*) 67
4.2.4 LE TEST A LA CARRAGHENINE 69
4.2.5 LES TESTS SUR SOURIS INVALIDEES POUR LE GENE TREK-1 (TREK-1$^{-/-}$) 71
4.2.6 ELECTROPHYSIOLOGIE SUR CELLULES 75
4.3 CONCLUSION 79

CHAPITRE 5 EXPLORATION STRUCTURALE 83

5.1 CONCEPTION DE NOUVELLES MOLECULES A PARTIR DU NOYAU AR = CATECHOL 83
5.1.1 SYNTHESE D'ANALOGUES CATECHOL 24-27 88
5.1.2 EVALUATION DE L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DES ANALOGUES CATECHOL 18A, 24-27 90
5.1.3 CONCLUSION 100
5.2 MODIFICATION DU NOYAU AROMATIQUE AR 100
5.2.1 CHOIX DES NOYAUX AROMATIQUES AR 100
5.2.2 SYNTHESE DES ESTERS 36-43 104
5.2.3 RESULTATS DES TESTS *IN VIVO* ET *IN VITRO* 104
5.2.4 PHARMACOCINETIQUE 111
5.2.5 CONCLUSION 111
5.3 OPTIMISATION DES ESTERS ETHYLIQUES 36, 40 ET CYCLOHEXYLIQUES 40, 42. 114
5.3.1 MODIFICATIONS ISOSTERIQUES DES ESTERS 114
5.3.2 MODIFICATIONS DU NOYAU AROMATIQUE AR 131
5.4 CONCLUSION 140

CHAPITRE 6 EVALUATION PHARMACOLOGIQUE COMPLEMENTAIRE 146

6.1 ACTIVATION DES CANAUX TREK-1 146
6.2 IMPLICATION DU CANAL TREK-1 DANS L'ACTIVITE ANTALGIQUE 149
6.3 ACTIVATION INDIRECTE : IMPLICATION DU RECEPTEUR MGLUR4? 151
6.4 IMPLICATION DES CANAUX TREK-2 DANS LE MECANISME *IN VIVO* DES COMPOSES 12 ET 13 153
6.5 MODELE DE DOULEUR INFLAMMATOIRE : TEST A LA CARRAGHENINE 154
6.6 INFLUENCE DU MODE D'ADMINISTRATION 158
6.7 CONCLUSION 159

CHAPITRE 7 VERS LA SYNTHESE DE *BI-DRUGS* 161

7.1 PRINCIPE ET INTERETS DES *BI-DRUGS* 161
7.2 *BI-DRUG* AVEC LE PARACETAMOL 163
7.2.1 CHOIX DU PARACETAMOL 163
7.2.2 SYNTHESE 166
7.2.3 EVALUATION DE L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE 169
7.3 *BI-DRUG* AVEC LE NEFOPAM 170
7.3.1 CHOIX DU NEFOPAM 170
7.3.2 SYNTHESE 174
7.3.3 EVALUATION PHARMACOLOGIQUE 180
7.4 CONCLUSION 182

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES 185

8.1 CONCLUSION GENERALE 185
8.2 PERSPECTIVES 189

CHAPITRE 9 PARTIE EXPERIMENTALE 193

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Allodynie et hyperalgésie[2] 17
Figure 2 : Cascade de réaction déclenchée par les protéines G et leurs récepteurs couplés[4] ... 18
Figure 3 : Exemples des récepteurs métabotropiques[4] 19
Figure 4 : Prévalence de la douleur chronique dans le monde[7] 23
Figure 5 : Principales causes de douleur chronique[8] 24
Figure 6 : Impact de la douleur chronique sur les activités quotidiennes[9] 24
Figure 7 : Mécanisme de la douleur[13] 28
Figure 8 : Transport des ions potassium, calcium sodium et chlorure dans la cellule 31
Figure 9 : Structure générale d'un canal ionique[18] 32
Figure 10 : Fibres nerveuses responsables de la conduction de la douleur[13] 33
Figure 11 : A Implication des canaux ioniques dans le mécanisme douloureux[adapté de 21] 34
Figure 12 : Les différents TRP[24] 35
Figure 13 : Transmission du message nociceptif au niveau de la synapse[43] 39
Figure 14 : Rayons ioniques[46] 40
Figure 15[49] : a. Représentation du canal Kcsa de la bactérie *Streptomyces Lividans*.. 41
Figure 16 : Arbre phylogénétique des sous-unités potassiques de mammifères.[50] 42
Figure 17 : Séquence signature pour différents canaux potassiques K_{1P} (K_v1.1, KcsA) et K_{2P} (TWIk-1, TASK-1 et TREK-1).[33] 43
Figure 18 : Arbre phylogénétique des sous-unités de la famille K_{2P}[50] 45
Figure 19 : Structure dans canaux TREK-1[50] 46
Figure 20 : Séquence d'acides aminés du canal TREK-1[63] 46
Figure 21 : Structure du canal TREK-1[adapté de 64] 47
Figure 22 : Mécanisme d'ouverture proposé par Piechotta *et al*[67] 48
Figure 23 : Activation polymodale du canal TREK-1[adapté de 72] 49
Figure 24 : Schéma récapitulatif. Intérêt du canal TREK-1. 52
Figure 25 : Activateurs des canaux TREK-1 53
Figure 26 : Activateurs des canaux TREK-1 découverts plus récemment 54
Figure 27 : Pharmacophores des analogues long 55
Figure 28 : Molécules « tête de série » 56
Figure 29 : Résultat du test au formol 65
Figure 30 : Effet-dose sur le test au formol pour le composé 12 67
Figure 31 : Activité antinociceptive (latence avant l'apparition de la douleur) du CDC 8 et des acides 11, 12, 13 (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude, 30 et 45 min après l'injection. 68
Figure 32 : Exemple de courbe de cinétique pour le composé 12 68
Figure 33 : Test à la carraghénine sur le composé 12 70

Figure 34 : Test à la carraghénine sur le composé 13 71
Figure 35 : Implication de TREK-1 dans l'effet du catéchol 11 72
Figure 36 : Implication de TREK-1 dans l'effet du furane 12 73
Figure 37 : Implication de TREK-1 dans l'effet de l'indole 13 73
Figure 38 : configurations du patch-clamp[99] 76
Figure 39 : Montage de la cellule entière[100] 77
Figure 40 : Radar-plot des propriétés *drug-like* du CDC 8, du catéchol 11, furane 12 et de l'indole 13 81
Figure 41[102] : Analogie avec les dérivés de l'acide caféique 83
Figure 42 : Représentation de l'hydrophobicité à l'aide de molinspiration[109] 94
Figure 43 : représentation radar des propriétés *drug-like* 95
Figure 44 : Stabilité métabolique du CDC 8 : profil HPLC au cours du temps 97
Figure 45 : Stabilité métabolique de l'acide 11 : profil HPLC au cours du temps 98
Figure 46: Stabilité métabolique de l'ester 24 : profil HPLC au cours du temps 99
Figure 47 : Stabilité métabolique de l'ester 26 : profil HPLC au cours du temps 99
Figure 48 : Réactions chimiques du catéchol dans l'environnement et la cellule[88] 101
Figure 49 : Visualisation du Molecular Lipophilicity Potential à l'aide du logiciel molinspiration[109] 108
Figure 50 : Radar-plot des propriétés pharmacocinétiques des furanes 110
Figure 51 : Radar-plot des propriétés pharmacocinétiques des indoles 110
Figure 52 : Premier site d'interaction 112
Figure 53 : Deuxième site d'interaction 113
Figure 54 : Modifications 117
Figure 55 : Radar-plot des propriétés pharmacocinétiques des furanes 12 et 55 129
Figure 56 : Radar-plot des propriétés pharmacocinétiques des indoles 42 et 59 130
Figure 57 : Hypothèse sur le site d'interaction 144
Figure 58 : Courbe effet-dose pour l'ester 18b et calcul de EC_{50} 147
Figure 59 : Comparaison des courbes effet-dose pour le CDC 8, le ML-67 et les analogues 12, 18b, 25-26 148
Figure 60 : Comparaison des résultats du test de la plaque chaude chez les souris WT et TREK-$2^{-/-}$ pour l'acide 12 154
Figure 61 : Comparaison des résultats du test de la plaque chaude chez les souris WT et TREK-$2^{-/-}$ pour l'acide 13 154
Figure 62 : Test à la carraghénine sur le composé 38 156
Figure 63 : Test à la carraghénine sur le composé 42 156
Figure 64 : Test à la carraghénine sur le composé 55 157
Figure 65 : Test à la carraghénine sur le composé 59 157
Figure 66 : Représentation graphique des aires sous la courbe pour les analogues 158
Figure 67 : Analgésiques arrivés sur le marché entre 1990 et 2010.[133] 161

Figure 68 : Paracétamol 163
Figure 69 : Rôle des COX [136] 164
Figure 7 0 : Implication des canaux TRPV1 dans le mécanisme d'action du paracétamol[142] 165
Figure 71 : *Bi-drug* avec le *p*-aminophénol 167
Figure 72 : Nombre de crampes au cours du temps pour l'amide 91 170
Figure 73 : Néfopam 170
Figure 74 171
Figure 75 : Métabolites du néfopam 172
Figure 76 : Stratégie de combinaison du CDC et du Néfopam® 174
Figure 77 : Perspectives 189

Tableau 1: Quelques antagonistes des TRPV1[30] 37
Tableau 2 : Résultats du test au Formol 66
Tableau 3 : Résultats du test de la plaque chaude 69
Tableau 4 : Implication des canaux TREK-1 dans l'effet antalgique 74
Tableau 5 : Implication des canaux TREK-1 dans l'effet antalgique du test au formol 75
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des configurations patch-clamp[97] 77
Tableau 7 : Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp). 78
Tableau 8: Résultats *in vivo* et *in vitro* des molécules *lead* 8, 11-13 et du ML-67 80
Tableau 9 : Propriétés d*rug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 87
Tableau 10 : effet-dose pour la molécule *lead* CDC 8 91
Tableau 11 : récapitulatifs des résultats biologiques 92
Tableau 12 : Volume moléculaire déterminés à l'aide du logiciel molinspiration[108] 93
Tableau 13 : Inflluence de l'hydrophobicité du groupe ester 93
Tableau 14 : Temps de demi-vie des molécules 8, 11, 24 et 26 96
Tableau 15 : Propriétés *drug-like* de la série des furanes déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 102
Tableau 16 : Propriétés *drug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 103
Tableau 17 : récapitulatifs des résultats biologiques 105
Tableau 18 : Influence du volume moléculaire[108] 109
Tableau 19 : Comparaison des temps de demi-vie des acide *lead* 12-13 et des esters 36, 38, 40, 42 111
Tableau 20 : Volume des différents esters déterminés à l'aide du logiciel molinspiration[108] 113

Tableau 21 : Propriétés d*rug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 116
Tableau 22 : Evaluation pharmacologique des analogues 45-47 119
Tableau 23 : Inflluence de l'hydrophobicité du groupe ester 120
Tableau 24 : Influence du volume moléculaire et du logP pour la série indole[108] 120
Tableau 25 : Propriétés *drug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 122
Tableau 26 : Formation des composés 70-72 126
Tableau 27 : Tentatives d'obtention du composé 61 126
Tableau 28 : Récapitulatif des résultats biologiques *in vivo* et *in vitro* 128
Tableau 29 : Influence du volume moléculaire et de l'hydrophobicité[108] 130
Tableau 30 : Constantes d'hydrophobicité des différents noyaux calculée selon la méthode proposée par Mannhold et Rekker[112] 132
Tableau 31 : Propriétés *drug-like* de la série esters éthyliques déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 133
Tableau 32 : Propriétés *drug-like* de la série esters cyclohexyliques déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 134
Tableau 33 : Evaluation pharmacologique des analogues 73-84 138
Tableau 34 : influence du LogP et du volume moléculaire[108] 140
Tableau 35: influence du LogP et du volume moléculaire[108] 140
Tableau 36 : Analogues classés selon les groupes A, B, C, D. 142
Tableau 37 : propriétés des molécules de la catégorie A 143
Tableau 38 : Concentration efficace médium (EC_{50}) des activateurs de TREK-1 148
Tableau 39: Récapitulatif des résultats des molécules sélectionnées 149
Tableau 40 : Tests sur souris invalidées pour le gène TREK-1 150
Tableau 41 : Molécules sélectionnées pour les tests sur souris TREK-$1^{-/-}$ 151
Tableau 42 : Implication des récepteurs $mGluR_4$ dans l'activation des canaux TREK-1 152
Tableau 43 : Molécules sélectionnées pour les tests sur souris $mGluR_4^{-/-}$ 153
Tableau 44 : Molécules sélectionnées pour le test à la carraghénine 155
Tableau 45 : Valeurs des aire sous la courbe pour les analogues 12-13, 38, 42, 55, 59 (100 mg/kg) 158
Tableau 46 : Comparaison du mode d'administration 159
Tableau 47: Propriétés *drug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 167
Tableau 48 : Evaluation pharmacologique de la *bi-drug* 91 169
Tableau 49 : Propriétés *drug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108] 175
Tableau 50 : Evaluation pharmacologique de la morpholine 97 181
Tableau 51 : Propriétés de l'amide 97[108] 181

Tableau 52 : Classement des 36 analogues en fonction de leurs activités *in vivo* et *in vitro*. 186
Tableau 53 : Récapitulatif des molécules les plus prometteuses 188

ABREVIATIONS

Ac : acétate
AC : adénylate cyclase
ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme Excrétion Toxicité
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdien
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APTS, H_2O : acide *p*-toluènesulfonique monohydrate
ASIC : Acid Sensing Ion Channel
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BK : Big conductance calcium-activated K^+ channel
CAPE : Caffeic Acid Phenylethyl Ester
CB_1 : Cannabinoid Type 1
CDC : Cinnamyl-1-3,4-dihydro-alpha-cyanocinnamate
clogP : logP calculé, abrégé logP dans le manuscrit
CNS : Central Nervous System
COX : cyclo-oxygénase
DCC : *N*,*N*′-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : diméthylformamide
EC_{50} : concentration efficace médiane
Et_3N : triéthylamine
EtOAc : acétate d'éthyle
EtOH : éthanol
EtONa : Ethanolate de sodium
FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase
GDP : guanosine diphosphate
GFG : Glycine Phénylalanine Glycine
GIRK : G protein-coupled inwardly-rectifying K^+ channel
GTP : guanosine triphosphate
GYG : Glycine Tyrosine Glycine
HBA : Hydrogen Bond Acceptor
HBD : Hydrogen Bond Donor
HEK : Human Embryonic Kidney
HPLC : High Performance Liquide Chromatography
IC_{50} : concentration efficace inhibitrice médiane
IP : intrapéritonéale

K_1P : One-Pore Domain K^+ Channel
K_2P : Two-Pore Domain K^+ Channel
Kcsa : potassium crystallographically-sited activation
KO : knockout
KOH : hydroxyde de potassium
K_2CO_3: carbonate de potassium
MeOH : méthanol
mGluR : récepteur métabotropique au glutamate
MLP : Molecular Lipophilicity Potential
p-AP : *para*-aminophénol
Pd/C: palladium sur charbon
PGG_2 : prostaglandine G_2
PGH_2 : prostaglandine H_2
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PSA : Polar Surface Area
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
ROS : Reactive Oxygen Species
SK : Small conductance calcium-activated K^+ channel
Tamb : température ambiante
TASK : TWIK-related acid-sensitive K^+ channel
TBAF : fluorure de tetrabutylammonium
TBDMSCl : chlorure de ter-butyldiméthylsilane
TFA : Acide trifluoroacétique
TFAA : Anhydride trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TMSCl: chlorure de triméthylsilane
TRAAK : TWIK-related arachidonic acid stimulated K^+ channel
TREK : TWIK related K^+ channel
TRESK : TWIK-related spinal cord K^+ channel
TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrine
TRPM : Transient Receptor Potential Melastatine
TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloïde
TVGYG : Thréonine Valine Glycine Tyrosine Glycine
TWIK : the weakly inward rectifying K+ channel
WT : wild type

GLOSSAIRE

Analgésique/ Antalgique : Les antalgiques ont pour but de diminuer la douleur tandis que les analgésiques sont conçus pour l'éliminer. Par définition, les antalgiques (paracétamol, AINS) sont donc moins puissants que les analgésiques (opiacés telle que la codéine jusqu'aux opioïdes forts telle que la morphine).

Action centrale / action périphérique : Un antalgique peut avoir une action périphérique, au niveau de la lésion ou agir au niveau central sur les mécanismes de contrôle de la douleur.

Allodynie : douleur ressentie par un sujet après un stimulus normalement indolore. On parle d'allodynie lorsque les fibres à bas seuil sont impliquées (fibres du toucher).[1] **U**n stimulus normalement non nociceptif va être perçu comme douloureux par le patient. Une allodynie peut toucher une ou plusieurs parties du corps et est généralement due à une lésion des terminaisons nerveuses. Les douleurs ne sont pas traitables par des antalgiques classiques et le traitement repose le plus souvent sur un processus de rééducation de la sensibilité.

Hyperalgésie : douleur accrue pour un stimulus douloureux. Elle correspond à une augmentation de la réponse au dessus du seuil douloureux mais aussi à un abaissement du seuil douloureux.[1]

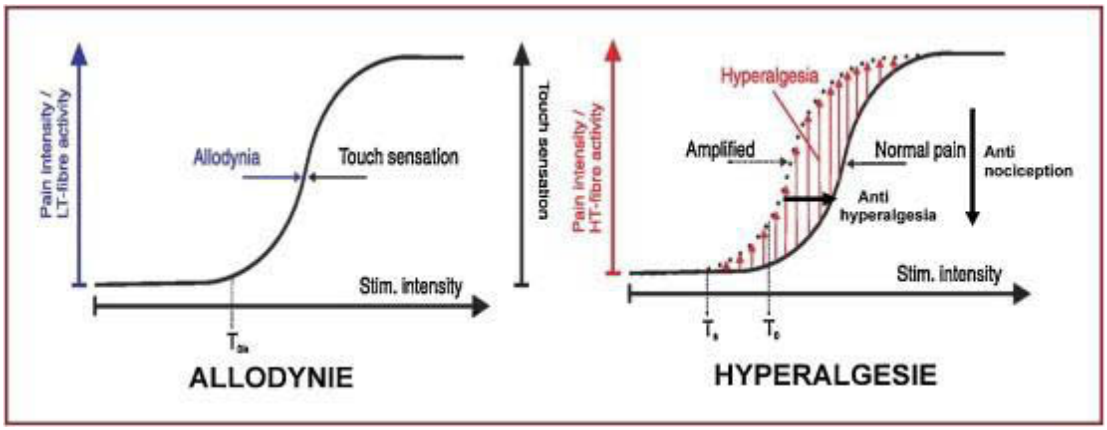


Figure 1 : Allodynie et hyperalgésie[2]

La Figure 1 illustre la différence entre ses deux notions. A gauche, pour un sujet sain, la sensation évoquée est le toucher (échelle noire) alors qu'en cas d'allodynie, la sensation évoquée est la douleur (échelle bleue). A droite, la courbe de sensibilité normale est décalée vers la gauche : le seuil douloureux est abaissé et les réponses sont augmentées pour un même stimulus.

***Lead* (tête de série, chef de file)** : composé chimique possédant une activité pharmacologique ou biologique intéressante mais qui peut encore être optimisé pour mieux s'adapter à la cible.

Substance P : neuropeptide membre de la famille des tachykinines, impliqué dans le mécanisme douloureux: il est libéré par les terminaisons des fibres nociceptives et va se fixer sur les récepteurs spécifiques, permettant ainsi la transmission et la modulation du message nociceptif.[3]

Protéines G : protéines permettant le transfert d'informations à l'intérieur de la cellule (participation à la transduction du signal) en utilisant l'énergie de la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques. Elles sont constituées de sous-unités G_α et $G_{\beta\gamma}$ étroitement liées entre-elles. Ils existent différentes sous-unités α, parmi lesquelles on retrouve G_S (active l'adénylase cyclase), G_q (active la phospholipace C) et G_i (inhibe l'adénylase cyclase). Elles peuvent être couplées à un récepteur (récepteur couplé aux protéines G, RCPG). La liaison du premier messager (médiateur) sur le récepteur va permettre à la protéine G de transmettre l'information à une enzyme effectrice qui va réaliser la synthèse d'un second messager (Figure 2). Celui-ci stimule alors les enzymes catalysant la greffe d'atomes de phosphore (kinases) sur les protéines, ce qui entraine des réponses cellulaires aux stimulations déclenchées au niveau extracellulaire.

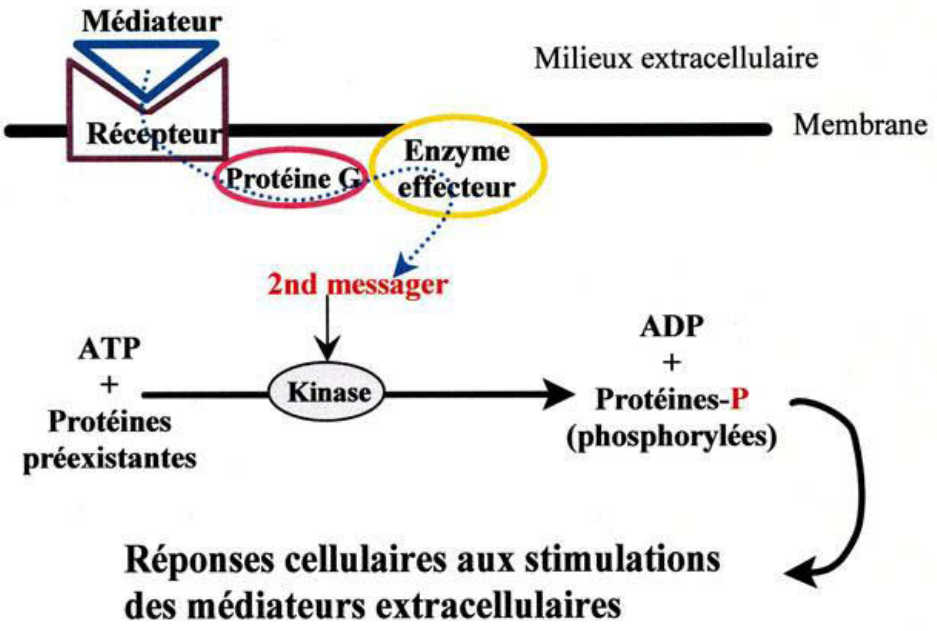


Figure 2 : Cascade de réaction déclenchée par les protéines G et leurs récepteurs couplés[4]

Récepteurs $mGluR_1$, $mGluR_2$, $mGluR_4$, $mGluR_5$, $5\text{-}HT_1$, $5\text{-}HT_4$: dans le cas des récepteurs métabotropiques (Figure 3) à la sérotonine ($5\text{-}HT_4$) et au glutamate ($mGluR_1$ et $mGluR_5$) abordés dans le chapitre 3, les enzymes effectrices sont l'adénylase cyclase ($5\text{-}HT_4$) et la phospholipase C ($mGluR_1$ et $mGluR_5$), les messagers secondaires sont respectivement l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique, qui active directement la **protéine kinase A PKA**) et le diacylglycérol, qui active directement **la kinase C (PKC**). Ces récepteurs induisent donc une fermeture des canaux TREK-1.

A l'inverse, les récepteurs $mGluR_2$, $mGluR_4$ et $5\text{-}HT_1$ sont couplés à la protéine G_i et induisent donc une diminution de production d'AMPc et donc une activation des canaux TREK-1 indirectement par levée d'inhibition.

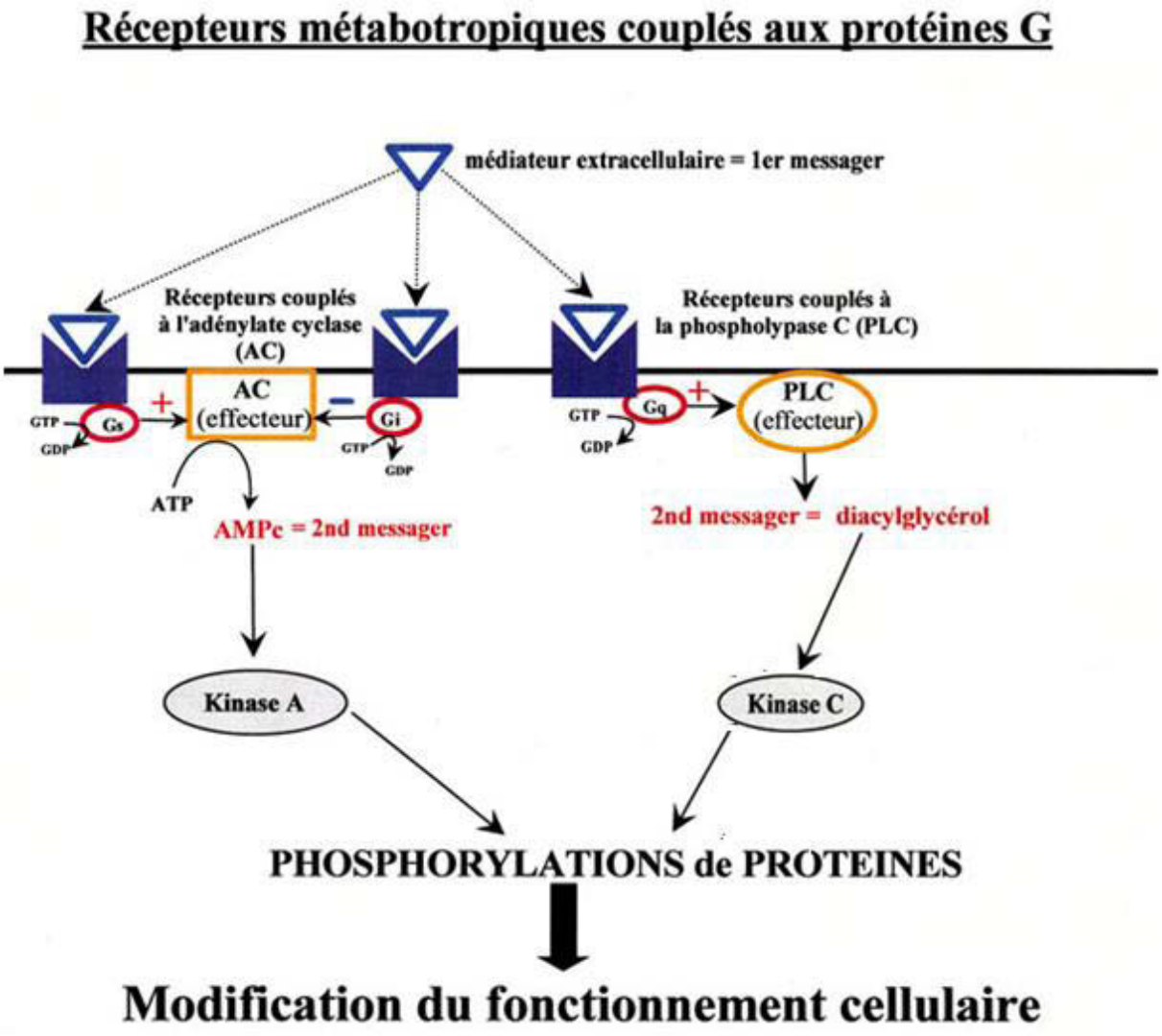


Figure 3 : Exemples des récepteurs métabotropiques[4]

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 LA DOULEUR

1.1 Introduction

La douleur représente un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier. Définie selon l'IASP (International Association for the Study of Pain) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion »,[5] elle est, avec la fièvre et la fatigue, l'un des premiers motifs de consultation médicale.

En France,[6] sur 20 605 000 patients interrogés, 31,7% présentent des douleurs chroniques. Pour 19,9% d'entre eux, elles sont d'intensité modérée à intense. Bien que plus fréquente chez les personnes âgées, la douleur touche toute la population : 46,3% des patients interrogés ont moins de 60 ans.

A l'échelle mondiale, plus d'1,5 milliard de personnes souffrent de douleur chronique[7] (Figure 4).

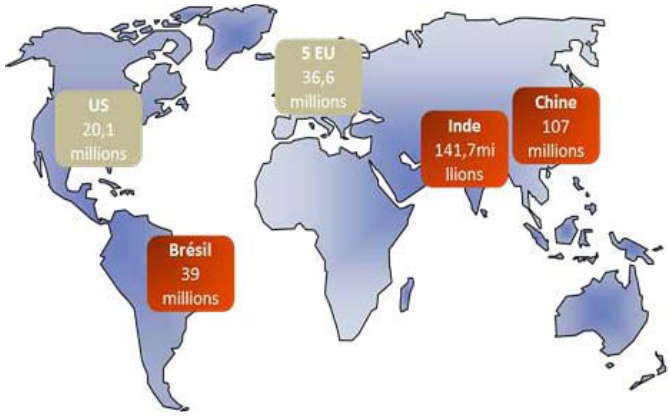


Figure 4 : **Prévalence de la douleur chronique dans le monde**[7]

Parmi les douleurs chroniques (persistantes plus de 3 mois), le mal de dos semble être le plus important, d'après une étude européenne effectuée sur 294 patients[8] (Figure 5).

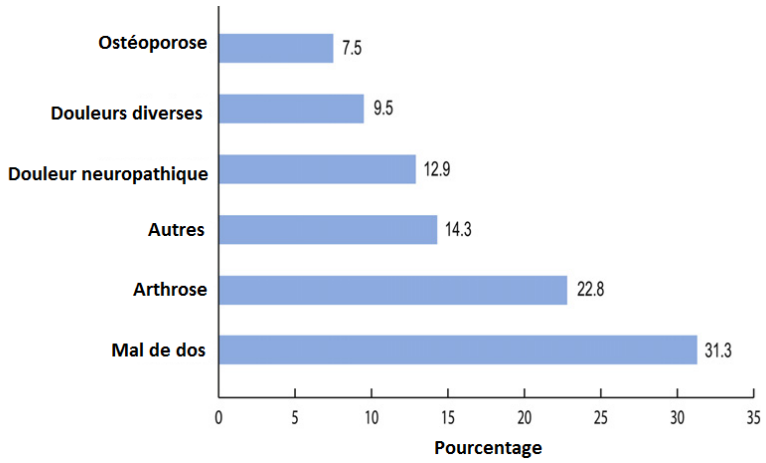


Figure 5 : **Principales causes de douleur chronique**[8]

Au-delà de la souffrance elle-même, la douleur chronique a un impact majeur sur la qualité de vie (Figure 6) : une seconde étude européenne[9] a démontré que 21% des patients se sentent déprimés, 44% ont des difficultés à se concentrer, 50% ont moins d'énergie et 65% souffrent de troubles du sommeil. 79% d'entre eux déclarent que leur douleur s'intensifie dans la journée, suite à un effort.

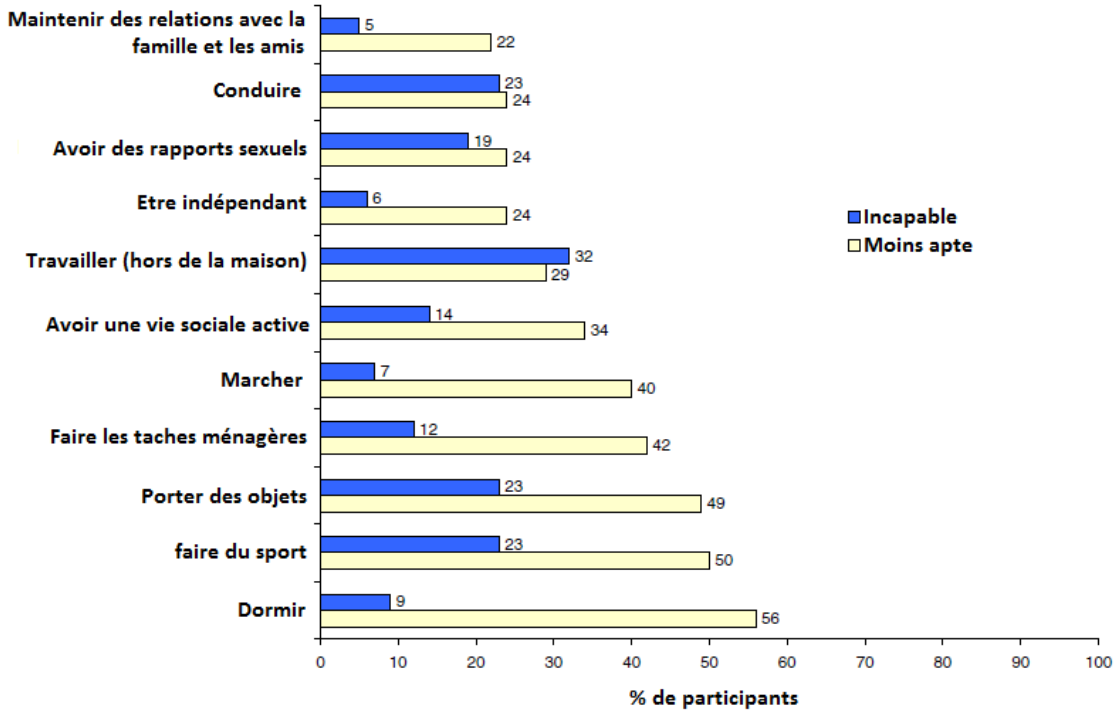


Figure 6 : **Impact de la douleur chronique sur les activités quotidiennes**[9]

De plus, l'efficacité des traitements reste très controversée : 40% des Européens suivant un traitement médical ne sont pas satisfaits. Ceci est dû notamment aux effets indésirables des médicaments (accoutumance, tolérance, constipation, nausée), à leur

inefficacité sur certains patients mais aussi à la durée moyenne avant de trouver un traitement adéquat (28% des patients ont dû attendre 5 ans ou plus). A tel point qu'un tiers des Européens interrogés ne suivent aucun traitement, soit parce qu'ils arrivent à gérer leur douleur, soit parce qu'ils préfèrent avoir recours à des traitements non médicamenteux (massage, acupuncture…).
Les coûts économiques sont par ailleurs très importants puisque 33% des personnes interrogées ont dû réduire leur durée hebdomadaire de travail et 65% songent à arrêter de travailler complètement.[6]

Afin d'enrayer ce phénomène, la prévention et la prise en charge de la douleur sont devenues des préoccupations majeures pour les autorités de santé. En France, elles font depuis près de 15 ans l'objet d'une politique nationale, à travers trois plans successifs (1998-2000, 2002-2005 et 2006-2010).[10] Au niveau mondial, la découverte de nouveaux antalgiques est devenue une priorité pour nombre de sociétés pharmaceutiques.

1.2 Différents types de douleur

Il existe différents types de douleurs que l'on peut classer selon leur mécanisme physiopathologique ou leur durée d'évolution notamment.[11,12] Le traitement médicamenteux sera adapté selon le type de douleur.

1.2.1 Douleur aiguë – douleur chronique

On distingue la douleur aiguë, d'installation récente, de la douleur chronique, évoluant depuis trois à six mois. La première joue un rôle d'alarme très important et permet de déclencher des réactions de protection ainsi qu'une démarche diagnostique. Dans la plupart des cas, cette douleur disparaîtra suite à l'instauration d'un traitement adapté. Cependant, elle peut évoluer en douleur chronique si elle n'est pas traitée correctement.

La douleur chronique accompagne généralement une pathologie inflammatoire ou neuropathique. A la différence de la douleur aiguë, elle n'a aucun objectif utile et va rapidement envahir le quotidien du malade et détériorer de manière importante sa qualité de vie. En effet, le fait de souffrir en permanence peut entraîner des comportements agressifs ou dépressifs, provoquant un repli social et des répercussions sociales et professionnelles. Comme précédemment indiqué, les douleurs chroniques les plus fréquentes sont les lombalgies, suivies des douleurs neuropathiques, céphalées chroniques ou encore les douleurs liées au cancer et à son traitement.

1.2.2 Les douleurs par excès de stimulations nociceptives

Appelée également douleur nociceptive, ces douleurs résultent de lésions des tissus périphériques (peaux, muscles, viscères), provoquant un excès d'influx douloureux transmis par un système nerveux intact. Elles représentent le mécanisme le plus couramment rencontré dans les douleurs aiguës (brûlures, traumatismes, rage de dent, colique néphrétique) mais elles peuvent également provoquer des douleurs chroniques (rhumatisme, maux de dos, cancer). Les traitements prescrits diffèrent selon les causes et le niveau de douleur. Ainsi, les douleurs de faible à moyenne intensité sont traitées par les antalgiques non opioïdes (céphalée, douleurs dentaires, rhumatisme : paracétamol, anti-inflammatoires non stéroïdien ou AINS) ou certains antalgiques opioïdes faibles (codéine, tramadol®). Les douleurs intenses, aiguës ou chroniques justifient l'utilisation d'antalgiques opioïdes puissants (morphine, oxycodone).[8]

1.2.3 Les douleurs neuropathiques

Les douleurs neuropathiques sont dues à une lésion primaire, un dysfonctionnement ou une perturbation du tissu nerveux, que ce soit au niveau périphérique (à la suite d'une amputation, de la section d'un nerf, d'un zona, d'une neuropathie diabétique ou alcoolique...) ou central (après un traumatisme médullaire, un infarctus cérébral...). Ces douleurs peuvent être spontanées, c'est-à-dire se manifester en l'absence de tout stimulus ; elles sont alors associées à des sensations continues de type brûlures et à des accès de type décharge électrique. Mais elles peuvent aussi résulter d'un stimulus normalement non douloureux (allodynie, cf. glossaire) ou d'un stimulus peu douloureux qui est perçu de façon exagérée (hyperalgésie, cf. glossaire). Dans tous les cas ce sont des douleurs très invalidantes, qui s'accompagnent parfois, surtout quand elles sont chroniques, d'une anxiété et d'un fond dépressif. Ces douleurs ne sont généralement pas sensibles aux antalgiques usuels. Dans ce cas, l'utilisation de certains antidépresseurs (amitriptyline, clomipramine), antiépileptiques (gabapentine, carbamazépine) et/ou des techniques de neurostimulation est préconisée mais la réussite de la prise en charge de ces douleurs est beaucoup plus incertaine.

1.2.4 Les douleurs dysfonctionnelles

Les douleurs dysfonctionelles regroupent les douleurs sans cause identifiable, sans lésion apparente pouvant inclure des facteurs neuropsychologiques. Elles sont insensibles aux antalgiques non opioïdes et AINS mais les médicaments psychotropes et la psychothérapie peuvent être utiles.

Il existe différents types de douleur qui ne peuvent pas être pris en charge de manière similaire. Il est donc nécessaire de développer des médicaments plus spécifiques afin de

mieux répondre aux besoins des patients. De plus, certaines pathologies telles que la fibromyalgie ou le syndrome du colon irritable ne possèdent aucun traitement adéquat. Les médicaments les plus souvent prescrits pour lutter contre les douleurs associées à ces maladies sont les antalgiques de palier II (tramadol®), les antidépresseurs et les antiépileptiques. Il faut environ une quinzaine d'années, dans le cas de la fibromyalgie, avant de trouver une combinaison permettant au patient de retrouver une qualité de vie acceptable.

1.3 Le mécanisme de la douleur

La douleur est perçue grâce à l'intervention de nocicepteurs qui sont des neurones sensoriels capables de transmettre un message nerveux au cerveau lorsqu'ils sont stimulés. Le message nociceptif résulte d'une stimulation douloureuse, telle qu'une brûlure, au niveau des terminaisons nerveuses des tissus cutanés, musculaires ou articulaires ainsi que des viscères. Ce stimulus va être transformé en impulsion électrique par les nocicepteurs (**transduction** Figure 7). Ensuite, le message nerveux est véhiculé jusqu'à la moelle épinière par les fibres nerveuses afférentes (**propagation** Figure 7).

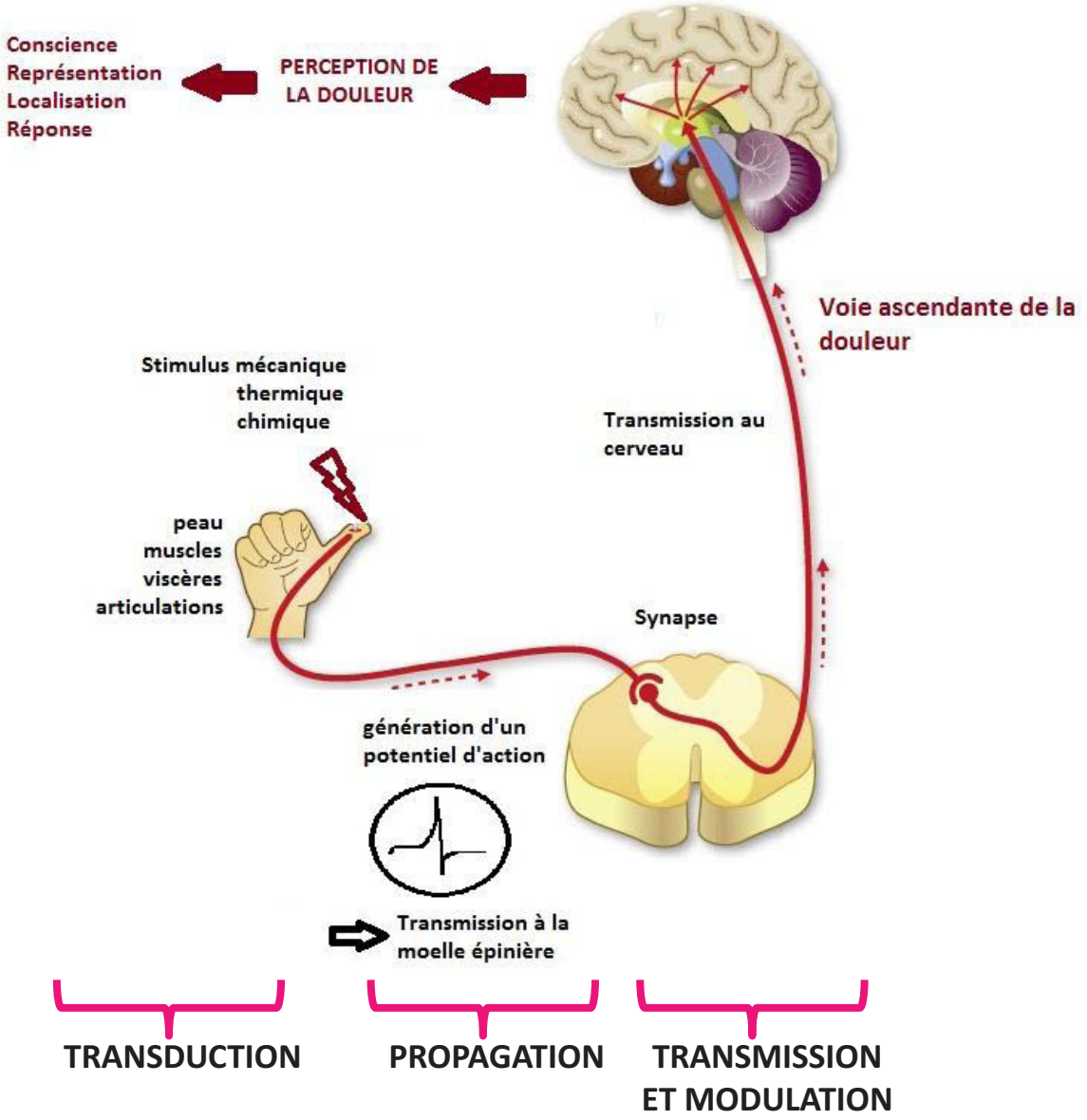


Figure 7 : Mécanisme de la douleur[13]

Lorsque le message nerveux arrive dans la moelle épinière, on observe les étapes de **transmission** et de **modulation**. Au niveau pré-synaptique,[14] l'impulsion électrique va permettre de relarguer les neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ceux-ci vont alors se fixer sur les récepteurs appropriés au niveau de l'axone post-synaptique, entrainant la création d'un signal électrique qui va se propager jusqu'au cerveau. C'est ici qu'a lieu la dernière étape de perception. Le sujet prend conscience du type et de la localisation du stimulus nociceptif ce qui va entrainer une réponse (par exemple retrait du membre en cas de brûlure, évitement) et donner naissance à la composante émotionnelle de la douleur.

1.4 Besoin de nouveaux antalgiques

Le marché global de la douleur (10 milliards de dollars en 2010) devrait atteindre 60 milliards de dollars en 2015.[7] Cette augmentation n'est pas due à l'introduction de nouveaux médicaments coûteux puisque la plupart des antalgiques sur le marché aujourd'hui ont plus de 50 ans (ibuprofène 1961, paracétamol 1955, aspirine 1899, morphine 1829). Elle résulte plutôt de l'utilisation accrue d'antalgiques par une population qui vieillit et qui aspire à une meilleure qualité de vie. Du fait du manque d'innovation, le marché des antalgiques est dominé par les médicaments génériques. La reformulation et l'association d'antalgiques déjà connus sont aussi des stratégies courantes pour tenter d'augmenter l'efficacité antalgique tout en diminuant les effets indésirables.

Il apparait donc important de développer de nouvelles molécules, plus sûres et plus efficaces afin de mieux répondre à la demande des patients. Pour cela, de nouvelles cibles thérapeutiques doivent être envisagées, permettant notamment d'offrir des traitements plus adaptés aux différents types de douleur.

CHAPITRE 2 LES CANAUX IONIQUES

2.1 Généralités

Toutes les cellules de l'organisme sont délimitées par une bicouche lipidique appelée membrane cytoplasmique. Celle-ci isole l'intérieur de la cellule du milieu extracellulaire et permet la compartimentation, la régulation des échanges cellule/environnement, ou encore le contrôle des flux d'informations entre les cellules.[15] Les échanges avec le milieu extracellulaire s'effectuent de manière générale par l'intermédiaire de protéines transmembranaires.

La membrane plasmique, hydrophobe, étant imperméable aux molécules hydrosolubles, le transport des ions et des molécules polaires telles que les glucides ou les acides aminés est donc assuré par des protéines transmembranaires spécialisées: les transporteurs et les canaux ioniques.[16]

Les transporteurs utilisent l'énergie de gradients de concentration (transport passif) ou de l'hydrolyse de l'ATP (transport actif) pour faire passer des ions ou des molécules d'un côté à l'autre de la membrane. La pompe Na^+/K^+ ATPase, responsable de la mise en place des gradients de Na^+ et K^+, est le transporteur le plus connu. Cependant, ce procédé est relativement lent.

Les canaux ioniques, plus rapides, laissent passer spécifiquement des ions, selon leur gradient de concentration (Figure 8). Leurs ouverture/fermeture sont régulées par différents facteurs suivant la nature des canaux considérés: variation du potentiel membranaire, de la pression, ou encore fixation d'un ligand.

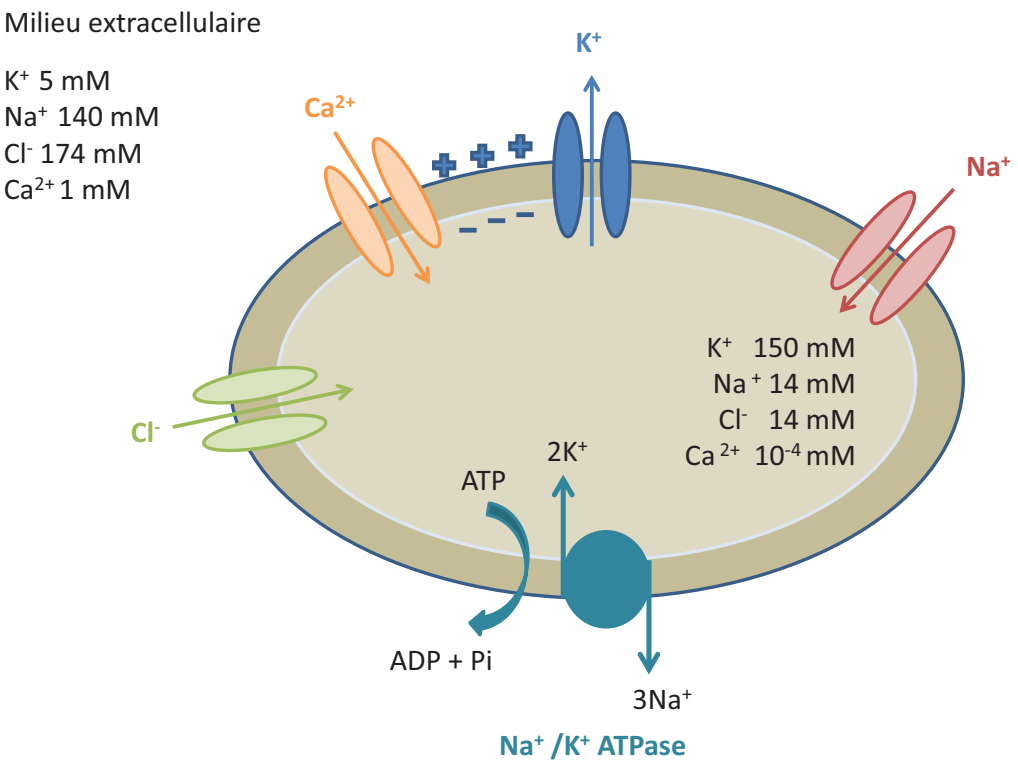


Figure 8 : Transport des ions potassium, calcium sodium et chlorure dans la cellule

Les gradients de concentration permettent à la cellule de générer des courants électriques. On appelle potentiel de repos (Er) le potentiel de membrane lorsque la cellule est à l'état d'équilibre et qu'aucun courant ne traverse la membrane. A cet instant, seuls les canaux potassiques sont ouverts, le potentiel de repos de la cellule est donc proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+, généralement compris entre -50 et -80 mV. Au repos, l'intérieur de la cellule est donc chargé négativement. Par convention, on dit qu'on dépolarise la membrane lorsqu'on applique un potentiel moins négatif (ou plus positif) et qu'on l'hyperpolarise lorsqu'on applique un potentiel plus négatif (ou moins positif). Ainsi, l'ouverture des canaux calciques et sodiques entraîne une entrée de cations et donc la dépolarisation de la membrane. A l'inverse, l'ouverture des canaux potassiques et chlorures conduit à une hyperpolarisation.[17]

Structure générale

Schématiquement, les canaux ioniques sont constitués de différentes protéines assemblées de façon à créer un pore rempli d'eau permettant le passage d'un ion à travers la membrane. Ces protéines varient fortement d'un canal à l'autre mais on peut décrire une structure générale : quatre ou cinq hélices agencées de manière cylindrique. La plupart des

canaux ioniques possèdent également une région appelée boucle P qui constitue le filtre de sélectivité ionique, régulant les ions qui sont autorisés à traverser le pore (Figure 9).

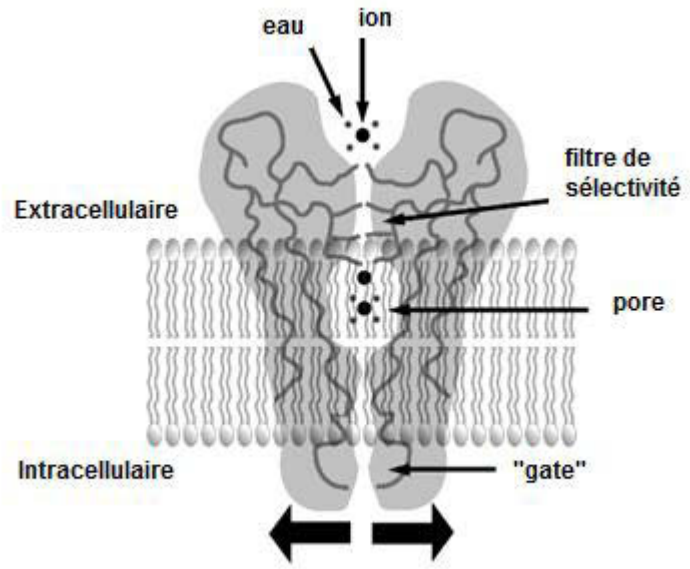


Figure 9 : Structure générale d'un canal ionique[18]

Le canal comporte un mécanisme de déclenchement qui commande l'ouverture et la fermeture des pores au travers de changements conformationnels de la protéine, associé à un mécanisme de détection qui répond aux différents stimuli.

Il existe une très grande diversité de canaux ioniques qui remplissent des fonctions biologiques très variées telles que la contraction musculaire ou la génération de potentiel d'action. Ils sont également des éléments fondamentaux de la signalisation dans le système nerveux.[19]

2.2 Les canaux ioniques et la douleur

Les nocicepteurs réagissent à des stimuli nocifs (thermiques, mécaniques ou chimiques) afin de préserver l'intégrité physique de l'organisme. Ils sont constitués de quatre composants majeurs permettant de déclencher le phénomène de nociception[20,21] (Figure 11B):

- la terminaison périphérique qui permet la transduction du stimulus douloureux et initie le potentiel d'action
- l'axone qui propage le potentiel d'action
- le corps cellulaire qui contrôle l'identité et l'intégrité du neurone
- la terminaison centrale qui forme l'élément pré-synaptique de la première synapse (voie de la nociception du système nerveux central).

Dans le cas de fibres cutanées, des stimulations de faible intensité vont produire les sensations tactiles en activant les fibres Aα et Aβ, tandis que les sensations douloureuses seront dues à l'activation des fibres C et Aδ (Figure 10).

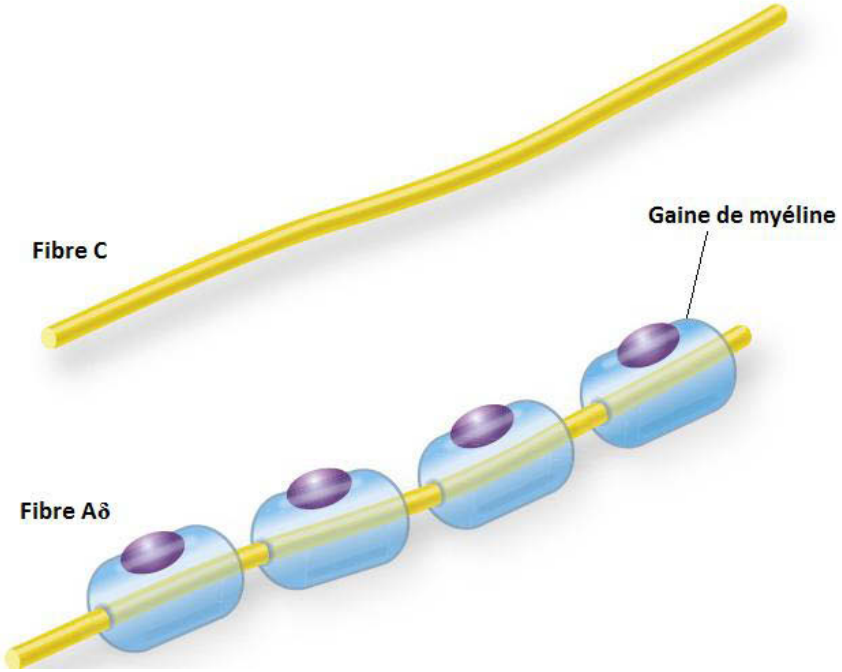


Figure 10 : Fibres nerveuses responsables de la conduction de la douleur[13]

Ces fibres peuvent être légèrement myélinisées (fibres Aδ) ou non-myélinisées (fibres C). Ces dernières sont majoritaires et sont responsables de la douleur diffuse (vitesse de propagation plus faible).

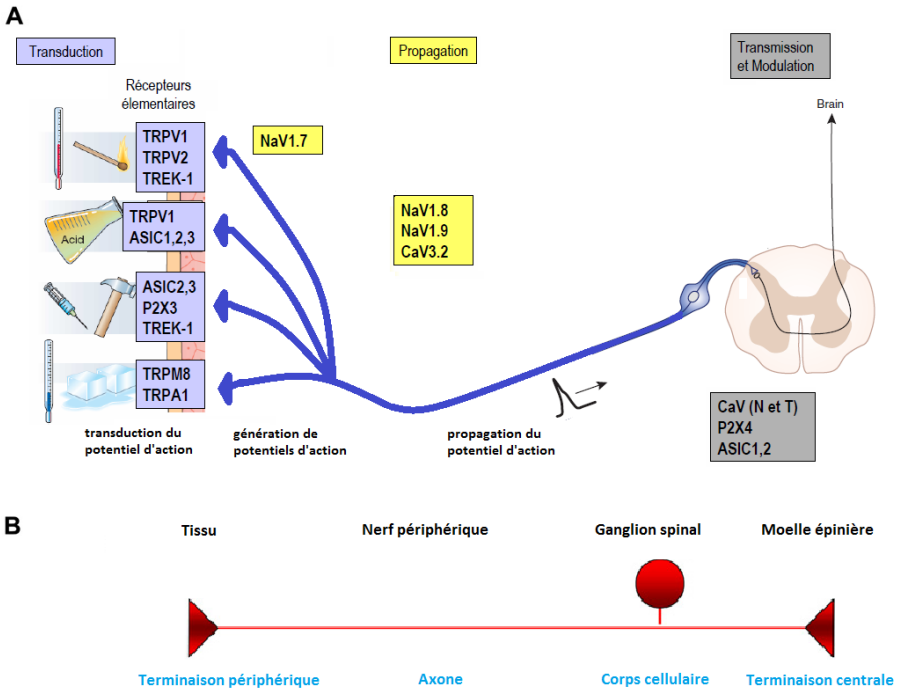


Figure 11 : A Implication des canaux ioniques dans le mécanisme douloureux[adapté de 21]
B Structure schématique d'un nocicepteur[20]

Les nocicepteurs expriment des dizaines de canaux ioniques et de récepteurs. Ainsi, la détection et la transmission du stimulus nociceptif font partie intégrante des rôles joués par les canaux ioniques (Figure 11A), ce qui leur confère un intérêt thérapeutique certain.[20]

2.2.1 La transduction

La transduction, ou transformation du stimulus nociceptif en impulsion électrique, s'effectue au niveau des terminaisons nerveuses périphériques par le biais des récepteurs. Il en existe différents types que l'on peut classer en trois grandes familles[11] par rapport à leur sensibilité:

La mécanosensibilité

La nociception mécanique naît suite à un stimulus externe (coup, coupure) ou interne (contraction, œdème, tumeur). Elle va entrainer l'activation des canaux mécanosensibles tels que les canaux TREK-1 (TWIK-Related K^+ Channel), ASIC2 et 3 (Acid Sensing Ion Channel, canal sodique) et $P2X_3$ (famille des récepteurs à l'ATP).[22]

La thermosensibilité

Suite à l'exposition à une source chaude, la sensation douloureuse apparait vers 43 °C. À l'inverse, la sensation de froid douloureux intervient pour des températures inférieures à 10-15 °C. Les variations de température vont générer des courants cationiques entrants et activer notamment les TRP (Transient Receptor Potential).[23] Ces canaux sont activés uniquement et directement par la température ou bien indirectement influencés par cette dernière. Cette pseudo-famille est constituée de 9 canaux : TRPV1-4 (Vanilloïde), TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8 (Mélastatine), TRPA1 (Ankyrine). Les sensations de chaud sont perçues par les canaux TRPV1 à 4 et les sensations de froid par les canaux TRPA1 et TRPM8. Ils peuvent aussi être activés par certaines substances chimiques provoquant des thermosensations telles que le menthol ou la capsaïcine (Figure 12).

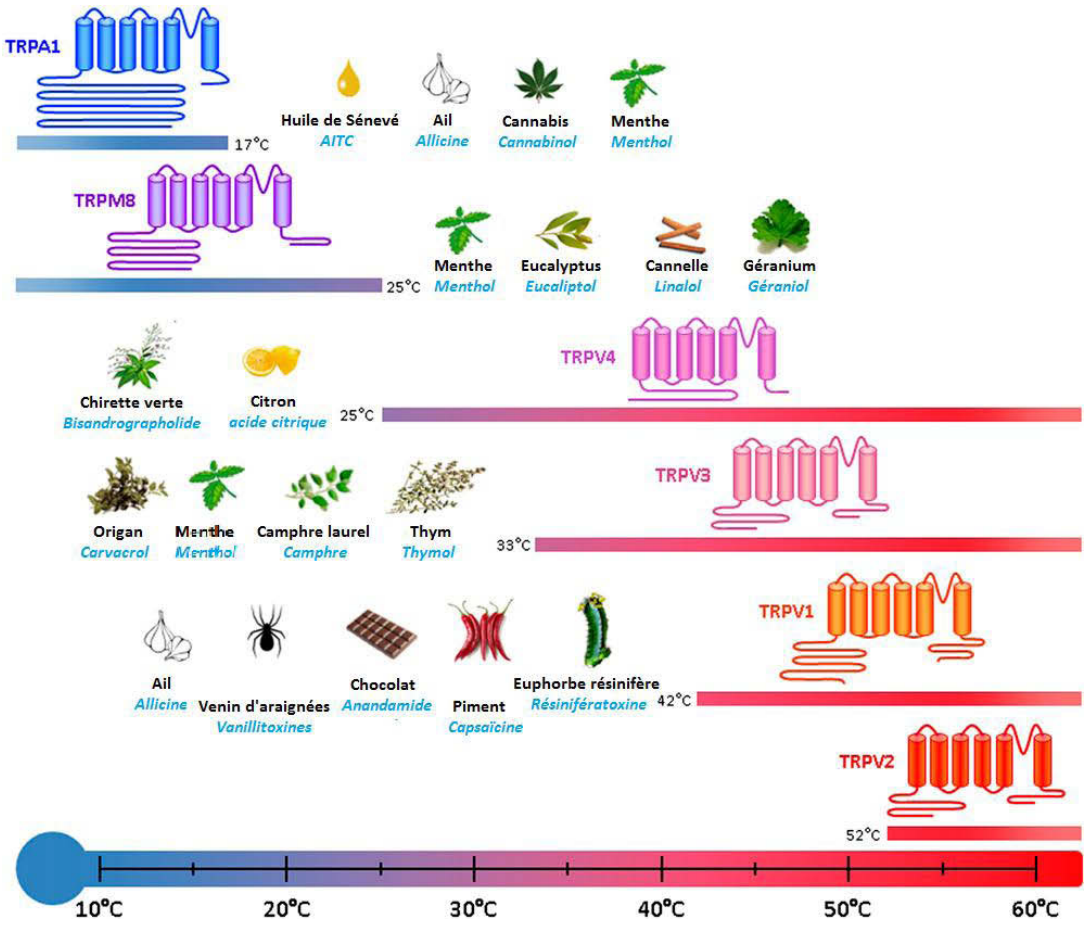


Figure 12 : Les différents TRP[24]

Le canal TRPV1 est sans doute le plus étudié pour son implication dans la nociception.[25,26] Il n'est pas sélectif d'un ion, bien qu'il ait une préférence pour le calcium ($P_{Calcium}/P_{Na} \sim 9$).[27] L'utilisation d'antagonistes des récepteurs TRPV1 permettrait d'éviter la douleur en bloquant un important capteur du message nociceptif sur les neurones sensoriels,

tandis qu'un agoniste permettrait de désensibiliser les neurones sensoriels et donc d'atténuer la douleur. Cette dernière approche présente des avantages comme une durée d'action plus importante par exemple. En effet, la resiniferatoxine[28], un puissant agoniste de TRPV1, permet une activation irréversible (et donc une utilisation à des doses très faibles) et une dépolarisation qui va engendrer une inactivation des canaux sodiques voltage-dépendant sur le court terme empêchant ainsi la formation du potentiel d'action et entrainant la mort des terminaisons nerveuses dépendantes du calcium[29]. Ces dernières ayant la capacité de se régénérer, la toxicité sur le long terme ne devrait pas poser de problème.

Au cours des dix dernières années, l'industrie pharmaceutique a porté beaucoup d'intérêt à la recherche d'antagonistes des canaux TRPV1. A ce jour, une quinzaine de molécules a atteint la phase I des études cliniques, voire la phase II pour certaines d'entre-elles, et de nouvelles molécules sortent régulièrement des laboratoires.[30]

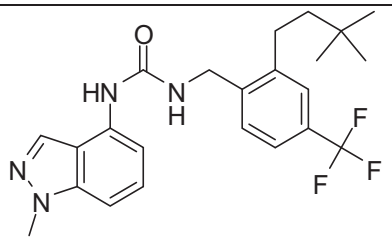
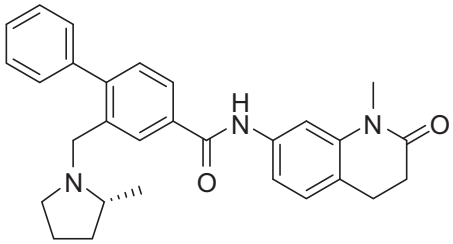
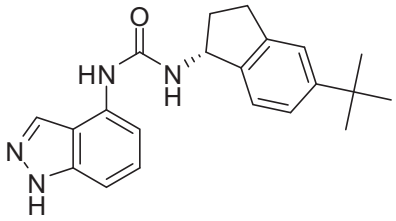
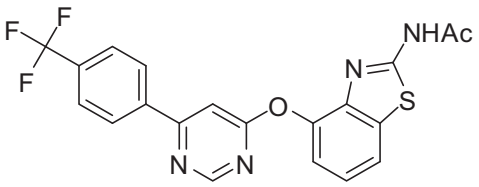
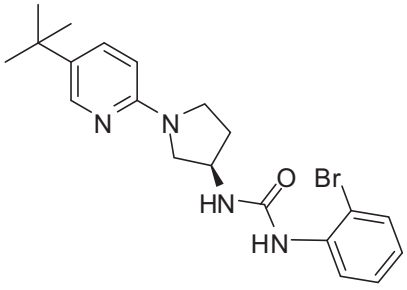
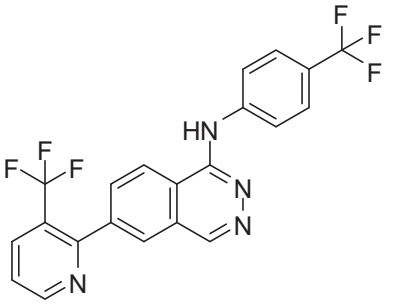
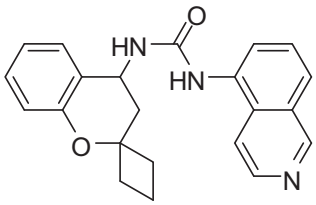
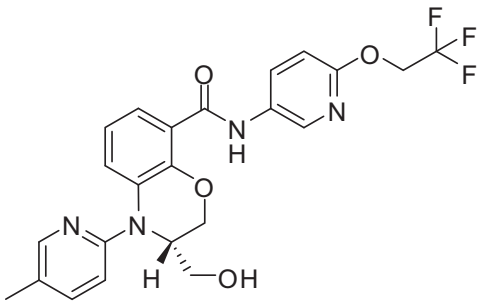
Pré-clinique	Antagonistes	 **ABT-116 (Abbott)** (douleur associée à l'inflammation, aux lésions tissulaires et à l'ischémie) [31]	 **AS1928370 (Astella)** (Douleur) [32]
Phase I	Antagonistes	 **ABT-102 (Abbott)** (douleur associée à l'inflammation, aux lésions tissulaires et à l'ischémie) **Phase I**	 **AMG 517 (Amgen)** (douleur) **Phase I** (arrêté)
Phase II	Antagonistes	 **SB-705498 (GlaxoSmithKline)** (Rhinite, Toux chronique, Prurit) **Phase II** migraine et douleur rectale (arrêté) **Phase II** rhinite non-allergique (en cours)  **MK-2295 (Merck-Neurogen)** (Douleur) **Phase II** (achevé)	 **GRC-6211 (Glenmark)** (Douleur, migraine, incontinence associée à la douleur et arthrose) **Phase II** arthrose (suspendu)  **JTS-653 (Japan Tobaco)** (Douleur) **Phase II** (arrêté)

Tableau 1: Quelques antagonistes des TRPV1[30]

Malheureusement, la plupart des candidats-médicaments sont abandonnés à cause des effets indésirables (sensation de froid ou chaud, hyperthermie, goût altéré). Ceci est sûrement dû à la présence de canaux périphériques et centraux et à l'impossibilité de différencier leur activation.

Comme pour la mécanosensibilité, certains canaux potassiques, notamment les canaux TREK-1, sont aussi impliqués dans la thermosensibilité.[33]

La sensibilité chimique

La sensation de douleur peut aussi être due à l'action de produits chimiques, exogènes tels que la capsaïcine ou encore un venin (stimulus externe : piqûre, morsure) ou endogènes (composés libérés par des cellules lésées, immunitaires, au cours de l'inflammation...).

Parmi les substances endogènes, les protons H^+ sont de puissants excitateurs des nocicepteurs. Ils agissent au niveau moléculaire sur deux types de récepteurs, activant directement les canaux ASIC[34] et sensibilisant le canal TRPV1.[35,36]

2.2.2 La propagation du message nociceptif

La propagation du message nociceptif s'effectue le long de l'axone du nocicepteur. L'activation des récepteurs membranaires dépolarise les fibres sensorielles ce qui conduit à l'activation des canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v). Ceux-ci sont responsables du déclenchement des potentiels d'action qui seront transmis aux neurones centraux. Ils forment une famille constituée de neuf sous-unités ($Na_v1.1$ à $Na_v1.9$). A l'exception du canal $Na_v1.4$, ils sont tous exprimés au niveau des nocicepteurs.[37]

Les canaux $Na_v1.7$ répondent à de petites dépolarisations lentes et amplifient ainsi les réponses de petits stimuli qui ne pourraient atteindre le seuil de génération de potentiel d'action sans leur intervention.[38] Des molécules visant à inhiber le canal $Na_v1.7$ sont en cours de développement. XEN402, un inhibiteur du canal, a montré des propriétés anti-nociceptives sur quelques patients atteints d'érythromélalgie.[39] Les $Na_v1.8$ et 1.9 sont particulièrement exprimés au niveau des ganglions spinaux dans les neurones de petit diamètre. On retrouve $Na_v1.9$ dans les fibres C et $Na_v1.8$ dans les fibres de type C, principalement, et dans certaines fibres de type A.[40] Ils participent tous les deux à la propagation du message nociceptif. Des inhibiteurs de Nav1.8 commencent également à être développés.[41]

2.2.3 La transmission et la modulation du signal nociceptif

Au niveau des terminaisons centrales (extrémité des nocicepteurs), on trouve les canaux calciques voltage-dépendants Ca_v. Ils contrôlent le relargage des neurotransmetteurs[42] dans la fente synaptique afin que le message douloureux puisse être conduit jusqu'au cerveau (Figure 11). Il existe trois familles de ces canaux : Ca_v1, Ca_v2 et Ca_v3, exprimant des courants de types différents. Les plus documentés sont sans doute les canaux $Ca_v2.2$, ou courant de type N, et les canaux Ca_v3, ou courant de type T.

Concrètement, les courants générés par ces canaux vont provoquer la migration des vésicules contenant les neurotransmetteurs vers la membrane. Elles vont alors fusionner avec cette dernière libérant ainsi les milliers de neurotransmetteurs qu'elles contiennent dans la fente synaptique. Ceux-ci vont alors se fixer sur des récepteurs spécifiques de la membrane post-synaptique, provoquant la formation d'un potentiel post synaptique codé en amplitude. A partir de celui-ci un nouveau message nerveux codé en potentiel est ensuite créé : c'est ainsi que le cerveau perçoit l'information.

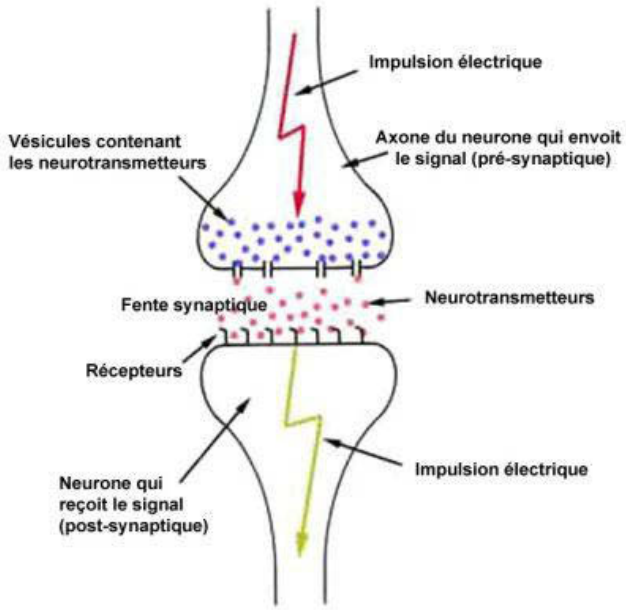


Figure 13 : Transmission du message nociceptif au niveau de la synapse[43]

Au niveau pharmacologique, l'inhibition des courants de type N permettrait de stopper le relargage de neurotransmetteurs tel que la substance P (cf. glossaire) et entrainerait ainsi la suppression du message douloureux.[44] Concernant les courants de type T, leur présence à divers endroits de l'organisme (cœur, pancréas, rein, système nerveux) ainsi que les différentes fonctions importantes qu'ils remplissent semblent limiter l'utilisation de ces

canaux en tant que cibles contre la douleur (génération d'effets indésirables trop importants tels que l'absence épileptique[45]).

Les canaux ioniques jouent donc un rôle prépondérant dans la nociception. Parmi la grande diversité de ces canaux, les canaux potassiques sont les plus nombreux et les plus largement distribués dans le corps humain. Ils permettent un efflux rapide d'ions K^+ qui peut influencer la limite des potentiels d'action, leur forme et leur fréquence. Ils représentent donc des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes pour le développement de nouveaux antalgiques.

2.3 Les canaux potassiques

Une des caractéristiques essentielles des canaux potassiques est d'être mille fois plus sélectifs pour l'ion K^+ que pour l'ion Na^+ alors que ce dernier a un rayon ionique inferieur (Figure 14).

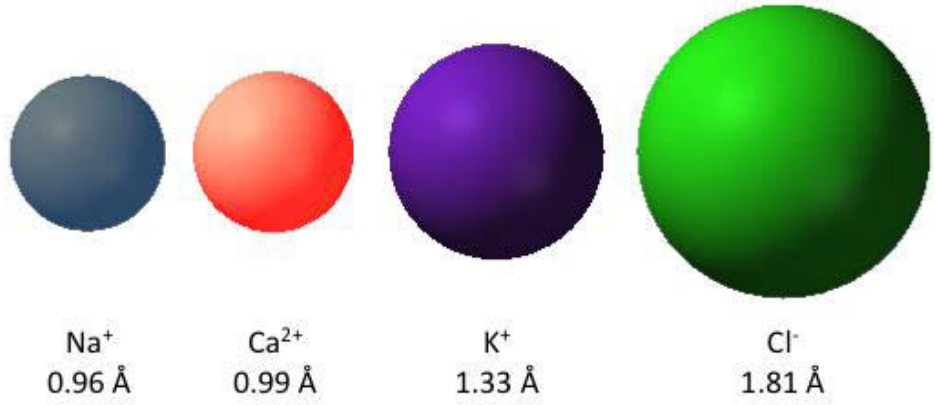


Figure 14 : Rayons ioniques[46]

Cette sélectivité est possible grâce à une boucle P, constituée de 20 acides aminés, présente dans tous les canaux potassiques, et particulièrement à la séquence signature GYG qui forme le filtre de sélectivité du potassium (Figure 17). Ceci a été démontré par des expériences de mutagénèse et de constructions chimériques.[47] Cependant, le mécanisme de sélectivité et de perméation du potassium a été élucidé grâce à la cristallographie du canal Kcsa (potassium crystallographically-sited activation) de *Streptomyces Lividans*.[48] Ce canal bactérien (Figure 15) présente peu d'homologie avec d'autres canaux potassiques excepté une boucle P qui contient la séquence signature des canaux potassiques.

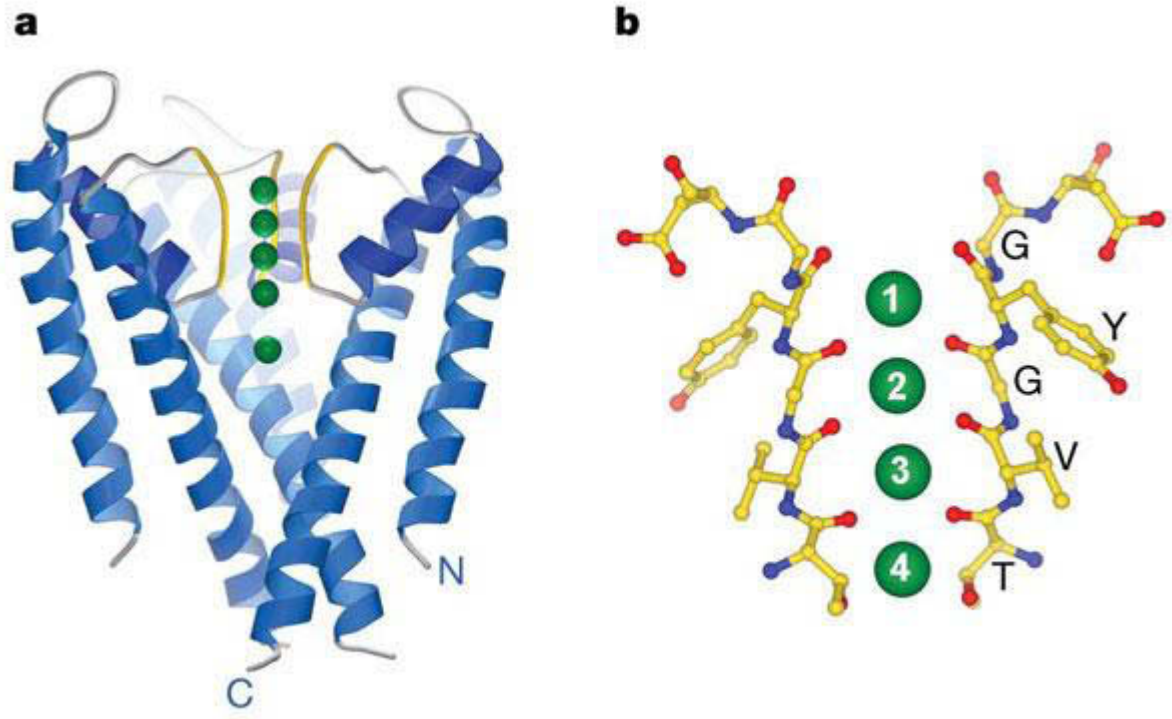


Figure 15[49] : a. Représentation du canal Kcsa de la bactérie *Streptomyces Lividans*. Les ions potassium (sphères vertes) se lient à quatre emplacements dans le filtre de sélectivité (jaune) et dans la cavité remplie d'eau au centre de la membrane (ion du bas).
b. Représentation boule-et-bâton du filtre de sélectivité avec les acides aminés clés. Les quatre ions K^+ sont numérotés pour indiquer l'emplacement des sites de liaison dans le filtre; la position 1 est la plus proche de la solution extracellulaire et la position 4 est la plus proche de la cavité.
Azote : bleu, Oxygène : rouge, Carbone : jaune.

Les ions K^+ vont pénétrer dans le pore sous une forme hydratée et atteindre une large cavité de 10 Å de diamètre située au centre de la membrane plasmique. Ils passent ensuite au travers du filtre de sélectivité, canal très étroit de 3.5 Å de large constitué d'un arrangement rigide de cinq groupes carbonyle très polaires fournis par les résidus T-V-G-Y-G (Thréonine, Valine, Glycine, Tyrosine, Glycine). Vu la taille du canal, seuls les ions K^+ partiellement déshydratés, stabilisés par les oxygènes des fonctions carbonyle, sont capables de traverser. La rigidité de cette structure empêche les ions sodium d'être stabilisés sous leur forme déshydratée et la forme hydratée est trop volumineuse pour passer au travers du filtre.[37]

2.3.1 Typologie des canaux potassiques

Les canaux potassiques possèdent une très grande diversité structurale et fonctionnelle qui repose en grande partie sur leur très grande diversité génétique. En effet, chez l'Homme, plus de 70 gènes différents codent pour des sous-unités potassiques. Chaque sous-unité possède un ou plusieurs domaines P ainsi qu'un nombre variable de segments transmembranaires. On peut distinguer trois grandes familles sur la base de leur homologie structurale (Figure 16) :

- La famille des canaux à **6 segments transmembranaires et 1 domaine P (K_{1P})**, responsable des courants potassiques **dépendant du potentiel** et des courants sensibles à la concentration intracellulaire de calcium (Figure 16, noir).
- La famille des canaux à **2 segments transmembranaires et 1 domaine P (K_{1P})**, à l'origine des courants à **rectification entrante** (Figure 16**,** bleu).
- La famille des canaux à **4 segments transmembranaires et 2 domaines P (K_{2P})**, responsables des **courants de fond** (Figure 16, rouge).

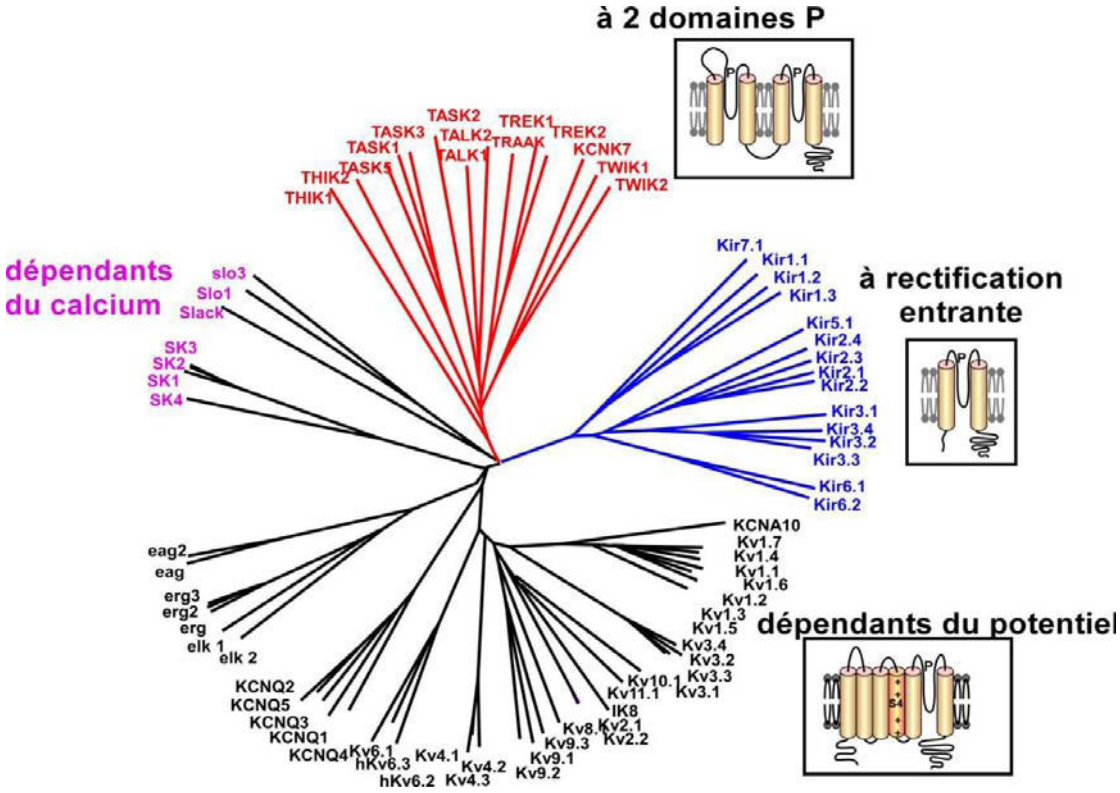


Figure 16 : Arbre phylogénétique des sous-unités potassiques de mammifères.[50]

Tous ces canaux nécessitent, pour être fonctionnels, la présence de 4 domaines P. Les familles possédant un seul domaine P forment donc des tétramères tandis que celles possédant 2 domaines P se dimérisent.

La séquence signature formant le filtre de sélectivité peut être légèrement modifiée selon les canaux (Figure 17).

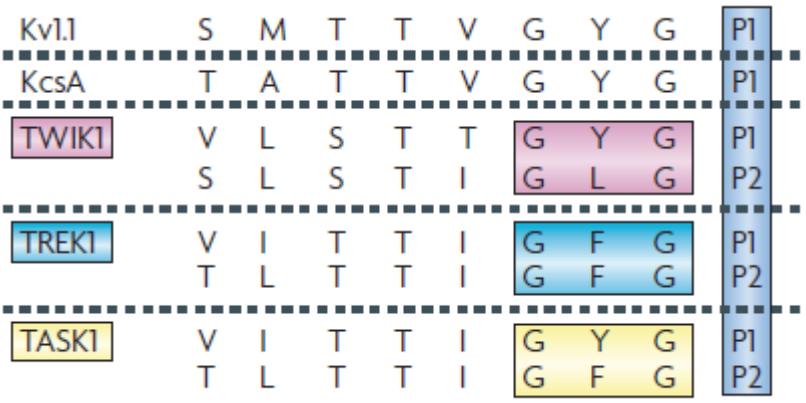


Figure 17 : Séquence signature pour différents canaux potassiques K_{1P} (K_v1.1, KcsA) et K_{2P} (TWIk-1, TASK-1 et TREK-1).[33]

2.3.2 Vers de nouvelles cibles thérapeutiques

Dans les années 1970-1980, de nombreuses études ont montré que plusieurs agonistes des récepteurs couplés à la protéine G (cf. glossaire) utilisaient l'ouverture des canaux potassiques afin de produire un effet antinociceptif.[51] Il semblerait donc que les canaux K^+ soient impliqués dans l'effet antinociceptif de ces agonistes. Afin d'identifier quels canaux étaient spécifiquement impliqués, une première stratégie a consisté en l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certains canaux, devant conduire à une baisse de l'effet antinociceptif produit par les agonistes des récepteurs couplés à la protéine G. Malheureusement, il existe très peu d'inhibiteurs spécifiques des différents canaux potassiques.

A la fin des années 1990, une nouvelle stratégie, basée sur l'utilisation d'animaux knockout (KO, n'exprimant pas le canal étudié), a permis d'identifier plusieurs canaux impliqués dans le mécanisme d'action de différentes molécules. Ainsi, il a été prouvé que les canaux potassiques à rectification entrante K_{ATP}[52] et GIRK[53] (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels) jouent un rôle dans la nociception induite par les agonistes des récepteurs opioïdes. De même, les canaux K_{ATP}, GIRK2[54] et BK (Big Potassium)[55] semblent être impliqués dans l'effet antinociceptif des agonistes des récepteurs muscariniques tandis que les canaux SK (Small conductance calcium-activated potassium channels)[55] prendraient part au mécanisme des agonistes des récepteurs cannabinoïdes. Les canaux K_{ATP} joueraient aussi un rôle significatif dans le mécanisme d'action de nombreux AINS.

Depuis, les canaux potassiques eux-mêmes sont devenus des cibles privilégiées pour la conception de nouveaux antalgiques. Selon leur localisation, ils peuvent empêcher la formation du potentiel d'action au niveau des terminaisons périphériques (K_v1.1, K_v1.2, K_v1.4, K_v3.4, K_v7.2, BK_{CA}, TREK-1, TRAAK), réduire la propagation du message nociceptif

le long de l'axone ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.4$...) ou encore limiter la libération des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons centrales ($K_v1.4$, $K_v3.4$, BK_{CA}…).[56]

Parmi ces canaux, la famille des canaux à deux domaines P (K_{2P}) émerge comme une cible privilégiée pour la modulation de la douleur.[56] Ces canaux sont responsables des courants de fuite (à rectification sortante) et jouent donc un rôle majeur dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire grâce à leur rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos. En effet, ils s'opposent en permanence à l'effet excitateur produit par des courants Ca^{2+} et Na^{+}, en empêchant notamment le potentiel de membrane d'atteindre le seuil nécessaire à l'activation de ces canaux.

L'implication des K_{2P} dans la douleur a été mise en évidence par la découverte d'une canalopathie humaine. Ainsi, la migraine avec aura est associée à une mutation dominante négative dans TRESK, une sous-unité fortement exprimée dans le nerf trijumeau humain et les ganglions rachidiens.[57] De plus, l'utilisation de souris knockout pour le gène TREK-1 a permis de démontrer le rôle joué par ce canal dans la nociception.[58]

En conclusion, les canaux ioniques, exprimés fortement dans les nocicepteurs, ont un rôle majeur dans le phénomène douloureux. Ils sont impliqués dans le mécanisme d'action de nombreuses molécules antalgiques et peuvent eux-mêmes être ciblés pour la conception de nouveaux médicaments. Les canaux K_{2P}, découverts plus récemment, semblent très prometteurs et tout particulièrement le canal TREK-1.

CHAPITRE 3 LE CANAL TREK-1

3.1 Structure et fonction

3.1.1 Les canaux K_{2P}

Le canal TREK-1 (TWIK Related K^+) appartient à la famille des canaux à deux domaines P (K_{2P}). Cette famille, comportant 15 sous-unités (Figure 18), semble avoir une importance considérable car elle est conservée dans des espèces très éloignées telle que la levure.[59]

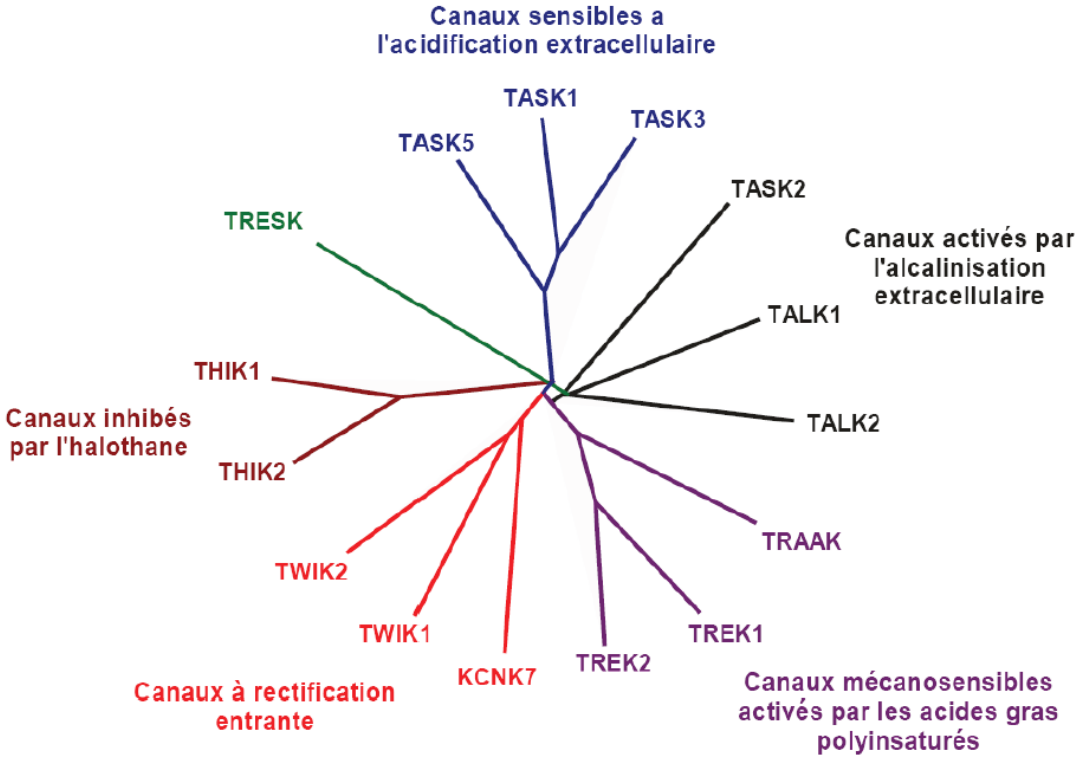


Figure 18 : Arbre phylogénétique des sous-unités de la famille K_{2P}[50]

Ces canaux sont constitués de quatre segments transmembranaires (4TM, M1 à M4), de deux boucles P (P1 et P2) et d'une boucle extracellulaire M1P1 comportant 60 à 70 acides aminés. La signature des pores de ces sous-unités n'est pas toujours GYG contrairement aux autres canaux potassiques. Leurs régions N- et C-terminales sont intracellulaires. Afin d'être fonctionnelles, ces sous-unités se dimérisent (Figure 19).

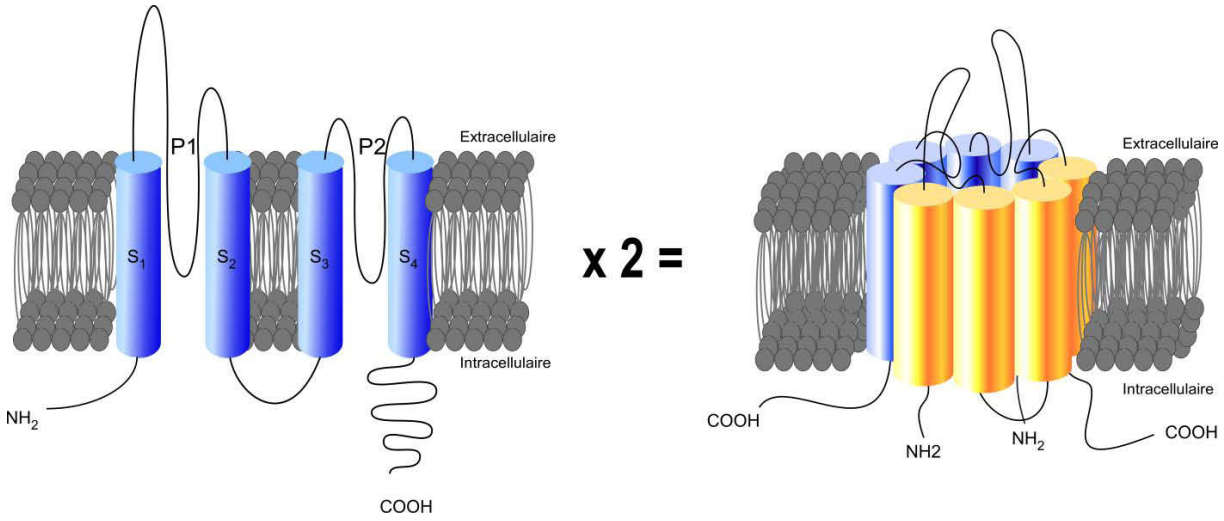


Figure 19 : Structure dans canaux TREK-1[50]

3.1.2 Les canaux TREK-1

Les canaux TREK-1 sont très fortement exprimés dans le système nerveux central[60] mais on les retrouve aussi dans les neurones sensoriels des ganglions spinaux de la moelle épinière,[61] ou encore dans l'estomac et l'intestin grêle.[62] Ils s'activent de façon spontanée et sont capables d'osciller très rapidement entre les états ouvert et fermé (flickering).

3.1.2.1 Structure de TREK-1

Le canal TREK-1 chez l'Homme est composé de 426 acides aminés (Figure 20). Comme dans tous les canaux potassiques, on retrouve la séquence signature, légèrement modifiée puisque la tyrosine est remplacée par une phénylalanine (GFG, rose Figure 20). Deux sites potentiels de *N*-glycosylation ont été découverts sur la boucle P1 ainsi que quatre sites potentiels de phosphorylation pour la protéine kinase C, deux pour la protéine kinase A et deux pour la caséine kinase II (Figure 21).[60]

MLPSASRERPGYRAGVAAPDLLDPKSAAQNSKPRLSFSTKPTVLAS
RVESDTTINVMKWKTVSTIFLVVVLYLIIGATVFKALEQPHEISQRTT
IVIQKQTFISQHSCVNSTELDELIQQIVAAINAGIIPLGNTSNQISHW
DLGSSFFFAGTVITTIGFGNISPRTEGGKIFCIIYALLGIPLFGFLLAGV
GDQLGTIFGKGIAKVEDTFIKWNVSQTKIRIISTIIFILFGCVLFVALPA
IIFKHIEGWSALDAIYFVVITLTTIGFGDYVAGGSDIEYLDFYKPVVW
FWILVGLAYFAAVLSMIGDWLRVISKKTKEEVGEFRAHAAEWTAN
VTAEFKETRRRLSVEIYDKFQRATSIKRKLSAELAGNHNQELTPCRR
TLSVNHLTSERDVLPPLLKTESIYLNGLTPHCAGEEIAVIENIK

Figure 20 : Séquence d'acides aminés du canal TREK-1[63]
En rose : séquence signature, en gris : résidus 306 à 326.

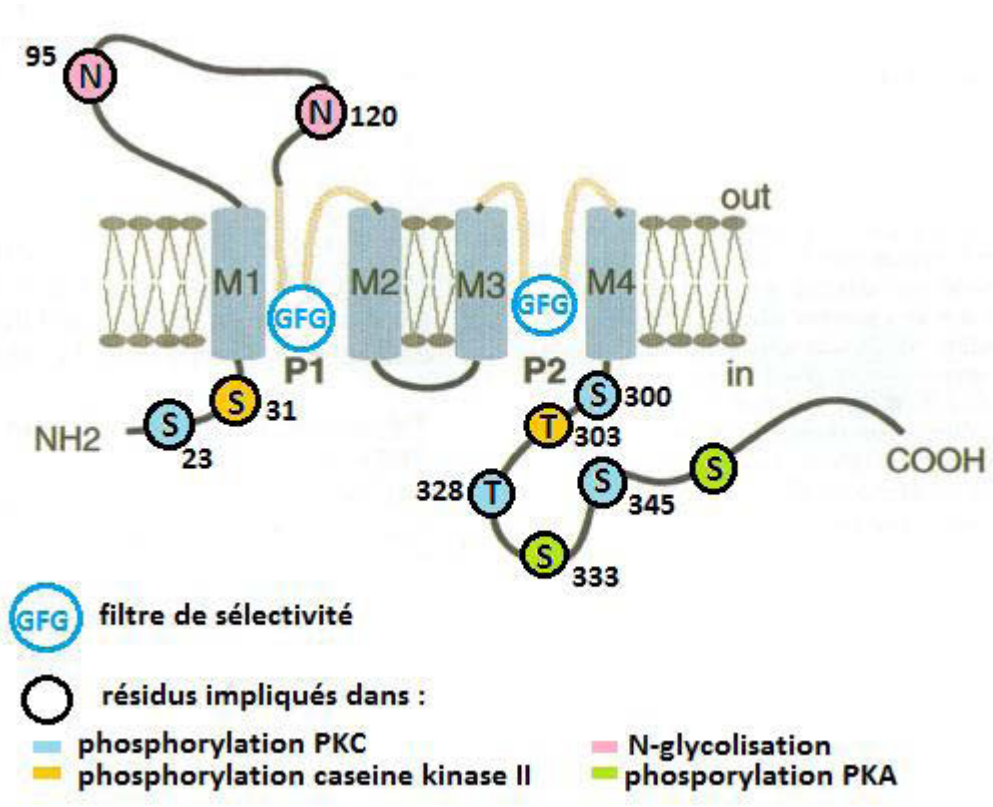


Figure 21 : Structure du canal TREK-1[adapté de 64]

Le canal n'ayant pas encore été cristallisé, la structure 3D du récepteur n'est pas connue, ni le mécanisme d'ouverture. Récemment, différents modèles structuraux de TREK-1 ont été publiés.[65,66,67] En utilisant la dynamique moléculaire pour générer ces modèles, une étude a montré que les extrémités C-terminales des deux dimères interagissaient très fortement avec la membrane plasmique dans la conformation fermée du canal. Les lipides tels que l'acide arachidonique, connus pour activer le canal, mimeraient la bicouche lipidique et se lieraient avec les extrémités C-terminales, empêchant ainsi toute interaction entre celles-ci et la membrane : la fermeture du canal ne pourrait donc plus avoir lieu. Il pourrait donc être intéressant de cibler ces extrémités C-terminales, via leurs séquences spécifiques, pour développer des activateurs ou inhibiteurs du canal.

Par homologie avec les canaux KcsA, Milac *et al.* décrivent un autre modèle structurel de TREK-1 dans trois conformations différentes : fermée, ouverte et conductivité faible. Ce modèle décrit des caractéristiques uniques de cette sous-famille de K2P. En effet, les deux boucles P n'étant pas totalement identiques, on observe un arrangement de deux sous-unités semblables qui permet une plus grande liberté de conformation que dans le cas des canaux K^+ nécessitant un arrangement de quatre sous-unités identiques (KcsA). Une autre particularité des canaux TREK et TRAAK réside dans l'extrémité C-terminale : les résidus 306 à 326 (gris, Figure 20) seraient capables de former une hélice α amphiphile.

Piechotta *et al.*[67] démontrent que les ammoniums quaternaires, excepté le tétraéthylammonium, sont capables de se lier avec une grande affinité au canal TREK-1. En utilisant cette propriété et en comparant avec différents modèles structuraux possibles, les auteurs proposent que la structure du canal TREK-1 ressemble fortement à la conformation ouverte du canal KvAP et concluent que le mécanisme d'activation principal se situe à proximité, voire à l'intérieur, du filtre de sélectivité (Figure 22).

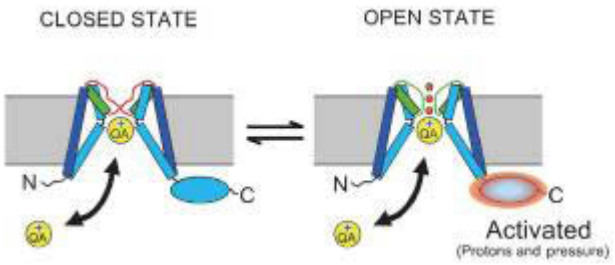


Figure 22 : Mécanisme d'ouverture proposé par Piechotta *et al*[67] : Des mouvements importants du domaine C-terminal sont convertis en petits mouvements d'hélices transmembranaires pour ouvrir le canal au niveau du filtre de sélectivité.

3.1.2.2 Modulation de TREK-1

Le canal TREK-1 possède un mécanisme d'action polymodale. En effet, il peut être activé par un très grand nombre de stimuli (Figure 23).

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, le canal TREK-1 est mécanosensible, il peut donc être ouvert suite à un étirement de la membrane ou suite à une pression.[68] De même, il est sensible à la température (la sensibilité maximale est située entre 32 et 37°C). Il peut aussi être activé par l'acidose intracellulaire. Ainsi, une baisse du pH à l'intérieur de la cellule conduit à l'ouverture des canaux à pression atmosphérique. Ce canal possède aussi un mécanisme voltage-dépendant : il s'ouvre suite à une dépolarisation de la membrane. L'acide arachidonique et plus généralement les acides gras polyinsaturés[69] sont de très bons activateurs du canal (mécanisme proposé ci-dessus). Les lysophospholipides[70] extracellulaires possédant une longue chaîne aliphatique et une large tête polaire comme la phosphatidylcholine peuvent aussi activer TREK-1.

La fermeture du canal peut être obtenue par la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G_s et G_q[71](cf. glossaire). En effet, la fixation de sérotonine sur les récepteurs 5-HT_4 couplés à la protéine G_s inhibe les courants, en impliquant l'AMP cyclique puis la protéine kinase A (PKA). De la même façon, les courants TREK-1 sont inhibés par la liaison d'un neurotransmetteur sur son récepteur lorsque celui-ci est couplé à la protéine G_q (glutamate et récepteur métabotropiques au glutamate mGluR1 et mGluR5).

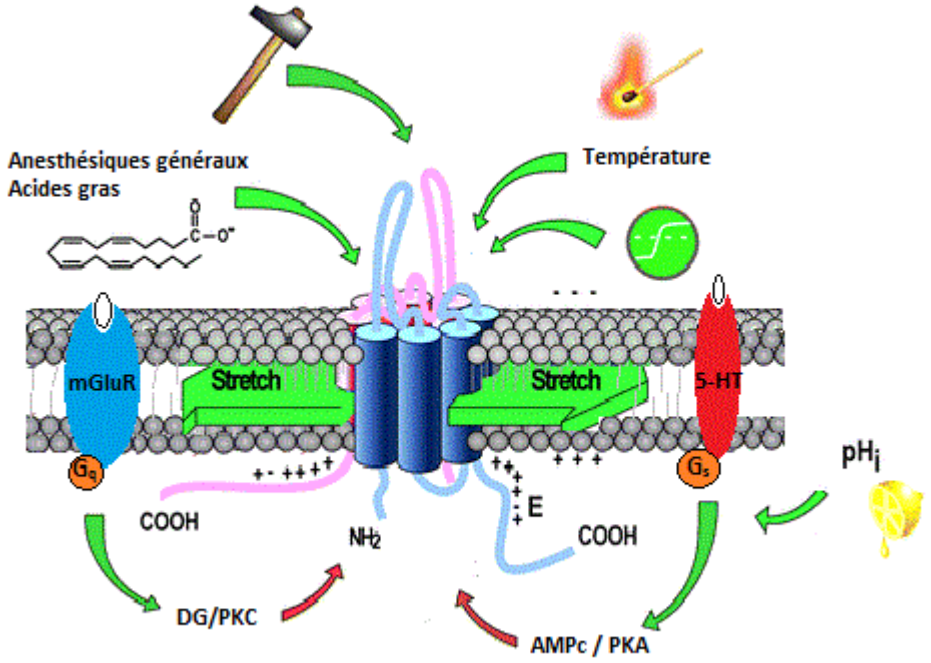


Figure 23 : Activation polymodale du canal TREK-1[adapté de 72]

D'un point de vue pharmacologique, le canal TREK-1, contrairement aux autres K_{2P}, n'est pas inhibé par les bloqueurs classiques que sont l'ion tétraéthylammonium et la 4-aminopyridine. En revanche, il est inhibé par divers agents pharmacologiques tels que la fluoxetine[73] ou la lidocaïne.[74]

TREK-1 est activé par une classe importante de substances chimiques : les anesthésiques volatils généraux (chloroforme, éther, halothane). De même, les anesthésiques gazeux tels que l'oxyde d'azote ou le xénon sont capables d'activer le canal.[75]

3.2 TREK-1 en tant que cible thérapeutique

Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au canal TREK-1 dans des buts divers et variés. La majorité des connaissances ainsi découvertes repose sur l'utilisation de souris KO pour le gène TREK-1 (TREK-1$^{-/-}$).

Le premier intérêt porté à TREK-1 est basé sur son rôle dans l'anesthésie générale et la neuroprotection. En effet, une caractéristique importante de ce canal est d'être activée par les anesthésiques volatils à des concentrations utilisées en clinique. Les résultats des études portant sur cette propriété révèlent un rôle majeur du canal dans l'anesthésie car il faut une dose beaucoup plus importante pour que les souris TREK-1 $^{-/-}$ ressentent l'effet de l'halothane par exemple.[76]

Parallèlement, la même équipe[76] a mis en évidence que les souris TREK-1 $^{-/-}$ étaient beaucoup plus sujettes aux crises d'épilepsie induite par l'injection de kaïnate et plus

sensibles suite à une intervention provoquant des ischémies : le taux de mortalité dans les trois jours est beaucoup plus important dans les deux cas. Le canal TREK-1 est donc impliqué dans la neuroprotection.

Le canal TREK-1 a aussi été étudié en tant que cible contre la dépression. En effet, la sérotonine est considérée comme le neurotransmetteur impliqué dans les phénomènes de dépression. Or, TREK-1 est modulé par la sérotonine *via* ses récepteurs couplés à la protéine G_S. Des tests permettant d'évaluer l'état dépressif ont été effectués sur des souris sauvages et TREK-1 $^{-/-}$ et ont démontré l'indéniable implication du canal : les souris KO semblent moins déprimées que leurs congénères sauvages.[77] De plus cette étude a permis d'identifier la spadine, peptide endogène capable d'inhiber le canal TREK-1, comme un anti-dépresseur naturel avec une rapidité d'action peu commune. Cette découverte apporte un nouveau concept pour le traitement de la dépression mais aussi pour son diagnostique. En effet, la spadine pourrait être utilisée comme marqueur de cette maladie et son dosage permettrait alors une détection fiable et une prise en charge rapide.

Plus récemment, l'implication des canaux TREK-1 dans la relaxation utérine pendant la grossesse a été mise en évidence. En fait, un dérèglement de ce mécanisme pourrait être à l'origine de certaines naissances avant-terme.[78]

Le dernier intérêt thérapeutique réside dans l'effet antinociceptif. Nous détaillerons cet aspect dans le paragraphe suivant.

3.3 TREK-1 et douleur

De part leur localisation, notamment au niveau des neurones des ganglions rachidiens impliqués dans la nociception, et leur activation par des stimuli potentiellement douloureux (pression, température), il semblait évident que les canaux TREK-1 jouent un rôle dans la perception de la douleur. Ainsi, des études ont montré que les souris TREK-1$^{-/-}$ étaient beaucoup plus sensibles aux stimuli thermiques et mécaniques. Elles perçoivent comme douloureuses des stimulations qui ne le sont pas chez les souris sauvages (allodynie) et semblent plus sensibles que les souris sauvages vis-à-vis de stimuli douloureux (hyperalgie).[58]

3.3.1 Implication du canal TREK-1 dans le mécanisme d'action de la morphine

Des travaux plus récents[79] entrepris par nos collaborateurs (Institut Neuro-Dol UMR1107), basés sur des tests de nociception thermique (immersion de la queue à 46 °C et

plaque chaude à 52 °C) ont démontré l'implication du canal TREK-1 dans le mécanisme d'action de la morphine.

Dans un premier temps, l'implication des canaux dans le mécanisme d'action de la morphine a été évaluée en comparant le temps écoulé avant l'observation d'une réaction douloureuse entre les souris sauvages et les souris TREK-1$^{-/-}$ saines, après administration de doses croissantes de morphine. Les résultats montrent une importante diminution de l'analgésie induite par la morphine chez les souris KO et ceci dans les deux tests. De même, l'implication des canaux TREK-1 dans l'effet antalgique de la morphine a été validée chez des animaux modèles de douleurs postopératoires et neuropathiques[79].

Dans un second temps, des études *in vitro*[79] (électrophysiologie) ont prouvé l'existence d'un couplage fonctionnel entre les récepteurs opioïdes-μ (μOR) et TREK-1. De plus, l'utilisation de cellules exprimant TREK-1 avec une mutation a permis d'affirmer que la sérine en position 333, impliquée dans la phosphorylation dépendante de la protéine kinase A (PKA, cf glossaire), est essentielle à l'activation du canal par la morphine.

3.3.2 Intérêt du canal TREK-1

Outre le rôle essentiel dans le mécanisme antalgique de la morphine, nos collaborateurs ont prouvé que le canal TREK-1 n'était pas impliqué dans les effets indésirables induits par les opioïdes[79].

Un des effets indésirables le plus fréquent est la constipation. La comparaison des quantités de matières fécales produites par les souris sauvages et TREK$^{-/-}$ suite à une injection de morphine (1, 3, 5 mg/kg, sous-cutané) montre que l'apparition du phénomène de constipation est dépendant de la dose mais pas du génotype.

La dépression respiratoire est un autre effet indésirable, moins fréquent (survenant le plus souvent lorsque la morphine est administrée par voie injectable) mais plus dangereux. L'analyse de la fréquence respiratoire des souris TREK-1$^{+/+}$ et TREK-1$^{-/-}$ suite à l'injection de fortes doses de morphine a démontré que les canaux TREK-1 étaient indépendants de ce phénomène.

De même, le phénomène de dépendance physique à la morphine n'impliquerait pas les canaux TREK-1.

Le canal TREK-1 joue donc un rôle très important dans l'effet antalgique de la morphine alors qu'il n'est pas impliqué dans les effets indésirables induits par cette substance. Cette dissociation entre effet antalgique et effets indésirables est observée pour la première fois et permet de considérer très sérieusement les canaux TREK-1 en tant que cible thérapeutique pour le traitement de la douleur avec un ratio bénéfice / risque amélioré par rapport aux opiacés (Figure 24).

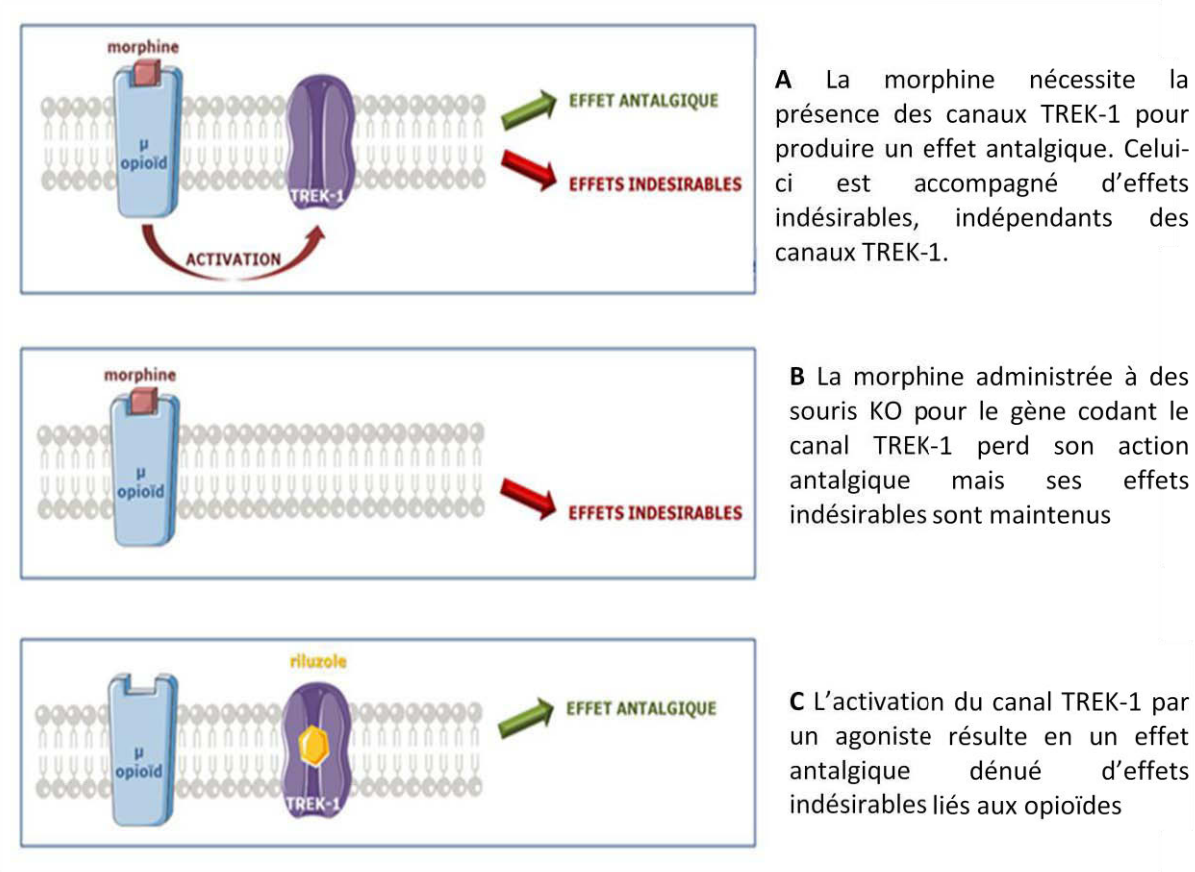
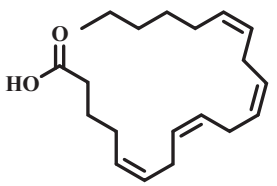


Figure 24 : Schéma récapitulatif. Intérêt du canal TREK-1.

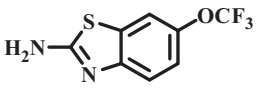
3.4 Modulateurs du canal TREK-1

Les canaux TREK-1 peuvent être activés par différentes substances chimiques. Nous avons déjà vu que les acides gras polyinsaturés tels que l'acide arachidonique et le lysophosphatidylcholine peuvent ouvrir le canal, tout comme le riluzole. Une étude bibliographique antérieure avait permis d'identifier d'autres activateurs. Ainsi, l'acide flufénamique[80], un anti-inflammatoire non stéroïdien et le trichloroéthanol[81], un anesthésique volatil, activent également TREK-1. Le CAPE[82] (Caffeic Acid Phenylethyl Ester) et plus spécialement le CDC[82] (Cinnamyl-1-3,4-dihydro-alpha-cyanocinnamate) sont des activateurs de TREK-1 (Figure 25).



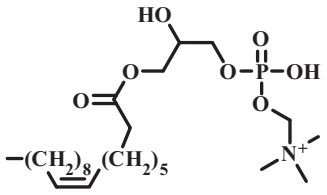
Arachidonic acid
1

I max/I seuil = 5 à 80 mV à 10 µM
sur des cellules COS par patch clamp



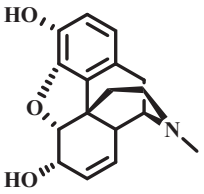
Riluzole
2

I max/I seuil =2 à 50 mV à 100 µM
sur des cellules COS par patch clamp



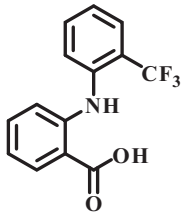
Lysophosphatidylcholines (LPC)
3

I max/I seuil = 2 à 40 mV à 3 µM
sur des cellules COS par patch clamp



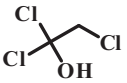
Morphine
4

activation du canal par l'intermédiaire des récepteurs µ



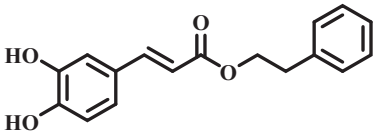
Flufenamic acid
5

IC_{50} (TREK-1) = 0.6 à 100 µM
sur des cellules COS par patch clamp



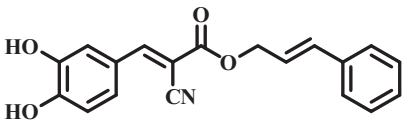
Trichloroethanol
6

I max/I seuil = 4 à 40 mV à 20 mM
sur des cellules CHO par électrophysiologie



CAPE
7

I max/I seuil = 3 à 40 mV à 40 µM
sur des cellules CHO par patch clamp

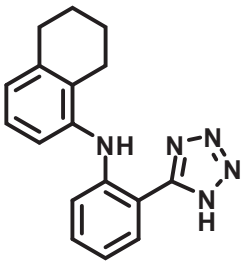


CDC
8

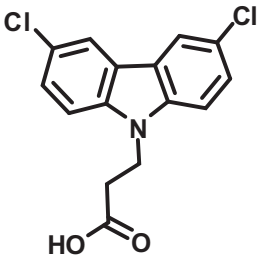
I max/I seuil = 4 à 40 mV à 20 µM
sur des cellules CHO par patch clamp

Figure 25 : Activateurs des canaux TREK-1

Le BL-1249[83] ((5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine) a été décrit comme activateur des canaux potassiques. Bien que le canal spécifique n'ait pas été identifié, il est fortement supposé que son mécanisme d'action repose sur le canal TREK-1. Plus récemment, un nouvel activateur a été découvert par l'équipe du Professeur Minor : le ML67.[84]



BL-1249
9



ML-67
10

EC_{50} (TREK-1) ~210 µM
sur des cellules HEK293T par patch clamp

Figure 26 : Activateurs des canaux TREK-1 découverts plus récemment

Depuis 2008, le canal TREK-1 a été ciblé par l'équipe du Professeur Ducki afin de développer de nouveaux antalgiques. Le CDC, évoqué précédemment, a été utilisé comme molécule *lead* et différents analogues ont été synthétisés en vue d'améliorer le pouvoir antalgique.[85,86]

3.5 Bilan des travaux antérieurs

La structure 3D du canal TREK-1 étant inconnue, toute approche de modélisation moléculaire ne peut se limiter qu'à une SAR (relation structure-activité), voire QSAR, indépendante du récepteur. C'est pourquoi l'équipe s'est basée dans un premier temps sur une recherche bibliographique des différents activateurs de TREK-1. Ensuite, le choix de la molécule *lead* s'est effectué en fonction du potentiel antalgique de chaque candidat. Pour cela, il a fallu sélectionner un test d'évaluation de l'activité antalgique *in vivo* permettant à la fois d'obtenir des résultats fiables et prédictifs tout en étant sensible. Le test de l'acide acétique, (AcOH-induced writhing assay) consistant à provoquer une douleur au niveau de l'abdomen de l'animal en lui injectant de l'acide acétique à 0.6%[87], rassemble ces critères et semble être un test de criblage primaire pertinent.

Ainsi le choix de la molécule *lead* du projet s'est porté sur le 3,4-dihydro-α-cyanocinnamate de cinnamyle (CDC **8**, Figure 24). En effet, il permet d'inhiber 50% des crampes abdominales induites lors du test de l'acide acétique. De plus, son aptitude à activer les canaux TREK-1 a été mesurée grâce à l'électrophysiologie. Cette technique consiste à mesurer un courant d'ions en fonction du temps grâce à deux électrodes de KCl fixées sur un ovocyte unicellulaire de *xénope* surexprimant le canal TREK-1. L'intensité du courant détectée représente le débit d'ions circulant à travers la membrane et donc à travers le canal TREK-1, majoritaire. Si le courant augmente en présence d'une molécule, celle-ci active le canal. A l'inverse, si le courant diminue ou reste stable, alors la molécule inhibe le canal ou

n'a aucun effet. Le calcul de l'activité (R_{TREK}) est le rapport entre l'intensité maximale atteinte et le seuil de repos. (R_{TREK} = I max/I seuil). Pour le CDC, la valeur de R obtenue est de 2.64.

A partir de la molécule *lead*, différents analogues ont été synthétisés et testés *in vivo* et *in vitro*. On peut les regrouper en deux sous-familles : les analogues longs et les analogues courts.

Sur chacune de ces familles, une étude QSAR a permis d'identifier les pharmacophores, ou autrement dit les groupements impliqués dans l'activité de la molécule. Ainsi, l'importance du groupement nitrile (jaune) et de la fonction ester (bleu) a pu être observée pour les analogues longs. En effet, les analogues possédant une fonction cétone, amide ou thioester se sont révélés moins actifs. Le remplacement du groupement nitrile par une amine ou un acide montre qu'il est important de conserver ce groupement pour optimiser l'activité.

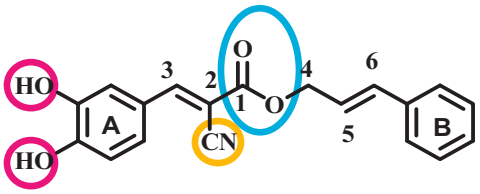


Figure 27 : Pharmacophores des analogues longs

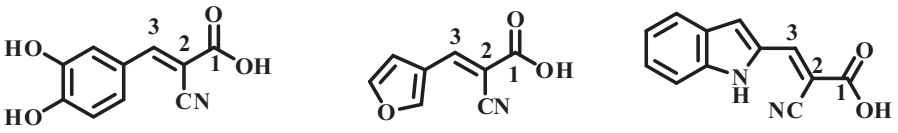
Il semblerait que les groupements hydroxyl (rose) sur le noyau aromatique aient une influence bénéfique sur l'activité bien que l'on puisse s'interroger sur la pertinence du noyau catéchol, notamment concernant sa toxicité.[88]

La chaîne latérale (carbones 4 à 6 + noyau B) a été raccourcie ou rallongée sans modification significative de l'activité. Cependant, les différentes tentatives de substitution ont conduit à une baisse de l'activité, suggérant l'importance d'une chaine alkylée.

Dans un deuxième temps, l'évaluation des analogues courts (acides acryliques et esters éthyliques notamment) a montré que l'activité pouvait être conservée voire améliorée dans certains cas. Deux hypothèses peuvent être formulées :

- Les analogues courts et longs n'interagissent pas de la même manière avec le récepteur
- les acides correspondent aux métabolites des analogues esters longs et ils sont peut-être à l'origine de l'activité. La partie ester jouerait alors plutôt un rôle de vecteur.

L'influence du noyau aromatique **A** a aussi été étudiée. En plus du groupement catéchol, deux noyaux aromatiques se sont révélés particulièrement intéressants au niveau de l'activité biologique: le furane **12** et l'indole **13.**



	11	**12**	**13**
activation de TREK-1 R	**1.29**	**1.43**	**2.44**
% d'inhibition des crampes induite par AcOH	**32%**	**31%**	**26%**

Figure 28 : Molécules « tête de série »

En résumé, les travaux antérieurs de notre laboratoire ont permis la préparation de 43 analogues du CDC qui ont été évalués *in vivo* et *in vitro*, conduisant aux trois nouvelles structures *lead* (**11**, **12** et **13** Figure 28).

3.6 Objectifs

Les canaux TREK-1 peuvent être modulés de diverses façons et notamment par des stimuli douloureux. Ils sont très fortement présents dans les nocicepteurs, ce qui renforce leur intérêt en tant que cible thérapeutique pour le traitement de la douleur.

Récemment, les travaux de l'équipe du Professeur Eschalier ont démontré l'implication du canal TREK-1 dans le mécanisme d'action de la morphine (activation indirecte). En l'absence de ce canal, l'effet antalgique de la morphine disparaît mais les effets indésirables subsistent. En revanche, l'activation du canal par un activateur tel que le riluzole entraine l'apparition d'un effet antalgique sans déclencher les effets indésirables habituels des opioïdes (données non publiées). La dissociation de ces deux effets, observée pour la première fois, permet de considérer le canal TREK-1 comme une cible privilégiée pour le traitement de la douleur.

A partir des travaux antérieurs réalisés[89] par l'équipe du Professeur Ducki et notamment des trois structures les plus actives, le but de ma thèse est d'optimiser le profil pharmacologique des analogues du CDC afin d'obtenir des candidats pré-cliniques les meilleurs possibles (activateur de TREK-1 : R > 3 et effet antalgique > 50% ; bon profil « *drug-like* »). Du bilan ci-dessus ressortent deux axes de travail principaux :

- La possibilité d'une chaine ester aliphatique (suppression du noyau aromatique **B** de droite) n'a pas encore été exploitée. Des études de pharmacocinétiques (temps de demi-vie) nous aideront alors à conclure sur l'utilité de la partie ester.

- En s'inspirant des analogues courts, il parait intéressant de continuer l'étude de l'influence du noyau aromatique A (naphtalène, imidazole, pyrrole…).

De plus, il semble important de renforcer l'évaluation pharmacologique de nos analogues. En effet, suite aux tests de criblage qui nous ont permis d'identifier des structures intéressantes, nous allons affiner notre sélection avec des tests supplémentaires (test au formol et test de la plaque chaude sur souris sauvages et KO, test d'Irwin, électrophysiologie sur cellule…). Des études de pharmacocinétiques et pharmacodynamiques nous aideront à améliorer l'activité des composés.

Enfin, nous aborderons une autre approche de la recherche en matière d'antidouleurs, le principe de drogue duale ou combinaison chimique de deux molécules connues pour leurs propriétés antinociceptives (mécanismes différents et complémentaires).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 4 CARACTERISATION DES MOLECULES « *LEAD* »

Avant de débuter la synthèse de nouveaux analogues, nous allons caractériser plus précisément les molécules *lead*. Dans un premier temps, une évaluation de type Irwin (test d'observation comportementale) nous a permis d'évaluer les éventuels effets indésirables (sédation, locomotion, mortalité). Ensuite, afin d'affiner l'évaluation pharmacologique, différents modèles de douleur ont été testés. Pour finir, des expériences d'électrophysiologie sur cellules, plus sensibles que sur ovocytes, nous ont permis de mesurer la capacité à activer le canal TREK-1.

4.1 Synthèse du CDC 8 et des molécules 11-13

Le CDC **8** est obtenu en 2 étapes à partir de l'acide cyanoacétique **14** (Schéma 1). La première étape consiste en une estérification entre l'alcool **15** et l'acide cyanoacétique **14**, en présence de DCC et de DMAP[90]. L'ester **16** est obtenu avec un rendement de 98% après purification sur gel de silice. Une réaction de Knoevenagel en présence de pipéridine avec l'aldéhyde **17a**, mise au point au laboratoire,[89] dans le dichlorométhane permet ensuite d'obtenir le CDC **8**, avec un rendement quantitatif.

L'obtention du CDC **8** est confirmée par l'apparition d'un singulet à 8.1 ppm caractéristique du proton éthylénique H-3.

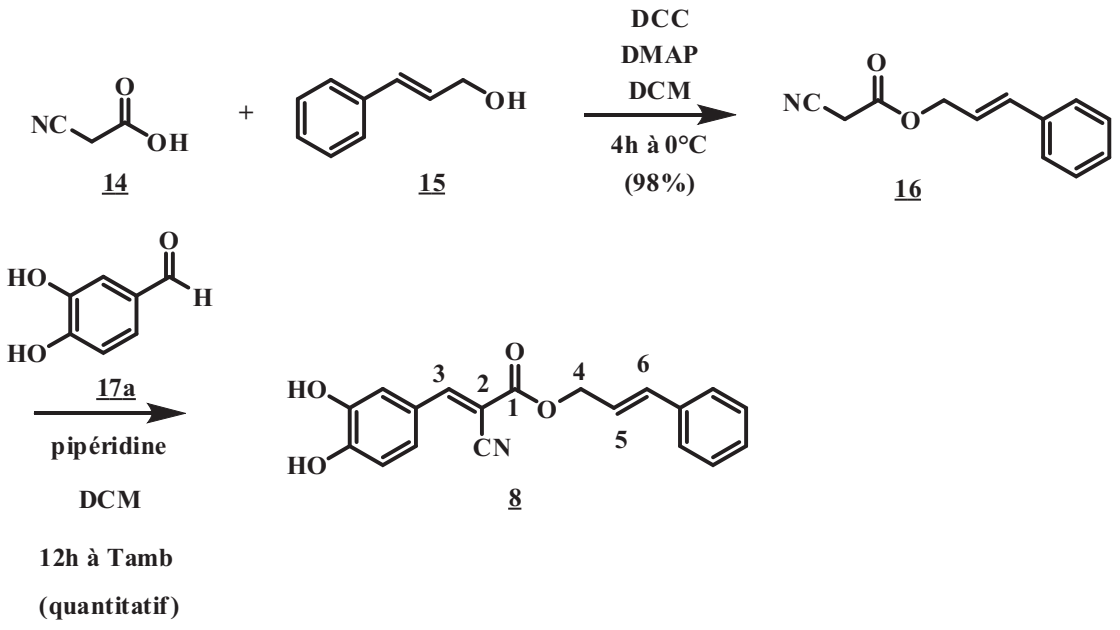


Schéma 1

Les acides **11**-**13** proviennent des esters **18a-c** qui peuvent être formés par condensation de l'α-cyano acétate **19** avec les aldéhydes **17a-c**.

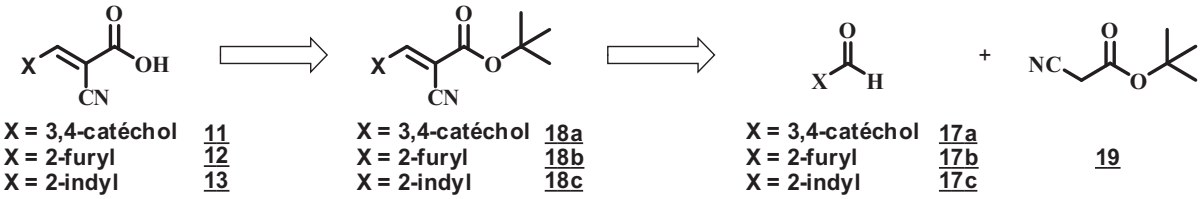


Schéma 2

L'acide cyanoacétique **14** réagit avec le *t*-butanol **20** en présence de DCC dans le DCM pour donner le précurseur **19**[91], avec un rendement de 45% (Schéma 3).

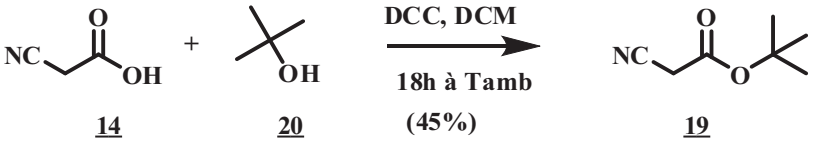


Schéma 3

L'ester **19** est ensuite engagé dans une réaction de Knoevenagel avec l'aldéhyde approprié (**17a-17c**), avant la dernière étape d'hydrolyse en présence d'acide trifluoroacétique[92] (Schéma 4) permettant d'obtenir les acides **11-13** avec des rendements de 78 et 90%. L'apparition du singulet caractéristique du proton éthylénique vers 8 ppm permet de confirmer la formation de l'acide α,β-insaturé.

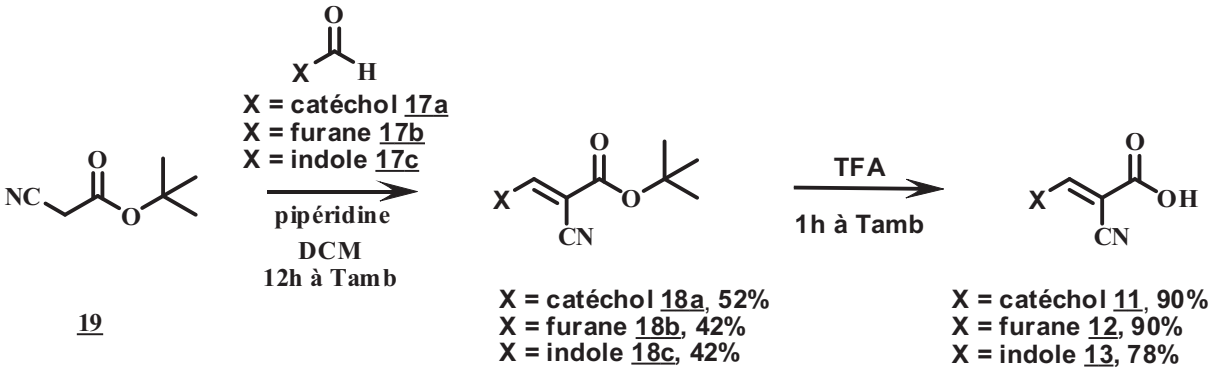


Schéma 4

Le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **17a** et le furaldéhyde **17b** sont disponibles commercialement alors que l'indole **17c** a été synthétisé selon le schéma de synthèse suivant (**Schéma 5**). A partir de l'acide **21**, une estérification permet d'obtenir, avec un rendement de

77%, l'ester éthylique **22** qui subit ensuite une réduction pour donner l'alcool **23**. Une oxydation en présence de MnO_2 conduit à l'aldéhyde **17c**, avec un rendement global de 40%.

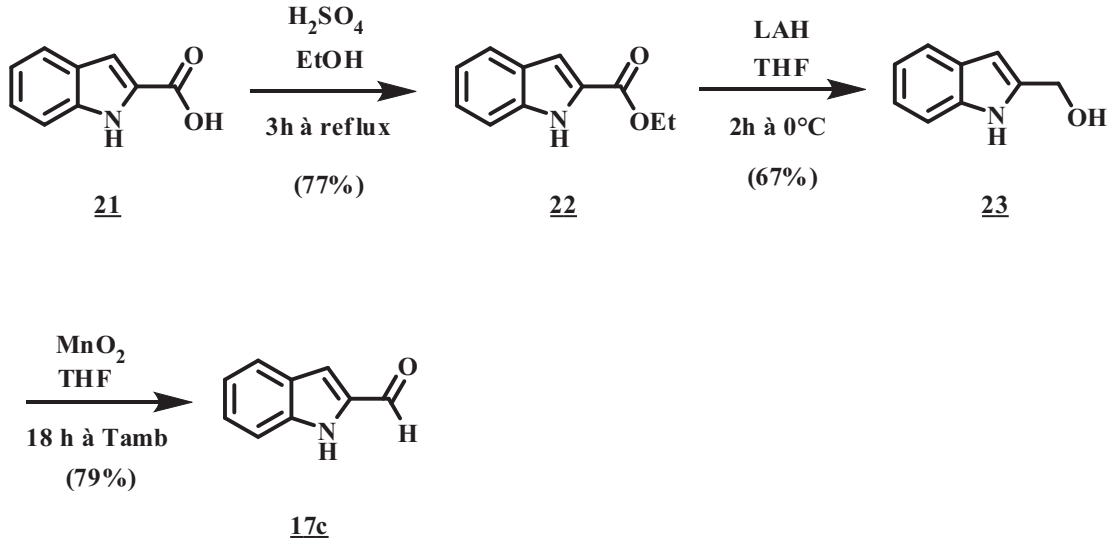


Schéma 5

4.2 Caractérisation pharmacologique des composés

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe plusieurs types de douleur chez l'Homme. Ainsi, il est nécessaire d'adapter les traitements à chaque type de douleur. Afin de fournir des outils pour la recherche fondamentale, différents modèles de douleur ont été développés chez les rongeurs (tests utilisant des stimuli thermiques, mécaniques ou chimiques, des mesures d'hyperalgésie ou d'allodynie). Récemment, des efforts ont été mis en œuvre afin d'évaluer la douleur induite chez les rongeurs plutôt que les réflexes nociceptifs. En effet, il existe une différence subtile entre douleur et nociception. Cette dernière englobe les mécanismes détectant, codant et transférant les stimuli nocifs de manière inconsciente au système nerveux central ainsi que les réponses réflexes permettant de protéger l'organisme. Au contraire, la douleur nécessite un traitement de l'information nociceptive par le cortex cérébral et entraine une réponse affective et subjective. Le patient est conscient de la douleur et peut la décrire verbalement. Chez l'animal, il est donc compliqué d'évaluer la douleur et la plupart des tests de douleur sont en fait des tests nociceptifs. Le développement de modèles capables de mesurer la douleur des rongeurs (modèles de douleur inflammatoire ou neuropathique) a permis d'améliorer la valeur de la recherche préclinique.[93]

Ainsi, différents tests nociceptifs (plaque chaude, test au formol) et modèles de douleur inflammatoire (test à la carraghénine) ont été menés.

4.2.1 Le test d'Irwin

Ce test décrit, pour la première fois en 1968 par Irwin,[94] permet d'évaluer qualitativement les effets d'une substance sur le comportement et les fonctions physiologiques de souris mais aussi d'estimer la durée d'action de la molécule. Il peut être facilement adapté à différentes espèces telles que les rats. Il est très souvent employé en première intention, lors des phases de découverte d'un *lead*, afin de déterminer la toxicité d'une molécule, l'intervalle des doses actives, les principaux effets sur le comportement (sédation, locomotion) et les fonctions physiologiques. Lors des phases plus avancées de développement, ce test donne une idée précise de la marge de sécurité du médicament (indications générales sur l'effet de la molécule sur les fonctions vitales telles que la respiration ou la motilité intestinale). Cependant, seuls les effets visibles peuvent être quantifiés.[95]

Le test consiste à administrer *per os* la molécule à un groupe d'animaux et à comparer le comportement de ces animaux à celui d'un groupe contrôle. Six doses différentes sont généralement évaluées. La plus basse correspond à la dose thérapeutique supposée et la plus haute peut être jusqu'à 100 ou 300 fois plus élevée, si la fenêtre thérapeutique (intervalle entre l'apparition des effets bénéfiques et des effets indésirables d'un médicament) le permet.

Différents critères tels que la sédation, l'excitation, les convulsions, la perte d'équilibre, l'agressivité, l'hypo- ou l'hyperthermie, les crampes, la température et même la mort sont observés 15, 30, 60, 120, 180 minutes et 24, 48 heures après l'administration du composé. L'évaluation se fait principalement en terme de présence ou d'absence d'un symptôme, mais certains effets sont quantifiés sur une échelle à trois points : faible, modéré, important (sédation, excitation).

Ce test nous a notamment permis de déterminer les concentrations maximales du CDC **8** et des trois acides **11-13** pour lesquelles nous n'observons pas d'effets indésirables importants.

4.2.2 Le test au formol (*formalin assay*)

Afin de confirmer les premiers résultats de criblage (test de l'acide acétique, induit par un stimulus chimique), un autre test nociceptif chimique, le test au formol, a été réalisé. Ce test peut également être considéré comme un modèle de douleur inflammatoire sur le court terme. Simple à mettre en œuvre, il constitue un moyen privilégié d'évaluer les antalgiques.[96]

Il consiste à injecter du formol dans la patte d'une souris, entrainant des démangeaisons que la souris va combattre en léchant ou secouant sa patte. Ce test provoque des réponses comportementales différentes selon le temps après l'injection. On observe d'abord une première phase de réaction importante, correspondant à l'activation directe des nocicepteurs. Elle ne dure que quelques minutes (0-10 min) avant de laisser place à une période de quiescence d'environ dix minutes. Finalement, on remarque une deuxième phase de réaction

durant de 20 à 35 minutes, reposant sur les mécanismes de la douleur inflammatoire.[93] L'évaluation du potentiel antalgique des molécules se fait en comparant la fréquence des comportements entrainés par la douleur entre une souris témoin et une souris traitée. Plus la différence est importante (la souris traitée se lèche moins), plus l'effet antalgique est fort.

Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme représentant le temps de léchage de la souris, au cours de deux phases.

Les composés **11** et **13** ont été testés à leur concentration maximale déterminée lors des tests d'Irwin (Figure 29).

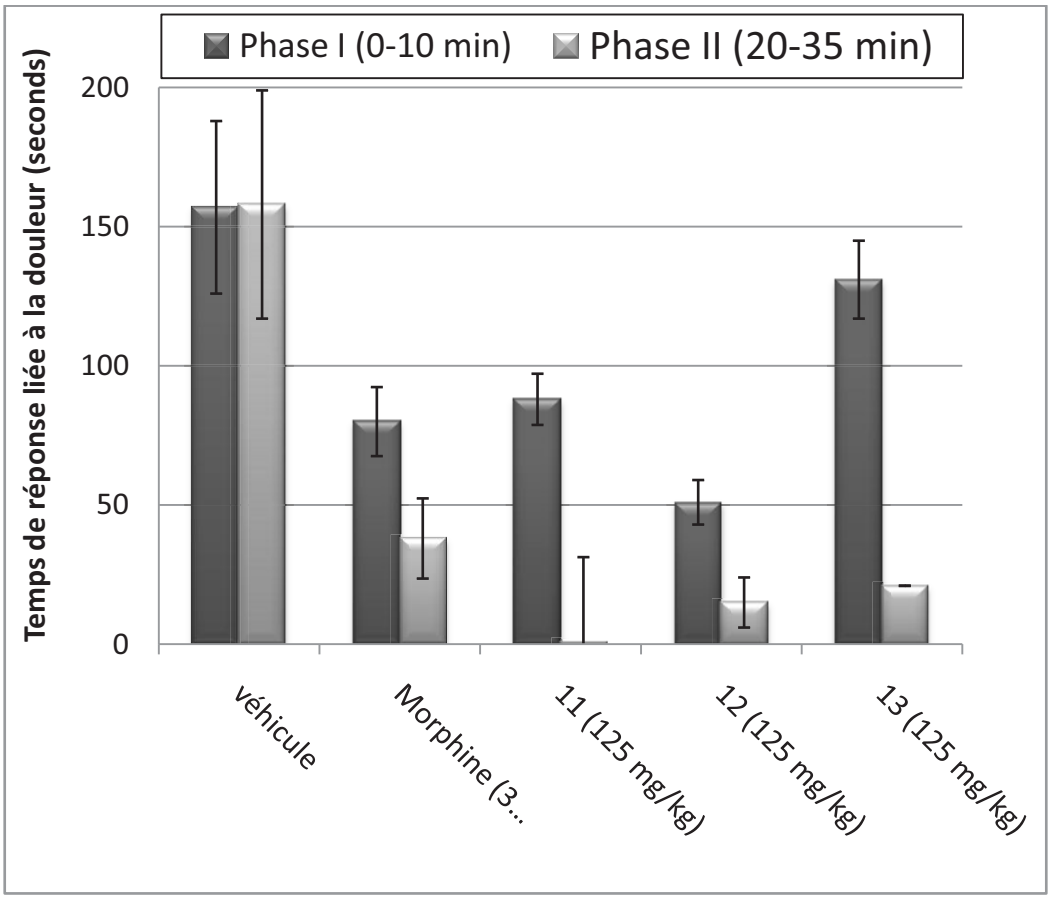


Figure 29 : Résultat du test au formol
Activité antinociceptive (latence avant l'apparition de la douleur) des composés 11, 12 et 13 (125 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol. Véhicule : Tween 80 (5%)

On remarque que le catéchol **11** et le furane **12** (125 mg/kg) sont capables de réduire la douleur aussi efficacement, voire mieux, que la morphine à 3 mg/kg au cours des deux phases. L'indole **13** ne montre pas d'efficacité lors de la première phase mais se révèle plus actif que la morphine dans la seconde.

A partir du graphe (Figure 29), on peut déterminer le pourcentage d'inhibition de la douleur grâce à la formule suivante :

$$\left(1 - \frac{temps\ de\ léchage\ du\ composé}{temps\ de\ léchage\ du\ véhicule}\right) \times 100 = \%\ d'inhibition\ de\ la\ douleur$$

Les données obtenues sont regroupées dans le Tableau 2.

Molécules	Aromatique	% inhibition de la douleur Formol I/II (mg/kg)[a]
morphine		3 mg/kg 59% / 79%
11	Catéchol	125 mg/kg 44%/99%
12	Furane	125 mg/kg 68% / 91%
13	Indole	125 mg/kg 17% / 87%

Tableau 2 : Résultats du test au Formol

[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (125 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol.

A la même concentration (125 mg/kg), le furane **12** est le plus efficace (68% d'inhibition de la douleur en phase I et 91% en phase II). Le catéchol **11** est modérément actif en phase I et très efficace en phase II (100% d'inhibition). L'indole **13** suit également cette tendance, en étant plus efficace en phase II (87%) qu'en phase I (17%).

La différence d'activité entre les deux phases peut s'expliquer par la cinétique et la distribution. En effet, chez le petit animal, on observe un pic de distribution entre 45 min et une heure environ. Ces résultats se révèlent d'autant plus intéressants lorsque l'on sait que certains médiateurs de l'inflammation telle que la prostaglandine (voie de l'AMPc) sont capables d'inhiber les canaux TREK-1.[33]

Un effet-dose a été effectué sur le produit le plus actif, l'acide **12** (Figure 30). Il montre la même capacité que la morphine (3 mg/kg) à réduire la douleur lors de la première phase du test à 30 mg/kg, et se révèle aussi efficace que la morphine durant la seconde phase pour une dose de 60 mg/kg.

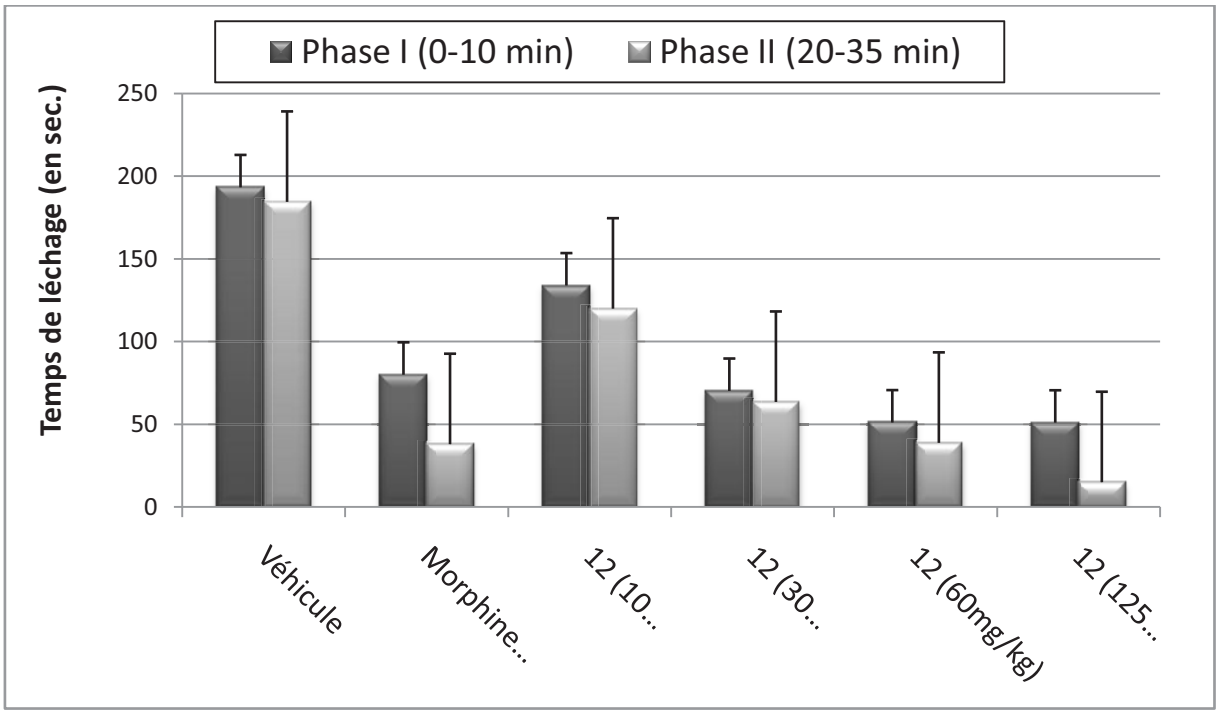


Figure 30 : Effet-dose sur le test au formol pour le composé 12
Activité antinociceptive (latence avant l'apparition de la douleur) (125 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol. Véhicule : Tween 80 (5%)

4.2.3 Le test de la plaque chaude (*hot plate assay*)

L'activité antalgique a ensuite été évaluée grâce à un test nociceptif thermique : le test de la plaque chaude. Ce test, beaucoup plus sélectif, va nous permettre de sélectionner des molécules ayant un réel potentiel antalgique.

Il consiste à déposer une souris sur une plaque chauffée de manière contrôlée à 52 °C et équipée d'un chronomètre et d'observer son comportement. Dès que la souris se lèche la patte ou sautille, le chronomètre est arrêté et la souris retirée. La valeur enregistrée mesure le temps d'apparition de la réaction douloureuse. On compare ensuite les seuils de base, enregistrés en l'absence de traitement, et les temps nécessaires à l'apparition de la douleur 30 minutes et 45 minutes après l'injection du produit testé. En général, seuls les opioïdes ont une influence sur le léchage de la patte, bien que certains antalgiques moins puissants, tels que le paracétamol et l'aspirine, soient capables de rallonger le temps avant que la souris ne sautille, mais ce pour des températures inférieures à 50°C.[87]

Les résultats sont présentés sous forme de graphique représentant la variation entre le seuil d'apparition de la douleur à 30 ou 45 min et le seuil de base. Ainsi, plus la barre de l'histogramme est élevée, plus la différence entre ces deux seuils est importante et plus le composé possède une forte activité antalgique. Les produits sont testés à 60 mg/kg et la morphine à 3 mg/kg (Figure 31).

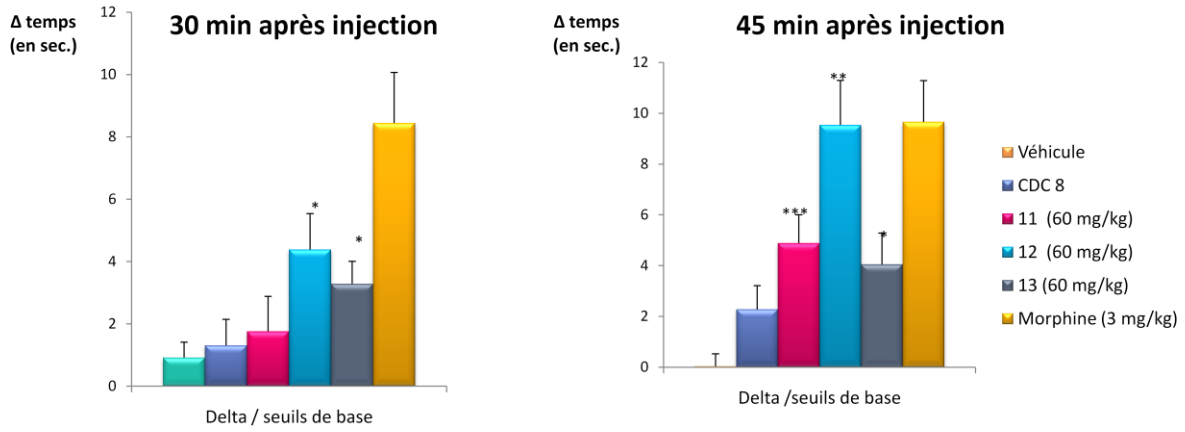


Figure 31 : Activité antinociceptive (latence avant l'apparition de la douleur) du CDC 8 et des acides 11, 12, 13 (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude, 30 et 45 min après l'injection. Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05. Véhicule : Tween 80 (5%)

Globalement, on observe une meilleure activité antalgique pour les nouvelles molécules que pour le CDC **8**. Le composé **12** se montre particulièrement intéressant alors que les produits **11** et **13** montrent une activité plus modérée. Le CDC **8** ne se révèle pas efficace sur ce test de la plaque chaude. En revanche, les acides **11-13** ont une activité modérée à forte, 45 minutes après l'injection. En effet, le furane **12** montre même un effet antalgique semblable à la morphine (3 mg/kg), ce qui est très encourageant.

On remarque ensuite que les composés sont plus actifs à 45 min ce qui est cohérent avec le pic de distribution chez le petit animal.

Il est aussi possible de présenter les résultats sous forme de graphe représentant la cinétique (Figure 32). On remarque ainsi que l'effet antalgique de la morphine se fait ressentir plus rapidement que celui du furane **12**.

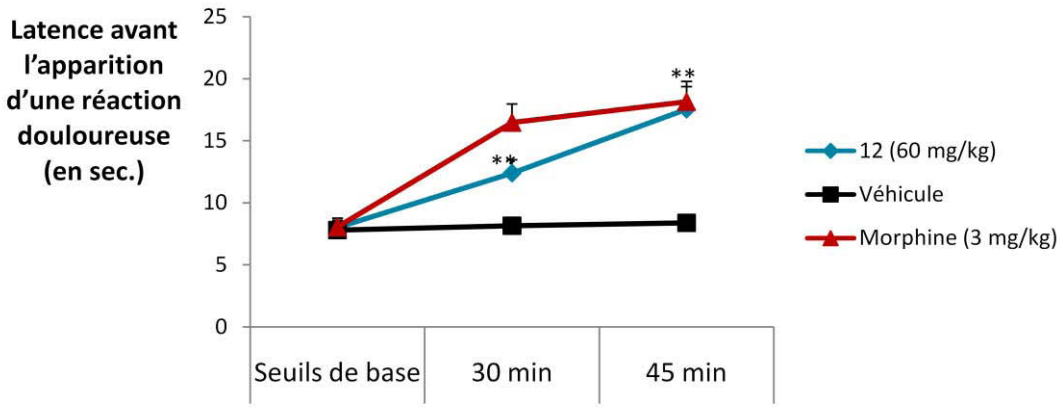


Figure 32 : Exemple de courbe de cinétique pour le composé 12
Activité antinociceptive (latence avant l'apparition de la douleur) du CDC 8 et des acides 11, 12, 13 (60 mg/kg, IP) au cours du temps pour le test de la plaque chaude.
Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05. Véhicule : Tween 80 (5%).

A partir de ce graphique, en comparant le temps écoulé avant l'apparition d'une réaction douloureuse pour le véhicule et pour le composé, on peut obtenir un pourcentage qui représente l'efficacité de la molécule :

$$\frac{latence\ post\ traitement - latence\ pré\ traitement}{latence\ pré\ traitement} \times 100 = \%\ d'activité\ antalgique$$

Molécules	Plaque chaude 60 mg/kg (30/45min)[a]
morphine	185% / 159.7%
CDC	34.8% / 30.5%
11	25.1% / 63.2%***
12	56.4%*/ 119.5%**
13	52.8%*** / 63.4%*

Tableau 3 : Résultats du test de la plaque chaude
[a]Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) du CDC 8 et des acides 11, 12, 13 (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude, 30 et 45 min après l'injection.
Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

Les composés augmentent tous le temps de latence des souris suite à une stimulation thermique ce qui montre leur implication dans les voies nociceptives thermiques. Ce résultat est très encourageant car peu de composés présentent une activité antalgique à ce test. Le pproduit le plus actif est encore l'acide **12**.

4.2.4 Le test à la carraghénine

La plupart des modèles de douleur inflammatoire repose sur l'injection de produits irritants produisant une réponse auto-immune et donc une inflammation ou directement sur l'administration des produits inflammatoires. C'est le cas de la carraghénine, un polysaccharide soufré extrait d'algues marines. L'injection intra-plantaire de cette substance chez le rat entraine à la fois une allodynie thermiquee et mécanique ainsi qu'une hyperalgésie, et ce pendant plusieurs heures.[5] Un test nociceptif (thermique : immersion de la patte dans de l'eau chaude, ou mécanique : Von-Frey, Randall et Selitto) est ensuite mené sur la patte inflammée du rat, afin d'évaluer la capacité d'une molécule à réduire l'hyperalgésie, et donc son pouvoir antalgique.

Dans notre cas, nous avons choisi le test mécanique de Randall et Selitto. Il consiste à exercer une pression (mesurée en gramme, g) sur la patte du rat et à enregistrer le seuil de douleur quand l'animal vocalise. Une première mesure de seuil de base est réalisée avant l'injection de carraghénine puis une seconde 3h30 après l'injection, afin de laisser le temps à

l'inflammation de s'installer. Le produit est alors injecté (s.c.) et les seuils de douleur sont ensuite enregistrés à 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min.

Ce test a été effectué uniquement sur le furane **12** et l'indole **13** présentant des résultats encourageants sur les tests précédents. A première vue, la réponse est dépendante de la concentration. On observe que le furane **12** permet une protection complète contre l'hyperalgie induite par la carraghénine entre 30 et 45 min, pour une dose de 100 mg/kg (Figure 33). En effet, le niveau du seuil douloureux lors de cette période est identique à celui du seuil de base. L'effet anti-hyperalgique est plus modéré pour les doses plus faibles bien que significatif à partir de 6 mg/kg. De plus, le furane **12**, à 100 mg/kg, montre une activité comparable à celle de la morphine (6 mg/kg). Ces résultats sont très encourageants.

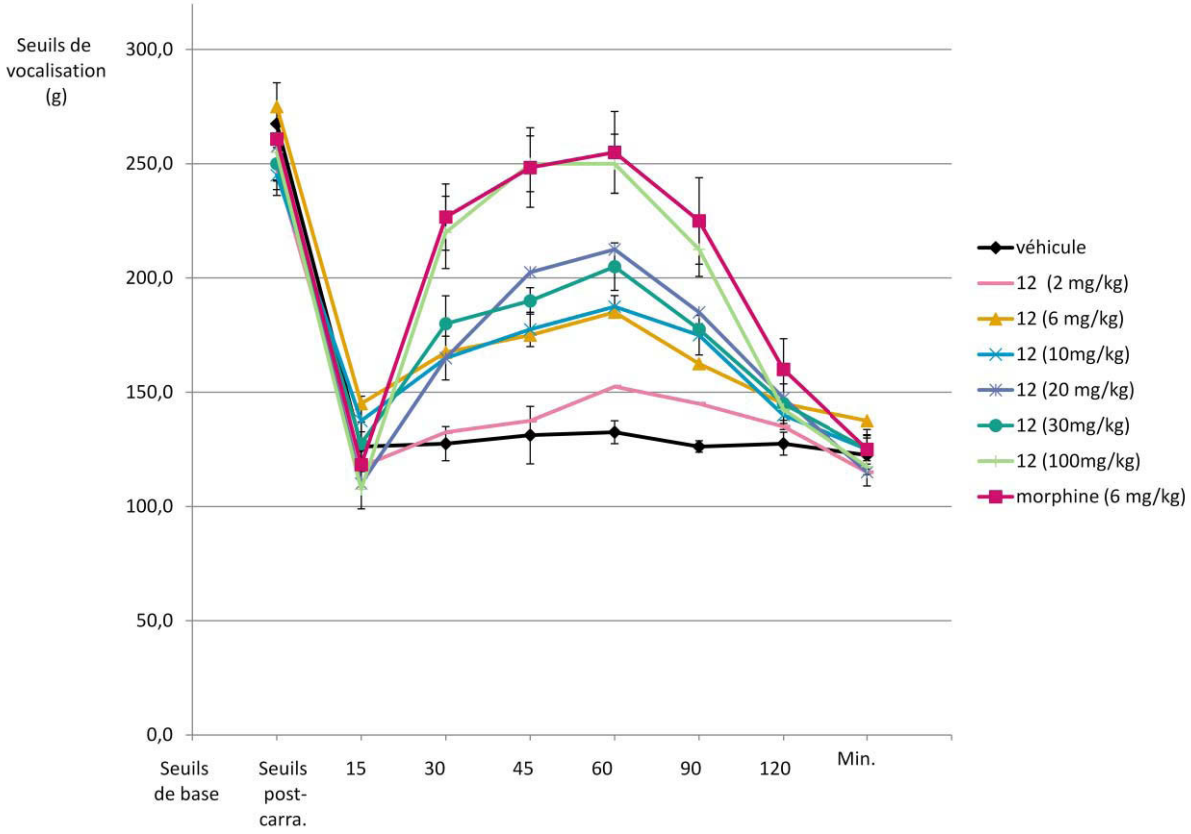


Figure 33 : Effet-dose test à la carraghénine sur le composé 12
Véhicule : Tween 80 (5%).

Pour l'indole **13** (Figure 34), la réponse est également dose-dépendante. On observe une protection importante à 100 mg/kg.

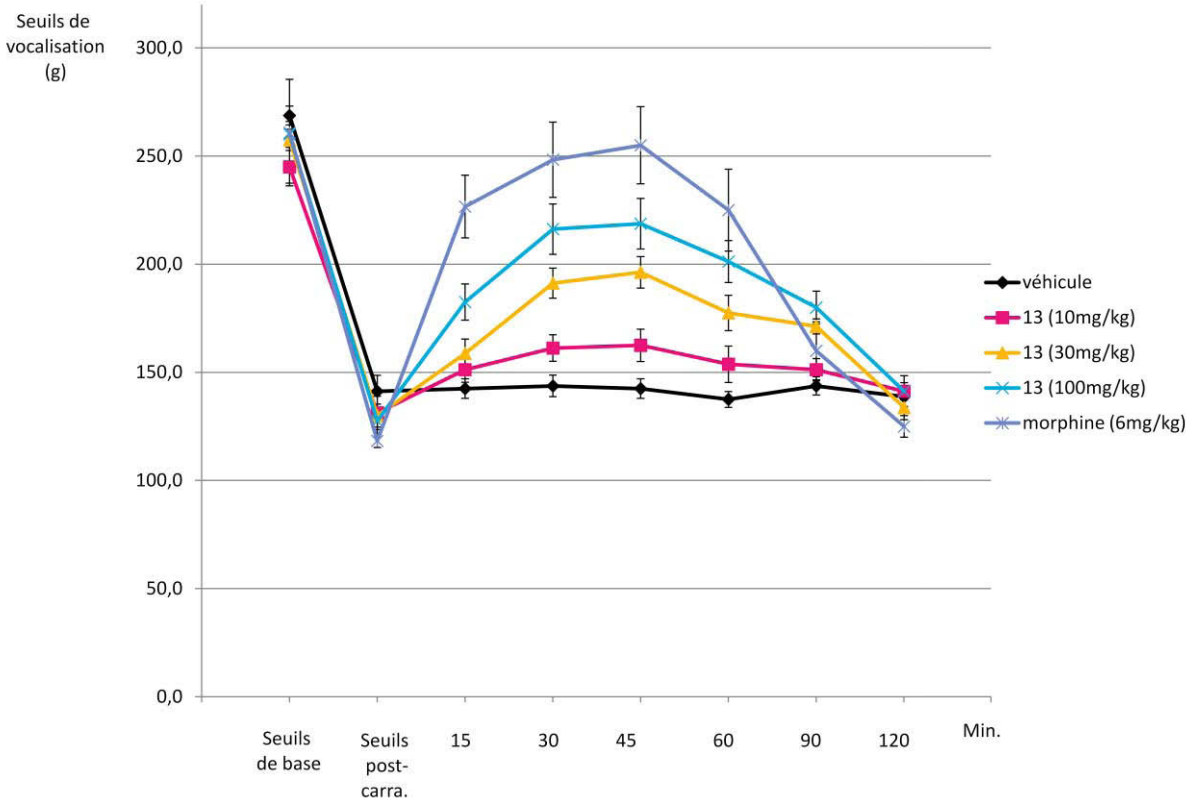


Figure 34 : Effet-dose test à la carraghénine sur le composé 13
Véhicule : Tween 80 (5%).

En conclusion, les deux acides **12** et **13** sont capables de réduire voire supprimer l'hyperalgésie induite par la carraghénine à des concentrations comprises entre 30 et 100 mg/kg. On remarque également que l'effet des deux composés est dose-dépendant.

4.2.5 Les tests sur souris invalidées pour le gène TREK-1 (TREK-1$^{-/-}$)

Grâce aux tests précédents, nous avons pu confirmer le pouvoir antalgique de nos molécules *lead* (4.2.2 à 4.2.3). Il nous faut maintenant déterminer si le mécanisme d'action *in vivo* de ces molécules dépend de l'activation des canaux TREK-1. Pour cela, nous allons réaliser les tests du formol et de la plaque chaude sur des souris invalidées pour le gène exprimant TREK-1 (KO ou TREK-1 $^{-/-}$). En comparant l'influence de nos molécules sur les souris sauvages (WT ou TREK-1$^{+/+}$) et KO, nous serons en mesure d'évaluer l'implication des canaux TREK-1 sur l'activité antalgique.

Les souris TREK-1$^{-/-}$ (souris noires) sont générées par recombinaison homologue conduisant à la suppression de l'exon 3, qui code pour le premier segment transmembranaire M1 de TREK-1.[76] Elles sont en bonne santé, fertiles et ne présentent pas de différences

morphologiques apparentes (couleur de peau, tonus, poids). Elles ne montrent pas d'anomalies dans leur posture, respiration ou activité spontanée. Leur activité motrice est identique à celle des souris TREK-$1^{+/+}$, tout comme leurs réflexes, les fonctions autonomes, la fréquence et le volume de la miction et de la défécation. Les réponses à divers tests portant sur le système visuel ou la reconnaissance d'objet sont les même pour les deux génotypes. De plus, la morphologie du cerveau, dans lequel les canaux TREK-1 sont fortement exprimés, reste normale. On n'observe pas non plus de surexpression compensatoire d'autres canaux K_{2P}.[76]

Les composés **11-13** (60 mg/kg) sont évalués en parallèle chez les souris TREK-$1^{+/+}$ et TREK-$1^{-/-}$ sur le test de la plaque chaude. Les différences de résultats sur les souris TREK-$1^{+/+}$ par rapport au paragraphe précédent sont dues au génotype des souris utilisées. En effet, les souris KO sont générées à partir de souris noires, plus résistantes que les souris blanches utilisées lors des tests de screening. On remarque que l'action de la morphine est en partie perdue chez l'animal TREK-$1^{-/-}$. Cela implique que les canaux TREK-1 jouent un rôle crucial dans l'effet antalgique de la morphine.[79]

Pour le catéchol **11** (Figure 35), on observe une perte d'activité antalgique complète de la molécule chez l'animal TREK-$1^{-/-}$ (8% d'antalgie contre 28% chez les souris TREK-$1^{+/+}$) ce qui signifie que le canal TREK-1 est fortement impliqué dans l'effet antalgique de ce composé.

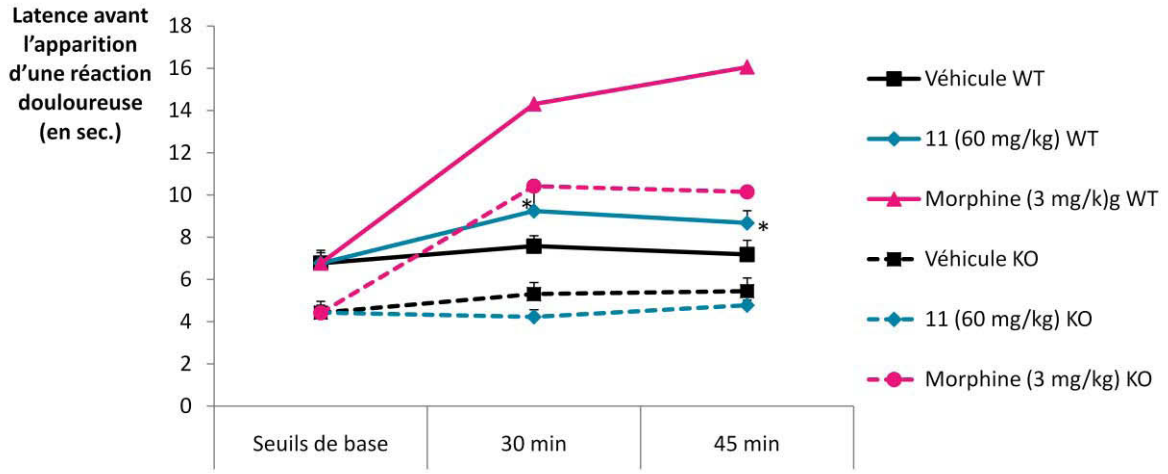


Figure 35 : Implication de TREK-1 dans l'effet du catéchol 11 : comparaison de l'activité antinociceptive (latence avant apparition de la douleur, 60 mg/kg, IP) au cours du temps pour le test de la plaque chaude chez les souris TREK-$1^{+/+}$ et TREK-$1^{-/-}$. Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$. Véhicule : Tween 80 (5%).

Pour le furane **12** (Figure 36), on remarque une diminution de l'activité antalgique bien qu'elle soit en partie conservée, ce qui signifie que le canal TREK-1 est partiellement

impliqué dans l'activité antalgique (121% d'antalgie chez les souris TREK-$1^{+/+}$ contre 78% chez les TREK-$1^{-/-}$).

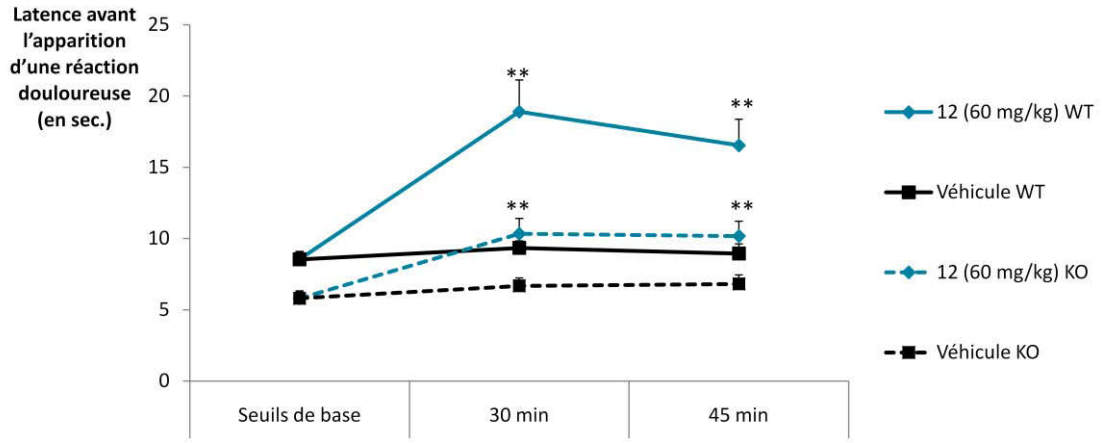


Figure 36 : Implication de TREK-1 dans l'effet du furane 12 : comparaison de l'activité antinociceptive (latence avant apparition de la douleur, 60 mg/kg, IP) au cours du temps pour le test de la plaque chaude chez les souris TREK-$1^{+/+}$ et TREK-$1^{-/-}$ Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$. Véhicule : Tween 80 (5%).

30 minutes après l'injection de l'indole **13** (Figure 37), l'effet antalgique du composé est complètement perdu chez le TREK-$1^{-/-}$ (-8% d'activité antalgique contre 25% chez les souris WT).

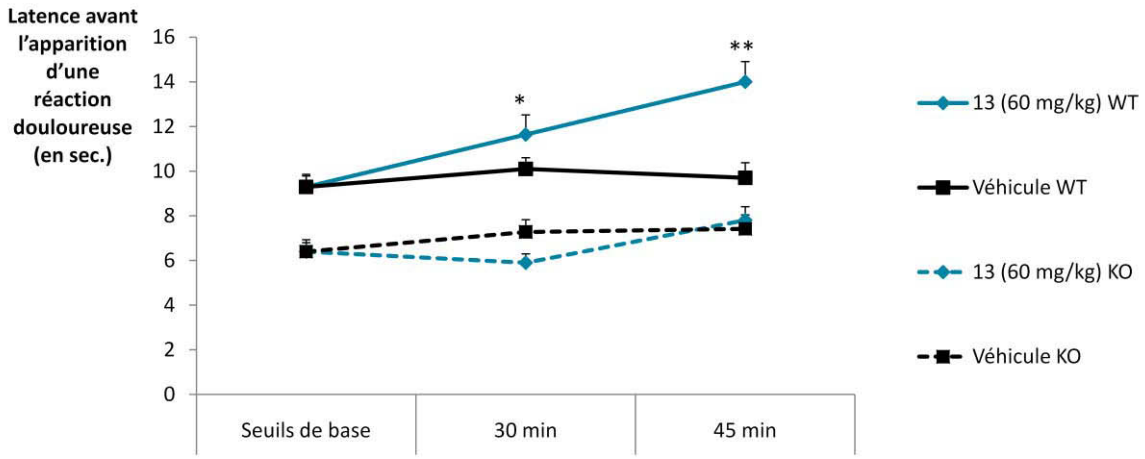


Figure 37 : Implication de TREK-1 dans l'effet de l'indole 13 : comparaison de l'activité antinociceptive (latence avant apparition de la douleur, 60 mg/kg, IP) au cours du temps pour le test de la plaque chaude chez les souris TREK-$1^{+/+}$ et TREK-$1^{-/-}$. Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$. Véhicule : Tween 80 (5%).

Globalement, on remarque que les acides **11-13** sont moins efficaces sur les souris KO que sur les souris WT, ce qui laisse entendre que le mécanisme d'action de nos antalgiques est dépendant du canal TREK-1. Afin de quantifier le rôle de ce dernier, on peut effectuer le calcul suivant (le calcul des pourcentages d'antalgie a été expliqué au chapitre 4.2.3):

$$\left(1 - \frac{\%\ antalgie\ KO}{\%\ antalgie\ WT}\right) * 100 = \%\ d'effet\ antalgique\ impliquant\ le\ canal\ TREK - 1$$

Pour les molécules *lead* **11-13**, on obtient les résultats suivants (Tableau 4) :

Molécule	% antalgie TREK-1$^{+/+}$ Plaque chaude[a] (30/45min)	% antalgie TREK-1$^{-/-}$ Plaque chaude[b] (30/45min)	% d'effet antalgique impliquant TREK-1
Morphine	98.6% / 124.5%	86.7% / 94.6%	12.1% / 24.0%
Catéchol 11	36.4%* / 28.1%*	-4.5% / 7.9%	100% / 71.9%
Furane 12	121.2%** / 93.5%**	78.1%** / 75.4%**	35.6% / 19.4%
Indole 13	25.2% / 50.5%	-7.8% / 22.0%	100% / 56.6%

Tableau 4 : Implication des canaux TREK-1 dans l'effet antalgique
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris TREK-1$^{+/+}$.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris TREK-1$^{-/-}$.
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$

Les *lead* **11** et **13**, bien que modérément antalgiques sur les souris TREK-1$^{+/+}$, perdent 100% de leur effet 30 min après l'injection, confirmant ainsi que leur activité antalgique est dû exclusivement à l'activation des canaux TREK-1. Le furane **12**, quant à lui, est très antalgique sur les souris TREK-1$^{+/+}$ mais cet effet n'implique les canaux TREK-1 qu'à hauteur de 36%.

Par ailleurs, les tests sur animaux TREK-1$^{-/-}$ permettent de mettre en évidence l'implication des canaux TREK-1 mais il n'est pas possible de savoir s'ils jouent un rôle directement ou s'ils sont activés de manière indirecte (comme la morphine qui active les récepteurs opioïdes-μ) et nécessitent l'intervention d'un autre système en amont ou en aval.

Des tests au formol sur souris TREK-1$^{-/-}$ ont aussi été effectués (Tableau 5) mais à des concentrations beaucoup plus faibles (10 mg/kg contre 60 mg/kg pour le test de la plaque chaude) : il est donc difficile de comparer les résultats. En effet, ce test montre une implication des canaux TREK-1 moins importante que le test de la plaque chaude. On peut expliquer ceci par les différents mécanismes impliqués selon les types de douleur. Ainsi, la

plaque chaude révèle les antalgiques avec des modes d'action centraux tandis que le test au formol reflète plutôt une action périphérique.

Molécules	% antalgie TREK-1$^{+/+}$ Formol[a] (phase I/II) 10 mg/kg	% antalgie TREK-1$^{-/-}$ Formol[b] (phase I/II) 10 mg/kg	% d'effet antalgique impliquant TREK-1[c] test au formol (phase I/II)
12	63%* / 76%*	60% / 65%	5% / 14%
13	36%* / 43%*	21% / 27%	42% / 37%

Tableau 5 : Implication des canaux TREK-1 dans l'effet antalgique du test au formol
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test formol chez les souris TREK-1$^{+/+}$.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test formol chez les souris TREK-1$^{-/-}$.
c % d'effet antalgique impliquant TREK-1 = (1 - %antalgie KO / % antalgie WT)*100
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$

4.2.6 Electrophysiologie sur cellules

Afin de confirmer la capacité de nos molécules à activer les canaux TREK-1, nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie sur des cellules HEK-293 transfectées avec TREK-1 et l'exprimant en permanence. Contrairement à l'électrophysiologie sur ovocytes, une seule micro-électrode en verre (micro-pipette) est utilisée pour mesurer le potentiel et imposer un courant. Les conditions expérimentales sont plus proches de celles *in vivo*. En effet, à l'inverse de la cellule, les ovocytes ne sont pas fécondés et ne contiennent donc que la moitié de l'information génétique. Ils ne se divisent pas et la composition protéique intracellulaire est différente ainsi que la structure membranaire. De plus, les courants obtenus sont plus importants que pour l'ovocyte.

La technique du patch-clamp, mise au point par Erwin Neher et Bert Sakmann (prix Nobel de physiologie ou médecine 1991), a été utilisée. Elle consiste à mesurer les courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires à l'aide d'une micro-pipette en verre remplie d'une solution ionique de composition définie. Le principe est basé sur la propriété des pipettes en verre à coller aux membranes biologiques formant ainsi une zone de très forte résistance ("gigaseal") qui isole électriquement la portion de membrane ("patch") présente sous la pipette. Pour obtenir le "gigaseal" plusieurs astuces sont utilisées : arrondissement de la pipette à l'aide d'une microforge, utilisation d'huile minérale, légère aspiration, etc.[97] Il existe différentes configurations en patch-clamp, selon ce que l'on veut enregistrer (Figure 38).[98]

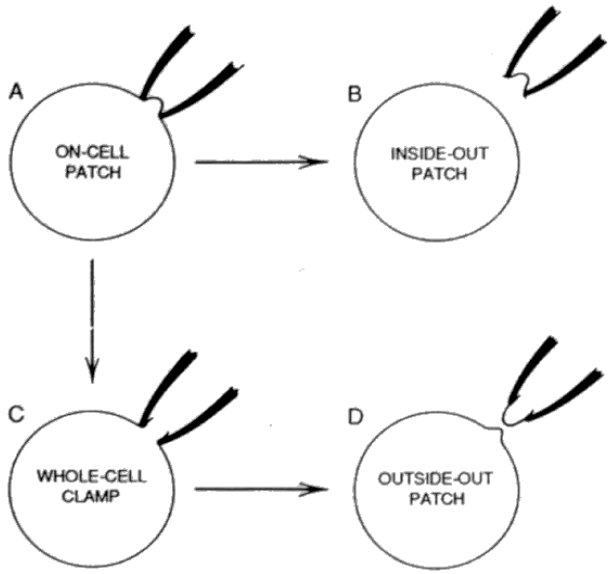


Figure 38 : configurations du patch-clamp[98]

La configuration cellule attachée (on-cell patch, Figure 38A) permet la mesure du courant produit par les canaux isolés dans la pipette tout en gardant la cellule intacte.

En éloignant la pipette, on peut obtenir la configuration inside-out (Figure 38B) avec la face interne de la membrane dans le bain. Elle permet la mesure du courant produit par les canaux isolés dans le fragment de la membrane excisée, en faisant abstraction de la cellule. On peut ainsi observer si la molécule agit directement sur le côté intracellulaire du canal indépendamment de toute signalisation intracellulaire.

A partir de la configuration cellule attachée, on peut rompre la membrane par aspiration pour obtenir la configuration cellule entière (whole-cell Figure 38C). Elle est utilisée pour mesurer le courant produit par tous les canaux présents sur la membrane cellulaire.

En éloignant la pipette, on peut réaliser un outside-out (Figure 38D) qui permet également la mesure des courants produits par les canaux isolés dans le fragment de membrane excisée. On peut voir si l'effet de la molécule s‘exerce directement sur le côté extracellulaire du canal indépendamment de toute signalisation intracellulaire.

Les différentes techniques présentent chacune des avantages et inconvénients (Tableau 6).

	Configurations	Avantages	Inconvénients
A	Cellule attachée (on-cell patch)	- Milieu interne de la cellule conservé - Mesure de courant unitaire	- Potentiel transmembranaire inconnu - Milieu interne non contrôlé
C	Cellule entière (whole-cell patch)	- Milieu externe parfaitement contrôlé - Milieu interne relativement bien contrôlé - Mesure d'un courant global	- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal
B/D	Patch excisé (inside-out et outside-out)	- Milieux interne et externe parfaitement contrôlés - Mesure de courant unitaire	- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des configurations patch-clamp[97]

Nous avons choisi d'utiliser la configuration cellule entière (Figure 38A, Figure 39) afin d'enregistrer des courants de grande amplitude, ce qui n'est pas possible avec des canaux isolés.

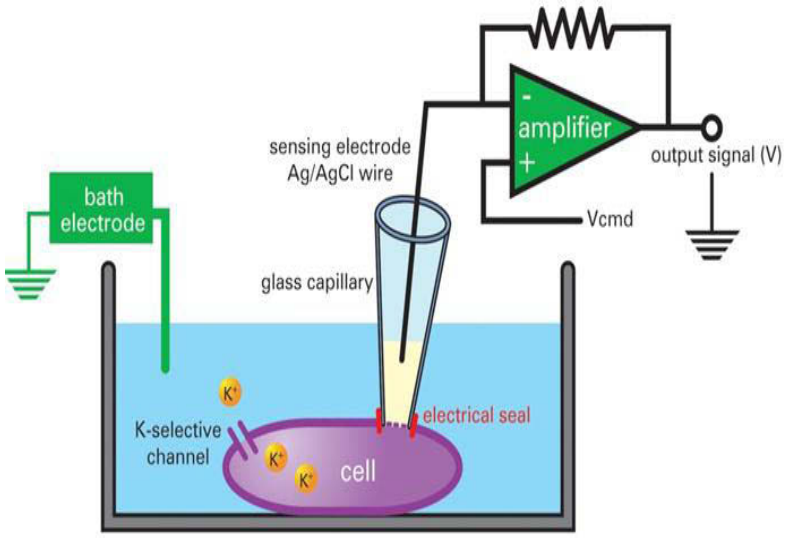


Figure 39 : Montage de la cellule entière[99]

Comme pour l'électrophysiologie sur ovocyte, l'intensité du courant détectée représente le débit d'ions circulant à travers la membrane et donc à travers le canal TREK-1 surexprimé. Si le courant augmente en présence d'une molécule, celle-ci active/ouvre le canal. A l'inverse, si le courant diminue ou reste stable, alors la molécule n'a aucun effet ou inhibe/ferme le canal. Le calcul de l'activité (R_{TREK}) est le rapport entre l'intensité maximale atteinte et le seuil de repos (R_{TREK} = I max/I seuil). En cas d'activation, on obtient une valeur de R_{TREK} positive. A l'inverse, une valeur négative traduit une inhibition. Ce paramètre nous permet de réaliser un premier criblage de nos molécules : on considère qu'il y a activation

notable du canal pour $R_{TREK} > 3$ à une concentration supérieure à 20 µM et pour $R_{TREK} > 2$ pour une concentration inférieure ou égale à 20 µM (Tableau 7).

Molécules	Activation de TREK-1 R_{TREK} (100µM)[a]
ML-67[84]	8.56 ± 2.24***
CDC	6.20 ± 2.61**
Catéchol 11	1.50 ± 0.2*
Furane 12	7.01 ± 2.75**
Indole 13	1.18 ± 0.16

[a] **R_{TREK} = I max/I seuil**

Tableau 7 : Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp). Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

Le CDC **8** et le furane **12** sont de bons activateurs des canaux TREK-1 *in vitro* tandis que le catéchol **11** et l'indole **13** n'activent que très faiblement ces canaux. Ces résultats semblent être en contradiction avec les tests sur souris KO. En effet, les conclusions précédentes (cf 4.2.5) montraient que l'implication du canal TREK-1 était plus importante pour les acides **11** et **13** alors qu'ici ils n'activent que très faiblement les canaux TREK-1 *in vitro*. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- Il est possible que, *in vivo*, le catéchol **11** et l'indole **13** activent indirectement le canal TREK-1 par le biais d'un autre système. L'absence de ce système dans la cellule HEK-293-TREK-1 pourrait expliquer cette faible capacité d'activation de TREK-1 en électrophysiologie. Par exemple, il a été démontré que l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate mGluR2 et $mGluR_4$ induit une activation des canaux TREK-1.[100] Il peut être envisageable que le catéchol **11** et l'indole **13** exercent leur action antalgique *via* l'activation de ces récepteurs.
- On peut aussi envisager que l'action *in vivo* de ces molécules est plutôt due à des métabolites de ces acides. Les composés **11** et **13** seraient alors des pro-drogues, inactives *in vitro* et qui deviendraient actives *in vivo*.

A l'inverse, le furane **12** est un très bon activateur *in vitro* mais les résultats des tests sur animal KO ne montrent qu'une faible implication de TREK-1. Cela peut s'expliquer *in vivo* par l'intervention d'un deuxième mécanisme complémentaire. Ainsi cette molécule combinerait une action antalgique due à l'activation des canaux TREK-1 et un autre mécanisme indépendant de ces canaux, permettant d'obtenir une analgésie modérée sur les souris KO.

4.3 Conclusion

Les résultats obtenus ont été compilés dans le Tableau 8. On peut remarquer que les trois composés chef de file **11-13**, malgré une inhibition moyenne de la douleur dans le test de l'acide acétique, démontrent une plus forte activité antalgique que le CDC **8** dans les autres modèles et particulièrement lors du test de la plaque chaude. Ceci est très satisfaisant car, habituellement, peu de molécules se révèlent actives au cours de ce test, à l'exception des opioïdes.

Par ailleurs, le test de la plaque chaude semble révéler une implication des canaux TREK-1 dans le mécanisme douloureux plus importante que le test au formol. En effet, seulement 14% et 42% au maximum de l'effet antalgique des produits **12** et **13** sont attribués à l'activation des canaux TREK-1 contre 56% et 100% dans le test de la plaque chaude. Cette différence peut s'expliquer par les modèles de douleurs impliqués (inflammatoire induite par un agent chimique versus nociception thermique) mais aussi par les différents modes d'action (action centrael versus action périphérique).

Cependant, on remarque également que les données *in vivo* sur souris KO et *in vitro* ne corrèlent pas. Ainsi, le furane **12** est l'activateur de TREK-1 le plus efficace d'après l'électrophysiologie alors que le pourcentage de son activité antalgique dû au canal TREK-1 est le plus faible sur les souris KO, quelque soit le modèle de douleur utilisé. On peut supposer que le composé **12** possède plusieurs mécanismes d'action qui n'impliquent pas tous les canaux TREK-1. A l'inverse, l'action de l'indole **13** semble reposer en grande partie sur l'activation des canaux TREK-1 lors des tests sur souris KO et pourtant l'électrophysiologie montre que ce composé est incapable d'activer le canal *in vitro*. On peut penser que le mécanisme d'action *in vivo* implique une activation indirecte des canaux TREK-1, par le biais d'un autre système tels que les récepteurs $mGluR_4$ et $mGluR_2$ ou bien $5\text{-}HT_1$. L'absence de ce système dans les cellules HEK-293 surexprimant TREK-1 expliquerait l'incapacité à activer le canal. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer une série de tests sur des animaux KO pour les récepteurs $mGluR_4$. Nous pourrions ainsi déterminer si ces récepteurs sont impliqués dans l'effet antalgique de nos molécules (activation indirect de TREK-1).

Nous avons aussi comparé nos composés à un produit récemment publié[84], le ML67, rapporté comme activateur des canaux TREK-1. Nous avons évalué son pouvoir antalgique : test au formol et test de la plaque chaude. On remarque que nos composés ont un effet antalgique plus important que le ML67, particulièrement sur le test de la plaque chaude. En revanche, seuls le CDC et l'acide **12** montrent la même capacité que le composé ML-67 à activer les canaux TREK-1 *in vitro* (Tableau 8).

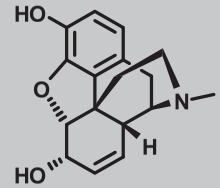
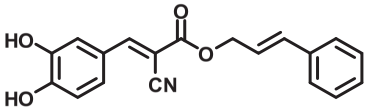
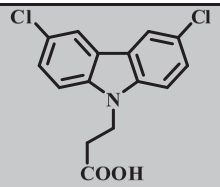
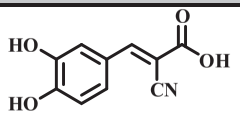
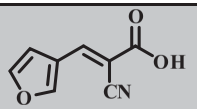
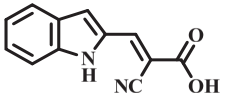
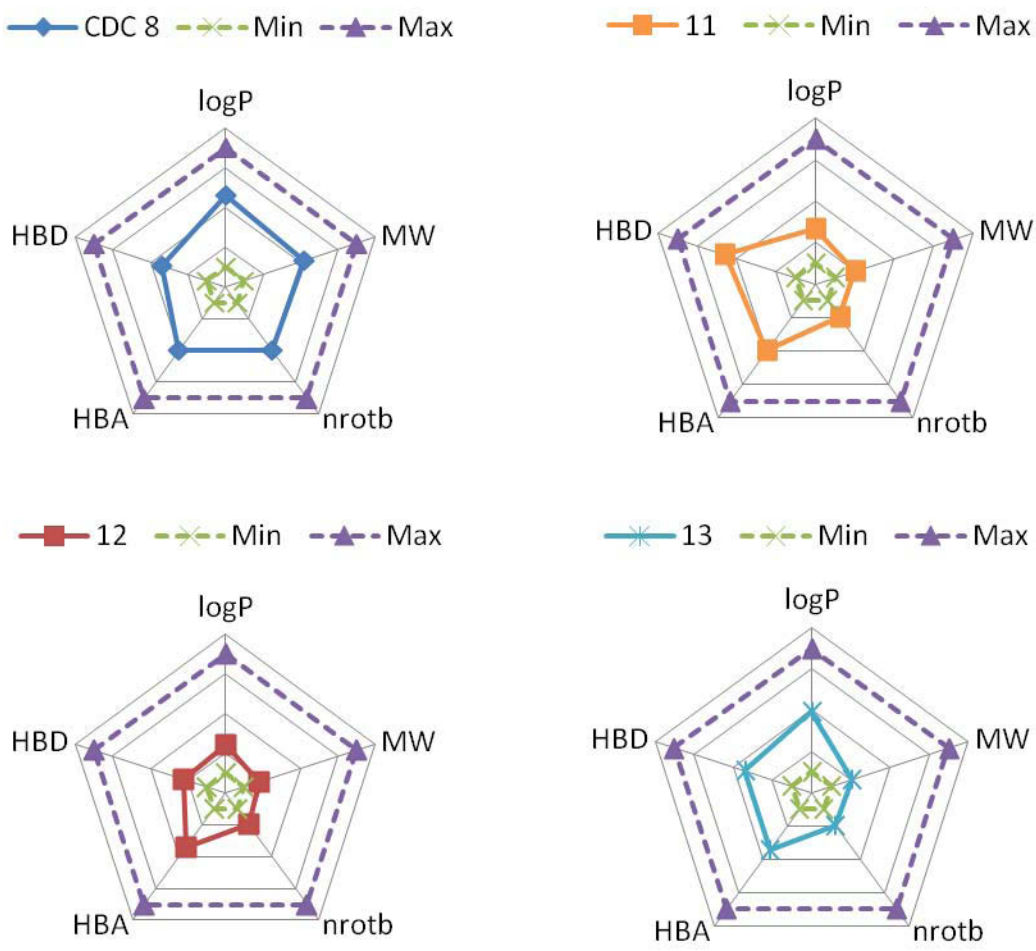
NOM	Structure	% inhibition de la douleur AcOH 10mg/kg	% inhibition de la douleur Formol I/II (mg/kg)	activation due à TREK1 formol Phase I / II (10 mg/kg)	Plaque chaude 60 mg/kg (30/45min)	activation due à TREK1 Plaque chaude 60 mg/kg (30/45min)	Test à la carra-ghénine	électrophysiologie Cellules R_{TREK} (100µM)
morphine		/	3 mg/kg 59% / 79%	/	3 mg/kg 185% / 159.7%	3 mg/kg 27.1% / 37.0%	+++	/
CDC 8		50.8	En cours	/	34.8% / 30.5%	/	/	6.20 ± 2.61**
ML67[84]		En cours	60 mg/kg 31% / 28%	/	77.4%*** / 36.6%	/	/	8.56 ± 2.24***
11		31.8	125 mg/kg 44%/ 99%	/	25.1% / 63.2%***	100% / 82%	/	1.50 ± 0.2*
12		30.7	125 mg/kg 68% / 91%	5% / 14%	56.4%*/ 119.5**	56% / 45%	+++	7.01 ± 2.75**
13		25.8	125 mg/kg 17% / 87%	42% / 37%	52.8%*** / 63.4%*	100% / 70%	+	1.18 ± 0,16

Tableau 8: Résultats *in vivo* et *in vitro* des molécules *lead* 8, 11-13 et du ML-67 .Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

Suite à une recherche bibliographique, nous avons découvert une publication[101] portant sur l'activité antinociceptive de dérivés esters de l'acide caféique et démontrant que cette activité était meilleure que celle de l'acide lui-même. Nous avons donc décidé d'orienter la suite de nos travaux vers la synthèse d'esters dérivés de nos acides *lead* **11-13**.

De plus, en comparant (Figure 40) les propriétés *drug-like* de nos *lead* **8** et **11-13** (c'est-à-dire les propriétés permettant à la molécule de circuler à travers le corps et d'atteindre sa cible sans perdre son efficacité, détaillées dans le chapitre suivant), on peut penser que l'ajout d'une chaîne ester permettrait d'obtenir un profil pharmacocinétique plus adéquat, se rapprochant de celui du CDC **8**. Notamment, une augmentation du logP devrait permettre une perméation plus importante (meilleur passage des membranes lipidiques).



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5
Optimum	3	350	6	5	2

Figure 40 : Radar-plot des propriétés *drug-like* du CDC 8, du catéchol 11, furane 12 et de l'indole 13
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre d'accepteurs de liaison H ; HBD, nombre de donneurs de liaison H. Min et Max définis d'après les règles de Lipinski.

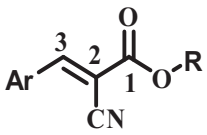
En résumé, ces différents tests nous ont permis d'affiner la caractérisation pharmacologique de nos molécules chefs de file. Nous avons ainsi pu confirmer l'amélioration de l'activité antalgique découverte lors du criblage.

L'analyse succinte des propriétés *drug-like* et l'étude de De Campos *et al.*[101] ont orienté la suite des travaux vers la synthèse d'esters de nos acides *lead* **11-13**.

Cette évaluation pharmacologique complémentaire nous a également permis d'optimiser notre nouvelle stratégie pour le criblage des futurs analogues. En effet, le test à l'acide acétique étant vraiment sensible, nous avons décidé de l'associer au test de la plaque chaude, simple et rapide à mettre en œuvre, afin d'éliminer d'éventuels faux positifs.

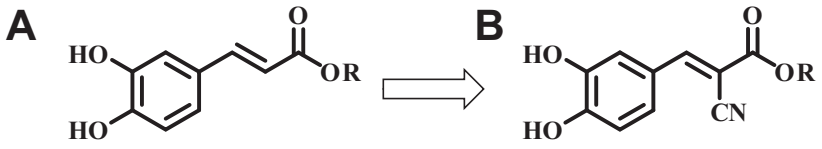
CHAPITRE 5 EXPLORATION STRUCTURALE

D'après les résultats et le bilan de SAR dressé précédemment (chapitre 3), nous allons d'abord nous concentrer sur la synthèse d'analogues possédant une chaine ester aliphatique **R**, afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des acides correspondants (**Ar** = catéchol **11**, furane **12**, indole **13**).



5.1 Conception de nouvelles molécules à partir du noyau Ar = catéchol

Dans un premier temps, le choix des chaines aliphatiques **R** s'est fait en s'appuyant sur une étude démontrant une activité antinociceptive pour une série de dérivés de l'acide caféique (Figure 41 A).[101] Parmi les esters rapportés par De Campos Buzzi, nous avons sélectionné les groupements éthyl, isopentyl et dodécyl afin d'évaluer l'influence de la longueur de la chaîne. Nous avons aussi voulu étudier l'importance de l'encombrement stérique en rajoutant les esters *t*-butylique et cyclohexylique (Figure 41 B). De part sa forte analogie avec l'acide caféique, le premier noyau aromatique sur lequel nous avons travaillé est le catéchol.



dérivés de l'acide caféique

R	Inhibition (%)
-H	34.6 (± 3.9)*
$-CH_2CH_3$	58.1 (± 4.4)**
$-(CH_2)_2CH(CH_3)_2$	75.8 (± 4.5)**
$-(CH_2)_{11}CH_3$	78.8 (± 1.5)**

Activité antinociceptive des dérivés de l'acide caféique lors du test à l'acide acétique chez la souris (10 mg/kg), IP.
*p < 0.05, **p <0.01

dérivés du CDC

R = - H **11**
$-CH_2CH_3$ **24**
$-C(CH_3)_3$ **18a**
$-(CH_2)_2CH(CH_3)_2$ **25**
$-C_6H_{11}$ **26**
$-(CH_2)_{11}CH_3$ **27**

Figure 41[101] : Analogie avec les dérivés de l'acide caféique

Dans un deuxième temps, nous avons tenu compte des propriétés *drug-like* de ces molécules. Le concept de *druggability*, développé par Lipinski, permet de décrire, pour une petite molécule thérapeutique, la probabilité de celle-ci à être capable de se lier avec une grande affinité à une cible biologique et de moduler son activité. Cette notion aide à l'optimisation des propriétés pharmacologiques en se basant sur des critères favorisant l'obtention de candidats médicaments sûrs et biodisponibles oralement.[102] Parmi les propriétés pharmacologiques, il faut distinguer la pharmacocinétique de la pharmacodynamique. Cette dernière résulte de l'action d'une molécule sur l'organisme, c'est-à-dire de son interaction avec une cible, reposant sur des pharmacophores et donc fortement dépendante de la structure 3D. A l'opposé, la pharmacocinétique découle de l'action de l'organisme sur la molécule : on peut la décrire en termes d'absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité (ADMET).[103] Ces propriétés, appelées propriétés *drug-like*, permettent de doter une molécule d'un comportement pharmacocinétique adéquat, c'est-à-dire qu'elles permettent à la molécule de circuler à travers le corps et d'atteindre sa cible de façon optimale, avant d'être ensuite éliminée sous la forme d'un métabolite non toxique.

Ainsi, au cours de son trajet dans le corps, une molécule va d'abord être absorbée : elle va devoir franchir plusieurs barrières pour atteindre la circulation sanguine. La plupart du temps, l'absorption se fait au niveau de l'intestin grêle, étant donné que la surface est très importante et que le temps de séjour est assez prolongé. Les barrières étant des bicouches lipidiques, il est donc important que la molécule possède à la fois un caractère lipophile et un caractère hydrophile (afin de se dissoudre dans le bol alimentaire puis dans le sang). Cette propriété est illustrée par la perméabilité, exprimée en logP entre 0 et 5. Ensuite, le système sanguin va permettre la distribution de la molécule aux différents organes, puis aux tissus, à travers la paroi des capillaires. Les molécules de petite taille (poids moléculaire < 500) pourront traverser plus facilement cette paroi. Le métabolisme définit les réactions subies par la molécule dans le corps, afin d'être excrétée plus facilement. La première phase consiste à introduire des groupes polaires afin d'augmenter la polarité du médicament, grâce à l'intervention du cytochrome P450, présents dans le foie notamment. Ce dernier joue un rôle crucial pour les molécules absorbées au niveau de l'intestin. En effet, celles-ci passent dans le sang puis traverseront le foie avant de rejoindre leur cible. Il est donc important qu'une grande proportion de ces molécules puisse survivre à cette première phase de métabolisme. La deuxième phase consiste à conjuguer les molécules à des biomolécules polaires, tels que des glucides, pour favoriser l'élimination. L'excrétion se fait principalement *via* les reins. La toxicité du principe actif et de ses métabolites est également un paramètre important.

Les propriétés *drug-like* ont été regroupées dans la règle des 5, énoncée par Linpinski.[104] Afin de posséder une biodisponibilité optimale, un composé doit suivre les critères suivants :

- *Poids moléculaire < 500* : il est relatif à la taille de la molécule. Plus celle-ci est grande, plus il est difficile de la solubiliser. De même, le passage des barrières biologiques devient plus compliqué.
- *Nombre de liaisons H accepteurs < 10* : le nombre de liaisons hydrogène augmente la solubilité dans l'eau et rend donc plus difficile le passage des barrières lipidiques.
- *Nombre de liaisons H donneurs < 5*
- *-1 < clogP <5* : une trop forte augmentation du logP se ferait au détriment de la solubilité aqueuse.

Autrement dit, une molécule « *drug-like* » est un composé possédant des propriétés ADMET optimales et une fenêtre thérapeutique acceptable, ce qui devrait lui permettre de passer avec succès la première phase des tests cliniques. L'utilisation de ces différents paramètres portant sur la biodisponibilité a ainsi contribué à la diminution de l'attrition au cours du développement de nouveaux médicaments.

Ces règles ont ensuite été complétées par Veber,[105] qui suggère que l'absorption au niveau intestinal ne dépend pas du poids moléculaire mais plutôt du nombre de liaisons rotatoires. Il relève aussi l'importance de la surface polaire (PSA, correspondant principalement aux atomes d'oxygène et d'azote), qui si elle est trop élevée, rend le passage des membranes plus compliqué.

- *Nombre de liaisons rotatoires < 12.*
- *Surface polaire < 140.*

Un concept développé plus récemment, ligand efficiency (LE)[106], permet d'estimer l'efficacité d'une interaction entre un ligand et sa cible, en tenant compte des propriétés physiques du ligand, notamment la taille. Il peut être complété par la notion de ligand-lipophilicity efficiency (LLE)[106], prenant en compte la lipophilicité du candidat médicament.

$$LE = pIC_{50} / \text{nombre d'atomes lourds}$$

$$LLE = pIC_{50} - clogP$$

Avec IC_{50} : la concentration inhibitrice médiane

Ou EC_{50} : la concentration efficace médiane.

Par ailleurs, toutes les règles citées précédemment doivent s'adapter si l'on décide de synthétiser un médicament à action centrale. En effet, ceci implique que la molécule doit être capable de traverser une barrière supplémentaire, la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, les ajustements suivants doivent être faits :[107]

- *Poids moléculaire < 450*
- *Nombre de liaisons H accepteurs < 7*
- *Nombre de liaisons H donneurs < 3*
- *1.5 < clogP <2.7*
- *Nombre de liaisons rotatoires < 8*
- *Surface polaire < 70.*

Nous avons donc déterminé, à l'aide du logiciel molinspiration,[108] les propriétés *drug-like* des cinq esters décrit en Figure 41 **18a** et **24-27** (Tableau 9). Comme attendu, l'ajout des esters permettrait d'augmenter le logP, le poids moléculaire mais également le nombre de liaisons rotatoires.

Le Tableau 9 montre que les analogues respectent les règles citées précédemment, excepté le composé **27** qui possède un logP élevé (> 5). Les molécules étant similaires, les surfaces polaires totales sont identiques (90 – 100 Å²) mais nous allons pouvoir étudier l'influence du logP et du poids moléculaire pour les propriétés pharmacocinétiques ainsi que l'influence de la longueur et de l'encombrement de la chaîne latérale pour les propriétés pharmacodynamiques. La stabilité métabolique ($t_{1/2}$) nous permettra de conclure sur le rôle joué par le groupement ester R.

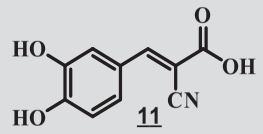
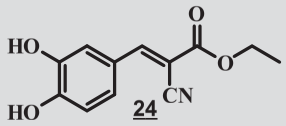
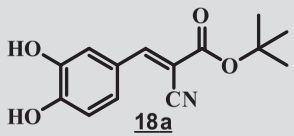
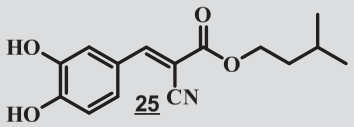
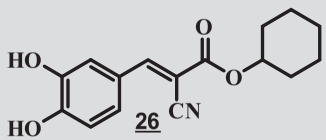
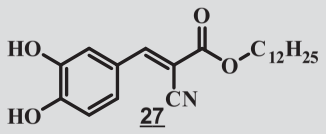
olécules envisagées	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire (MW, g.mol^{-1})	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire Å²
 11	205.169	5	3	0.664	2	101.547
 24	233.223	5	2	1.656	4	90.553
 18a	261.277	5	2	2.466	4	90.553
 25	275.304	5	2	2.933	6	90.553
 26	287.315	5	2	3.186	4	90.553
 27	373.493	5	2	6.760	14	90.553

Tableau 9 : Propriétés d*rug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

5.1.1 Synthèse d'analogues catéchol 24-27

Les cinq analogues sont obtenus selon la rétrosynthèse décrite au Schéma 6. Les esters finaux seront obtenus par une réaction de Knoevenagel entre le 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17**, commercial, et le cyanoester **28-31** correspondant. Ce dernier proviendra d'une réaction d'estérification de l'acide cyanoacétique **14** avec l'alcool approprié **32-35**.

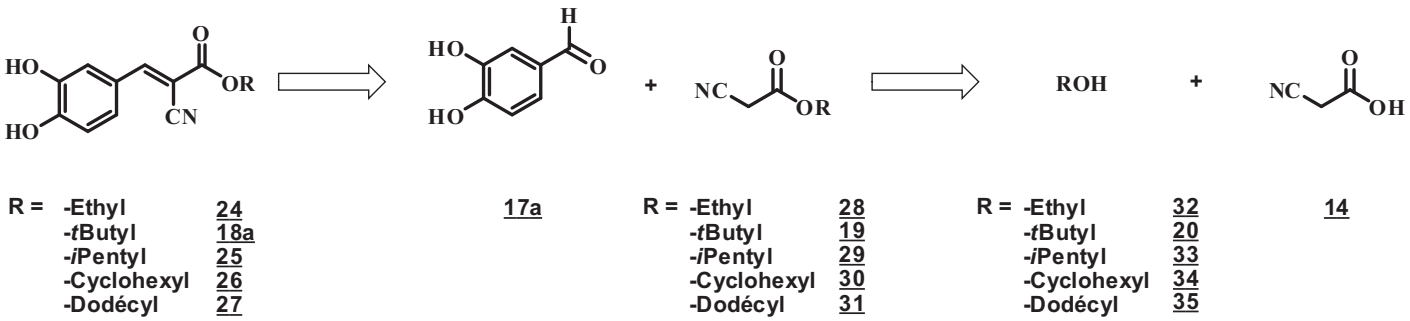


Schéma 6

5.1.1.1 Synthèse des esters 28-31

Différentes méthodes d'estérification ont été employées pour obtenir les esters **28** à **31**.

Pour commencer, une estérification de Steglich[109,110] entre l'acide cyanoacétique **14** et l'alcool correspondant (**32-33**, **35**) dans le dichlorométhane, en présence de DCC et de DMAP permet l'obtention des esters **28**, **29** et **31** avec des rendements compris entre 48 et 87% (Schéma 7).

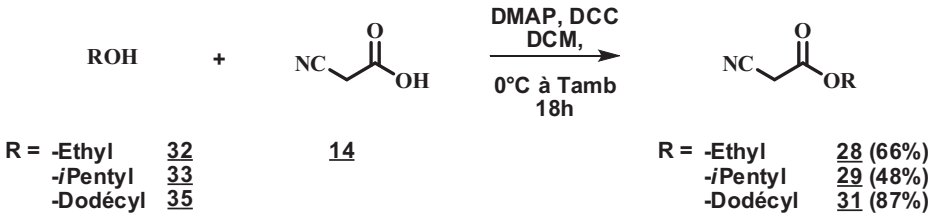
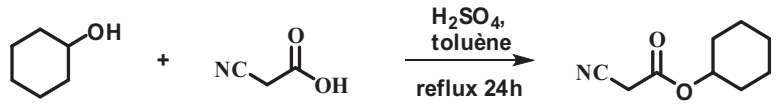


Schéma 7

Ensuite, une estérification de Fischer[111] entre le cyclohexanol **34** et l'acide **14** en présence d'acide sulfurique donne l'ester **30** avec un rendement de 77% (Schéma 8).



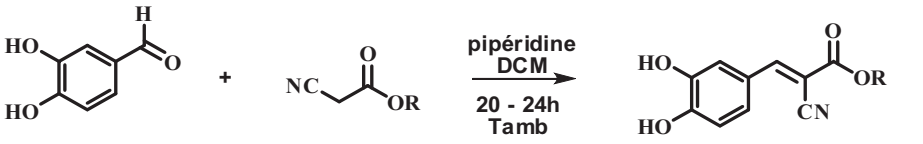
34 14 30, (77%)

Schéma 8

Les composés ont été caractérisés par leurs données spectroscopiques. En RMN ^{1}H, on note l'apparition d'un singulet entre 3.30 et 3.50 ppm caractéristique du méthylène en alpha du nitrile.

5.1.1.2 Synthèse des esters 24-27

Les esters **28-31** obtenus précédemment sont engagés dans une réaction de Knoevenagel avec le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **17**, en présence de pipéridine (Schéma 9).



17

R =	-Ethyl	28	R =	-Ethyl	24 (55%)
	-*t*Butyl	19		-*t*Butyl	18a (52%)
	-*i*Pentyl	29		-*i*Pentyl	25 (66%)
	-Cyclohexyl	30		-Cyclohexyl	26 (71%)
	-Dodécyl	31		-Dodécyl	27 (76%)

Schéma 9

Les esters sont obtenus avec des rendements compris entre 52 et 76%. Ils ont été caractérisés par leurs données spectroscopiques. En RMN ^{1}H notamment, on remarque l'apparition d'un singulet vers 8 ppm, caractéristique du proton éthylénique.

Les conditions expérimentales,[89] mises au point au laboratoire précédemment, préconisaient l'utilisation d'un léger excès d'aldéhyde afin d'optimiser le rendement. Cependant, nous avons rencontré des problèmes pour la plupart des composés lors des purifications par chromatographie sur gel de silice. En effet, l'aldéhyde et le produit final co-éluent, rendant leur séparation plus délicate.

Dans un premier temps, l'ester cyanoacétate étant plus facilement séparable du produit final, nous avons envisagé de l'introduire en excès afin de consommer un maximum d'aldéhyde. Cette solution n'étant pas pleinement satisfaisante (traces d'aldéhyde), nous avons ensuite essayé d'effectuer un lavage au bisulfite de sodium. Ce dernier permet de

réduire l'excédant d'aldéhyde selon le mécanisme proposé dans le Schéma 10, et de le faire passer en phase aqueuse lors du traitement.

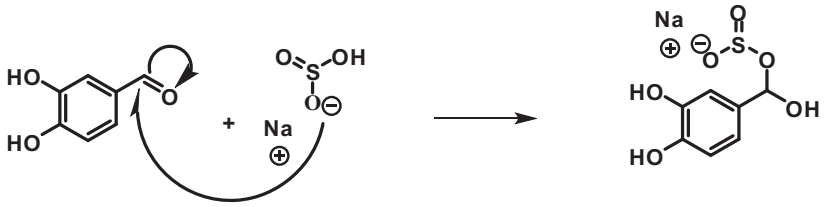


Schéma 10

Nous avons ainsi pu améliorer nos rendements : pour le composé **24** on obtient un rendement de 55% contre 20% sans lavage.

5.1.2 Evaluation de l'activité pharmacologique des analogues catéchol 18a, 24-27

Dans un premier temps, nous avons adopté la stratégie de criblage utilisée précédemment au laboratoire : test à l'acide acétique pour évaluer l'activité antinociceptive *in vivo* et électrophysiologie sur ovocytes pour déterminer la capacité des composés à activer le canal TREK-1 *in vitro* (Tableau 11). Nous avons choisi de présenter ce dernier critère en le comparant au CDC **8**. Ainsi le coefficient d'activation est normalisé par rapport à la valeur du CDC : $R_{norm} = R_{TREK} / R_{CDC}$. Si ce coefficient R_{norm} est supérieur à 1, la molécule sera donc un meilleur activateur que le CDC.

Les activités antalgiques (test de l'acide acétique) des esters **18a**, **24-27** varient de 27 à 55%. Une activation des canaux TREK-1 est également observée pour touts les composés, comprise entre 0.93 et 1.01.

Ce criblage primaire nous permet de sélectionner trois produits (**24**, **25** et **26)** ayant un effet antalgique intéressant (% test acide acétique > 50%) et/ou une bonne capacité à activer le canal TREK-1 (R_{norm} proche ou supérieur à 1). Nous avons alors exploré le profil antalgique de ces trois produits sur deux nouveaux tests de douleur, détaillés précédemment (Chapitre 4) : le test au formol et la plaque chaude (Tableau 11). L'ester cyclohexylique **26** ne montre qu'une faible activité antalgique *in vivo* sur la plaque chaude (< 40%) et une faible action sur le test au formol (33% lors de la phase deux). L'ester éthylique **24** présente des résultats un peu plus encourageants mais semble avoir un effet de courte durée : 39% lors de la première phase du test au formol et 47% pour le test de la plaque chaude à 30 min (30% à 45min). L'ester *i*pentylique **25**, quant à lui, semble beaucoup plus intéressant. En effet, en plus d'un coefficient d'activation de TREK-1 proche de 1, il inhibe significativement la douleur lors du test de la plaque chaude (87.5% après 45 min).

Afin de confirmer l'activation du canal TREK-1, nous avons réalisé l'électrophysiologie sur cellules HEK-293 stabilisées pour TREK-1, plus sensibles que les ovocytes. Tous les produits n'étant pas solubles à une concentration de 100 µM, nous avons dû effectuer ce test à des concentrations différentes (10, 20, 50 ou 100 µM selon les molécules). Afin de pouvoir comparer les résultats, des effets-dose ont été réalisés sur les produits référence : le CDC **8** et le ML-67 **10** (Tableau 10).

Molécules	CDC 8 Cellules[a]
1 µM	2.68 ± 0.31**
10 µM	3.55 ± 0.61**
20 µM	8.23 ± 2.83*
50 µM	8.99 ± 1.87***
100 µM	10.30 ± 2.68**

Tableau 10 : effet-dose pour la molécule *lead* CDC 8
[a] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$

L'électrophysiologie sur cellules HEK-293 nous a permis de confirmer que l'ester *i*-pentylique **25** (R_{TREK} = 4.07 ± 0.57 à 100 µM) et l'ester cyclohexylique **26** (R_{TREK} = 5.78 ± 0.64 à 100 µM) sont capables d'activer le canal TREK-1 avec une bonne efficacité.

Si l'on compare les résultats *in vivo* des esters **18a**, **24-27** aux molécules référence CDC (acide acétique : 50.8% ; plaque chaude : 34.8% / 26.7%) et ML-67 (formol : 31% / 26% ; plaque chaude : 77.4% / 36.6%), on remarque une meilleure activité antinociceptive lors du test de l'acide acétique pour les esters **24** (57.8%) et **26** (55.3%) et un même ordre de grandeur pour le test au formol ou de la plaque chaude. L'ester **25**, quant à lui, est moins actif lors du test de l'acide acétique (27.2%) mais largement plus efficace lors du test de la plaque chaude.

De plus, si l'on compare les résultats avec ceux de l'acide correspondant **11,** on observe une amélioration quasi-générale sur le test à l'acide acétique. Pour le test au formol, les résultats sont inférieurs mais la dose injectée est beaucoup plus faible (60 mg/kg contre 250 mg/kg). Seul le test de la plaque est réellement plus convaincant pour l'acide **11** (25.1% / 63.2%). Concernant les tests *in vitro*, les esters **25-26** sont de meilleurs activateurs des canaux TREK-1 que l'acide **11** selon les résultats de l'électrophysiologie sur cellule ($R_{TREK} > 3$). On peut donc penser que les esters sont hydrolysés trop rapidement *in vivo* et qu'ils n'ont pas le temps d'activer TREK-1.

	Molécules	Tests *in vivo*			Tests *in vitro*	
		AcOH[a] 10mg/kg	Formol I/II[b] (60 mg/kg)	Plaque chaude[c] 30/45min (60 mg/kg)	Ovocytes[d] (20 nM)	Cellules[e] R_{TREK} (µM)
-	**CDC 8**	**50.8%**		34.8% / 26.7%	1	**10.30 ± 2.68** (100)**
-	**ML67 10**		31% / 28%	**77.4%** / 36.6%	-	**8.48 ± 1.83*** (100)**
H	**11**	31.8%	44% / **89%** (250 mg/kg)	25.1% / **63.2%**	0.66	1.50 ± 0.2* (100)
Ethyl	**24**	**57.8%**	39% / 34%	46.7%$^{-}$ /29.9%$^{-}$	0.94	1.54 ± 0.1*** (100)
t-butyl	**18a**	43.4%	-	-	0.93	2.52 ± 0.54** (100)
i-pent	**25**	27.2%	-	20.3%$^{-}$ / **87.5%***	**0.97**	**4.07 ± 0.57*** (100)**
Cyclo-hexyl	**26**	**55.3%**	- / 33%	25.5%* / 34.2%*	**1.01**	**5.78 ± 0.64*** (100)**
Dodecyl	**27**	45.2%	-	-	0.93	2.7 ± 0.37** (20)

Tableau 11 : récapitulatifs des résultats biologiques

[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.

[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol.

[c] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.

[d] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des ovocytes de Xenope et mesurés par la technique du voltage-clamp avec deux microélectrodes.

[e] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).

Test de Student : *** $p \leq 0.001$ ≤ ** $p \leq 0.01$ ≤* $p \leq 0.05$

Les différents esters ont été choisis afin d'étudier l'influence de la longueur et de l'encombrement de la chaine. Ces paramètres vont par ailleurs jouer sur l'hydrophobicité et le volume de la molécule. Ainsi, on remarque que les esters courts (éthyl **24**, *t*-butyl **18a**) ou trop longs (dodécyl **27**) ont une faible capacité à activer les canaux TREK-1 en électrophysiologie (R < 3). Néanmoins ces esters montrent une meilleure activité in vitro que l'acide **11** (R_{TREK} =1.50 ± 0.2 à 100µM). Les meilleurs résultats sont obtenus pour les esters *i*-pentylique **25** (R_{TREK} = 4.07 ± 0.57 à 100 µM) et cyclohexylique **26** (R_{TREK} = 5.78 ± 0.64 à 100µM) qui possèdent tous deux des volumes moléculaires voisins (Tableau 12). On peut donc supposer que le volume moléculaire est un paramètre important et qu'il doit être proche de 260 $Å^3$ pour obtenir une activation optimale *in vitro*.

Molécules	R	Volume (Å^3)	R_{TREK}
11	-H	171.357	1.50 (100)
24	-Ethyl	205.686	1.54 (100)
18a	-*t*-Butyl	238.510	2.52 (100)
25	-*i*-pentyl	**255.877**	**4.07 (100)**
26	-cyclohexyl	**262.319**	**5.78 (100)**
27	-dodécyl	373.704	2.7 (20)

Tableau 12 : Volume moléculaire déterminés à l'aide du logiciel molinspiration[108]

On peut aussi émettre l'hypothèse que le facteur important est l'hydrophobicité, découlant du volume et de la longueur de la chaine. Ce paramètre, crucial pour le passage des barrières biologiques, est représenté par le logP. Cependant, le noyau catéchol étant commun à la série d'analogue, nous nous sommes intéressés aux constantes d'hydrophobicité des différents esters (Tableau 13).

	Esters	Constante d'hydrophobicité π^a	R_{TREK}
24	Ethyl	1.12	1.54 (100)
18a	*t*Butyl	2.16	2.52 (100)
25	*i*Pentyl	2.68	4.07 (100)
26	Cyclohexyl	2.79	5.85 (100)
27	Dodécyl	6.31	2.7 (20)

Tableau 13 : Inflluence de l'hydrophobicité du groupe ester
[a] constante calculée selon la méthode proposée par Manhold et Rekker.[112]

Les esters *i*-pentyl **25** et cyclohexyl **26**, montrant les meilleurs résultats *in vitro*, présentent des hydrophobicités similaires, proche de 2.70. On pourrait donc penser qu'il existe une hydrophobicité optimale pour interagir avec la cible de façon efficace. A l'aide du logiciel molinspiration,[108] nous avons pu illustrer ce paramètre et observer sa distribution en visualisant le « molecular lipophilic potential » (MLP, ou « molecular hydrophobicity potential » MHP), c'est-à-dire les propriétés hydrophobes (en bleu et violet) et hydrophiles (rouge et orange) des différentes molécules.

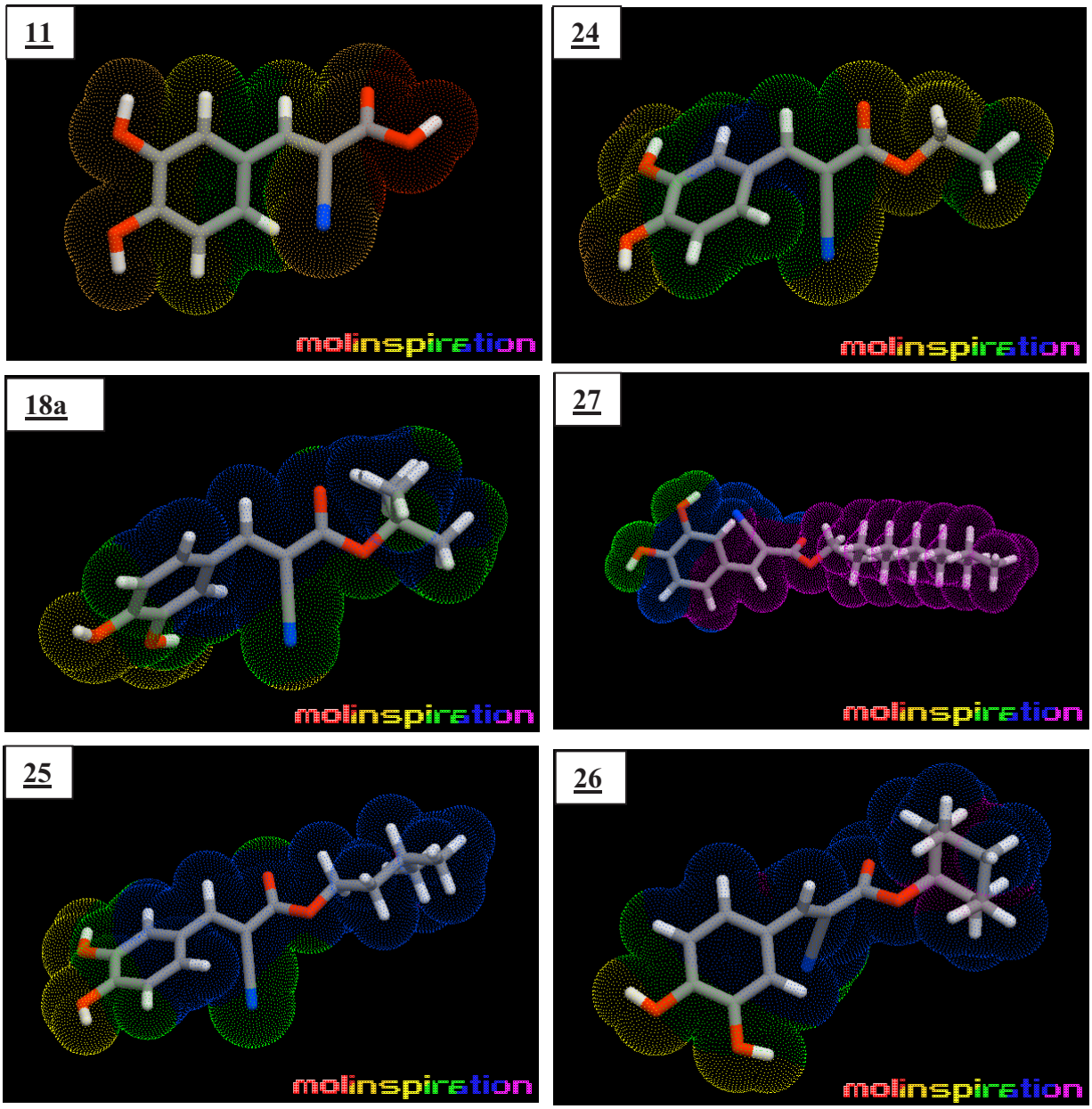


Figure 42 : Représentation de l'hydrophobicité à l'aide de molinspiration[108]
Propriétés hydrophobes : bleu et violet ; propriétés hydrophiles : rouge et orange ;
Intermédiaires : jaune et vert. Atomes : rouge, oxygène ; bleu, azote ; gris, carbone ; blanc, hydrogène.

Comme attendu, l'acide **11** et l'ester éthylique **24** sont globalement hydrophiles alors que l'ester à chaîne longue **27** est hydrophobe. Les esters *i*-pentylique **25** et cyclohexylique **26** possèdent quasiment la même distribution des propriétés hydrophobes. Ceci pourrait corréler avec l'existence d'une poche hydrophobe. En effet, les groupements *i*-pentyl et cyclohexyl ont une longueur et une hydrophobicité similaires ainsi qu'un volume et un encombrement stérique proches. Ils pourraient donc interagir de façon optimale avec cette poche hydrophobe. En revanche, l'ester à longue chaine **27**, du fait de sa trop grande taille, ne pourrait intégrer la poche. A l'inverse, l'acide **11** et les esters courts **24** et **18a** ne possèderaient ni un caractère hydrophobe assez marqué, ni une taille convenable pour interagir de façon optimale.

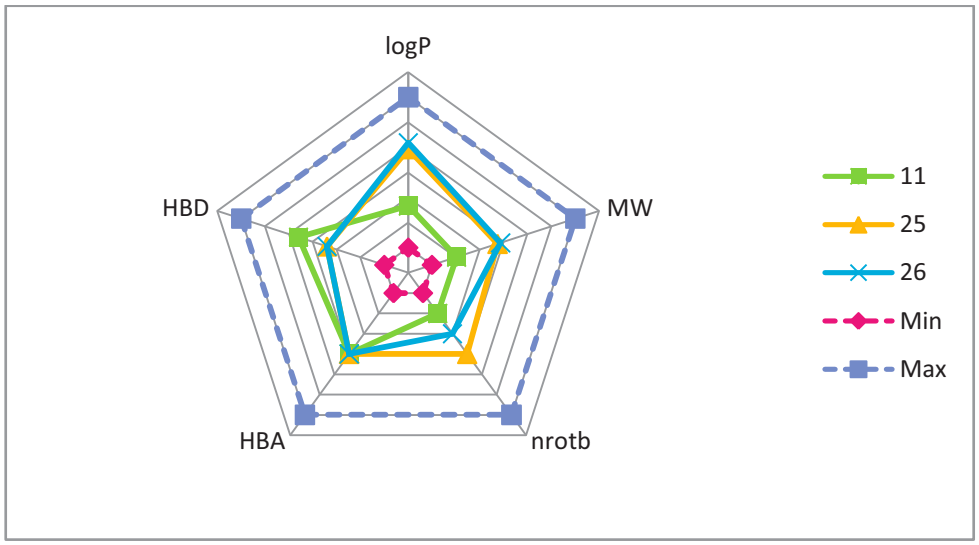
La meilleure action antalgique *in vivo* est observée pour l'ester **25** (**R** = *i*-pent), suivi de l'ester éthylique **24** (plaque chaude : 46.7% / 29.9%) bien que son activité antalgique reste inférieure à celle de l'acide **11** (plaque chaude : 25.1% / 63.2%). De plus, on remarque que l'effet de la molécule semble se dissiper assez rapidement (activité à 30min > activité à 45min). On peut supposer que l'ester **24** est métabolisé trop rapidement pour agir sur le long terme. A l'inverse, l'ester *i*-pentylique **25** montre un effet antalgique uniquement 45 minutes après l'injection. On peut donc émettre deux hypothèses :

- le groupement *i*-pentyl permet de ralentir le métabolisme (hydrolyse de l'ester) et l'action observée à 45 min est due au métabolite acide **11**. Cependant, cette hypothèse est peu probable du fait des résultats *in vitro*.

-l'ester **25**, bon activateur de TREK-1 *in vitro*, met plus de temps à atteindre la cible et son effet se fait donc ressentir plus tardivement (distribution optimale atteinte après 45 min).

De même, l'ester cyclohexylique **26** ne montre une activité *in vivo* au test du formol que lors de la deuxième phase. Nous avons rencontré des problèmes de solubilité, notamment pour les esters **26** et **27** ce qui a pu diminuer l'effet des molécules *in vivo*.

Si l'on s'intéresse aux propriétés *drug-like* de l'acide chef de file **11** et des deux meilleurs esters **25** et **26** (Figure 43), on remarque que les trois profils se situent entre les valeurs extrêmes,[104] représentant l'intervalle des propriétés permettant une biodisponibilité orale optimale.



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5

Figure 43 : représentation radar des propriétés *drug-like*
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre de liaison H accepteurs ; HBD, nombre de liaison H donneurs.

Afin de donner quelques réponses à nos hypothèses, nous avons déterminé la stabilité métabolique (temps de demi-vie $t_{1/2}$) du CDC **8**, de l'acide **11** et des esters éthyl **24** et cyclohexyl **26** en présence de microsomes de foie de rats et d'un co-facteur, le NADPH, afin de mimer la première phase du métabolisme (principalement des réactions d'oxydation visant à rendre la molécule plus polaire et donc plus facilement éliminable). Grâce à un suivi cinétique par HPLC, nous avons pu observer la disparition des produits ainsi que l'apparition de métabolites et déterminer les temps de demi-vie $T_{1/2}$ (temps auquel la concentration d'un produit a diminué de moitié, Tableau 14). Cette étude nous permet d'avoir une idée du comportement de nos molécules lors d'une administration orale. En effet, les tests *in vivo* sont effectués par injection sous-cutanée, permettant ainsi d'obtenir une biodisponibilité totale et d'éviter les effets de premier passage hépatique. De plus, le pH sanguin se situant entre 7.35 et 7.45, il semblerait peu probable qu'une saponification de nos produits surviennent avant qu'ils atteignent leur cible.

	Esters	**$T_{1/2}$**
8	CDC	4 min
11	-H	-
24	-Ethyl	< 3 min
26	-Cyclohexyl	25 min

Tableau 14 : Temps de demi-vie des molécules 8, 11, 24 et 26

Le CDC **8** (Figure 44) est dégradé très rapidement ($T_{1/2}$ = 4 min) et métabolisé en plusieurs métabolites : l'acide **11** (T_R = 8.90 min) et l'alcool cinnamique (T_R = 14.22) apparaissent au bout de 2 min et leur concentration augmente au détriment de celle du CDC jusqu'à 1 h d'exposition aux microsomes. Au bout de 24 h, on remarque que le pic correspondant à l'alcool cinnamique a diminué alors que deux nouveaux métabolites sont apparus (T_R = 15.07 min et 18.35 min : oxydation de l'alcool en aldéhyde et acide?).

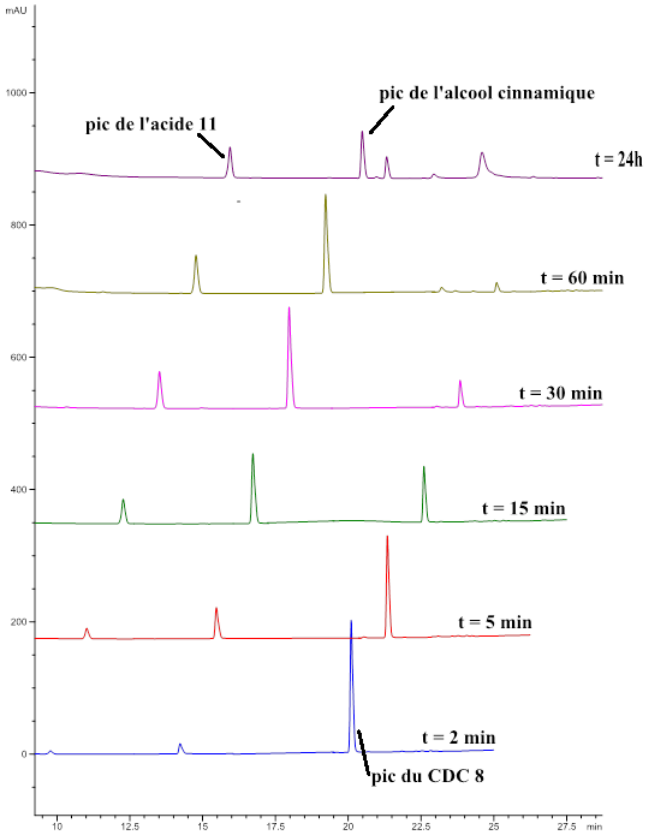


Figure 44 : Stabilité métabolique du CDC 8 : profil HPLC au cours du temps

On peut donc supposer que lors d'une administration *per os*, l'activité antalgique du CDC serait principalement due au métabolite acide **11**. Le CDC serait donc une pro-drogue de cet acide mais n'apporterait pas de grande amélioration au niveau du passage des barrières biologiques, au vu de son faible temps de demi-vie.

Par ailleurs, on remarque que la concentration en acide **11** reste quasi constante (légère baisse entre 0 et 15 min puis stabilisation) au cours des 24 h d'incubation en présence des microsomes (Figure 45). Le métabolisme de phase I n'est donc pas suffisant pour dégrader notre produit et on peut en déduire que l'intervention de la deuxième phase du métabolisme est nécessaire à l'élimination complète de la molécule **11**. L'acide semble donc capable de résister au premier passage hépatique. Cependant, sa faible hydrophobicité (logP = 0.664) pourrait rendre difficile le passage d'autres barrières telle que la barrière hémato-encéphalique (Blood Brain Barrier BBB, passage facilité pour les produits possédant un logP compris entre 1 et 2.5[107]).

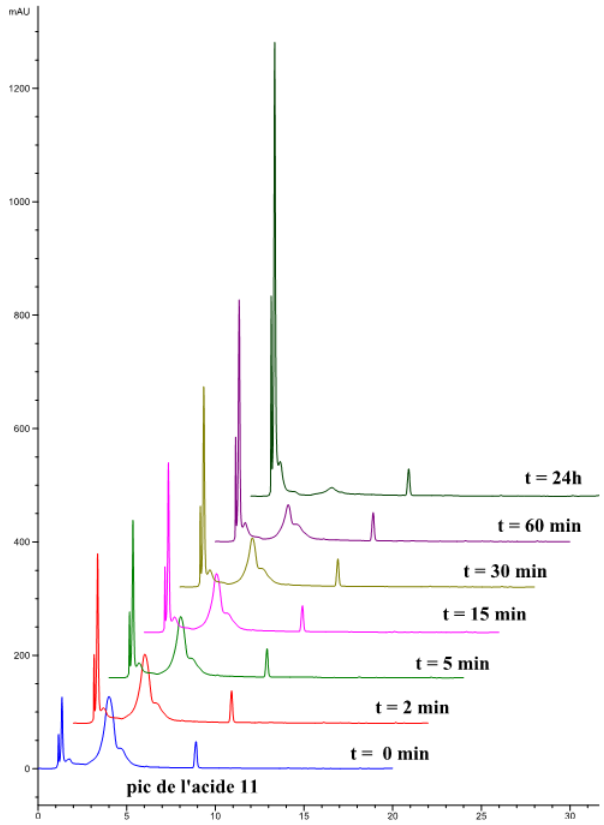


Figure 45 : Stabilité métabolique de l'acide 11 : profil HPLC au cours du temps

A l'instar du CDC **8**, l'ester **24** (T_R = 13.12 min) est métabolisé très rapidement ($T_{1/2}$ < 3 min) en l'acide **11** (T_R = 8.90 min). Il ne semble donc pas apporter d'amélioration à notre composé chef de file (Figure 46).

En revanche, l'ester **26** présente un temps de demi-vie plus important ($T_{1/2}$ = 25 min) et on n'observe l'apparition du pic correspondant à l'acide **11** qu'au bout de 15 min (Figure 47). Ce composé semble donc intéressant car, outre sa capacité à rejoindre la circulation sanguine, son logP plus important pourrait faciliter la distribution. De plus, il est plus actif *in vitro* que l'acide **11**.

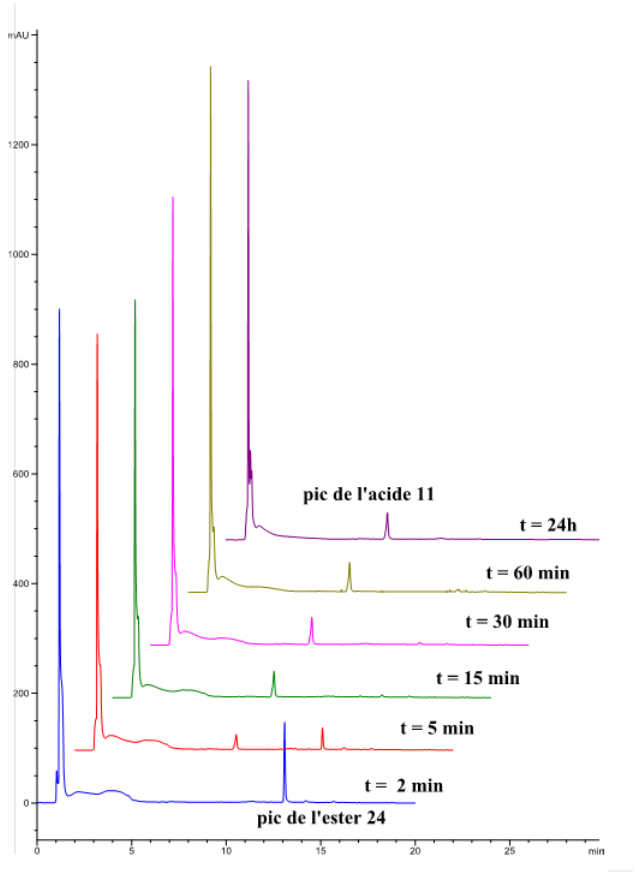


Figure 46: Stabilité métabolique de l'ester 24 : profil HPLC au cours du temps

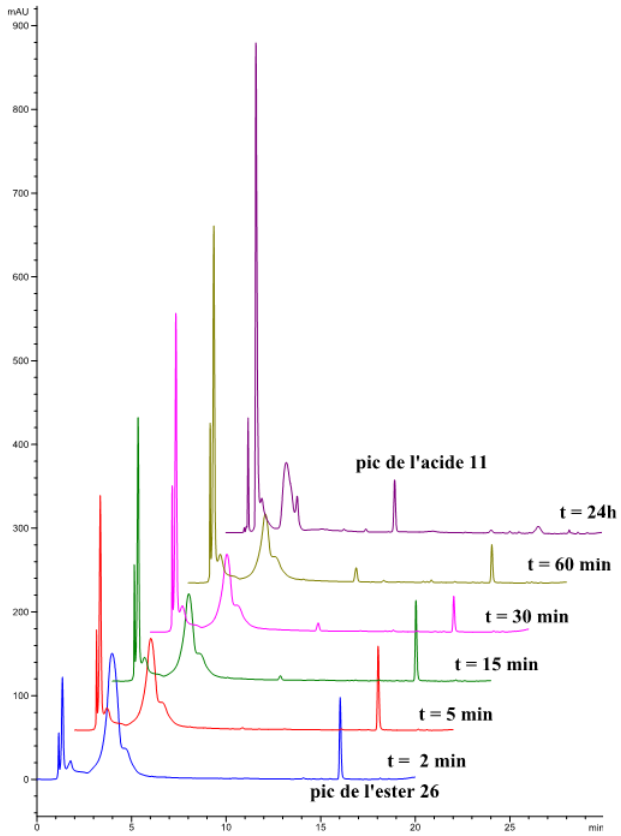


Figure 47 : Stabilité métabolique de l'ester 26 : profil HPLC au cours du temps

5.1.3 Conclusion

Les premières conclusions concernant les analogues de l'acide **11** sont partagées. En effet, les nouvelles molécules ont une meilleure activité *in vitro.* Le métabolisme étant limité *in vitro*, on peut en déduire que les esters sont nécessaires à une meilleure activation des canaux TREK-1. Ils ne jouent donc pas uniquement le rôle de pro-drogue. Cependant, l'effet antalgique *in vivo* semble diminuer à l'exception des esters **24**, **25** et **26** (effet comparable au CDC). Ces résultats demeurent encourageants et nous avons décidé de confirmer l'intérêt de la chaine ester aliphatique en l'accrochant à d'autres noyaux aromatiques.

5.2 Modification du noyau aromatique Ar

5.2.1 Choix des noyaux aromatiques Ar

Les esters aliphatiques se montrant prometteurs et du fait de la forte toxicité du noyau catéchol (Figure 48), nous avons décidé de remplacer ce noyau aromatique. En effet, le catéchol peut réagir de plusieurs façons avec différentes biomolécules, conduisant à des dégradations permanentes. Par exemple, il peut former des adduits avec les nucléotides entrainant une rupture des brins d'ADN. Il peut aussi interagir avec des protéines menant à leur inactivation ou entrainant des allergies.

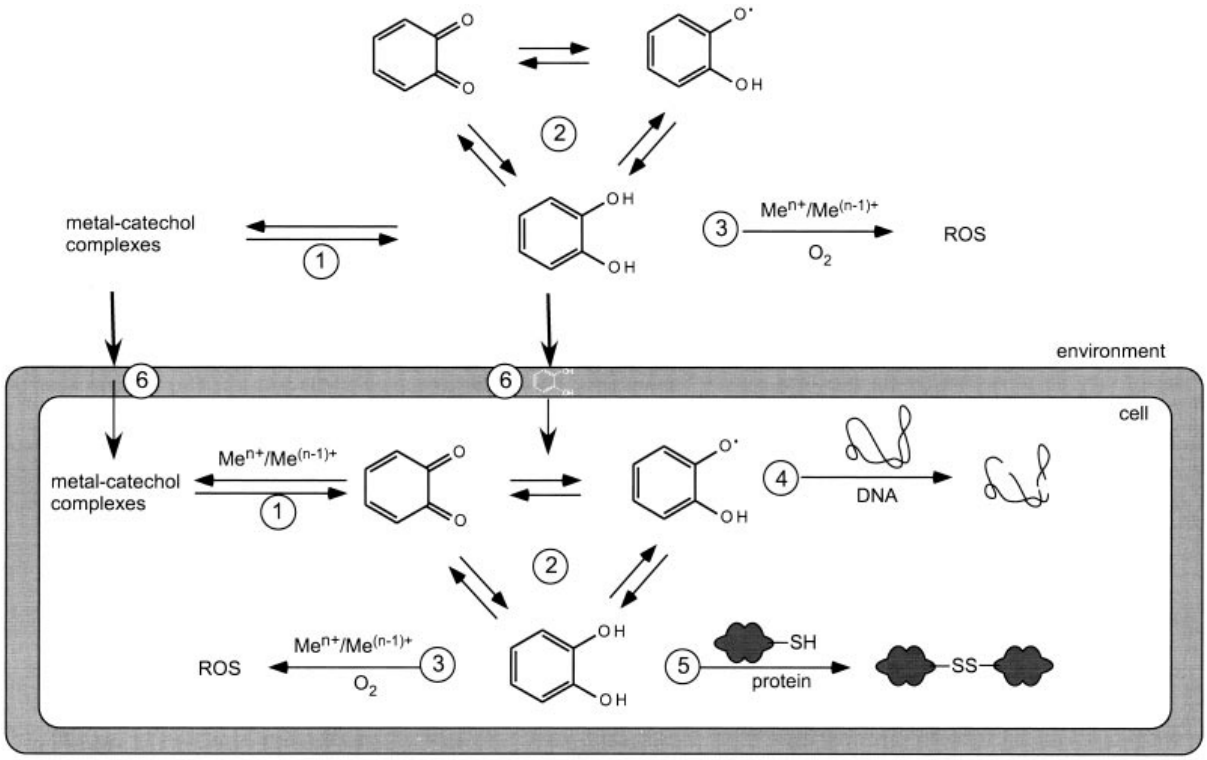


Figure 48 : Réactions chimiques du catéchol dans l'environnement et la cellule[88]
1 : formation de complexes avec les métaux lourds
2 : réaction REDOX
3 : production d'espèces oxygénée réactives (ROS en anglais)
4 : endommagement de l'ADN
5 : endommagement des protéines
6 : absorption dans les membranes et possibles interactions

Notre choix s'est porté sur deux autres noyaux aromatiques : le furane et l'indole, ayant tous deux donné des résultats prometteurs précédemment (chapitre 4).

Préalablement à la synthèse, nous avons vérifié que les propriétés *drug-like* de ces nouveaux composés respecteraient les règles de Lipinski et de Veber (Tableau 15 pour la série furane et Tableau 16 pour la série indole). Pour les deux familles, on retrouve une surface polaire plus faible que précédemment (< 80 Å²) et plus en accord avec les critères CNS. Par comparaison entre les deux séries, nous allons pouvoir étudier l'influence du noyau aromatique (taille, polarité, propriétés électroniques, volume) ainsi que celle de la chaîne aliphatique **R** (taille, volume, hydrophobicité).

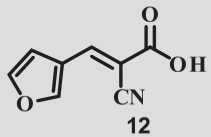
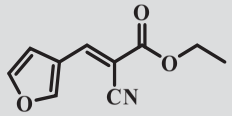
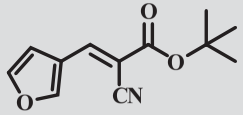
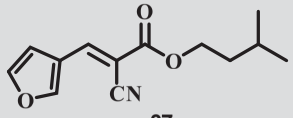
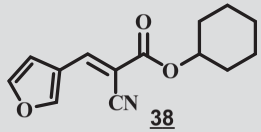
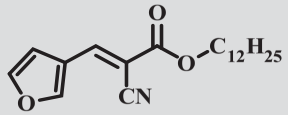
Molécules envisagées	Poids moléculaire (MW, g.mol^{-1})	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire Å^2
 12	163.132	4	1	0.399	2	74.231
 36	191.186	4	0	1.391	4	63.237
 18b	219.240	4	0	2.201	4	63.237
 37	233.267	4	0	2.668	6	63.237
 38	245.278	4	0	2.921	4	63.237
 39	331.456	4	0	6.495	14	63.237

Tableau 15 : Propriétés *drug-like* de la série des furanes déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

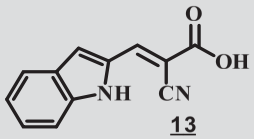
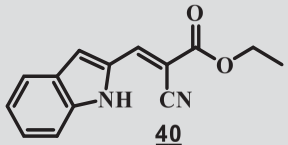
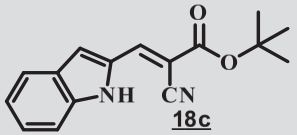
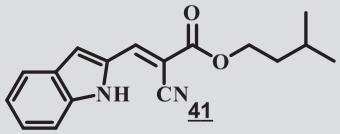
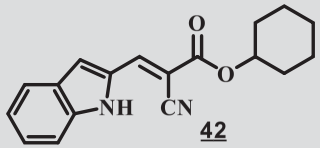
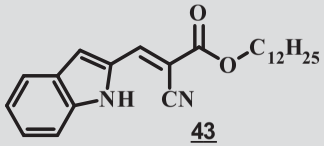
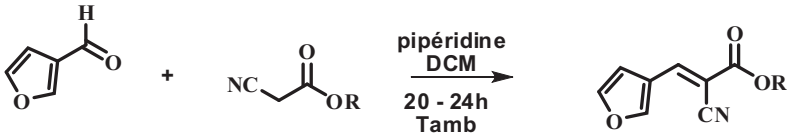
Molécules Envisagées	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire (MW, g.mol^{-1})	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire Å^2
 13	212.208	4	2	1.914	2	76.882
 40	240.262	4	1	2.907	4	65.888
 18c	268.316	4	1	3.716	4	65.888
 41	282.343	4	1	4.184	6	65.888
 42	294.354	4	1	4.436	4	65.888
 43	380.532	4	1	8.010	14	65.888

Tableau 16 : Propriétés *drug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

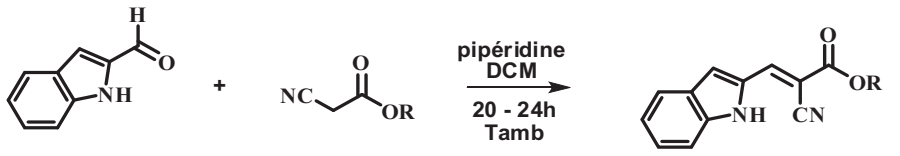
5.2.2 Synthèse des esters 36-43

Les produits **36** à **43** sont obtenus par réaction de Knoevenagel entre l'aldéhyde **17b** ou **17c** et l'ester correspondant **28-31** (Schéma 11 et Schéma 12). L'aldéhyde **17b** est commercial alors que l'aldéhyde **17c** est préparé selon la procédure décrite précédemment (cf chapitre 4. 1).



17b	R =			R =		
		-Ethyl	28		-Ethyl	36, 33%
		-*t*Butyl	19		-*t*Butyl	18b, 42%
		-*i*Pentyl	29		-*i*Pentyl	37, 32%
		-Cyclohexyl	30		-Cyclohexyl	38, 33%
		-Dodécyl	31		-Dodécyl	39, 35%

Schéma 11



17c	R =			R =		
		-Ethyl	28		-Ethyl	40, 61%
		-*t*Butyl	19		-*t*Butyl	18c, 42%
		-*i*Pentyl	29		-*i*Pentyl	41, 27%
		-Cyclohexyl	30		-Cyclohexyl	42, 98%
		-Dodécyl	31		-Dodécyl	43, 39%

Schéma 12

On obtient les esters désirés avec des rendements variant de 32 à 42% pour la série furane (**36-39**) et de 27 à 98% pour la série indole (**40-43**). On note qu'il n'a pas été possible d'obtenir ces analogues par estérification des acides **12** et **13**.
Les produits sont caractérisés par leurs données spectroscopiques. L'apparition du singulet caractéristique du proton éthylénique vers 8 ppm permet de confirmer la formation de composés α,β-insaturés.

5.2.3 Résultats des tests *in vivo* et *in vitro*

Nous avons adopté la deuxième stratégie de criblage pour ces dix nouveaux esters : test à l'acide acétique et plaque chaude pour les tests *in vivo* et électrophysiologie sur cellules pour les tests *in vitro*. Le test au formol est réalisé seulement lorsque le pourcentage d'inhibition de la douleur au test de l'acide acétique est supérieur à 50% (Tableau 17).

N°	X	R	AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Formol I/II[c] (60 mg/kg)	Cellules[d] (µM) R_{TREK}
8	**CDC**		50.8%	34.8% / 26.7%	**-**	**10.30 ± 2.68 (100)**
10	**ML67**		-	**77.4%*** / 36.6%**	31% / 28%	**8.56 ± 2.24 (100)**
12	furyl	H	30.7%	**56.4%* / 119.5%*** **	**74% / 79%**	**7.01 ± 2.75** (100)**
13	indyl	H	25.8%	**52.8%* / 63.4%***	**17% / 82% (125 mg/kg)**	1.18 ± 0.16
36	furyl	Et	**55.9%*** **	28.4% /11.9%	**60%*** / 83%*** **	2.09 ± 0.4* (100)
40	indyl	Et	**88.4%**	33.3%* / 32.7%	36%* / -8%	**4.71 ± 1.85* (20)**
18b	furyl	*t*Bu	**81.8%*** **	20.8% /-1.3%	**55%*** ** / 1%	**6.09 ± 1.24** (20)**
18c	indyl	*t*Bu	**51.3%*** **	41.3%** / 41.0%*	44%* / 20%	**4.07 ± 0.56*** (20)**
37	furyl	*i*Pent	**82.2%**	6.5% / 25.5%	**58%*** / 53%**	2.80 ± 0.41** (100)
41	indyl	*i*Pent	46.6%	21.8% / 37.8%*	-	**4.01 ± 1.7** (20)**
38	furyl	Cyclo	**91.2%*** **	18.4% / **96.7%*** **	41%** / 20%	1.79 ± 0.16** (100)
42	indyl	Cyclo	**83.6%*** **	**65.7%** / 52.6%***	37%* / **54%*** **	**1.98 ± 0.24*** (10)**
39	furyl	Dod	**53.8%*** **	21.8% / 22.2%	43%*** / 27%	2.33 ± 0.23*** (100)
43	Indyl	Dod	**54.1%*** **	6.8% / -0.9%	24% /35%*	2.19 ± 0.24** (100)

Tableau 17 : récapitulatifs des résultats biologiques

[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.

[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.

[c] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol.

[d] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).

Test de Student : *** $p \leq 0.001$ ≤ ** $p \leq 0.01$ ≤* $p \leq 0.05$

Excepté l'ester **41**, tous les composés montrent une activité antalgique supérieure à 50% au test de l'acide acétique ce qui traduit une nette amélioration par rapport au CDC **8** et aux acides chefs de file **12** et **13**.

Le test de la plaque chaude, plus sélectif, a permis de révéler deux produits avec un effet antalgique supérieur à 50% : les deux esters cyclohexyliques **38** et **42** se démarquent

avec des valeurs de 96.7% et 65.7% respectivement pour l'une des deux phases. Trois esters avec le noyau furyl (**36**-**37** et **18b**) et l'indole **42** ont obtenus des résultats supérieurs à 50% lors du test au formol. Seul l'indole **42** montre une action antalgique lors des trois tests de douleur.

Quatre esters, **18b-c** et **40-41**, sont capables d'activer les canaux TREK-1 en électrophysiologie à une concentration de 20 µM (R_{TREK} > 4). L'ester **42**, quant à lui, montre une activation de 1.98 à 10 µM. On peut donc le considérer comme étant activateur des canaux TREK-1. Parmi ces cinq esters, les ester *t*butylique **18b**, éthylique **40** et cyclohexylique **42** montrent une activité antalgique intéressante.

En résumé, quatre composés (**38** **Ar** = furyl, **R** = cyclo ; **40** **Ar** = indyl, **R** = Et ; **18c** **Ar** = indyl, **R** = *t*-Bu ; **42** **Ar** = indyl, **R** = cyclo) ont un meilleur profil antalgique que celui de la molécule *lead* CDC (résultats supérieurs aux tests de l'acide acétique et de la plaque chaude). Tous les esters, excepté le **40** et **41** se sont par ailleurs révélés au moins autant actifs que le ML-67 lors du test au formol.

Pour la série de furanes, la comparaison avec l'acide chef de file **12** montre une amélioration générale pour le test de l'acide acétique. Cependant, les résultats obtenus lors du test de la plaque chaude n'ont pas été à la hauteur de ceux obtenus par l'acide **12**. En effet, seul l'ester cyclohexylique **38** montre une activité intéressante (97% au bout de 45 min). Pour le test au formol, l'ester éthylique **36** induit une activité antalgique (60% / 83%) semblable à celle de l'acide correspondant tandis que les esters **18b** (**R** = *t*-Bu ; 55% / 1%) et **37** (**R** = *i*-Pent ; 58% / 53%) montrent un effet légèrement inférieur. Seul l'ester *t*-Butylique **18b** est capable d'activer les canaux TREK-1 *in vitro*.

En résumé, le groupement éthyl permet d'améliorer le profil antalgique : on obtient de meilleurs résultats pour deux tests sur les trois tests de douleur effectués. Le groupement cyclohexyl montre une action antalgique très intéressante en plaque bien que plus tardive que celle de l'acide. En effet, l'effet antalgique est quasi-nul 30 min après l'injection mais s'élève à 97% à 45min. On pourrait supposer que, d'une part l'ajout, du groupement cyclohexyl a permis de stabiliser le composé et d'autre part que le métabolite acide est en fait le principe actif. En revanche, on ne retrouve pas le même phénomène lors du test au formol. Finalement, le groupement *tert*-butyl permet d'améliorer l'activation des canaux TREK-1 *in vitro* (R_{TREK} = 6.09 ± 1.24 à 20 µM) ainsi que l'effet antalgique lors du test à l'acide acétique (81.8%). Les résultats au test du formol (55% / 1%) restent inférieurs à ceux de l'acide **12** (74% / 79%).

En comparant la série des indoles avec l'acide chef de file **13**, on remarque également une amélioration de l'activité antalgique lors du test de l'acide acétique. Trois composés (**40** **R** = Et, 33.3% / 32.7% ; **18c** **R** = *t*-Bu, 41.3%/ 41.0% et **42** **R** = Cyclo, 65.7% / 52.6%) montrent un effet antalgique supérieur au CDC et même à l'acide **13** pour l'ester **42** au cours

du test de la plaque chaude ainsi qu'une activité non négligeable pour le test au formol. Il est délicat de comparer ces derniers résultats à ceux de l'acide **13** à cause des concentrations différentes.

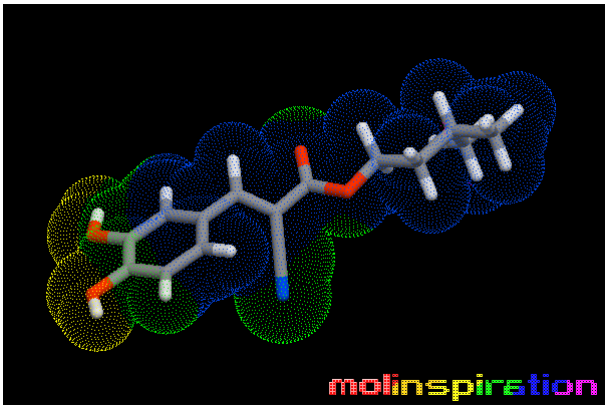
Les esters **40** (R_{TREK} = 4.71 ± 1.85), **18c** (R_{TREK} = 4.07 ± 0.56), **41** (R_{TREK} = 4.01 ± 1.7), capables d'activer les canaux TREK-1 *in vitro* à une concentration de 20 µM, sont nettement meilleurs que l'acide chef de file **13**. L'ester cyclohexylique **42** active également les canaux TREK-1 à une concentration de 10 µM (R_{TREK} = 1.98 ± 0.24).

Cette première analyse nous permet de tirer les conclusions suivantes :

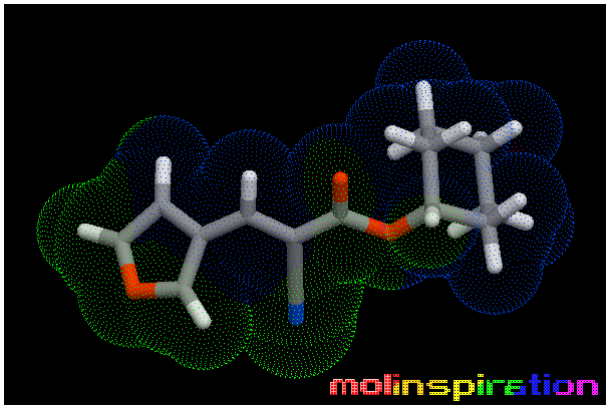
- Les esters cyclohexyliques **38** et **42** permettent d'obtenir un profil antalgique *in vivo* très intéressant: on observe une activité semblable voire une amélioration par rapport au chef de file correspondant pour les trois tests de douleur effectués. Cet effet antalgique peut être accompagné d'une activation *in vitro* des canaux TREK-1 (**42**).
- Le groupement éthyl (**36**, **40**) donne des résultats mitigés. Avec le noyau furane, il permet d'améliorer l'effet antalgique *in vivo* suite à un stimulus chimique (tests à l'acide acétique et au formol) alors que pour la série indole il permet d'augmenter l'activation *in vitro*.
- Dans les deux séries, le groupement *tert*-butyl (**18b**, **18c**) permet d'améliorer l'activation des canaux TREK-1 *in vitro* ainsi que l'effet antalgique lors du test à l'acide acétique.
- Le groupement dodécyl **39**, **43** (logP trop important, trop grand nombre de liaisons rotatoires) ne permet pas d'améliorer l'activité antalgique ni l'activation des canaux TREK-1. De plus, nous avons rencontré des problèmes de solubilité qui ont pu interférer sur les résultats.
- L'ajout d'un groupement ester **R** aux composés comportant un noyau aromatique Ar indole permet, dans quatre cas sur cinq, d'augmenter la capacité d'activation des canaux TREK-1 *in vitro* par rapport à l'acide **13**. Pour la série des furanes, seul le groupement *t*-butyl permet d'obtenir une meilleure activation des canaux TREK-1 par rapport à l'acide **12**.
- Le groupement *i*-pentyl, prometteur dans la série catéchol, se révèle décevant.

En général, une augmentation trop importante du logP (>3.5) se fait au détriment de l'activité antalgique *in vivo* (**39**, **18c**, **41**, **43**) à l'exception de l'indole **42** (logP = 4.436) qui présente une bonne activité aux différents tests de douleur (AcOH : 83.6% ; plaque chaude : 65.7% / 52.6% ; formol : 37% / 54%). On peut supposer qu'une trop grande lipophilicité se fait au détriment de la solubilité. Les composés ayant un logP compris entre 1.3 et 3 montrent une bonne activité *in vivo* (résultats >50% pour au moins deux test parmi les trois effectués).

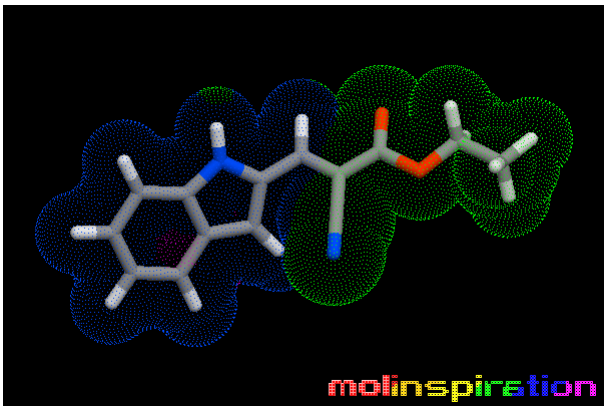
Pour les données *in vitro,* il est délicat de s'intéresser aux constantes d'hydrophobicité car les noyaux aromatiques sont différents (indole π = 1.902, catéchol π ~ 1.5, furane π = 1.086[112]). On s'intéresse donc aux logP mais l'hydrophobicité ne nous permet pas de tirer de conclusion. En effet, pour la série des indoles, on observe une bonne activation pour les esters **40-42** ayant des logP compris entre 2.907 et 4.436 (2.933 et 3.186 pour les esters actifs de la série catéchol). En revanche, seul un ester de la série furane **18b** (*t*-Bu) est capable d'activer le canal TREK-1 et il possède un logP inférieur (2.201). L'ester cyclohexylique **38**, possédant un logP de 2.921, ne présente aucune capacité d'activation des canaux TREK-1. Nous nous sommes donc intéressés à la distribution de l'hydrophobicité pour tenter d'expliquer les différences observées avec des produits de lipophilicités semblables (Figure 49).



25 logP = 2.933 R_{TREK} = 5.4 ± 2.02** (50 µM)



38 logP = 2.921 R_{TREK} = 1.79 ± 0.16** (100 µM)



40 logP = 2.907 R_{TREK} = 4.71 ± 1.85* (20 µM)

Figure 49 : Visualisation du Molecular Lipophilicity Potential à l'aide du logiciel molinspiration[108]

On remarque que les deux analogues actifs **25** et **40** ne présentent pas le même profil d'hydrophobicité. Ce paramètre ne suffit donc pas à expliquer l'activité. L'encombrement stérique du groupement ester et la longueur de celui-ci doivent jouer un rôle. Les noyaux

aromatiques sont particulièrement différents mais l'indole et le catéchol ont une caractéristique commune : ils possèdent un ou plusieurs groupes donneurs de liaison hydrogène (HBD, hydrogène des fonctions alcool –OH ou amine -NH). A l'inverse, le furane possède un accepteur de liaison hydrogène (HBA).

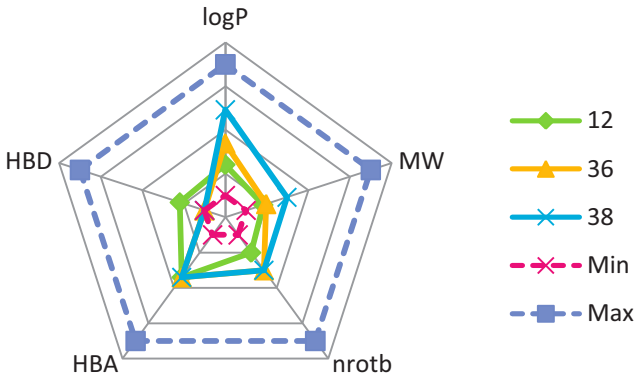
Nous avons également étudié l'influence du volume moléculaire. Pour la série indole, on remarque que les esters actifs *t*-Bu **18c**, *i*-pent **41** et cyclohexyl **42** possèdent eux aussi un volume moléculaire proche de 260 Å (Tableau 18). L'importance du volume moléculaire semble être confirmée car on retrouve les mêmes conclusions que précédemment (cf 5.1.2 Tableau 13).

Molécules	X	R	Volume (Å ^{3})
12	furyl	-H	**136.889**
36	furyl	-Ethyl	171.219
18b	furyl	-*t*Butyl	**204.043**
37	furyl	-*i*pentyl	221.409
38	furyl	-cyclohexyl	227.851
39	furyl	-dodécyl	339.237
13	indyl	-H	184.299
40	indyl	-Ethyl	**218.628**
18c	indyl	-*t*Butyl	**251.452**
41	indyl	-*i*pentyl	**268.819**
42	indyl	-cyclohexyl	**275.26**
43	indyl	-dodécyl	386.646

Tableau 18 : Influence du volume moléculaire[108]

Cependant, ce n'est pas le seul critère à prendre en compte. En effet, les esters *t*-butylique **18b** et éthylique **40** ainsi que l'acide **12** sont aussi capables d'activer les canaux TREK-1 *in vitro* alors qu'ils possèdent des caractéristiques différentes (volume, logP, HBD/HBA). On peut aussi supposer qu'il existe deux sites d'interactions, selon les propriétés des molécules.

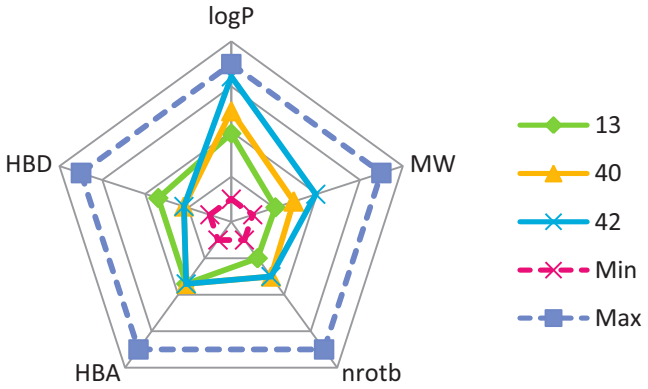
Si l'on compare les propriétés *drug-like* des esters éthylique **36** et cyclohexylique **38** avec le chef de file de la série furane **12**, on remarque que nous avons augmenté plusieurs caractéristiques tels que le logP, le poids moléculaire ou encore le nombre de liaisons rotatoires (Figure 50). En revanche, nous avons perdu un donneur de liaison hydrogène.



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5

Figure 50 : Radar-plot des propriétés *drug-like* des furanes
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre de liaison H accepteurs ; HBD, nombre de liaison H donneurs.

Pour la série des indoles (Figure 51), on observe le même phénomène : augmentation du logP (à l'exception de l'ester cyclohexylique **42**), du poids moléculaire et du nombre de liaisons rotatoires ainsi qu'une diminution du nombre de donneurs de liaisons hydrogène.



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5

Figure 51 : Radar-plot des propriétés *drug-like* des indoles
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre de liaison H accepteurs ; HBD, nombre de liaison H donneurs.

5.2.4 Pharmacocinétique

Comme précédemment, nous avons étudié la stabilité métabolique de quelques composés en utilisant des microsomes de foie de rat pour mimer la première phase de métabolisme. Nous avons sélectionné les acides **12** et **13** et les esters éthyliques (**36**, **40**) et cyclohexyliques (**38**, **42**) afin de comparer l'influence des substituants (Tableau 19).

	Aromatique	Esters	$T_{1/2}$
12	Furyl	-H	-
13	Indyl	-H	-
36	Furyl	-Ethyl	< 3 min
38	Furyl	-Cyclohexyl	< 3 min
40	Indyl	-Ethyl	40 min
42	Indyl	-Cyclohexyl	40 min

Tableau 19 : Comparaison des temps de demi-vie des acide *lead* 12-13 et des esters 36, 38, 40, 42

Les acides **12** et **13** ne sont pas métabolisés lors de la première phase, tout comme l'acide **11**. En effet, on remarque une légère baisse lors des premières minutes d'incubation qui ne s'accompagne pas de l'apparition d'un nouveau pic correspondant à un métabolite.
Les esters éthylique **36** et cyclohexylique **38** avec le noyau furane sont tous deux métabolisés en acide **12** (T_R = 10.57 min) et possèdent un temps de demi-vie très faible ($T_{1/2}$ < 3 min). De plus, ils sont très peu actifs *in vitro* contrairement à l'acide **12** qui est un très bon activateur des canaux TREK-1. On pourrait donc penser qu'ils constituent des pro-drogues de l'acide 12. Cependant, l'activité antalgique (test de la plaque chaude) de ces composés est significativement différente : 28.4% /11.9% pour **36** contre 18.4% / 96.7% pour **38**. On peut supposer que, en plus du métabolite commun acide **12**, ils se forment d'autres métabolites propres à chacun des esters, que l'on n'observe pas en phase I. L'acide **12** ne serait alors pas forcément le métabolite actif.

A l'inverse, les esters **40** et **42** (**Ar** = indole) ont une activité antalgique modérée et sont métaboliquement plus stable (temps de demi-vie multiplié par treize par rapport à l'ester **36**). Comme pour les autres esters, on observe l'apparition du pic correspondant au métabolite acide **13** (T_R = 16.50 min).

5.2.5 Conclusion

Nous avons préparés dix esters à partir des acides **12** et **13**. Parmi ces composés, les esters **R** = Et (**36**, **40**) et **R** = Cyclo (**38**, **42**) se sont révélés les plus intéressants.

Le groupement cyclohexyl permet d'obtenir un effet antalgique *in vivo* comparable au chef de file **12** pour la série des furanes et permet d'améliorer le profil antalgique de l'acide **13** pour les indoles.

- Le furane **38** perd sa capacité à activer les canaux TREK-1 *in vitro* par rapport à l'acide **12** et son faible temps de demi-vie nous laisse penser que, administré par voie orale, il jouerait le rôle de pro-drogue et relarguerait le principe actif. En jouant sur les propriétés *drug-like* tels que le nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène, on pourrait encore optimiser l'absorption et la distribution de la molécule et ainsi améliorer son efficacité.

- L'indole **42** présente non seulement un meilleur profil antalgique que l'acide **13** mais il a également une meilleure capacité à activer les canaux TREK-1 *in vitro*. On peut en déduire que dans le cas du noyau indole, comme pour le catéchol, le groupement cyclohexyl ne joue pas uniquement un rôle de vecteur. Essayer de diminuer la lipophilicité de cette molécule pourrait permettre une meilleure solubilité dans les milieux aqueux et augmenter la distribution par le système circulatoire.

Pour le groupement éthyl, on observe aussi un comportement différent selon le noyau aromatique **Ar**. Dans la série des furanes (**36**), il permet d'augmenter l'activité antalgique suite à un stimulus chimique (AcOH, formol) alors qu'il permet d'améliorer les résultats *in vitro* pour la série des indoles (**40**).

Au vu de ces résultats, il semblerait qu'il existe deux sites d'action différents sur les canaux TREK-1, comme il avait été proposé précédemment[89] :

- Un premier site de volume proche de 260 Å^3 (Figure 52) nécessitant la présence de groupement HBD favorisant la formation de liaisons hydrogène sur le noyau aromatique et possédant une poche hydrophobe pour accueillir le groupe **R**.

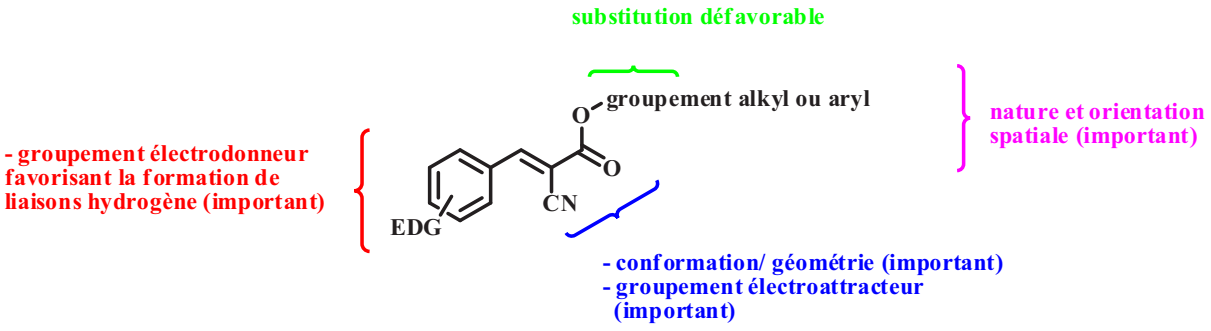


Figure 52 : Premier site d'interaction

Les analogues catéchol et indole se fixeraient plutôt sur ce site car ils ont la possibilité de former des liaisons hydrogène *via* les hydrogènes des fonctions alcool OH ou amine NH. Concernant la poche hydrophobe, nous avons pu sonder plus ou moins son volume grâce aux différents esters aliphatiques ou aryls synthétisés précédemment. En effet, on remarque une bonne activité *in vitro* pour des groupements esters ayant un volume compris entre 80 et 130 $Å^3$ environ (Tableau 20), à condition que la taille de la molécule entière soit aux alentours de 260 $Å^3$ (CDC **8**, catéchols **25** et **26**, indoles **18c-42**).

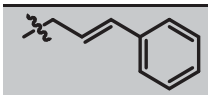
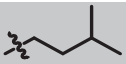
Ester	Volume du groupe ester ($Å^3$)
	128.021
	79.146
	95.947
	102.604

Tableau 20 : Volume des différents esters déterminés à l'aide du logiciel molinspiration[108]

L'indole avec l'ester éthylique **40** est lui aussi capable d'activer les canaux TREK-1 *in vitro*. On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer cette activité. On peut supposer que la taille du noyau indole, plus importante que celle du catéchol, permet au groupement ester d'atteindre l'entrée de la poche hydrophobe et ainsi d'établir des liaisons de Van Der Waals suffisantes pour interagir avec le canal. On peut aussi envisager une conformation différente entre l'indole et le catéchol, interdisant à ce dernier l'accès de la poche hydrophobe si la chaine ester est trop courte.

- Un deuxième site, de volume plus faible (≤ 200 $Å^3$, Figure 53), nécessitant un groupement électrodonneur à l'extrémité droite de la molécule et ne possédant pas forcément de donneurs de liaisons hydrogène sur le noyau aromatique

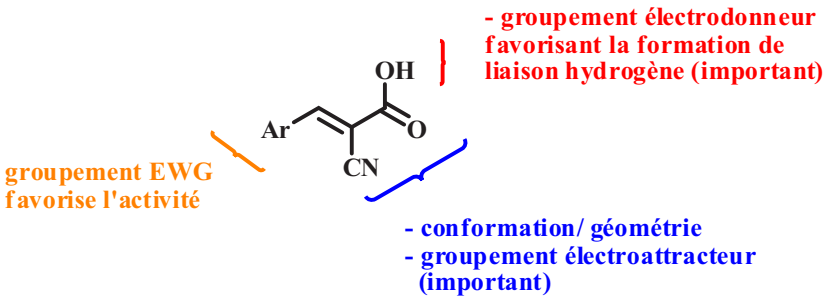


Figure 53 : Deuxième site d'interaction

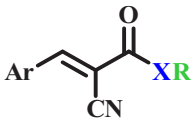
Ce site correspondrait à la cible privilégiée de l'acide avec le noyau furane **12**. Les nouveaux esters synthétisés pourraient être des pro-drogues, à l'exception de l'ester *t*-butylique **18b** capable d'activer les canaux TREK-1 *in vitro*.

5.3 Optimisation des esters éthyliques 36, 40 et cyclohexyliques 40, 42.

Les composés les plus actifs, dans la série furane ou indole, sont les esters cyclohexyliques et éthyliques (bons résultats *in vitro* ou *in vivo* bien qu'ils soient métabolisés trop rapidement). L'ester *i*-pentylique semble également intéressant mais il montre une forte ressemblance avec le groupement cyclohexyl (volume, hydophobicité). Nous allons donc effectuer des modifications sur ces deux esters simultanément sur les deux séries, afin d'étudier l'influence de ces changements sur les activités pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*.

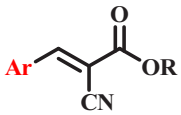
Afin d'optimiser l'activité biologique de nos analogues, nous avons décidé de suivre deux axes :

- Remplacement isostérique des esters éthylique et cyclohexylique :
  CH_3 => CF_3, Cy => Ph, O => NH



R = -Et, -CH_2CF_3, -Cy, -Ph...
X = O, NH...

- Remplacement du noyau aromatique : plus ou moins polaire, différence de taille, introduction d'atomes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène.



Ar = furyl, indyl, benzyl, naphtyl, imidazyl...

5.3.1 Modifications isostériques des esters

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur le groupement ester **R**, afin d'optimiser sa stabilité métabolique ou son interaction avec la poche hydrophobe présumée.

5.3.1.1 Groupement éthyl

A partir du groupement éthyl (**R** = -Et, **36**, **40**), nous avons envisagé deux modifications (Tableau 21).

La première consiste en un remplacement du CH_3 terminal par un groupement CF_3 (**44**, **46**). Le fluor étant un bioisostère de l'hydrogène[113] (rayon de Van der Waals 1.47 Å proche de celui de l'hydrogène 1.20 Å), il ne modifiera pas l'encombrement stérique. Il présente une très forte hydrophobie et va donc permettre d'augmenter la lipophilicité d'une molécule (cf clogP, Tableau 21). On pourra ainsi s'attendre à une amélioration du passage des membranes cellulaires. De plus, le fluor présente d'autres caractéristiques encore plus intéressantes. C'est l'atome le plus électronégatif et par conséquent un mauvais groupe partant ; lorsqu'il est attaché à une chaîne aliphatique, il est impossible de l'enlever par une réaction d'alkylation. La liaison carbone-fluor est très forte et difficilement clivable. Le fluor permet donc de bloquer le métabolisme et d'empêcher l'oxydation du CH_3 en CH_2OH voire en acide.

La seconde modification consiste à remplacer la fonction ester COO par une fonction bioisostère, la fonction amide CONH (**45**, **47**).[113] Cette dernière permet d'augmenter la polarité et donc de moduler la biodisponibilité (cf clogP, Tableau 21) ainsi que l'introduction d'un groupement donneur de liaison hydrogène. Elle présente également l'avantage d'être métabolisée moins rapidement dans l'organisme que l'ester correspondant.

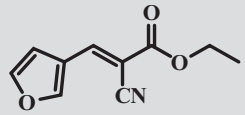
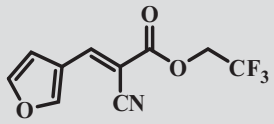
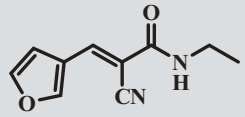
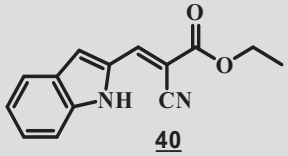
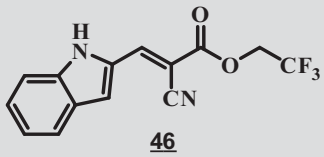
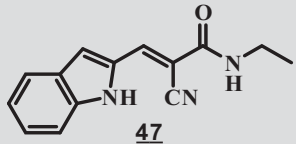
Molécules Envisagées	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire (Å²)
 **36**	191.186	4	0	1.391	4	63.237
 **44**	245.156	4	0	1.941	5	63.237
 **45**	190.202	4	1	0.635	3	66.030
 **40**	240.262	4	1	2.907	4	65.888
 **46**	294.232	4	1	3.456	5	65.888
 **47**	239.278	4	2	2.151	3	68.681

Tableau 21 : Propriétés d*rug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

Ces modifications devraient permettre, pour la série des furanes (**44**, **45**), d'améliorer l'absorption et la distribution et donc l'efficacité de l'acide **12**. De plus, l'introduction d'une fonction amide contribuerait à répondre aux critères du site d'interaction de plus petite taille, à savoir la possibilité d'effectuer des liaisons hydrogène grâce à un groupement HBD, tout en évaluant la possibilité d'existence d'une poche hydrophobe comme dans le deuxième site (Figure 54).

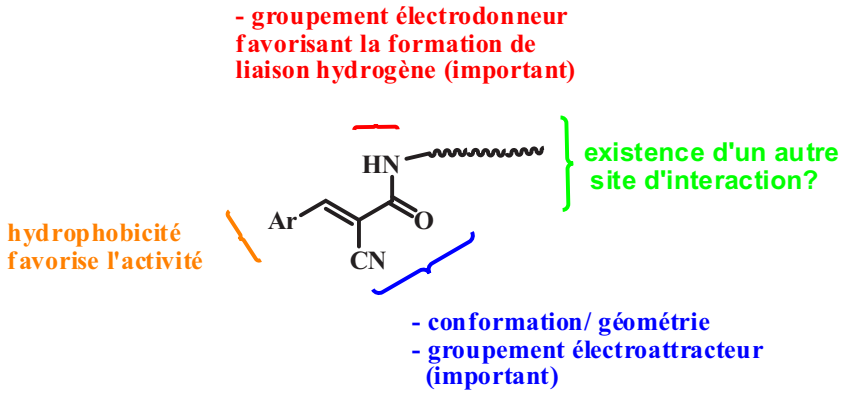


Figure 54 : Modifications

Pour la série indole (**46**, **47**), le remplacement de la fonction ester par une fonction amide permettrait d'étudier l'influence de l'introduction d'un groupement électrodonneur. Les esters **46** et **47** possédant respectivement des logP supérieur et inférieur à l'ester éthylique **40**, nous allons également pouvoir observer l'influence de la polarité.

5.3.1.1.1 Synthèse des analogues 44-47

Nous envisageons de préparer les nouveaux analogues selon le même schéma rétrosynthétique que précédemment (Schéma 13). Les produits **44**-**47** sont obtenus par une réaction de Knoevenagel entre l'aldéhyde **17b** ou **17c** et l'ester **48** ou l'amide **49**, issus de l'acide **14**.

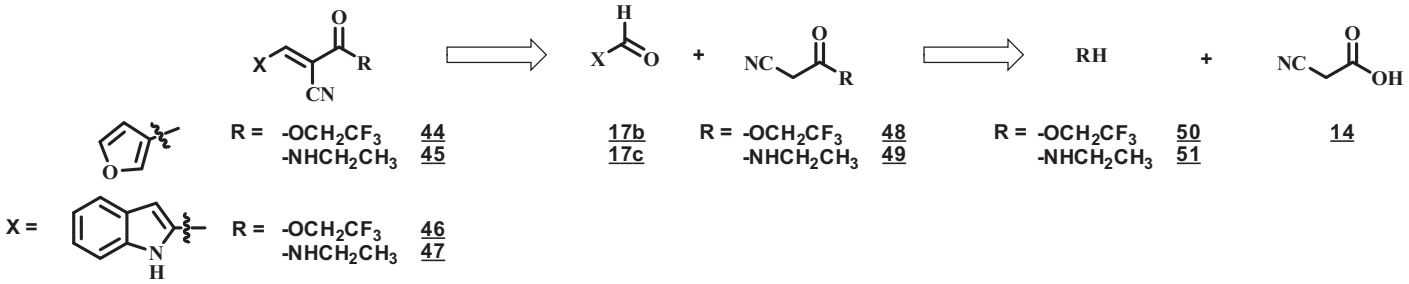


Schéma 13

Les techniques d'estérification utilisées auparavant (Fischer et Steglich) ne permettent pas d'obtenir le composé **48**. Nous nous sommes donc tournés vers la formation d'un chlorure d'acyle afin d'activer l'acide **14**.

Un premier protocole, adapté de Zhou *et al,*[114] préconise l'utilisation du chlorure d'oxalyle (Schéma 14).

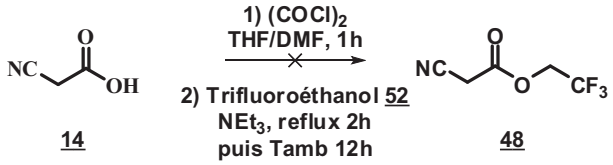


Schéma 14

Cependant, nous ne parvenons pas à obtenir le produit désiré **48**. Le remplacement du chlorure d'oxalyle par le pentachlorure de phosphore conduit à l'ester **48** avec un rendement de 48% (Schéma 15).[115] En RMN ^{1}H, le quadruplet à 4.57 ppm est caractéristique du CH_2 en alpha du groupement CF_3. La réaction d'aldolisation-crotonisation entre l'aldéhyde **17c** et l'ester **48** conduit à l'ester **46** avec un faible rendement (17%), l'analogue furane **44**, quant à lui, n'a pas pu être obtenu. Le produit est caractérisé par ses données spectroscopiques. En RMN ^{1}H, on reconnait le singulet entre 7 et 8 ppm, caractéristique du proton éthylénique.

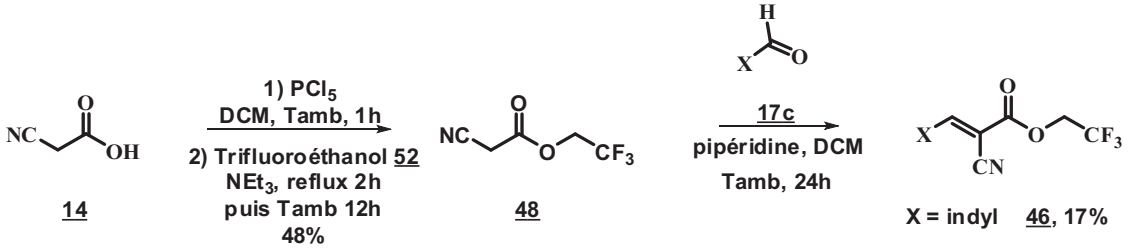


Schéma 15

L'amide **49** est synthétisé par réaction entre l'acide **14** et l'éthylamine **51** *via* formation d'un chlorure d'acyle. Celui-ci est obtenu selon les conditions proposées par Zhou *et al.*[114] Les amides **45** et **47** sont obtenus avec des rendements respectifs de 46 et 70%.

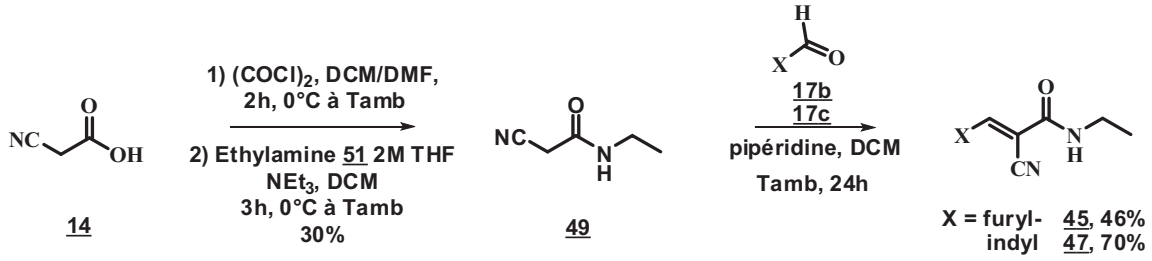


Schéma 16

5.3.1.1.2 Evaluation pharmacologique des esters 44-47

Les analogues **44-47** ont été évalués (Tableau 22) pour leur activité antalgique *in vivo* (test à l'acide acétique puis test de la plaque chaude) ainsi que pour leur capacité à activer les canaux TREK-1 *in vitro* (électrophysiologie sur cellules HEK-293).

Molécules			Tests *in vivo*		Test *in vitro*
N°	X	R	% d'inhibition de la douleur AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Cellules[c] (µM)
36	furyl	OEt	**55.9%*** **	28.4% /11.9%	2.09 ± 0.4* (100)
45	furyl	$NHCH_2CH_3$	30.8%	41.8%* / 27.7%	1.28 ± 0.13 (100)
40	indyl	OEt	**88.4%**	33.3%* / 32.7%	**4.71 ± 1.85* (20)**
46	indyl	OCH_2CF_3	31%*	**44.8%* / 69.7%*** **	1.05 ± 0.05 (50)
47	indyl	$NHCH_2CH_3$	45%*	**80.1%*** ** / 35.6%	1.26 ± 0.10* (100)

Tableau 22 : Evaluation pharmacologique des analogues 45-47
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.
[c] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$

Les modifications effectuées donnent des résultats mitigés. En effet, quelque soit le noyau aromatique, le remplacement de la fonction ester par un amide permet d'améliorer l'effet antalgique observé lors du test de la plaque chaude :

- 41.8% / 27.7% pour l'amide **45** contre 28.4% / 11.9% pour l'ester correspondant **36**.
- 80.1%/ 35.6% pour l'amide **47** contre 33.3% / 32.7% pour l'ester **40**.

Étonnamment, l'indole **47** perd une grande partie de son activité 45 min après l'injection. On peut supposer que, malgré l'introduction de la fonction amide, le métabolisme reste trop rapide. L'utilisation d'un groupement plus encombré et plus grand tel que le cyclohexyl permettrait probablement de ralentir la cinétique de sa métabolisation. Par ailleurs, les

résultats *in vitro* sont décevants. Pour le noyau furane, on obtient une activation très faible (**45**, R_{TREK} = 1.28 ± 0.13 à 100 µM), voisine de celle de l'ester **36** (R_{TREK} = 2.09 ± 0.4 à 100 µM) tandis que la capacité à activer le canal TREK-1 est complètement perdue chez l'amide **47** (R_{TREK} = 1.26 ± 0.10 à 100 µM) par rapport à l'ester **40** (R_{TREK} = 4.71 ± 1.85 à 20 µM).

Le remplacement bioisostérique du CH_3 en CF_3 (**46**) permet également une augmentation de l'effet antalgique par rapport à l'indole **40** (44.8% / 69.7% contre 33.3% / 32.7%). On peut émettre l'hypothèse que le CF_3 étant plus hydrophobe, il permet une meilleure interaction avec la poche hydrophobe. Cependant les résultats *in vitro* (Tableau 23) ne semblent pas confirmer cette hypothèse. On observe au contraire une perte de la capacité à activer les canaux TREK-1.

	Esters	Constante d'hydrophobicité π^a	R cellules
40	- CH_2CH_3	1.12	**4.71 ± 1.85* (20 µM)**
46	-CH_2CF_3	1.30	1.05 ± 0.05 (50 µM)

Tableau 23 : Inflluence de l'hydrophobicité du groupe ester
[a] constante calculée selon la méthode proposée par Manhold et Rekker.[112]
Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

En examinant la série des indoles, on remarque que l'introduction de la fonction amide (**47**) entraîne une baisse de la lipophilicité qui ne semble pas favoriser l'interaction avec la cible (Tableau 24). En comparant avec les indoles précédents, on note que les molécules capables d'activer TREK-1 *in vitro* possèdent un logP compris entre 2.907 et 4.436.

	Esters/ amides	LogP	Volume (Å^3)	R cellules
40	- OCH_2CH_3	2.907	218.628	**4.71 ± 1.85* (20 µM)**
46	-OCH_2CF_3	3.456	233.365	1.05 ± 0.05 (50 µM)
47	-$NHCH_2CH_3$	2.151	222.046	1.26 ± 0.10* (100 µM)

Tableau 24 : Influence du volume moléculaire et du logP pour la série indole[108]
Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

Pour la série furane, l'introduction de la fonction amide n'entraîne pas d'amélioration notable et ne nous permet pas de conclure sur la présence ou non d'une poche hydrophobe.

Par ailleurs, une étude de stabilité métabolique nous a permis de vérifier que le CF_3 ralentit le métabolisme. En effet, on observe un temps de demi-vie ($t_{1/2}$ ≈ 5 h) plus important

que pour l'ester **40** ($t_{1/2}$ = 40 min). Ceci pourrait aussi expliquer l'amélioration de l'activité *in vivo*.

5.3.1.2 Groupement cyclohexyl

En se basant sur les analogues **38** et **42** qui comportent un groupement cyclohexyl, nous avons envisagé quatre modifications :

- ajouter un substituant sur le cyclohexyl (**52**, **56**) afin d'augmenter sa polarité et donc d'abaisser le logP d'une unité (2.921 pour l'ester **39** contre 1.918 pour **52** ; et 4.436 pour l'ester **42** contre 3.433 pour **56**).

- remplacer le cyclohexanol par un glucide (**53**, **57**), le glucose, afin d'améliorer la biodisponibilité. En effet, les dérivés de sucres sont souvent utilisés dans le but d'améliorer une faible solubilité aqueuse[116].

- remplacer la fonction ester par une fonction amide (**54**, **58**).

- remplacer le cyclohexyl par un phényl (**55**, **59**). Ce groupement permet d'augmenter la polarité et sera susceptible d'interagir avec la cible par son coté hydrophobe (interactions π-π).

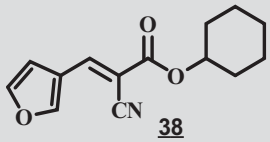
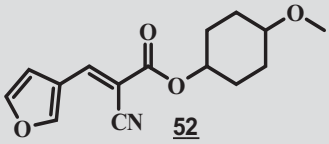
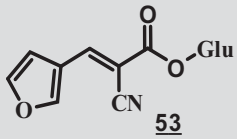
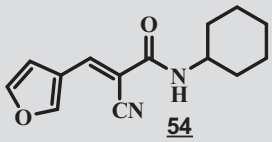
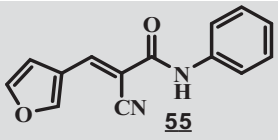
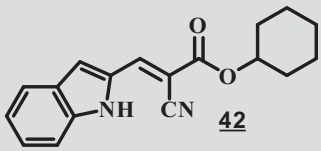
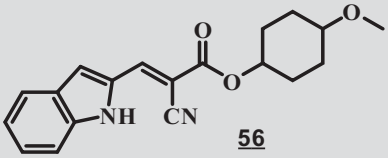
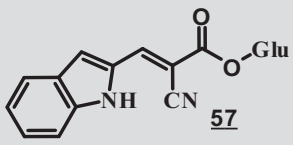
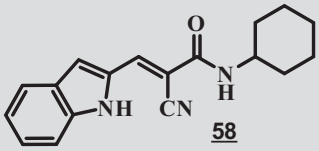
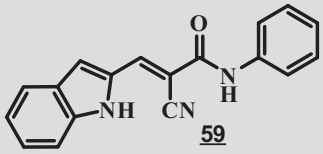
Molécules envisagées	Poids moléculaire (g.mol^{-1})	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire
 38	245.278	4	0	2.921	4	63.237
 52	275.304	5	0	1.918	5	72.471
 53	325.273	9	4	-1.308	5	153.383
 54	244.294	4	1	2.165	3	66.030
 55	238.246	4	1	1.957	3	66.030
 42	294.354	4	1	4.436	4	65.888
 56	324.380	5	1	3.433	5	75.122
 57	374.349	9	5	0.207	5	156.034
 58	293.370	4	2	3.680	3	68.681
 59	287.322	4	2	3.472	3	68.681

Tableau 25 : Propriétés *drug-like* de la série des indoles déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

Ces modifications apporteront des informations différentes selon la série d'analogues. En effet, pour les analogues furane (**52-55**), nous pourrons étudier l'influence de la polarité de la molécule. L'introduction du glucose devrait permettre une meilleure solubilité dans les milieux aqueux mais ce fera-t-elle au détriment de l'absorption? De plus, les amides nous permettront de continuer à explorer l'éventuelle présence d'une poche hydrophobe.

Pour la série des indoles (**56-59**), l'apport du groupement méthoxy sur le cycle à 6 nous aidera à analyser l'influence de l'insertion d'un groupement électroattracteur dans la poche hydrophobe et entrainera une diminution de la lipophilicité de la molécule permettant ainsi d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques. Dans ce même but, l'introduction de la fonction amide apporte un groupement électrodonneur. Nous pourrons aussi étudier l'influence de l'aromaticité (différence d'hydrophobicité mais aussi de volume, possibilité d'interactions π-π).

5.3.1.2.1 Synthèse des analogues 52-59

La stratégie de synthèse est la même que pour les analogues précédents. Une aldolisation-crotonisation entre un aldéhyde et un ester ou amide permettra d'obtenir les produits **52** à **59** (Schéma 17).

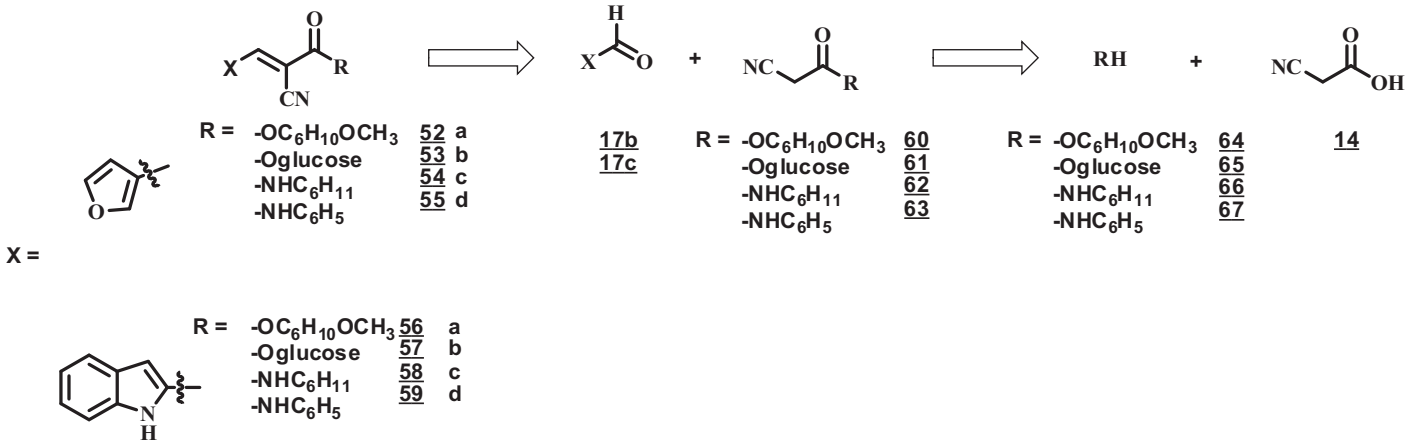


Schéma 17

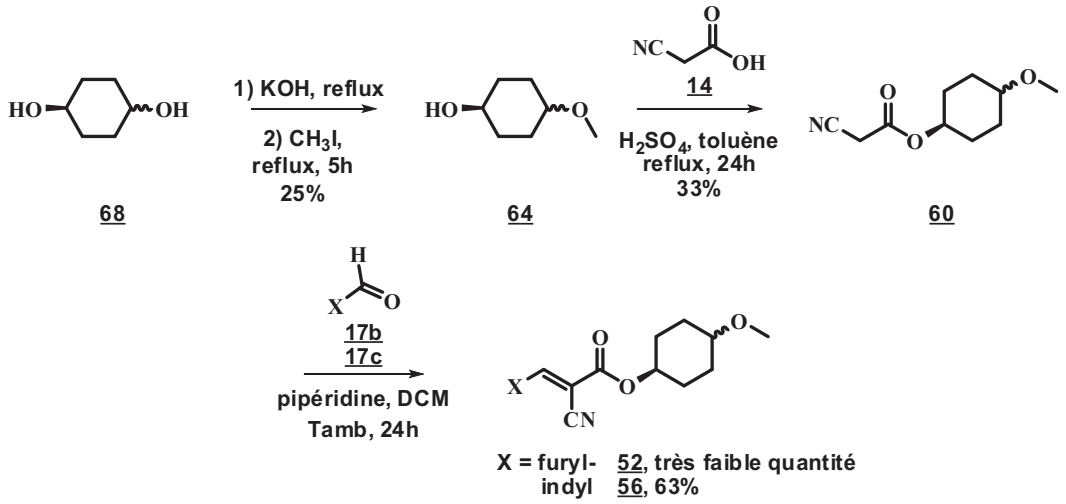
a- Esters 52 et 56 (R = -$OC_6H_{10}OCH_3$).

Ils sont synthétisés en trois étapes à partir du cyclohexandiol (mélange *cis / trans*) **68** (Schéma 18). Nous avons décidé, dans un premier temps, de tester ce composé sous forme d'un mélange *cis / trans*. Si les résultats biologiques se révèlent intéressants, nous envisagerons alors de préparer les deux isomères afin d'identifier le plus actif.

La première étape consiste en une méthylation de l'alcool **68** en présence d'iodure de méthyle.[117] Le faible rendement (25%) est dû aux nombreux produits secondaires formés, rendant la purification moins aisée.

Ensuite, une estérification de Fischer[111] entre l'alcool **64** et l'acide carboxylique **14** nous permet d'obtenir l'ester **60** (31%).

Finalement, une réaction de Knoevenagel entre l'indole carboxaldéhyde **17c** et l'ester **60** conduit à l'obtention du produit **56** avec un rendement global de 5%. Par contre, la réaction entre le furaldéhyde **17b** et l'ester **60** ne conduit qu'à une quantité infime de furane **52**, insuffisante pour les tests, due à une dégradaiton lors de la purification sur gel de silice. Une optimisation des conditions opératoires est envisagée. De plus, l'ajout du groupement méthoxy montrait un intérêt plus pertinent pour la série indole.

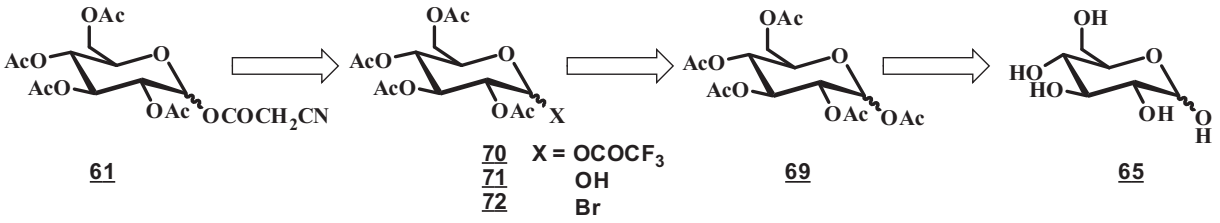


68 64 60

Schéma 18

b- Préparations des dérivés glucidiques

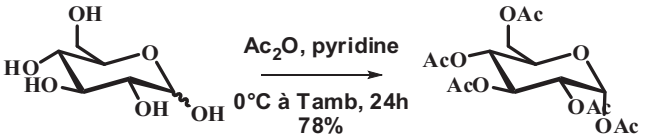
Nous avons envisagé de préparer des dérivés glycosylés, selon le Schéma 19 rétrosynthétique. Différentes substrats (X = $OCOCF_3$, OH, Br) ont été testées.



61 69 65

Schéma 19

Le glucose peracétylé **69** est obtenu selon la méthode classique,[118] sous sa forme alpha avec un rendement satisfaisant de 78% (Schéma 20).



65 69

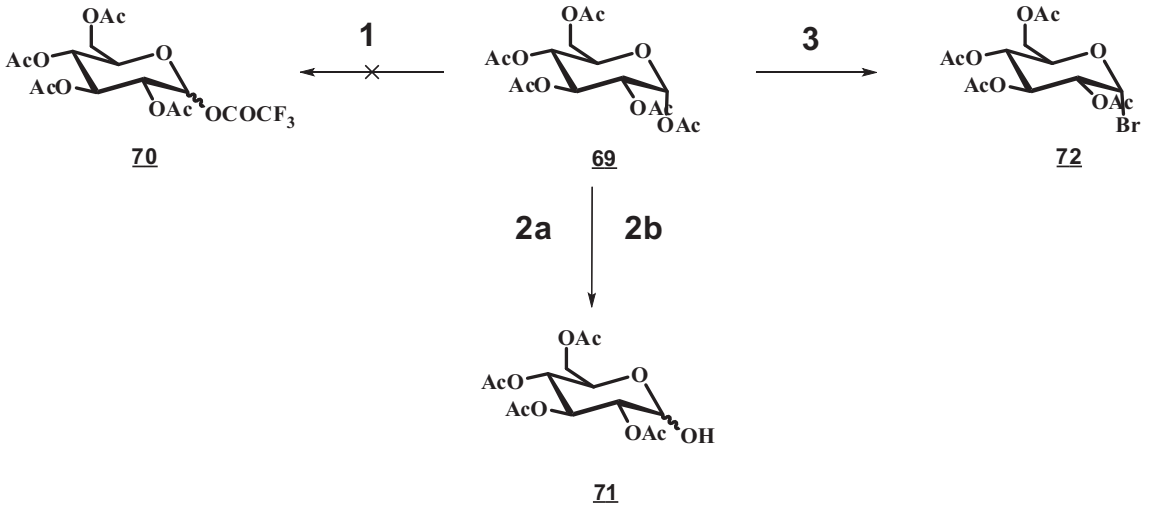
Schéma 20

A partir du glucose peracétylé **69**, nous avons tenté (Schéma 21) :

- D'activer la position anomérique en introduisant un groupement $-OCOCF_3$, voie **1**
- De déprotéger la position anomérique avant de réaliser une estérification de Steglich, [109,110] voie **2a** et **2b**
- D'activer la position anomérique en introduisant un atome de brome, voie **3**.

Les conditions expérimentales sont détaillées dans le Tableau 26.

L'activation de la position anomérique par introduction de trifluoroacétate[119] (**70**) n'a pas conduit au produit attendu. Le composé bromé **72** est obtenu avec un rendement quantitatif.[120] La réaction de déprotection de la position anomérique en présence d'hydrazine et d'acide acétique[121] a conduit à la formation de l'hémiacétal **71** mais il n'a pas pu être purifié. La procédure de Halasya *et al.*[122] nous a permis d'obtenir le composé **71**, sous sa forme α majoritaire, avec un rendement de 71%.



70 69 72

71

Schéma 21

Essai	Réactif	Conditions opératoires	Produit	Rendement
1	**69**	TFA, TFAA, CF_3SO_3H Tamb, 2 h	**70**	Pas de réaction
2a	**69**	NH_2NH_2 CH_3COOH, DMF Tamb, 4 h	**71**	Pas isolé
2b	**69**	Imidazole, MeOH Reflux, 24 h	**71**	71%
3	**69**	HBr à 33% wt dans CH_3COOH Tamb, 5 h	**72**	100%

Tableau 26 : Formation des composés 70-72

Ensuite, nous avons tenté d'obtenir l'ester **61**, à partir de l'hémiacétal **71** ou à partir du dérivé bromé **72** (Schéma 22). L'estérification de Steglich en présence de d'anhydride trifluoroacétique (Tableau 27, essai 1)[123] n'ayant pas conduit au produit attendu, nous avons alors tenté d'activer l'acide cyanoacétique **14** en formant un chlorure d'acyle (Tableau 27, essai 2). Les mêmes conditions que pour la formation de l'ester fluoré[115] **48** ont été appliquées mais cette fois-ci sans résultat. Nous avons ensuite essayé une réaction nucléophile à partir du composé bromé **72** en présence de diisopropyléthylamine,[120] sans succès (Tableau 27, essai 3).

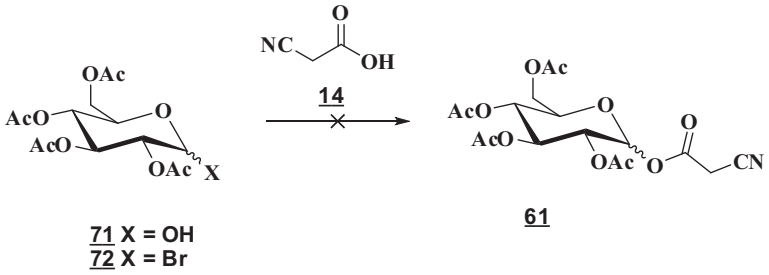


Schéma 22

Essai	Réactif	X	Conditions opératoires	Produit	Rendement
1	**71**	OH	TFAA, **14**, DCM Tamb, 1 h	**61**	Pas de réaction
2	**71**	OH	1) **14**, PCl_5, DCM, 40 °C, 1 h 2) DCM, Tamb, 12 h	**61**	Pas de réaction
3	**72**	Br	$i$$Pr_2$Net, **14**, MeCN tamis moléculaire, Tamb, 24 h	**61**	Pas de réaction

Tableau 27 : Tentatives d'obtention du composé 61

c- Les amides 54 et 58 (R = C_6H_{11})

Ils sont obtenus en deux étapes à partir de la cyclohexylamine **66** (Schéma 23). La première étape consiste en la formation de l'amide[124] **62** à partir de l'amine **66** et de l'acide cyanoacétique **14**. Le rendement est faible (34%) et le temps de réaction plus long que celui indiqué par les auteurs. Ensuite, une réaction de Knoevenagel permet l'obtention des amides **54** et **58** avec des rendements respectifs de 43 et 57%.

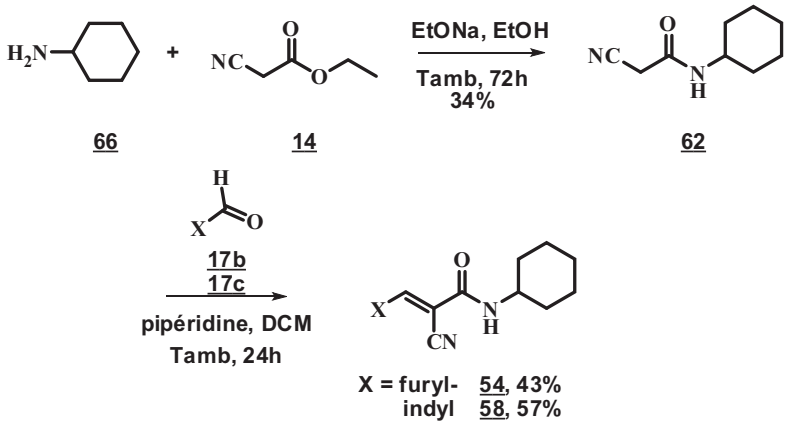


Schéma 23

d- Les amides 55 et 59 (R = C_6H_5)

Ils sont synthétisés en deux étapes à partir de l'aniline **67** (Schéma 24). L'activation de l'acide cyanoacétique **14** s'effectue en présence de pentachlorure de phosphore, avant de réagir avec l'aniline[125] **67** pour donner l'amide **63** avec un rendement de 94%. Une réaction de Knoevenagel permet d'obtenir les amides **55** et **59** avec des rendements respectifs de 11 et 74%. Les composés sont caractérisés par leurs données spectroscopiques.

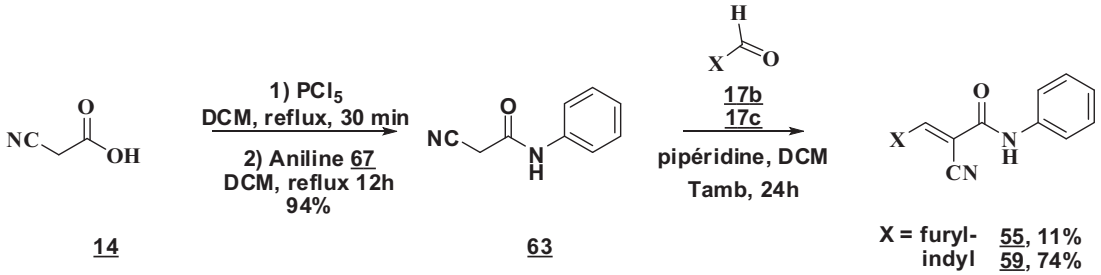


Schéma 24

5.3.1.2.2 Evaluation pharmacologique des analogues 54-59

Les analogues **54-59** ont été évalués (Tableau 28) pour leur activité antalgique *in vivo* (test à l'acide acétique puis test de la plaque chaude) ainsi que pour leur capacité à activer les canaux TREK-1 *in vitro* (électrophysiologie sur cellules HEK-293).

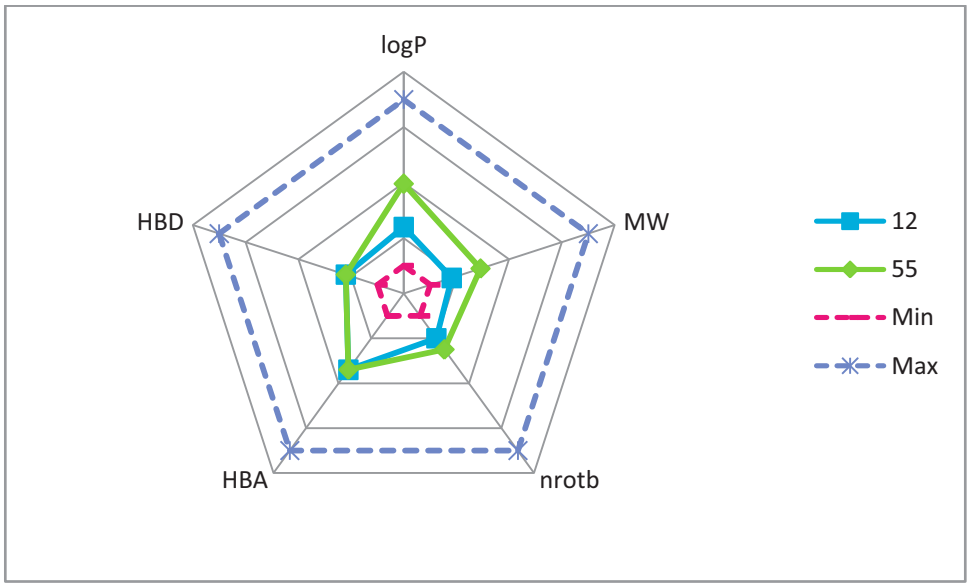
Molécules			Tests *in vivo*		Test *in vitro*
N°	X	R	% d'inhibition de la douleur[a] AcOH 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Cellules[c] (µM) R_{TREK}
38	furyl	$-OC_6H_{11}$	**91.2%*** **	18.4%$^{-}$ / **96.7%*** **	1.79 ± 0.16** (100)
54	furyl	$-NHC_6H_{11}$	0%	32.2%* / **78.3%****	1.07 ±0.08 (100)
55	furyl	$-NHC_6H_5$	48%*	**107.7%*** / 148.6%****	**4.64 ± 0.61*** (20)**
42	indyl	$-OC_6H_{11}$	**83.6%*** **	**65.7%** / 52.6%***	**1.98 ± 0.24*** (10)**
56	indyl	$-OC_6H_{11}OCH_3$	43.8%**	34.6%$^{-}$ / **52.4%****	1.60 ± 0.08* (10)
58	indyl	$-NHC_6H_{11}$	45%*	**67.5%*** ** / 35.4%	1.52 ± 0.17 (100)
59	indyl	$-NHC_6H_5$	**52%***	49.5%* / 49.5%	**2.16 ±0.53* (10)**

Tableau 28 : Récapitulatif des résultats biologiques *in vivo* et *in vitro*
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.
[c] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).
Test de Student : *** $p \leq 0.001$ ≤ ** $p \leq 0.01$ ≤* $p \leq 0.05$.

Contrairement aux analogues précédents (**45** et **47**), l'introduction de la fonction amide ne permet pas d'améliorer systématiquement l'activité *in vivo*. En effet, on observe une baisse de l'effet antalgique pour l'amide **54** (32.2% / 78.3% contre 18.4% / 96.7% pour l'ester **38**) et pour l'amide **59** (49.5% / 49.5% contre 65.7% / 52.6% pour l'ester **42**). Cependant, les activités antinociceptives des amides restent très intéressantes. Si le remplacement de la fonction ester par un amide influence négativement l'activité *in vitro*, on remarque que le remplacement du groupement cyclohexyl (**54**, **58**) par un phényl (**55**, **59**) s'accompagne d'une forte augmentation de la capacité à activer le canal TREK-1 : R_{TREK-1} = 4.64 ± 0.61 à 20 µM

pour l'amide **55** et R_{TREK-1} = 2.16 ± 0.53 à 10 µM pour l'amide **59**. Par ailleurs, les résultats *in vivo* de ces deux amides (> 50%) sont très intéressants faisant d'eux des candidats médicaments très prometteurs.

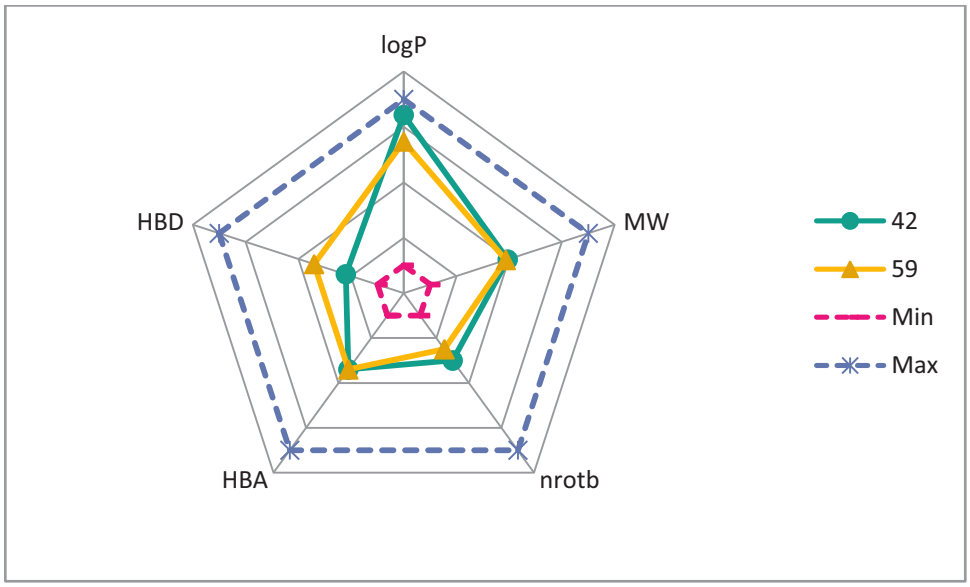
Nous avons alors décidé de comparer leurs propriétés *drug-like* avec celles des analogues furane (**12**, **R** = H) et indole (**42**, **R** = Cyclo) les plus actifs (Figure 55, Figure 56). On remarque que le pentagone de l'amide **55** est sensiblement plus large que celui de l'acide **12** ce qui se traduit notamment par une lipophilicité plus importante et théoriquement une meilleure capacité à traverser les membranes biologiques (dont la barrière hémato-encéphalique). On pourrait donc envisager une action centrale pour cet analogue (logP = 1.96, TPSA = 66 Å^2).



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5

Figure 55 : Radar-plot des propriétés *drug-like* des furanes 12 et 55
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre de liaison H accepteurs ; HBD, nombre de liaison H donneurs.

A l'inverse, l'introduction de la fonction amide dans la série indole **58** (logP = 3.68), **59** (logP = 3.47) a permis de baisser la lipophilicité, très haute pour l'ester cyclohexylique **42** (logP = 4.44). Par la même occasion, nous avons augmenté le nombre de liaisons rotatoires ainsi que le nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène (Figure 56).



	Log P	MW	nrotb	HBA	HBD
Min	-1	150	0	0	0
Max	5	450	12	10	5

Figure 56 : Radar-plot des propriétés *drug-like* des indoles 42 et 59
Abréviations : MW, poids moléculaire ; nrotb, nombre de liaison rotatoires ; HBA, nombre de liaison H accepteurs HBD, nombre de liaison H donneurs.

En examinant les volumes moléculaires, on remarque que ceux des amides **58-59** sont similaires (Tableau 29). Cependant, la géométrie plane du phényl semblerait favoriser l'activité lorsqu'on est en présence d'une fonction amide. Il se pourrait que la formation d'une nouvelle liaison hydrogène, par le biais de cette fonction amide, privilégie l'accès à une poche hydrophobe pour le groupement phényl. On peut ainsi envisager que l'activité est améliorée par l'établissement d'interactions π-π (π-stacking).

	Noyau aromatique	R	Cellules[c] (µM)	LogP	Volume (Å^3)
38	**Furane**	-OCy	1.79 ± 0.16** (100)	2.921	227.851
54	**Furane**	-NHCy	1.07 ±0.08 (100)	2.165	231.269
55	**Furane**	-NHPh	**4.64 ± 0.61*** (20)**	1.957	212.682
42	**Indole**	-OCy	**1.98 ± 0.24*** (10)**	4.436	275.260
58	**Indole**	-NHCy	1.52 ± 0.17 (100)	3.680	278.678
59	**Indole**	-NHPh	**2.16 ±0.53* (10)**	3.472	260.092

Tableau 29 : Influence du volume moléculaire et de l'hydrophobicité[108]
Test de Student : *** p ≤ 0.001 ≤ ** p ≤ 0.01 ≤* p ≤ 0.05

L'introduction du groupement méthoxy sur le cyclohexane (**56**) ne semble pas montrer grand intérêt. En effet, bien que l'activité antalgique lors du test de la plaque chaude soit conservée à 45 min (34.6% / 52.4% contre 65.7% / 52.6% pour l'ester **42**), celle du test à

l'acide acétique est abaissée (43.8% contre 83.6% pour l'ester **42**) ainsi que les résultats d'électrophysiologie sur cellules HEK-293 (R_{TREK} = 1.60 ± 0.08 contre 1.98± 0.24 à 10 µM pour l'ester **42**).

5.3.1.3 Conclusion

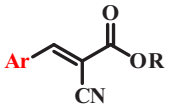
Les modifications apportées sur les esters éthyliques (furane **36** et indole **40**) et cyclohexyliques (furane **38** et indole **42**) conduisent aux conclusions suivantes :

- Le remplacement de la fonction ester par un amide permet de conserver l'activité antalgique *in vivo* ou même de l'améliorer pour la plupart des composés. Une meilleure stabilité métabolique pourrait expliquer ce phénomène. Cependant, cette augmentation se fait au détriment de l'activité *in vitro*.
- Le même effet est observé lors du remplacement bioisostérique du groupement CH_3 (**40**) par un CF_3 (**46**). Là encore, la plus grande stabilité métabolique de ces composés pourrait justifier l'influence positive sur l'activité.
- L'introduction d'aromaticité par le biais du groupement phényl permet à la fois une augmentation de l'activité *in vitro* et *in vivo* (ou du moins une conservation de cette dernière).
- L'introduction d'un groupement méthoxy en position 4 sur l'ester cyclohexylique n'apporte pas d'amélioration.

Les deux amides comportant un groupe phényl (**55** et **59**) se révèlent prometteurs, avec des coefficients d'activation de TREK-1 respectifs de R_{TREK} = 4.64 ± 0.61 à 20 µM et R_{TREK}= 2.16 ± 0.53 à 10 µM.

5.3.2 Modifications du noyau aromatique Ar

Nous allons maintenant nous intéresser à l'influence du noyau aromatique Ar, notamment de sa polarité, son encombrement et de son hydrophobicité. Ainsi, nous avons choisi une gamme de noyaux aromatiques allant du moins hydrophobe au plus hydrophobe : oxazole, imidazole, pyrrole, catéchol, furane, benzène, indole et naphtalène (Tableau 30). Ces différents noyaux, HBA ou HBD, ont été couplés avec les deux esters (**R**) ayant donné les meilleurs résultats, c'est-à-dire l'éthyl et le cyclohexyl.



Ar = furyl, indyl, benzyl, naphtyl, imidazyl...
R = Et, Cy

Ar	Constante d'hydrophobicité π^a
oxazole	-0.03
Imidazole	0.173
Pyrrole	0.83
Catéchol	1.00
Furane	1.31
benzène	2.12
Indole	2.34
naphtalène	3.19

Tableau 30 : Constantes d'hydrophobicité des différents noyaux calculée selon la méthode proposée par Mannhold et Rekker[112]

En plus de l'influence de la polarité du noyau (logP, Tableau 31 **R** = Et, Tableau 32 **R** = Cy) nous allons pouvoir étudier l'impact de l'orientation dans l'espace, en comparant les résultats obtenus pour le 2- et le 3-furaldéhyde. Nous pourrons également analyser l'influence de la taille, selon les trois types de molécules (pyrrole, imidazole et indole pour les noyaux HBD et furane (2 ou 3) et oxazole pour les noyaux HBA, benzène et naphtalène pour les noyaux hydrophobes). Comme précédemment, nous nous sommes intéressés aux propriétés *drug-like* des nouveaux analogues **73-84** (Tableau 31, Tableau 32). Tous les esters respectent les règles de Lipinski et Veber, excepté l'ester cyclohexylique avec le noyau naphtalène **84** (logP > 5).

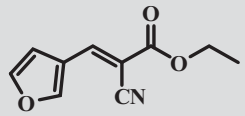
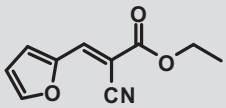
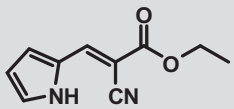
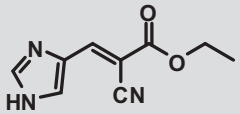
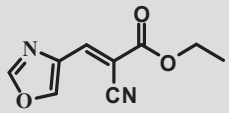
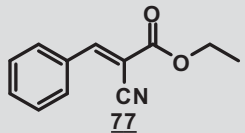
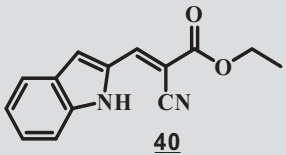
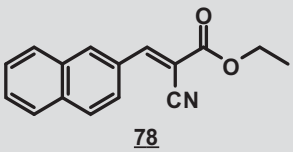
Molécules	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire ($Å^2$)
 36	191.186	4	0	1.391	4	63.237
 73	191.186	4	0	1.703	4	63.237
 74	190.202	4	1	1.600	4	65.888
 75	191.190	5	1	0.673	4	78.780
 76	192.174	5	0	0.973	4	76.129
 77	201.225	3	0	2.625	4	50.097
 40	240.262	4	1	2.907	4	65.888
 78	251.285	3	0	3.808	4	50.097

Tableau 31 : Propriétés *drug-like* de la série esters éthyliques déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

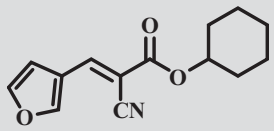
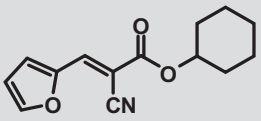
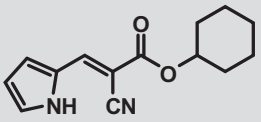
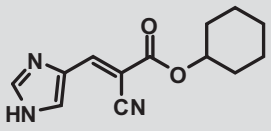
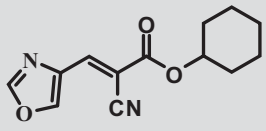
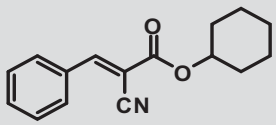
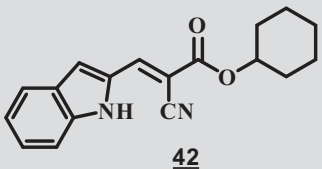
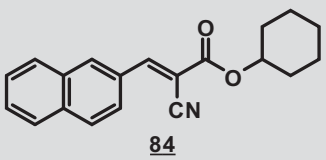
Molécules	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire ($g.mol^{-1}$)	HBA	HBD	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire ($Å^2$)
 38	245.278	4	0	2.921	4	63.237
 79	245.278	4	0	3.232	4	63.237
 80	244.294	4	1	3.129	4	65.888
 81	245.282	5	1	2.203	4	78.780
 82	246.266	5	0	2.503	4	76.129
 83	255.317	3	0	4.154	4	50.097
 42	294.354	4	1	4.436	4	65.888
 84	305.377	3	0	5.338	4	50.097

Tableau 32 : Propriétés *drug-like* de la série esters cyclohexyliques déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

5.3.2.1 Synthèse des analogues 73-84

Les esters **73** à **84** sont obtenus par une réaction de Knoevenagel entre un aldéhyde et l'ester cyanoacétique approprié. Tous les aldéhydes sont disponibles commercialement.

La procédure habituelle (cf 5.1.1.2) a été appliquée à la synthèse des esters **73** et **79** (Schéma 25). Cependant, nous n'observons aucune réaction.

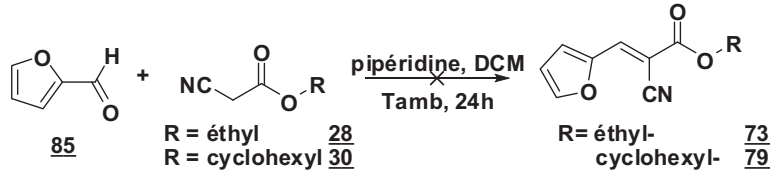


Schéma 25

Après différentes tentatives infructueuses (augmentation du temps de réaction, léger chauffage), une nouvelle recherche bibliographique nous a permis de trouver les conditions suivantes (Schéma 26). Cette réaction,[126] dans l'eau, semble plus respectueuse de l'environnement mais elle n'est pas utilisable pour toutes les molécules. En effet, il faut que les substrats soient solubles ou miscibles dans l'eau et que le produit y précipite. De plus, le rendement obtenu est plus faible que celui annoncé dans la publication (16% au lieu de 90% annoncé) et le temps de réaction beaucoup plus long (24 h au lieu de 1 h annoncée). L'ester **73** a été caractérisé par ses donnés spectroscopiques.

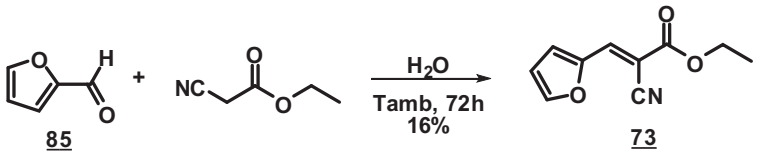


Schéma 26

Le composé **79** est quant à lui obtenu par une réaction de Knovenagel entre l'ester **30**, activé par du $TiCl_4$ et le 2-furaldéhyde[127] (Schéma 27), avec un rendement de 85%.

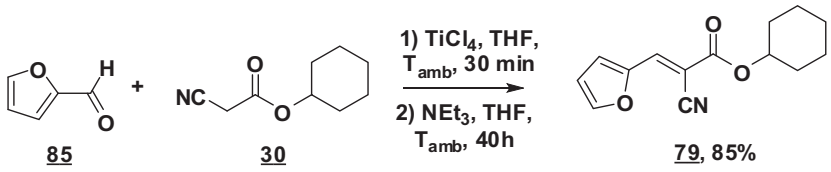


Schéma 27

La synthèse des pyrroles **74** et **80** et des imidazoles **75** et **81** a été effectuée selon les conditions usuelles (Schéma 28). Les produits, obtenus avec des rendements satisfaisants (51 – 77%). Leurs structures ont été confirmées par leurs données spectroscopiques.

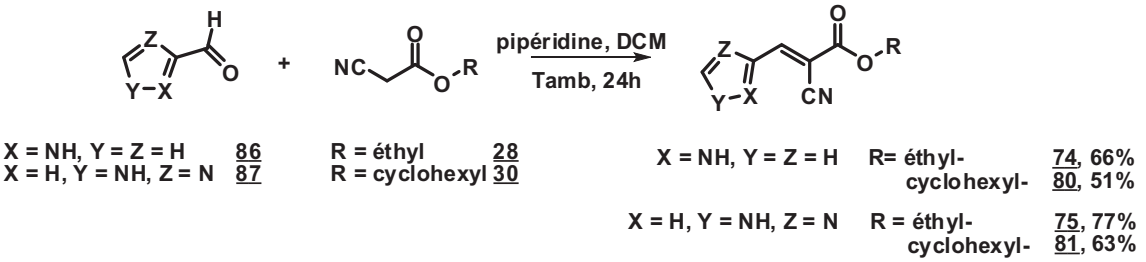


Schéma 28

La même voie de synthèse à partir du 4-oxazolecarboxaldehyde **88** n'a pas permis d'obtenir les esters attendus **76** et **82** (Schéma 29). En effet, on observe la formation d'un grand nombre de produits mais aucun ne semble correspondre aux molécules désirées après purification.

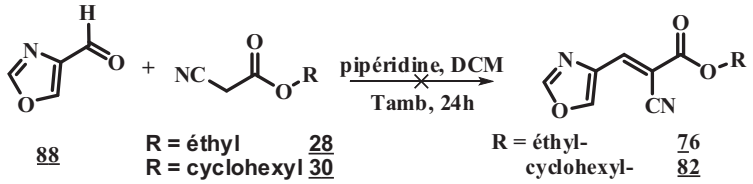


Schéma 29

Nous avons donc tenté la réaction en milieux aqueux et sans base,[126] comme précédemment (Schéma 30) mais seul l'ester éthylique **76** a pu être obtenu avec un rendement de 41%.

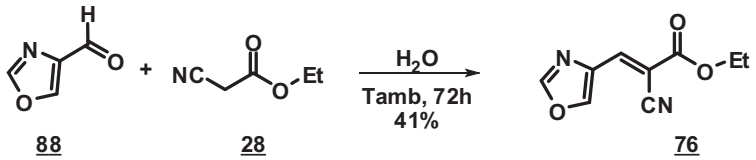
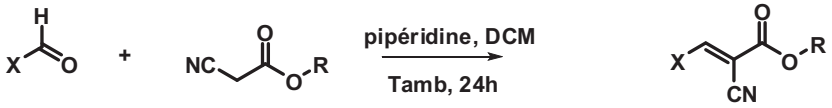


Schéma 30

Les derniers esters **77-78** et **83-84** ont été obtenus par réaction de Knoevenagel, à partir du benzaldéhyde **89** et du 2-naphthaldéhylde **90**, en présence de pipéridine dans le dichlorométhane (Schéma 31).



X = benzyl 89
X = naphtyl 90

X = benzyl R = éthyl- 77, 84%
cyclohexyl- 83, 73%

X = naphtyl R = éthyl- 78, 65%
cyclohexyl- 84, 73%

Schéma 31

Les esters **77**, **78**, **83** et **84** ont été caractérisés par leurs données spectroscopiques.

5.3.2.2 Evaluation pharmacologique

Les analogues **73-84** ont été évalués (Tableau 33) pour leur activité antalgique *in vivo* (test de l'acide acétique et test de la plaque chaude) et pour leur capacité à activer les canaux TREK-1 (électrophysiologie sur cellules HEK-293).

Molécules			Tests *in vivo*		Test *in vitro*
N°	Noyau aromatique	R	% d'inhibition de la douleur AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Cellules[c] (µM)
36	3-furane	-Ethyl	**55.9%*** **	28.4% / 11.9%	2.09 ± 0.40* (100)
73	2-furane	-Ethyl	23.3%	**69.4%*** / 24.1%	2.36 ± 0.65* (100)
74	Pyrrole	-Ethyl	0%	**50.3%**** / 13.2%	1.89 ± 0.23** (100)
75	Imidazole	-Ethyl	33%	**151.6%*** ** / 45.7%*	1.80 ± 0.16** (100)
76	Oxazole	-Ethyl	28.9%	0% / 19.6%	2.56 ± 0.36** (100)
77	Benzène	-Ethyl	30.8%	**67.8%*** ** / 45.1%**	1.80 ± 0.11** (100)
40	Indole	-Ethyl	**88.4%**	33.3%* / 32.7%	**4.71 ± 1.85* (20)**
78	Naphthalène	-Ethyl	44.7%	**110.9%**** / 73.4%	1.59 ± 0.23* (100)
38	3-furane	-Cyclohexyl	**91.2%*** **	18.4%/ **96.7%*** **	1.79 ± 0.16** (100)
79	2-furane	-Cyclohexyl	-	**52%*/68%****	-
80	Pyrrole	-Cyclohexyl	10%	**59.5%**** / 25.1%	2.62 ± 0.47** (100)
81	Imidazole	-Cyclohexyl	**50%***	27.0% / **62.4%**	1.50 ± 0.04** (100)
83	Benzène	-Cyclohexyl	7.1%	13.4% / -0.2%	1.17 ± 0.14 (100)
42	Indole	-Cyclohexyl	**83.6%*** **	**65.7%**** / **52.6%***	**1.98 ± 0.24*** (10)**
84	Naphthalène	-Cyclohexyl	30.8%	**68.9%*** ** / **50.3%****	2.60 ± 0.51* (100)

Tableau 33 : Evaluation pharmacologique des analogues 73-84

[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.

[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.

[c] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).

Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

Le changement de noyau aromatique ne semble pas d'améliorer le coefficient d'activation de TREK-1. En effet, les meilleurs résultats sont obtenus pour le noyau indole dans les deux séries d'esters (**40** et **42**).

En revanche, les résultats *in vivo* et notamment ceux de la plaque chaude sont intéressants. Ainsi, pour la série des esters éthyliques, les différents noyaux testés donnent de meilleurs résultats à 30 ou 45 min que les analogues **36** (28.4% / 11.9%) et **40** (33.3% / 32.7%), à l'exception du noyau oxazole **76** (0% / 19.6%). Pour la série des esters cyclohexyliques, seul le noyau benzène **83** (13.4% / - 0.2%) montre une activité antalgique plus faible que les esters **38** (18.4% / 96.7%) ou **42** (65.7% / 52.6%).

On peut ensuite comparer les résultats selon la nature du noyau aromatique. Ainsi pour les noyaux HBA, la meilleure activité *in vivo* (plaque chaude) est obtenue pour le 2-furane **73** (69.4% / 24.1%). Cependant, ces résultats sont à nuancer car nous avons enregistré une forte mortalité (4 souris sur 7) 24 h après l'injection de cette molécule. Il semble donc que l'orientation du furane dans l'espace soit particulièrement importante pour la toxicité du composé. Cependant, l'ester **79** portant lui aussi un noyau 2-furane ne montre d'augmentation de la mortalité chez les souris. Le test *in vitro* étant en cours, on ne peut pas conclure sur la capacité à activer les canaux TREK-1 pour cet ester. Les coefficients d'activation de TREK-1 des trois noyaux HBA (3-furane **36** et **38**, 2-furane **73** et oxazole **76**) sont du même ordre de grandeur (autour de 2 pour 100 µM). Il serait peut-être intéressant de synthétiser les acides correspondants à ces analogues afin de vérifier si on observe une amélioration de l'activité *in vivo* et *in vitro*, comme avec le furane **12**.

Les noyaux HBD (pyrrole **74** et **80**, imidazole **75** et **81,** indole **40** et **42**) donnent des résultats *in vivo* prometteurs (> 50% à 30 ou 45 min lors du test de la plaque chaude). Cependant, aucun des nouveaux noyaux ne permet d'améliorer l'activation des canaux TREK-1 *in vitro* par rapport au noyau indole. Ceci pourrait s'expliquer en corrélant ces résultats aux volumes moléculaires. En effet, on remarque que les analogues pyrroles (**74** et **80**) et imidazoles (**75** et **81**) sont bien moins volumineux (< 230 Å^3) que les analogues indoles (**40** et **42**) correspondants (Tableau 34). On peut supposer que l'action avec la cible nécessite, en plus de la liaison hydrogène formée par le biais de l'hydrogène de la fonction amine de l'indole, un noyau phényl pour former des interactions π-π (π-stacking). De plus, les analogues **74-75** et **80-81** sont bien moins lipophiles que l'indole **42**.

N°	Noyau aromatique	R	Cellules[c] (µM)	LogP	Volume (Å^3)
40	**Indole**	-Et	**4.71 ± 1.85* (20)**	**2.907**	**218.628**
74	**Pyrrole**	-Et	1.89 ± 0.23** (100)	1.600	174.636
75	**Imidazole**	-Et	1.80 ± 0.16** (100)	0.673	170.480
42	**Indole**	-Cy	**1.98 ± 0.24*** (10)**	**4.436**	**275.260**
80	**Pyrrole**	-Cy	2.62 ± 0.47** (100)	3.129	231.269
81	**Imidazole**	-Cy	1.50 ± 0.04** (100)	2.203	227.112

Tableau 34 : influence du LogP et du volume moléculaire[108]
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

Pour les noyaux hydrophobes (benzène **77** et **83**, naphtalène **78** et **84**), on observe aussi des coefficients d'activation de TREK-1 faibles, entre 1.17 et 2.60 à 100 µM). Il semble donc que la présence d'un groupe HBD soit indispensable pour une bonne interaction avec la cible. Les résultats *in vivo* et *in vitro* sont par ailleurs meilleurs pour le noyau naphtalène ce qui validerait l'hypothèse suggérant le besoin d'un volume compris autour de 275 Å^3 et d'un noyau phényl capable d'interagir par π-stacking (Tableau 35).

N°	Noyau aromatique	R	Cellules[c] (µM)	LogP	Volume (Å^3)
40	**Indole**	-Et	**4.71 ± 1.85* (20)**	**2.907**	**218.628**
77	**Benzène**	-Et	1.18 ± 0.11** (100)	2.625	189.651
78	**Naphtalène**	-Et	1.59 ± 0.23* (100)	3.808	233.643
42	**Indole**	-Cy	**1.98 ± 0.24*** (10)**	**4.436**	**275.260**
83	**Benzène**	-Cy	1.17 ± 0.14 (100)	4.154	246.283
84	**Naphtalène**	-Cy	2.60 ± 0.51* (100)	5.338	290.275

Tableau 35: influence du LogP et du volume moléculaire[108]

En résumé, il semble important que le noyau aromatique présente à la fois un groupe HBD et la possibilité d'effectuer des interactions π-π.

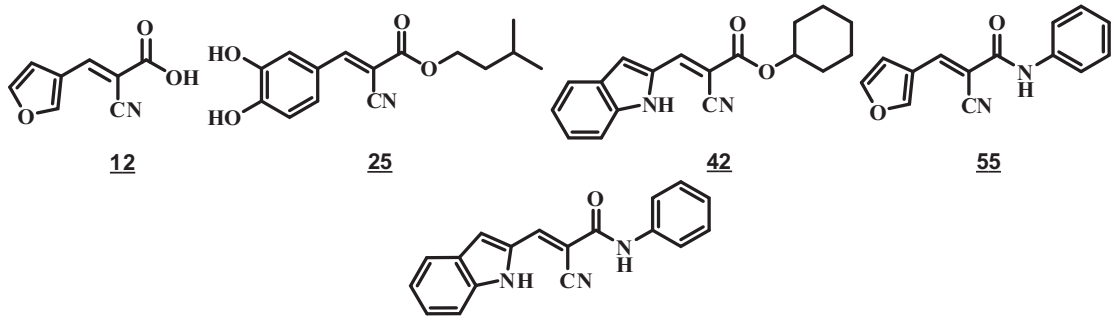
5.4 Conclusion

Cette étude de relation structure-activité nous a permis de dégager quatre grands groupes de molécules (Tableau 36) :

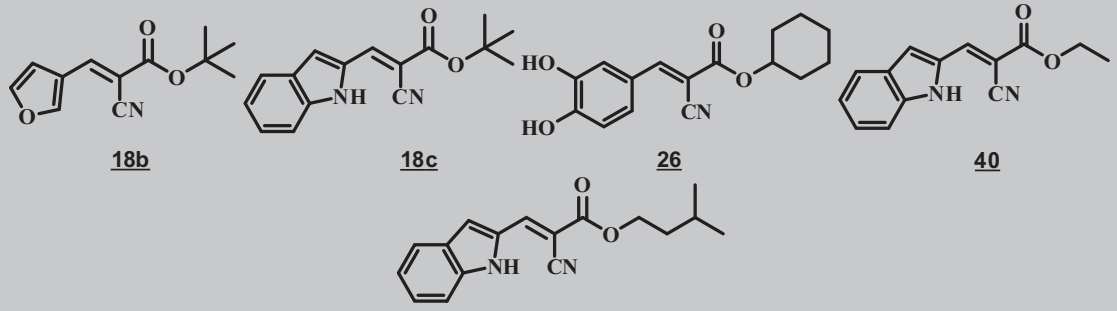
- Les molécules actives *in vivo* (antalgie > 50%) et *in vitro* (R_{TREK} > 3 si la concentration est supérieur à 20 µM et R_{TREK} > 2 si elle est inférieure à 20 µM) représentées par les analogues **12**, **25**, **42**, **55** et **59** (groupe A).

- Les molécules activatrices de TREK-1 ($R_{TREK} > 3$ si la concentration est supérieur à 20 µM et $R_{TREK} > 2$ si elle est inférieure à 20 µM) mais ne présentant pas d'effet antalgique (antalgie < 50%) : **18b-c**, **26**, **40-41**(groupe B).
- Les molécules antalgiques mais n'activant pas le canal TREK-1 ($R_{TREK} < 2$) : **11**,**13**, **38**, **45-47**, **54**, **56**, **58**, **73-75**, **77-78**, **80-81**, **84** (groupe C).
- Les molécules sans effet antalgique (antalgie < 50%) et n'activant pas le canal TREK-1 ($R_{TREK} < 2$) **18a**, **24**, **27**, **36-37**, **39**, **43**, **76**, **83** (groupe D).

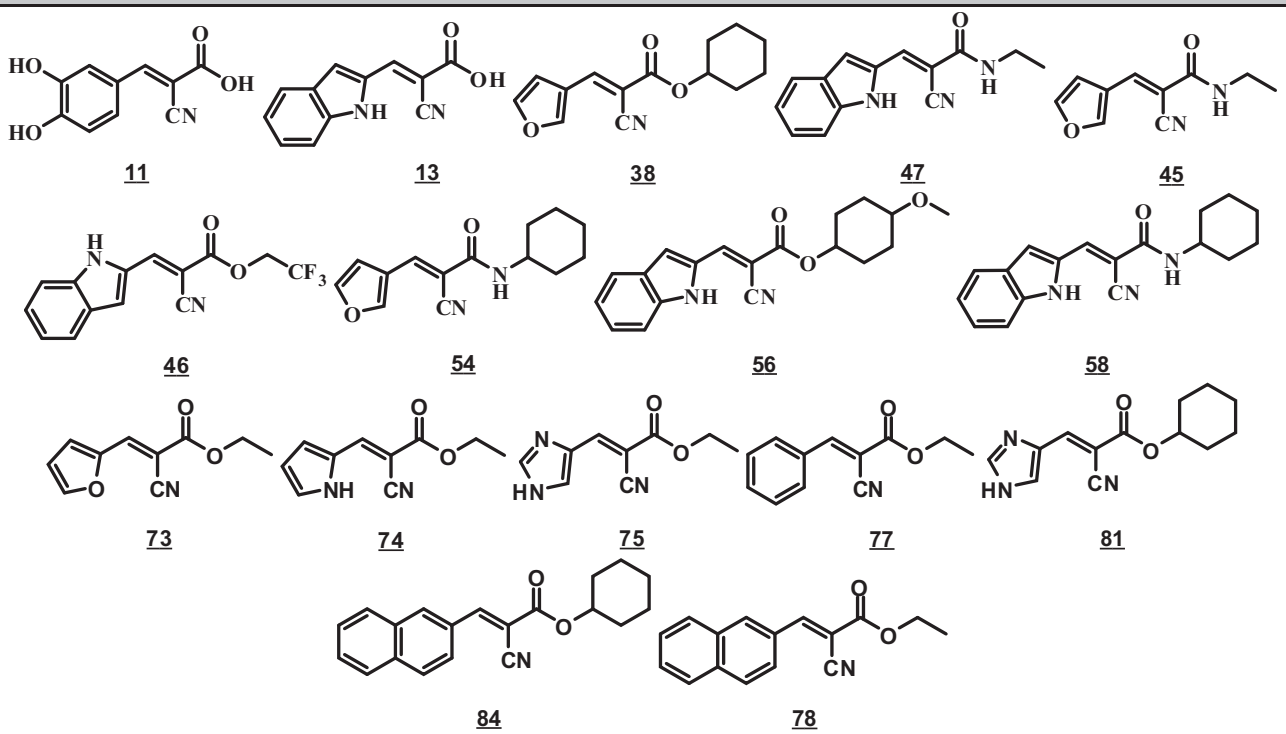
A



B



C



D

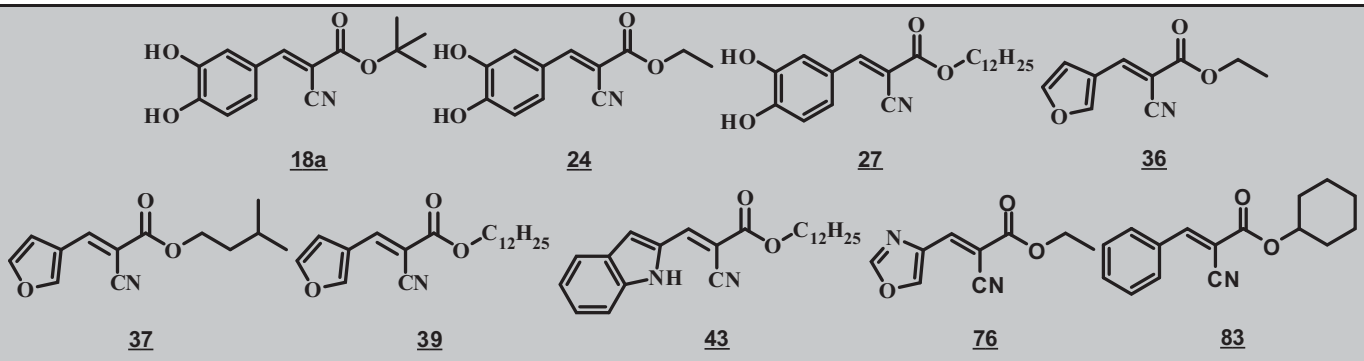


Tableau 36 : Analogues classés selon les groupes A, B, C, D.

A partir du groupe A, nous avons pu affiner les critères permettant une bonne interaction avec la cible (Tableau 37). On peut distinguer deux sous-groupes si l'on s'intéresse aux volumes moléculaires :

- Groupe à faible volume moléculaire (V < 230 Å ^{3}): composés **12** et **55**
- Groupe à volume moléculaire plus important (V > 230 Å ^{3}) : **25**, **42**, **59**.

En se penchant sur le deuxième sous-ensemble, on remarque que l'activité *in vitro* décroît quand le volume moléculaire et le logP augmentent.

N°	Noyau aromatique	X	LogP	Volume (Å ^{3})	Surface polaire Å²	R cellules (µM)
12	**Furane**	-OH	0.399	136.889	74.231	
55	**Furane**	-NHPh	1.957	212.682	66.030	4.64 ± 0.61*** (20 µM)
25	**Catéchol**	-O*i*pent	2.933	255.877	90.553	2.35 ± 0.37** (10 µM)
59	**Indole**	-NHPh	3.472	260.092	68.681	2.16 ± 0.53* (10 µM)
42	**Indole**	-OCy	4.436	275.26	65.888	1.98 ± 0.24*** (10 µM)

Tableau 37 : propriétés des molécules de la catégorie A

Ainsi, nous sommes revenus sur l'hypothèse des deux sites d'actions et nous l'avons remplacée par la proposition suivante : un seul site mais deux orientations spatiales d'interaction selon la nature du noyau aromatique. Ce site (taille ≈ 260 - 275 Å ^{3}) comporterait trois éléments:

- S_1 : une poche hydrophobe favorisant le π-stacking et possédant des résidus HBD.
- S_2 : un résidu HBA.
- S_3 : une poche hydrophobe, privilégiant les géométries planes et le π-stacking.

Selon la nature du noyau aromatique, l'orientation de la molécule serait inversée afin d'optimiser l'interaction avec le site S_1 et la poche hydrophobe S_3 ne serait pas forcément utilisée.

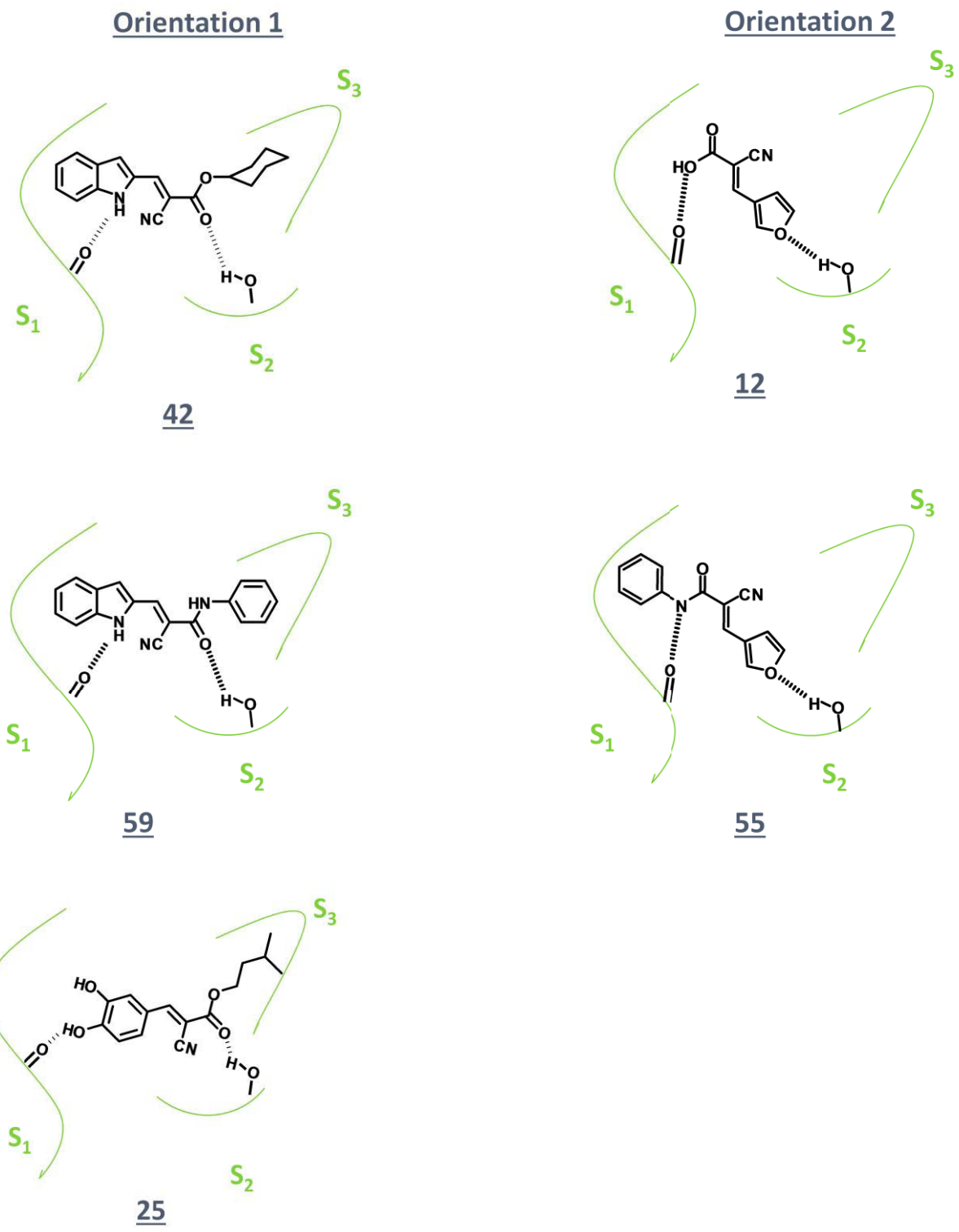


Figure 57 : Hypothèse sur le site d'interaction

Les molécules appartenant au groupe B (capables d'activer le canal TREK-1 mais sans effet antalgique) possèdent des volumes moléculaires qui devraient leur permettre d'accéder au site d'action précédent (orientation 1). Est-ce l'hydrophobicité, plus élevée (logP > 3), qui explique l'absence d'effet antalgique (critères CNS : logP < 2.5) ?[107] L'ester **40** avec le noyau indole semble quant à lui avoir un volume moléculaire plutôt faible (218 Å^3) pour interagir

selon l'orientation 1. On peut imaginer l'existence d'une autre configuration pour se lier au site, impliquant uniquement les sites S_2 et S_3 par exemple. De même, l'ester **18b**, de part son noyau furane, devrait privilégier l'orientation 2. L'absence de groupement HBD (ester *t*-Bu) ne devrait alors pas favoriser une bonne interaction. Cependant ce composé est un activateur du canal TREK-1 particulièrement efficace. Cette molécule étant petite, on peut supposer qu'elle s'oriente différemment afin d'optimiser son action.

Certains analogues du groupe C possèdent des volumes moléculaires trop faibles (**11**, **13**, **74-75**, **81**) ou trop important (**56**) pour interagir correctement avec le site selon l'orientation 1. Les analogues furane appartenant à cette catégorie sont uniquement des esters (**38**, **73**), incapables de former de liaison hydrogène avec la poche S_1. Les amides **45**, **54** et **58** ne permettent pas d'établir d'interactions π-π avec la poche S_1, tout comme le noyau pyrrole **80** (plus petit que le noyau indole). Les noyaux naphtalène et benzène (**77-78**, **84**) ne peuvent pas former de liaison hydrogène au niveau de la poche S_1. L'ester **46** (remplacement de $-CH_2CH_3$ par $-CH_2CF_3$) et l'amide **47** (remplacement de la fonction ester par un amide) perdent leur capacité à activer par rapport à l'ester **40**, malgré des volumes semblant correspondre à la taille du site.

Enfin, les analogues du dernier groupe ont des volumes moléculaires trop faibles (**18a**, **24**) ou trop importants (**27**, **39**, **43**) pour interagir de manière efficace avec la cible selon l'orientation 1 ou 2. Les esters **36-37** et **76** devraient préférer l'orientation 2 mais ils ne possèdent pas de groupement HBD leur permettant d'établir des liaisons hydrogène avec la poche S_1, à l'instar de l'analogue benzène (**83**).

CHAPITRE 6 EVALUATION PHARMACOLOGIQUE COMPLEMENTAIRE

Nous avons décidé de poursuivre l'évaluation pharmacologique des molécules les plus prometteuses (groupe A) mais aussi de celles appartenant au groupe C, afin de confirmer si l'activité antalgique observée *in vivo* est bien due à l'activation des canaux TREK-1. En effet, nous avons vu au chapitre 4 que l'effet antalgique *in vivo* de l'acide **13** (**Ar** = indole) est dépendant des canaux TREK-1, bien qu'il soit un mauvais activateur. Les composés d'intérêt ont donc subi une batterie de tests complémentaires.

- Test sur souris invalidées pour le gène TREK-1 (TREK-$1^{-/-}$) : nous pourrons ainsi observer l'implication du canal TREK-1 dans l'effet antalgique *in vivo* et émettre des hypothèses sur une activation directe ou indirecte. Par la même occasion, nous pourrons confirmer ou infirmer l'activité nociceptive sur une autre souche de souris (souris noires).
- Test sur souris invalidées pour le gène mGluR4 (mGluR$4^{-/-}$): l'hypothèse émise dans le chapitre 4 sur l'éventuelle implication du récepteur métabotropique mGluR4 dans l'activation indirecte du canal TREK-1 pourrait ainsi être in/validée.
- Test sur souris invalidées pour le gène TREK-2 (TREK-$2^{-/-}$) : nous pourrons ainsi avoir une idée de la sélectivité de nos composés *in vivo* par rapport au canal TREK-2, très proche du canal TREK-1 (près de 75% d'homologie).
- Test à la carraghénine, afin d'étudier l'effet antalgique sur un autre type de douleur (inflammatoire).
- Test de la plaque chaude sur souris WT, administration *per os* pour avoir une idée de l'influence du mode d'administration (influence du métabolisme).

6.1 Activation des canaux TREK-1

Le test de criblage *in vitro* (électrophysiologie sur cellules HEK-293) a été conduit de façon systématique à une seule dose (100 µM si la solubilité le permettait). Les molécules activatrices de TREK-1 ($R_{TREK} > 3$ ou $R_{TREK} > 2$ selon la dose testée) ont été classées dans le groupe A si elles montrent une activité antalgique ou dans le groupe B si elles ne sont pas antalgiques. Parmi ces molécules positives au criblage primaire, nous en avons sélectionné huit (groupe A ; **12**, **25**, **42**, **55**, **59** ; groupe B : **18b**, **26**, **40**) qui ont été évaluées sur une gamme de concentration de façon à déterminer la concentration efficace médiane (EC_{50}). Ce paramètre permettra de confirmer et de quantifier l'affinité des activateurs de TREK-1.

La concentration efficace médium correspond à la concentration induisant 50% de l'effet. Elle permet de caractériser la puissance d'un activateur, alors que son efficacité se

traduit par l'effet maximum obtenu, à saturation (E_{max}). On peut avoir une estimation rapide de cette concentration efficace medium à partir de la courbe d'effet-dose (Figure 58).

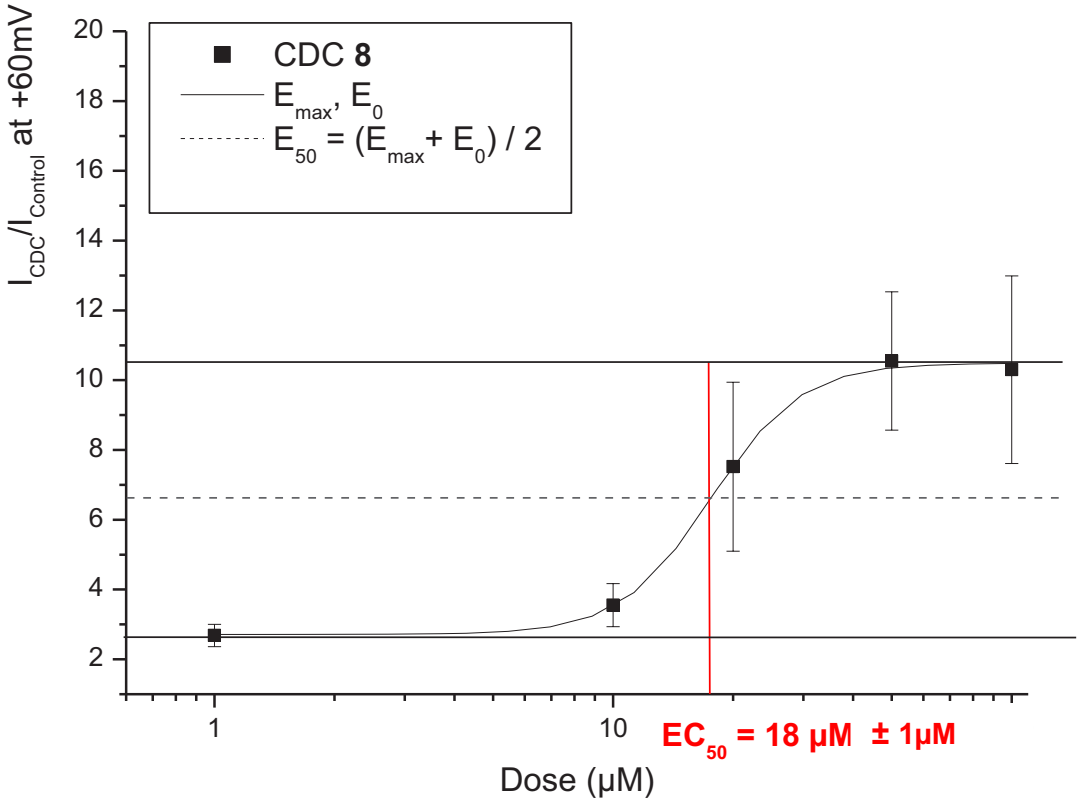


Figure 58 : Courbe effet-dose pour l'ester 18b et calcul de EC_{50}

Cependant, afin d'être plus précis, nous avons déterminé les EC_{50} de nos composés en utilisant l'équation de Hill :

$$y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + 10^{(\text{Log } EC_{50} - \text{Log}[C])*H})$$

Les valeurs obtenues pour les différents composés sont regroupées dans le Tableau 38. Pour l'ester **42** et l'amide **55**, nous avons rencontré des problèmes de solubilité, ne nous permettant pas d'atteindre l'activation maximale et donc de déterminer une EC_{50}. On remarque que les EC_{50} des composés sont de l'ordre de la dizaine de micromole. Ce résultat est plutôt encourageant pour la suite. Il semblerait que le catéchol **26** (EC_{50} = 60 µM) et l'acide **12** (EC_{50} = 49 µM) soient les analogues les moins puissants (Figure 59). A l'inverse, les esters *t*butylique **18b** (**Ar** = furane, EC_{50} = 11 µM), *i*pentylique (**Ar** = catéchol, EC_{50} = 13 µM), éthyliUE **40** (**Ar** = indole, EC_{50} = 13 µM) et l'amide **59** (**Ar** = indole, EC_{50} = 3 µM) montrent la meilleure puissance. Le CDC **8**, quant à lui, montre la meilleure efficacité (E_{max} = 11).

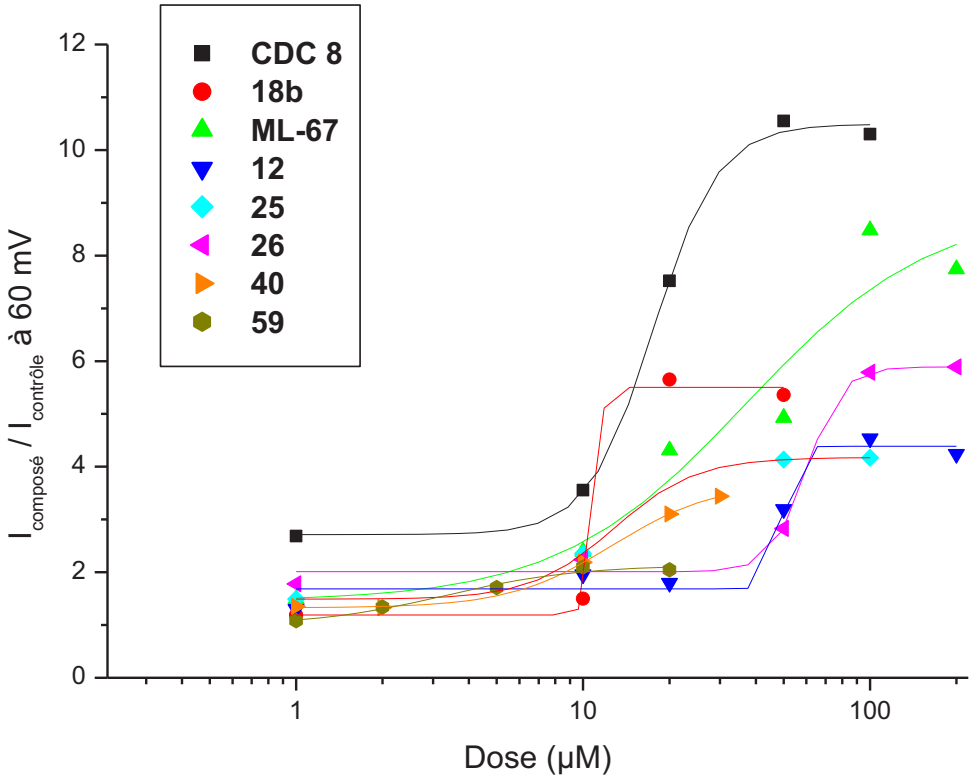


Figure 59 : Comparaison des courbes effet-dose pour le CDC 8, le ML-67 et les analogues 12, 18b, 25-26

N°	Noyau Aromatique Ar	X	groupe	EC_{50}[a] (µM)	EC_{80}[a] (µM)	E_{max}[b]
CDC 8	**-**	-	-	18	25	11
ML-67	**-**	-	-	36	103	9
12	**Furane**	-OH	A	49	53	4
18b	**Furane**	-O*t*bu	B	11	12	5.5
25	**Catéchol**	-O*i*pent	A	13	20	4
26	**Catéchol**	-OCy	B	60	73	6
40	**Indole**	-OEt	B	13	23	4
42	**Indole**	-OCy	A	NS[c]	NS[c]	NS[c]
55	**Furane**	-NHPh	A	NS[c]	NS[c]	NS[c]
59	**Indole**	-NHPh	A	4	7	2

Tableau 38 : Concentration efficace médium (EC_{50}) des activateurs de TREK-1

[a] Les données ont été ajustées avec l'équation de Hill : $y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + 10^{(Log\,EC_{50} - Log[C])*H})$, avec H : coefficient de Hill.

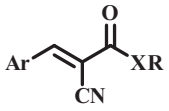
[b] $E_{max} = I_{composé} / I_0$ à saturation.

[c] NS : non soluble

6.2 Implication du canal TREK-1 dans l'activité antalgique

A l'aide de tests sur des souris invalidées pour le gène TREK-1, nous allons pouvoir étudier l'implication du canal TREK-1 dans le phénomène antinociceptif.

Les molécules ont d'abord été choisies afin d'être représentatives du set de composés. Ainsi, nous avons sélectionné quatre molécules pour la série des esters furane et indole (**37** groupe D, **38** groupe C, **18c** groupe B et **42** groupe A). Ensuite, parmi le groupe C, nous avons choisi deux molécules pour les modifications sur l'ester cyclohexylique (**56** et **58**) et deux pour les modifications de noyaux aromatiques (**78** et **81**).



N°	Ar	X	R	Groupe	Plaque chaude[a] 30/45min	Cellules[b] (µM) R_{TREK}
18c	Indyl	O	*t*butyl	B	41.3%**/ 41.0%*	**4.07 ± 0.56*** (20)**
37	Furyl	O	*i*pentyl	D	6.5%$^{-}$ / 25.5%$^{-}$	2.80 ± 0.41** (100)
38	Furyl	O	cyclohexyl	C	18.4%$^{-}$ / **96.7%*** **	1.79 ± 0.16** (100)
42	Indyl	O	cyclohexyl	A	**65.7%** / 52.6%***	**1.98 ± 0.24*** (10)**
56	Indyl	O	-C_6H_{10}OMe	C	34.6%$^{-}$ / **52.4%****	1.60 ± 0.08* (10)
58	Indyl	NH	cyclohexyl	C	**67.5%*** ** / 35.4%$^{-}$	1.52 ± 0.17 (100)
78	Naphtyl	O	éthyl	C	**110.9%**** / 73.4%$^{-}$	1.59 ± 0.23* (100)
81	Imidazyl	O	cyclohexyl	C	27.0%$^{-}$ / **62.4%**$^{-}$	1.50 ± 0.04** (100)

Tableau 39: Récapitulatif des résultats des molécules sélectionnées
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.
[b] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 stabilisées pour TREK-1 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

Le test de la plaque chaude est effectué sur des souris noires TREK-$1^{-/-}$ obtenues par recombinaison homologue (cf chapitre 4). La souche étant différente de celle des souris TREK-$1^{+/+}$ utilisées normalement (souris blanches), nous avons dû reconfirmer l'existence d'une activité antinociceptive sur les souris noires TREK-$1^{+/+}$.

N°	Ar	X	R	% antalgie TREK-$1^{+/+}$	% antalgie TREK-$1^{-/-}$	activation due à TREK-1[c]

				Plaque chaude[a] (30/45min)	Plaque chaude[b] (30/45min)	
18c	Indyl	O	*t*butyl	10.4% / 19.3%	NC[d]	NC[d]
37	Furyl	O	*i*pentyl	44.0% / 37.6%**	23.3% / 27.8%	47% / 26.1%
38	Furyl	O	cyclohexyl	39.4%* / 52.4%*	35.6% / 36.0%	9.6% / 31.3%
42	Indyl	O	cyclohexyl	76.7%**/ 67.9%**	24.5% / 67.8%	68.1% / 0%
56	Indyl	O	$-C_6H_{10}OMe$	19.5% / 37.1%*	14.3% / 31.8%	26.7% / 14.3%
58	Indyl	NH	cyclohexyl	13.1% / 3.0%	NC[d]	NC[d]
78	Naphtyl	O	éthyl	17.4% / 31.1%*	18.0% / 34.4%	0% / 0%
81	Imidazyl	O	cyclohexyl	22.8% / 17.2%	NC[d]	NC[d]

Tableau 40 : Tests sur souris invalidées pour le gène TREK-1
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris sauvages.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris KO.
[c]activation due à TREK-1 calculée lors du test de la plaque chaude avec la formule suivante :
(1- (% antalgie KO / % antalgie WT))*100 = % d'activation due à TREK-1
[d]NC : non calculé car pas d'effet chez les souris WT
Test student : *< 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05.**

En s'intéressant aux quatre premières molécules (Tableau 40), on remarque que l'ester *t*-butylique **18c** présente une activité antalgique encore plus faible chez les souris noires (blanche : 41.3%**/ 41.0%* *vs* noire : 10.4% / 19.3%). Il est donc impossible d'évaluer l'implication des canaux TREK-1. Etonnamment, l'ester *i*-pentylique **37** (groupe D : inactif *in vivo* et *in vitro*) montre une activité antalgique chez la souris noire sauvage (blanche : 6.5%$^{-}$ / 25.5%$^{-}$ *vs* noire : 44.0% / 37.6%) ainsi qu'une implication du canal TREK-1 (47% / 26.1%). L'ester cyclohexylique **38** conserve son activité *in vivo* (blanche : 18.4%$^{-}$ / 96.7%*** *vs* noire : 39.4% / 52.4%) mais ne démontre pas d'implication importante des canaux TREK-1 (9.6% / 31.3%). On peut émettre l'hypothèse que les furanes **37** et **38** sont métabolisés en acide **12** ou bien que leur mécanisme d'action implique d'autres cibles. Enfin, l'ester cyclohexylique **42** conserve non seulement une activité *in vivo* chez la souris sauvage (blanche : 65.7%** / 52.6%* *vs* noire : 76.7% / 67.9%) et démontre une forte implication des canaux TREK-1 30 min après l'injection (68.1% / 0%). Cependant, la perte d'implication à 45 min est difficilement explicable.

En résumé, on peut donc suggérer que les furanes **37** et **38** activent les canaux TREK-1 de manière indirecte. Nous avons donc sélectionné ces molécules pour les tests sur souris invalidées pour le gène du récepteur métabotropique mGluR4. L'indole **42**, supposé activer le canal directement, ne devrait donc pas pâtir de l'absence de ce récepteur.

Les autres molécules appartiennent toutes à la catégorie C (actives *in vivo*, inactives *in vitro*). On remarque que certains produits perdent leur activité antalgique chez les souris noires : **58** (blanche : 67.5%*** / 35.4%$^{-}$ *vs* noire : 13.1% / 3.0%), **81** (blanche : 27.0%$^{-}$ / 62.4%$^{-}$ *vs* noire : 22.8% / 17.2%). Il est donc impossible de conclure sur l'implication des canaux

TREK-1. Cependant, au vu de la perte d'activité antalgique, on peut penser qu'il n'est pas très intéressant de pousser plus loin les investigations sur ces molécules.

Deux autres molécules enregistrent une baisse de leur activité en changeant de souche : **56** (blanche : 34.6%- / 52.4%** *vs* noire : 19.5% / 37.1%), **78** (blanche : 110.9%** / 73.4%- *vs* noire : 17.4% / 31.1%). De plus, l'implication des canaux TREK-1 semble assez faible pour l'indole **56** (26.7% / 14.3%) laissant supposer l'intervention d'un autre mécanisme antinociceptif majoritaire. Quant au naphtalène **78**, aucune implication des canaux TREK-1 n'est à noter.

En conclusion, il est possible de classer les molécules appartenant à la classe C en deux sous-catégories :

- C_1 : molécules antalgiques n'impliquant pas le canal TREK-1 (**38**, **56**, **58**, **78**).
- C_2 : molécules antalgiques activant le canal TREK-1 de manière indirecte (**37**, **81**).

Afin de poursuivre ce classement, nous avons sélectionné quelques molécules montrant des activités *in vivo* intéressantes (**46**, **75**, **77**, **84**) pour tester l'implication des canaux TREK-1. En parallèle, nous souhaitons confirmer l'implication des canaux dans le mécanisme d'action de molécules activatrices de TREK-1 *in vitro* (**18b**, **25**, **26**, **55**, **59**).

N°	Ar	X	R
18b	Furyl	O	*t*butyl
25	Catéchol	O	*i*pentyl
²26	Catéchol	O	Cyclohexyl
55	Indyl	NH	Phenyl
59	Indyl	NH	Phenyl
46	Indyl	O	$-CH_2CF_3$
75	Imidazyl	O	Ethyl
77	Benzyl	O	Ethyl
84	Naphtyl	O	Cyclohexyl

Tableau 41 : Molécules sélectionnées pour les tests sur souris TREK-1$^{-/-}$

6.3 Activation indirecte : implication du récepteur mGluR4?

Les récepteurs métabotropiques au glutamate, contrairement aux récepteurs ionotropiques, ne possèdent pas de canal mais sont couplés à des protéines G, localisées à l'intérieur des cellules, capables de transmettre l'information à des messagers secondaires. Ils

sont classés en trois catégories selon leur pharmacologie et leur homologie de séquence.[128] Le groupe I comporte les récepteurs $mGluR_1$ et $mGluR_5$, couplés à la phospholipase C et capables d'inhiber les canaux TREK-1 (chapitre 3). Le groupe II inclut les récepteurs $mGluR_2$ et $mGluR_3$ et on retrouve les récepteurs $mGluR_4$, $mGluR_6$, $mGluR_7$ et $mGluR_8$ dans le groupe III. Les récepteurs de ces deux dernières catégories permettent d'empêcher la formation d'adénylate monophosphate cyclase (AMPc) en inhibant l'adénylate cyclase. Ainsi le récepteur $mGluR_4$ (cf glossaire) peut entraîner une levée d'inhibition du canal TREK-1, ce qui correspond à une activation indirecte du canal.[100]

Nous avions émis l'hypothèse, dans le chapitre 4, que certaines molécules telles que l'acide **13**, activeraient le canal TREK-1 indirectement, par le biais d'un autre système comme les récepteurs métabotropiques au glutamate ($mGluR_4$). Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé le test de la plaque chaude sur des souris invalidées pour le gène $mGluR_4$ ($mGluR_4^{-/-}$), obtenues selon la procédure développée par Pekhletski *et al*.[129] En plus de l'acide **13** (classe C_2 : activation indirecte de TREK-1) nous avons sélectionné l'acide **12** (classe A : effet *in vivo* et *in vitro*), afin de vérifier qu'il n'est pas influencé par l'absence ou la présence de ce récepteur (Tableau 42).

N°	Cellules[a] (100 µM)	activation due à TREK-1[b]	% antalgie $mGluR_4^{+/+}$ Plaque chaude[c] 30/45min	% antalgie $mGluR_4^{-/-}$ Plaque chaude[d] 30/45min	activation due à mGluR4[e]
12	7.01 ± 2.75**	35.6% / 19.4%	102.5% / 77.2%	84.8%* / 69.0%	17.3% / 10.7%
13	1.18 ± 0,16	100% / 56.6%	18.5% / 30.4%	0.2% / 7.3%	98.8% / 75.8%

Tableau 42 : Implication des récepteurs $mGluR_4$ dans l'activation des canaux TREK-1

[a] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 stabilisées pour TREK-1 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).

[b] activation due à TREK-1 calculée lors du test de la plaque chaude sur souris TREK-1$^{-/-}$ avec la formule suivante : (1- (% antalgie KO / % antalgie WT))*100 = % d'activation due à TREK-1.

[c] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris sauvages.

[d] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris TREK-1 $^{-/-}$.

[e] activation due à mGluR4 calculée lors du test de la plaque chaude sur souris TREK-1$^{-/-}$ avec la formule suivante : (1- (% antalgie KO / % antalgie WT))*100 = % d'activation due à TREK-1.

Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

Pour l'acide **13**, on remarque que l'activité antinociceptive présente chez la souris WT (18.5% / 30.4%) est totalement absente chez la souris $mGluR_4^{-/-}$ (0.2% / 7.3%). On peut donc supposer que les récepteurs $mGluR_4$ sont indispensables à l'action de la molécule. En revanche, pour l'acide **12**, bon activateur de TREK-1 *in vitro*, on ne remarque pas de différence notable entre les souris WT (102.5% / 77.2%) et $mGluR_4^{-/-}$ (84.8% / 69.0%) et donc aucune implication des récepteurs $mGluR_4$. Ces résultats vont dans le sens d'une

activation indirecte des canaux TREK-1 par le biais des récepteurs mGluR4 pour certaines molécules.

D'autres systèmes tels que certains récepteurs à la sérotonine couplés à la protéine G_i (cf glossaire) pourraient également activer les canaux TREK-1 par levée d'inhibition.

Au vu des résultats précédents, il semblait intéressant de réaliser la même expérience sur des molécules appartenant au groupe C_2 ou au groupe C_1 (n'impliquant pas TREK-1) afin de vérifier si leur effet antalgique implique les récepteurs $mGluR_4$ (Tableau 43).

N°	Ar	X	R
11	catéchol	O	H
37	Furyl	O	*i*pentyl
38	Furyl	O	Cyclohexyl
42	Indyl	O	Cyclohexyl

Tableau 43 : Molécules sélectionnées pour les tests sur souris $mGluR_4^{-/-}$

6.4 Implication des canaux TREK-2 dans le mécanisme *in vivo* des composés 12 et 13

Afin d'évaluer une possible implication des canaux TREK-2 dans l'effet antalgique *in vivo*, nous avons effectué le test de la plaque chaude sur des souris invalidées pour ce gène.

Les canaux TREK-2 appartiennent eux aussi à la sous-famille des canaux mécanosensibles. Très représentés dans le cerveau ou certains tissus périphériques (foie, reins, pancréas), ils sont très proches des canaux TREK-1 (près de 75% d'homologie[50]) bien que moins documentés. Comme les canaux TREK-1, ils sont activés par des anesthésiques volatils généraux (halothane, chloroforme)[130], par le riluzole,[131] par la température, par les acides gras polyinsaturés,[130] par l'acidose intracellulaire et l'étirement membranaire.[130] La seule différence réside en la sensibilité au pH extracellulaire (inhibition lors d'une acidification pour TREK-1 / activation pour TREK-2).[132] Etant donné la similarité structurelle, il paraît difficile de synthétiser des molécules sélectives du canal TREK-1.

Les acides **12** et **13** (bons résultats *in vivo* et activation directe ou indirecte) ont été sélectionnés pour ce test. Dans les deux cas (Figure 60, Figure 61), on observe des résultats équivalents chez les souris WT et TREK-$2^{-/-}$. On peut donc en déduire que la présence des canaux TREK-2 n'influence pas l'activité de ces molécules et qu'ils ne sont pas impliqués dans l'effet antalgique. Ces résultats, très encourageants, peuvent nous laisser penser que nos molécules seraient sélectives des canaux TREK-1. Cependant, ce phénomène pourrait aussi s'expliquer par la distribution de la sous-unité TREK-2, différente de celle de TREK-1. Des

études *in vitro* devraient nous permettre de conclure définitivement sur la sélectivité des composés vis-à-vis des canaux TREK-2 / TRAAK / TASK.

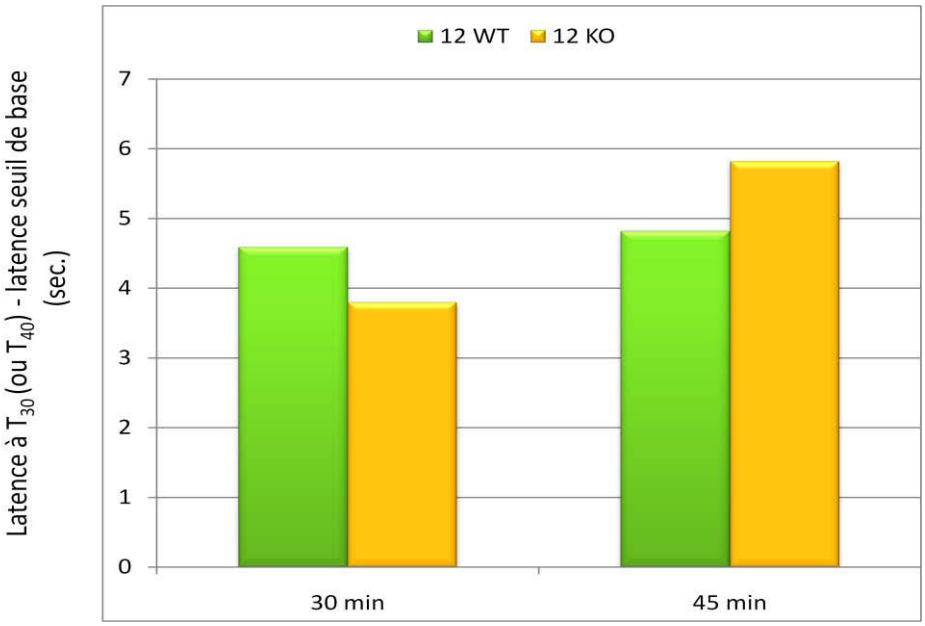


Figure 60 : Comparaison des résultats du test de la plaque chaude chez les souris WT et TREK-2$^{-/-}$ pour l'acide 12

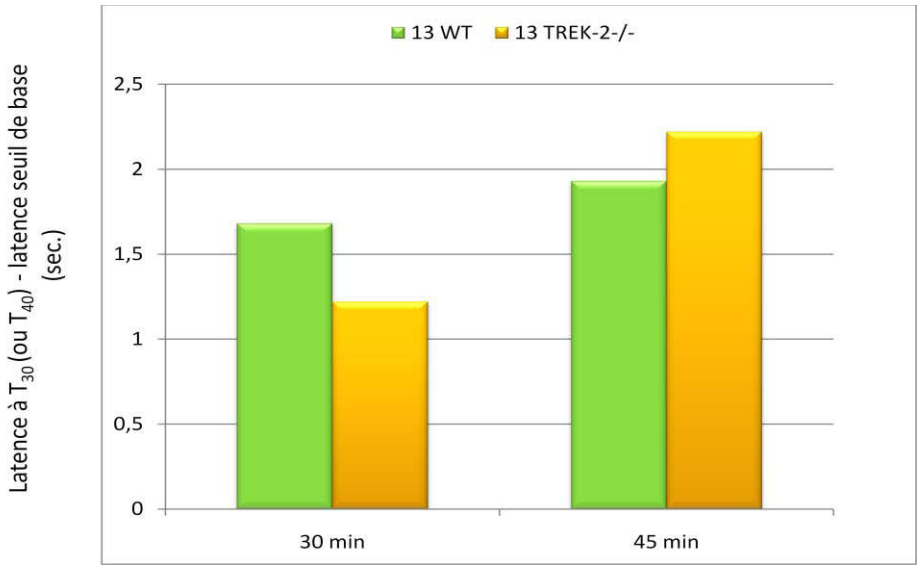


Figure 61 : Comparaison des résultats du test de la plaque chaude chez les souris WT et TREK-2$^{-/-}$ pour l'acide 13

6.5 Modèle de douleur inflammatoire : Test à la carraghénine

Afin de confirmer l'intérêt thérapeutique de nos composés, nous avons ensuite entrepris d'évaluer leur efficacité sur une autre espèce, le rat, et sur un autre modèle de douleur

inflammatoire. Pour cela, nous avons sélectionné le test à la carraghénine, décrit dans le chapitre 4. De plus, ce test étant effectué à différentes doses, il nous permettra de déterminer la dose optimale pour réaliser des tests de douleur complémentaires (ALGOGRAM), en partenariat avec l'entreprise ANSBiotech.

Pour le choix des molécules, nous nous sommes intéressés particulièrement aux résultats *in vivo* et à l'activité antalgique. Quatre molécules du groupe A (l'acide **12**, l'ester cyclohexylique avec le noyau indole **42**, les amides avec le noyau indole **59** ou le noyau furane **55)** ainsi que deux molécules appartenant à la catégorie C (l'acide **13** : C_2 et l'ester **38** : C_1) ont été sélectionnés.

N°	Ar	X	R
12	Furyl	O	H
13	Indyl	O	H
38	Furyl	O	Cyclohexyl
42	Indyl	O	Cyclohexyl
55	Furyl	NH	Phenyl
59	Indyl	NH	Phenyl

Tableau 44 : Molécules sélectionnées pour le test à la carraghénine

Les résultats des acides **12** et **13** ont été présentés dans le chapitre 4 (Figure 33, Figure 34). Pour l'indole **42** (Figure 63), on observe une réduction de l'hyperalgésie du même ordre de grandeur que l'acide **13** à la concentration de 100 mg/kg tandis que le furane **38** montre une activité légèrement plus faible (Figure 62). En revanche, les amides **55** et **59** ne présentent aucune activité notable lors de ce test à la carraghénine, ni d'effet-dose par ailleurs (Figure 64, Figure 65). Ceci peut paraître surprenant compte tenu de leurs résultats précédents. Le test à la carraghénine étant un modèle inflammatoire, il pourrait être intéressant d'évaluer le comportement de ces molécules sur d'autres modèles (douleur neuropathique ou cancéreuse par exemple).

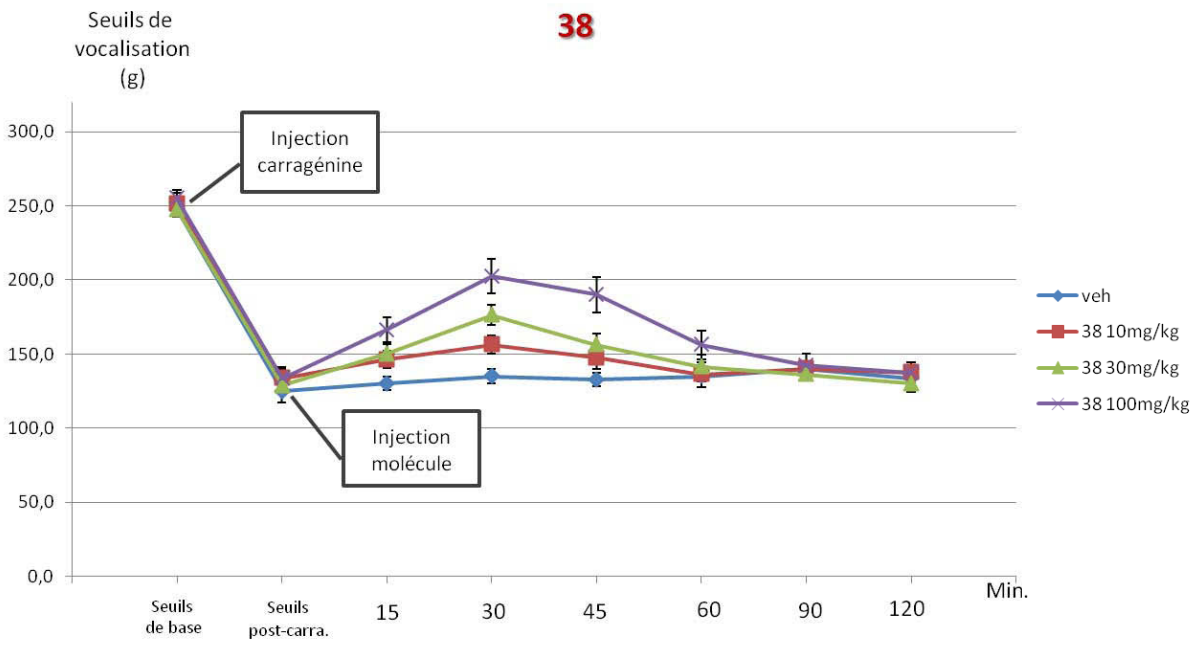


Figure 62 : Test à la carraghénine sur le composé 38

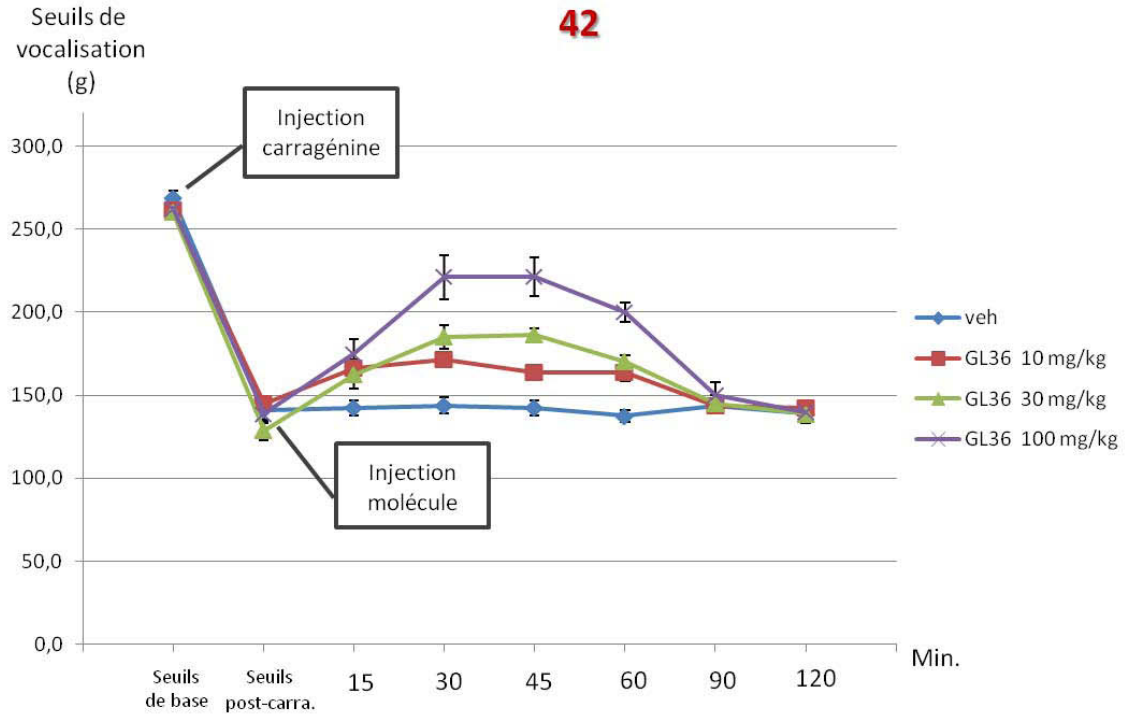


Figure 63 : Test à la carraghénine sur le composé 42

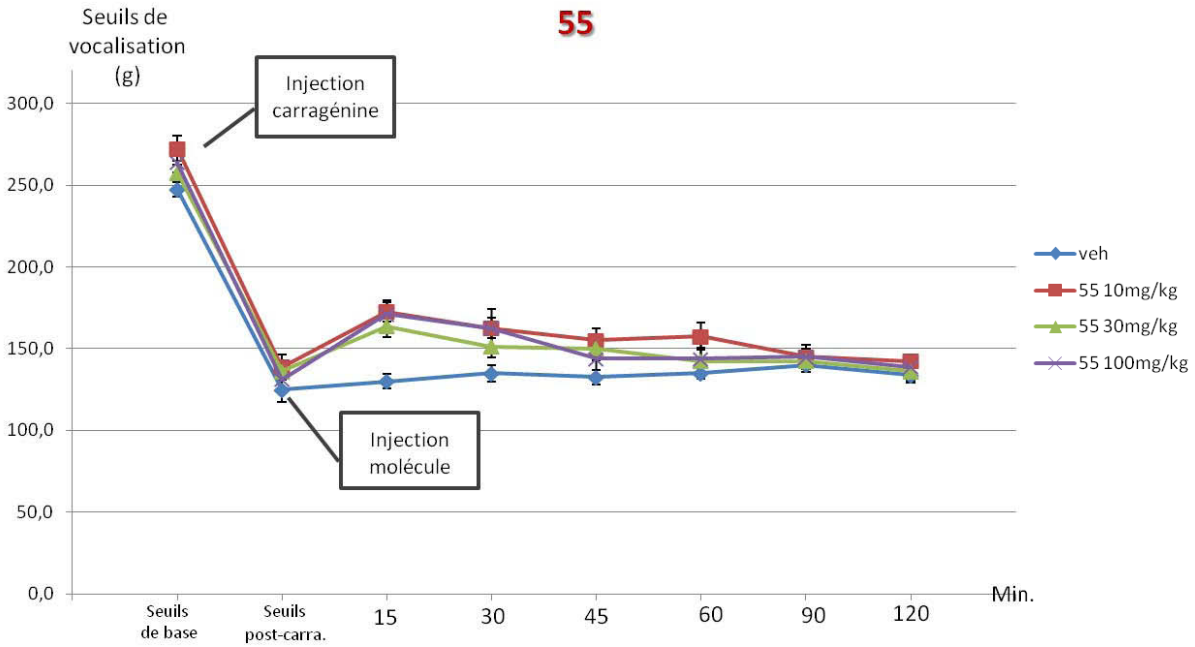


Figure 64 : Test à la carraghénine sur le composé 55

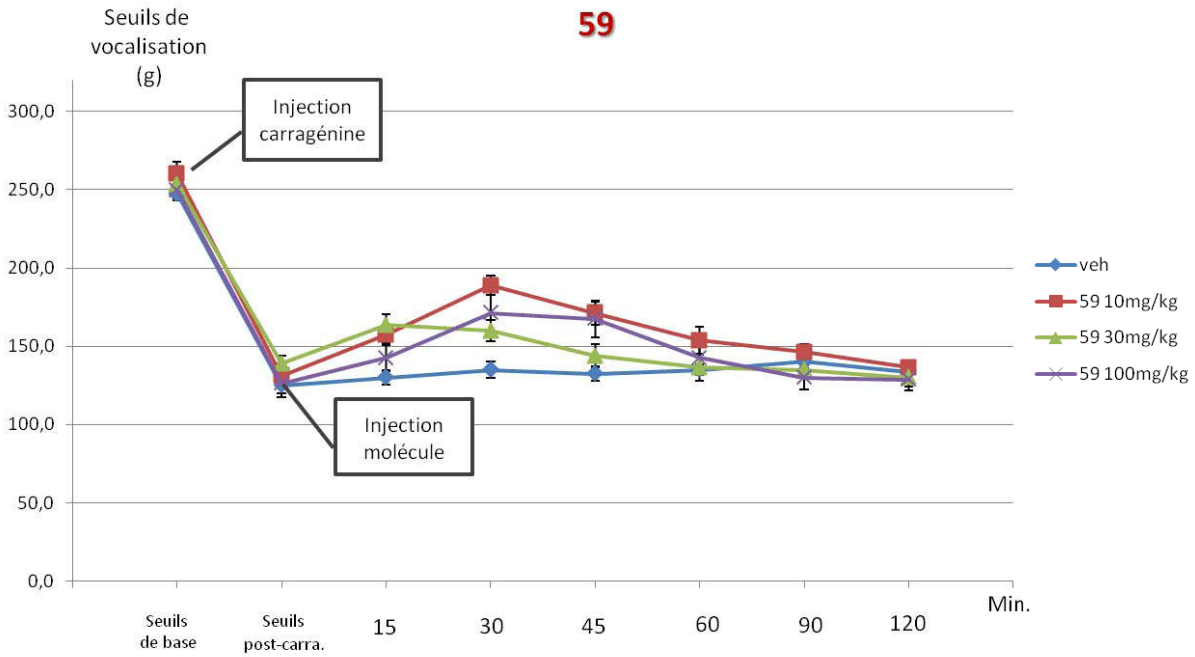


Figure 65 : Test à la carraghénine sur le composé 59

Afin de comparer les six analogues, nous avons calculé l'aire sous la courbe entre 0 et 120 min à la concentration de 100 mg/kg, en utilisant la méthode des trapèzes (Tableau 45, Figure 66). Les acides **12** (AUC = 9525) et **13** (6969) sont nettement les plus efficaces, suivis

par les esters cyclohexyliques **42** (**Ar** = indole, AUC = 4749) et **38** (**Ar** = furane, AUC = 3184).

	AUC (100 mg/kg)
12	9525
13	6969
38	3184
42	4749
55	2060
59	2049

Tableau 45 : Valeurs des aire sous la courbe pour les analogues 12-13, 38, 42, 55, 59 (100 mg/kg)

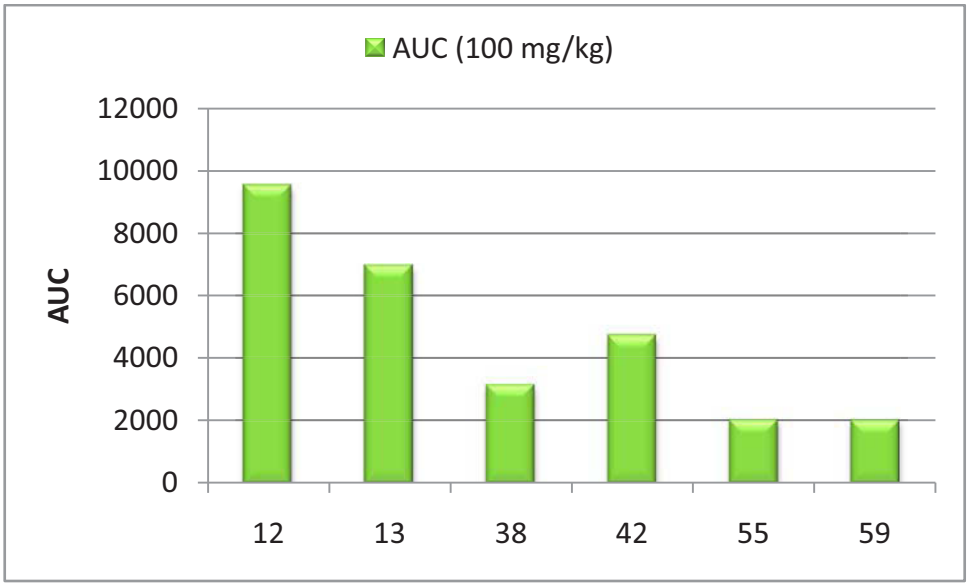


Figure 66 : Représentation graphique des aires sous la courbe pour les analogues 12-13, 38, 42, 55, 59 (100 mg/kg)

6.6 Influence du mode d'administration

Pour parachever cette étude complémentaire, nous avons débuté une étude sur le mode d'administration. En effet, tous les tests précédents ont été effectués suite à une injection sous-cutanée (s.c.) des molécules et nous avons rencontré quelques difficultés de solubilité pour certains composés. Il parait donc intéressant d'essayer une autre voie d'administration. Nous avons sélectionné la voie orale (*per os*) car c'est la plus simple d'utilisation et la plus plébiscitée par les patients. De plus, ce test nous permettra de voir si nos molécules sont suffisamment biodisponibles.

Nous avons donc effectué le test de la plaque chaude, après administration *per os* des trois acides chefs de file **11**, **12** et **13**. La distribution étant plus lente que lors d'une injection

sous-cutanée, les mesures ont été prises à 30, 45 et 60 min après l'administration (Tableau 46).

Molécules	Plaque chaude[a] 60 mg/kg *per os* (30/45/60 min)	Plaque chaude[a] 60 mg/kg sous-cutanée (30/45min)
Morphine	105.1% / 129.7% / 54.3%	185% / 159.7%
11	139.8%*** / 99.0%** / 148.5%**	25.1%- / 63.2%***
12	119.7% / 110.1% / 110.5%	56.4%*/ 119.5%**
13	36.4 % / 89.1% / 88.0%*	52.8%*** / 63.4%*

Tableau 46 : Comparaison du mode d'administration
[a]Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude chez les souris sauvages.
Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

Globalement, les résultats *per os* sont plus élevés que lors de l'administration en sous-cutané. On observe un effet dès 30 min après l'administration, ce qui confirme l'hypothèse émise dans le chapitre 5 lors des études de stabilité métabolique : les acides résistent au premier passage hépatique et gastrique. L'amélioration de l'activité antalgique est particulièrement intéressante pour le catéchol **11** (effet multiplié par plus de cinq, 30 minutes après l'ingestion). On peut supposer que la présence des phénols facilite la solubilisation de la molécule dans le bol intestinal et donc potentialise son action. Les acides **12** (119.7% / 110.1% *per os* contre 56.4% / 119.5% s.c.) et **13** (36.4%/ 89.1% *per os* contre 52.8% / 63.4% s.c.) montrent aussi une amélioration de leur activité antalgique. De plus, l'effet des molécules semble perdurer au-delà d'une heure. Cependant, ces résultats sont à nuancer. En effet, l'administration *per os* du furane **12** a entraîné la mort de deux souris sur sept. On peut donc supposer qu'il se forme un métabolite toxique, non produit lors d'une injection en sous-cutané.

Il serait intéressant de réaliser ce même test sur les composés de la catégorie A (bon antalgique, bon activateur de TREK-1 *in vitro*) afin de vérifier si leur activité antalgique est améliorée. On peut aussi envisager de compléter cette étude en testant différentes formulations (cyclodextrines, milieux micellaires, liposomes) pour optimiser la distribution de nos produits.

6.7 Conclusion

Ces tests supplémentaires nous ont apportés différentes informations.

- Nous avons pu, grâce aux tests sur souris TREK-1$^{-/-}$, diviser les molécules du groupe C (actif *in vivo*, inactif *in vitro*) en deux catégories plus précises : les molécules activant TREK-1 indirectement et celles n'impliquant pas le canal dans leur mécanisme antalgique *in vivo*.

- L'hypothèse impliquant une activation indirecte du canal TREK-1 par les récepteurs métabotropiques $mGluR_4$ a pu être validée pour l'acide **13**. D'autres composés sont en attente pour ce test.

- La sélectivité *in vivo* des acides **12** et **13** pour les canaux TREK-1 par rapport au canal voisin TREK-2 a été démontrée.

- Les meilleurs composés (catégorie A, **12**, **42**) et deux autres analogues fortement antalgiques (**13** et **38**) ont confirmé leur activité antalgique chez une autre espèce et sur un autre modèle de douleur. Les amides **55** et **59**, quant à eux, ne se sont pas révélés efficaces sur le test à la carraghénine mais il serait intéressant d'observer leur comportement sur d'autres modèles de douleur (douleur neuropathique, cancéreuse). Parmi ces composés, 3 molécules seront choisies pour être testées sur d'autres modèles de douleur en partenariat avec ANSBiotech (pain profiling).

- Une étude d'influence du mode d'administration a été commencée. Cette piste reste à poursuivre.

Nous avons ainsi pu confirmer l'intérêt thérapeutique de plusieurs candidats-médicament.

CHAPITRE 7 VERS LA SYNTHESE DE *BI-DRUGS*

7.1 Principe et intérêts des *bi-drugs*

Malgré des recherches intensives sur les mécanismes de la douleur et des investissements importants dans la recherche et le développement, la majorité des analgésiques disponibles sur le marché repose sur des molécules connues depuis longtemps. Les principales innovations en matière d'antidouleurs au cours de ces dernières années se résument à de nouvelles formulations et voies d'administration ou encore à l'association de deux principes actifs déjà existants. [133]

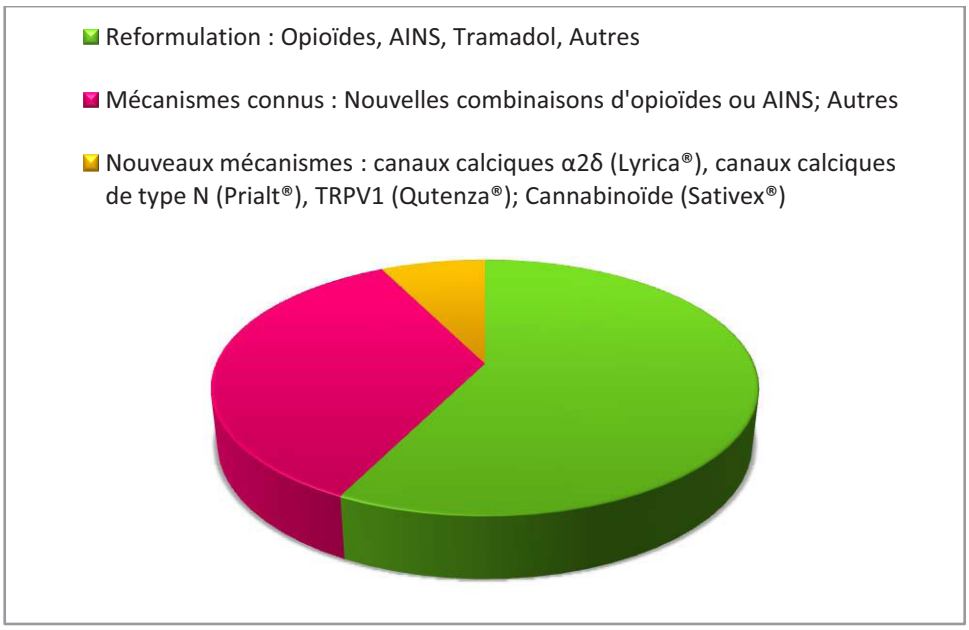


Figure 67 : Analgésiques arrivés sur le marché entre 1990 et 2010.[133]

Seulement 4 molécules sorties récemment sur le marché présentent un mécanisme d'action nouveau, impliquant notamment les canaux ioniques :

- Le Lyrica®, un antiépileptique exerçant son effet antinociceptif (la douleur neuropathique) en se liant à la sous-unité $\alpha_2\delta$ des canaux calciques dépendant du voltage.
- Le Prialt®, utilisé contre les douleurs chronique et neuropathique, premier bloqueur des canaux calcique de type N
- Le Sativex®, pour le traitement des douleurs liées à la sclérose en plaque, à base de dérivés du cannabis
- Le Qutenza®, consituté de capsaïcine, un agoniste des canaux TRPV1, administré en patch dans le traitement des douleurs chroniques

Les stratégies basées sur la reformulation représentent la majorité des nouveaux médicaments (57%). Elles se concentrent principalement sur l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques et sur la diminution de la toxicité. Par exemple, l'utilisation d'une forme galénique à libération prolongée va permettre un relargage régulier et soutenu dans le temps du principe actif, optimisant son activité. Ainsi, l'Oxycontin® a été conçu pour libérer de l'oxycodone sur une période de 12 heures.

Des voies d'administrations alternatives peuvent aussi être envisagées. En effet, la voie transcutanée (patch), en plein développement, permet une administration systémique, contrôlée et prolongée de principes actifs mal absorbés par d'autres voies ou subissant une dégradation trop importante lors du premier passage hépatique notamment (diclofenac, lidocaine). De plus, certains inconvénients tels qu'une odeur ou un goût désagréable sont ainsi éliminés. Cependant, les patchs peuvent entrainer des irritations de la peau.

L'association de molécules antalgiques connues est couramment utilisée afin d'améliorer l'efficacité et/ou de réduire les effets indésirables (Ixprim® association de paracétamol et chlorhydrate de tramadol, Dafalgan codéine® association de paracétamol et codéine phosphate, Vicodin® association de paracétamol et hydrocodone). En effet, l'association de molécules ayant des modes d'action complémentaires permet de viser des cibles différentes. Par exemple, la Vicodin® associe le mécanisme d'action central de l'hydrocodone, au mécanisme périphérique du paracétamol.[134] De plus, la combinaison de molécules ayant des propriétés pharmacocinétiques complémentaires (distribution, métabolisation) permet d'aboutir à une couverture thérapeutique plus importante. C'est le cas de l'Ixprime®, associant l'absorption et l'élimination rapide du paracétamol (demi-vie d'élimination de 2.5h) à celles plus longues du tramadol (demi-vie d'élimination 5h).[135] Dans cette situation, le développement pharmaceutique est peu coûteux puisqu'il repose sur une association de principes actifs ayant déjà obtenus une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). L'étude clinique consiste uniquement en la démonstration de la bioéquivalence de l'association.

En s'inspirant de ce concept, nous allons tenter de créer de nouvelles structures combinant des mécanismes d'action différents en associant, par liaison chimique, une molécule antalgique connue avec nos *lead* présentant, eux, un mécanisme d'action nouveau.

Deux principes actifs ont été sélectionnés : le paracétamol et le néfopam. Ils seront couplés, dans un premier temps, avec le noyau catéchol afin de se rapprocher de la structure du CDC. L'intérêt des ces deux molécules réside dans le fait que leur mécanisme d'action est différent de celui de la morphine et qu'elles ne présentent donc pas d'effets indésirables typiques des morphiniques. L'hydrolyse de cette *bi-drug*, dans le corps, permettra de libérer les deux principes actifs. Ainsi, on peut espérer additionner les effets antalgiques et obtenir un composé aussi puissant que la morphine en s'affranchissant des ses effets indésirables. De plus, la *bi-drug* ayant une structure nouvelle, il sera possible de la breveter.

7.2 *Bi-drug* avec le paracétamol

7.2.1 Choix du paracétamol

Le paracétamol est un des médicaments sans ordonnance le plus utilisé. Synthétisé pour la première fois en 1877 à l'Université Johns Hopkins (USA), il n'a été largement commercialisé qu'au début des années 1950. Il est de nos jours l'antalgique et l'antipyrétique le plus courant dû à sa bonne tolérance, bien que son mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé.

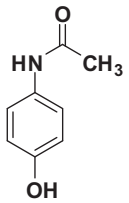


Figure 68 : Paracétamol

Le paracétamol est un acide faible (pKa 9.7) et donc peu ionisé au pH physiologique. Ceci, plus un logP légèrement supérieur à 3, lui permet un bon passage des membranes et donc une bonne distribution. Son spectre d'action est semblable aux Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) bien que l'activité antalgique soit un peu plus faible.

7.2.1.1 Mécanisme d'action

Malgré son ancienneté et sa ressemblance avec les AINS, le mécanisme d'action du paracétamol est resté incertain pendant de nombreuses années. Plusieurs hypothèses ont été formulées jusqu'à ce que l'implication d'une inhibition des enzymes COX-1 et COX-2 soit largement admise.

Les enzymes COX-1 et COX-2 permettent la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Elles possèdent deux fonctions (Figure 69) :

- Cyclooxygénase, permettant d'oxyder l'acide arachidonique en un premier intermédiaire PGG_2.
- Peroxidase, transformant le premier intermédiaire PGG_2 en second intermédiaire PGH_2, qui donnera ensuite la prostaglandine.

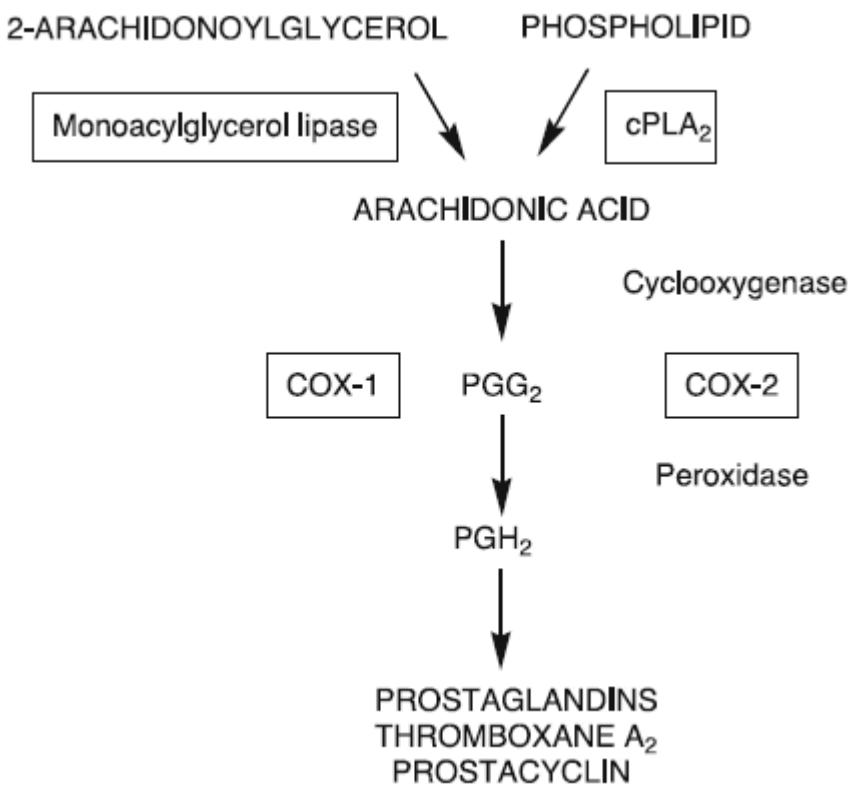


Figure 69 : Rôle des COX [136]

La prostaglandine joue un rôle dans le mécanisme de la nociception. En effet, elle permet une sensibilisation des fibres Aδ et C et donc une potentialisation des différents neurotransmetteurs. De part les fortes similitudes avec les AINS, un premier mécanisme impliquant une inhibition périphérique des enzymes COX avait été suggéré.[137] Celui-ci a été réfuté au profit d'une action centrale. En effet, une étude a prouvé que le paracétamol inhibe préférentiellement les enzymes COX au niveau central que périphérique.[138] Il est maintenant établi que le paracétamol inhibe la production de prostaglandines en agissant en tant que substrat des enzymes COX-1 et COX-2. Ce mécanisme repose sur une compétition entre deux réactions d'oxydation. En effet, l'oxydation du paracétamol en radical libre se fait au détriment de celle d'un résidu tyrosine en radical correspondant. Celui-ci est essentiel pour la fonction cyclooxygénase des enzymes COX et son absence empêche donc la production de PGG_2.[136] Une autre étude a proposé l'existence d'une troisième enzyme, COX-3, spécifique du paracétamol[139] mais cette hypothèse ne semble pas faire l'unanimité pour l'instant.

En revanche, il est admis que l'action antinociceptive du paracétamol ne repose pas uniquement sur l'inhibition de COX. D'autres systèmes, tels que le système sérotoninergique, sont essentiels à l'activité antalgique. En effet, des études ont montré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs 5-HT_3 entraine une diminution de l'activité antalgique.[140]

De même, une implication du système endocannabinoïde a été démontrée récemment.[141] L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs CB_1 et de souris KO pour ce récepteur ont montré une perte d'effet antalgique du paracétamol.

La découverte, en 2005, d'un métabolite actif du paracétamol, l'AM404 a permis d'explorer la possibilité d'un nouveau mécanisme d'action[142]. En effet, ce métabolite, issu de la conjugaison de l'acide arachidonique et du *p*-aminophénol via l'enzyme FAAH, inhiberait la recapture des neurotransmetteurs du système endocannabinoïde.

Récemment, l'implication d'un canal ionique, le canal TRPV-1, a été soulignée (Figure 70).[142] Cette étude montre que l'effet antalgique du paracétamol (oral) disparaît lors de différentes tests de douleur (formol, immersion de la queue et Von Frey) chez la souris KO pour le canal TRPV-1 ou en l'absence de FAAH. Elle implique que l'activation du canal TRPV-1 par l'AM404 serait à l'origine des propriétés antinociceptives.

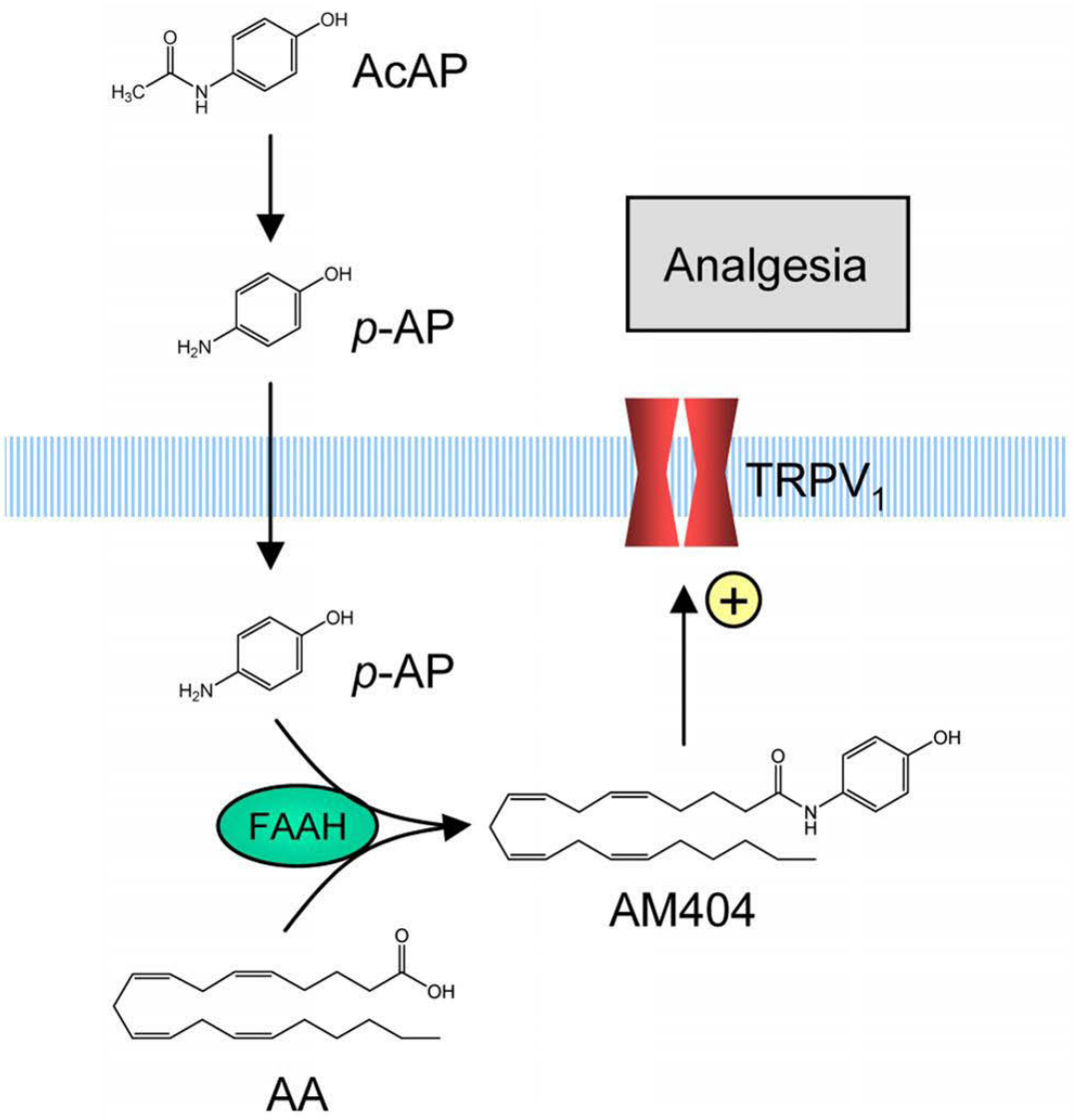


Figure 70 : Implication des canaux TRPV1 dans le mécanisme d'action du paracétamol[142]

7.2.1.2 Propriétés pharmacologiques

Le paracétamol possède une bonne biodisponibilité par voie orale (70 à 90%) et une faible liaison aux protéines plasmatiques ce qui limite le risque d'interactions médicamenteuses. Le temps de demi-vie plasmatique est d'environ 2-3 heures.[12]

Il existe plusieurs voies de dégradation du paracétamol. L'une d'entre-elles, s'appuyant sur le cytochrome P450, conduit à un métabolite toxique pour le foie, le NAPQI (N-acétyl-*p*-benzo-quinone imine), s'il se lie aux protéines. Cette réaction n'intervient qu'à des doses supérieures à 4g/jour. A la posologie thérapeutique, le glutathion est capable de neutraliser ce métabolite toxique en se liant à lui. En cas de surdosage, l'administration de N-acétylcystéine permet d'activer la synthèse du glutathion et de prévenir l'intoxication. L'excrétion du paracétamol est principalement rénale (90%).[12]

7.2.1.3 Propriétés antalgiques

Le paracétamol possède une activité antalgique et anti-inflammatoire plus faible que les AINS mais sa meilleure tolérance, notamment au niveau gastro-intestinal, en fait l'antalgique de référence dans toutes les classes d'âge. De plus, la faible liaison aux protéines plasmatiques limite les interactions médicamenteuses et permet donc de l'associer à de nombreuses autres molécules. Une combinaison avec des opioïdes ou des AINS permet de potentialiser l'effet antalgique du paracétamol.[136] Il est associé le plus souvent à des antalgiques de palier II tels que la codéine (Codoliprane®), le tramadol (Ixprim®) mais on le retrouve aussi combiné avec la caféine (Claradol cafeine®), qui augmente l'effet analgique.[143]

7.2.1.4 Conclusion

Le paracétamol est l'un des plus vieux antalgiques sur le marché, présentant peu d'effets indésirables et une bonne tolérance. Il est souvent associé à d'autres principes actifs, additionnant ainsi les effets anti-nociceptifs, car il présente peu de risque d'interactions médicamenteuses. Il paraît donc intéressant et judicieux de le combiner à une molécule activatrice de TREK-1.

7.2.2 Synthèse

Le paracétamol étant une pro-drogue, nous avons donc décidé de lier le noyau catéchol au 4-aminophénol, le métabolite actif du paracétamol (Figure 71).

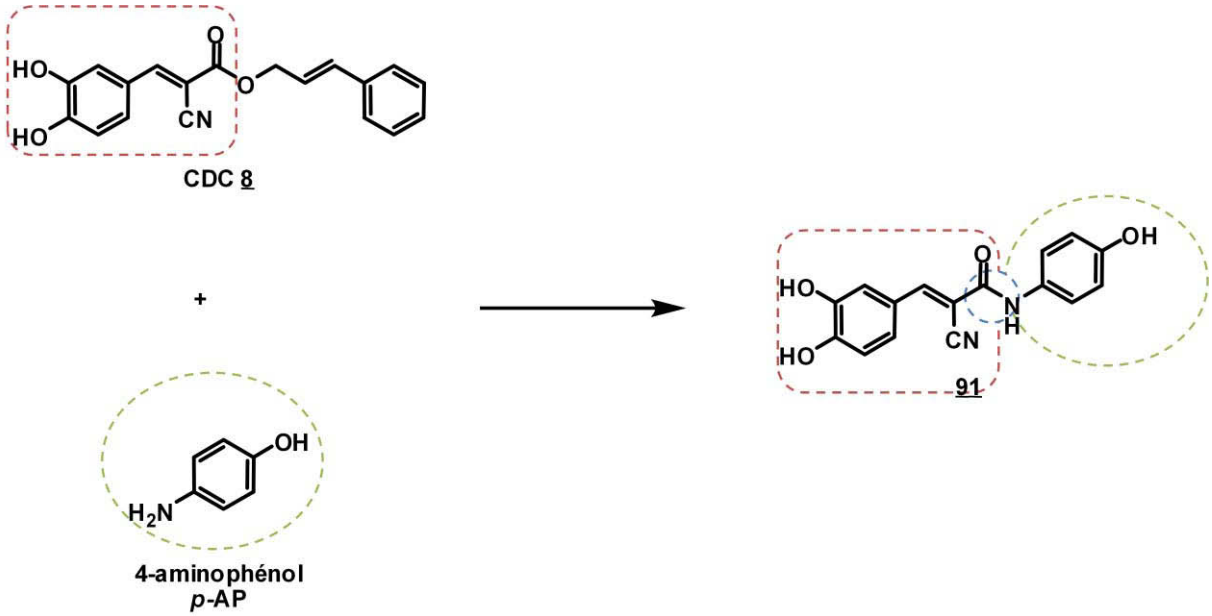


Figure 71 : *Bi-drug* avec le *p*-aminophénol

Comme lors des chapitres précédents, nous avons vérifié que cette « *bi-drug* » se plie aux règles de Lipinski et Veber (Tableau 47).

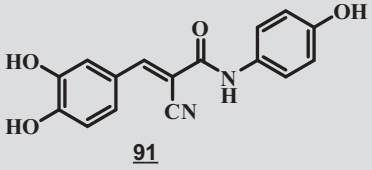
Molécule envisagée	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire (MW, $g.mol^{-1}$)	Nombre de liaisons H accepteurs	Nombre De liaisons H donneurs	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire ($Å^2$)
 91	296.282	6	4	1.742	3	113.574

Tableau 47: Propriétés *drug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

L'amide **91** sera obtenu par une réaction de Knoevenagel entre le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **17a** et l'amide **92**, lui-même issu d'un couplage entre l'acide cyanoacétique **14** et le 4-aminophénol **93** (Schéma 32).

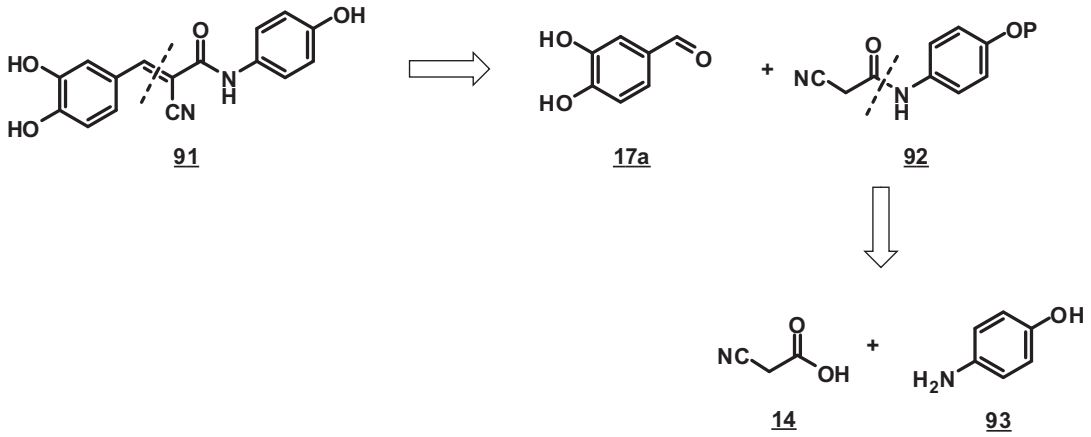


Schéma 32

Le 4-aminophénol **93** possédant deux fonctions susceptibles de réagir avec un acide, nous avons protégé l'alcool. Le choix du groupement protecteur s'est porté sur un éther silylé et plus particulièrement le groupement *t*-butyldiméthylsilyl (TBDMS). En effet, ce dernier est stable en milieu basique et peut-être clivé dans des conditions douces.

La voie d'obtention de l'amide **91** comporte quatre étapes (Schéma 33).

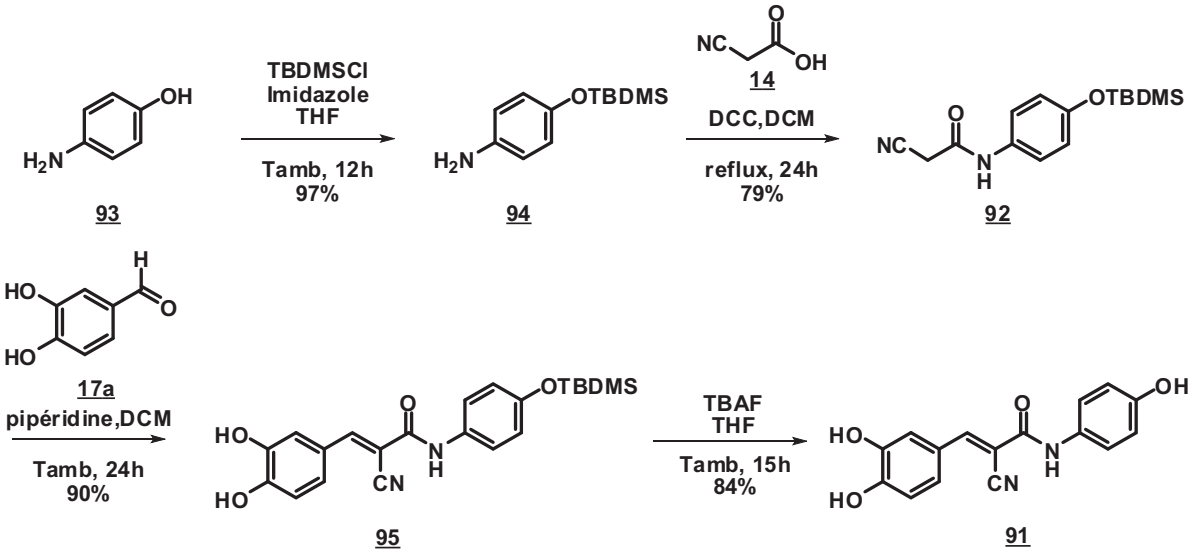


Schéma 33

La protection de la fonction alcool par le chlorure de *t*-butyldimethylsilyle se fait en présence d'imidazole dans le THF, avec un rendement quasiment quantitatif.[144] Ensuite, une réaction de couplage entre la phénylamine **94** et l'acide cyanoacétique **14** conduit à l'amide **92** avec un rendement de 79%.[145] Finalement, une réaction de Knoevenagel dans les conditions habituelles et une déprotection de l'éther silylé en présence de fluorure de tétra-*n*-butylammonium dans le THF[144] permet d'obtenir l'amide **91** avec un rendement global de 58%. Les produits ont été caractérisés par leurs données spectroscopiques.

7.2.3 Evaluation de l'activité pharmacologique

L'activité pharmacologique de l'amide **91** a été évaluée : test à l'acide acétique et test de la plaque chaude (*in vivo*), électrophysiologie sur cellules HEK-293 (*in vitro*).

Molécules	Tests *in vivo*		Test *in vitro*
N°	% d'inhibition de la douleur AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Cellules[c] (100 µM)
91	22.4%	0% / 13.9%	1.43 ± 0.16*
11	31.8%	25.1% / **63.2%**	1.50 ± 0.2*

Tableau 48 : Evaluation pharmacologique de la *bi-drug* 91
[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.
[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.
[c] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).
Test de Student : *** $p \leq 0.001$ ≤ ** $p \leq 0.01$ ≤* $p \leq 0.05$.

Les résultats aux différents tests sont très décevants. En effet, notre *bi-drug* présente une très faible activité antinociceptive lors du test à l'acide acétique (22.4%), comparable à celle de l'acide **11**. De plus, l'effet antalgique de l'acide **11** lors du test de la plaque chaude (25.1% / 63.2%) est totalement perdu chez l'amide **91** (0% / 13.9%). De même, il ne démontre aucune capacité à activer les canaux TREK-1 *in vitro* (R_{TREK} = 1.43 ± 0.16). Ce dernier résultat n'est pas très surprenant car l'acide **11** semble activer les canaux TREK-1 de manière indirecte (chapitre 6).

Malgré la présence de trois groupements hydroxyl (hydrophiles, devant faciliter la solubilisation), nous avons rencontré des problèmes lors de la préparation des solutions injectables. De plus, nous avons remarqué que les urines des souris étaient colorées (jaune, couleur caractéristique des dérivés de l'acide cinnamique) dès 10 minutes après l'injection, laissant penser à une élimination très rapide de notre molécule. Cette hypothèse se confirme lorsqu'on regarde l'évolution du nombre de crampes au cours du temps. En effet, on observe une action antalgique aux alentours de 10 minutes, qui diminue fortement ensuite.

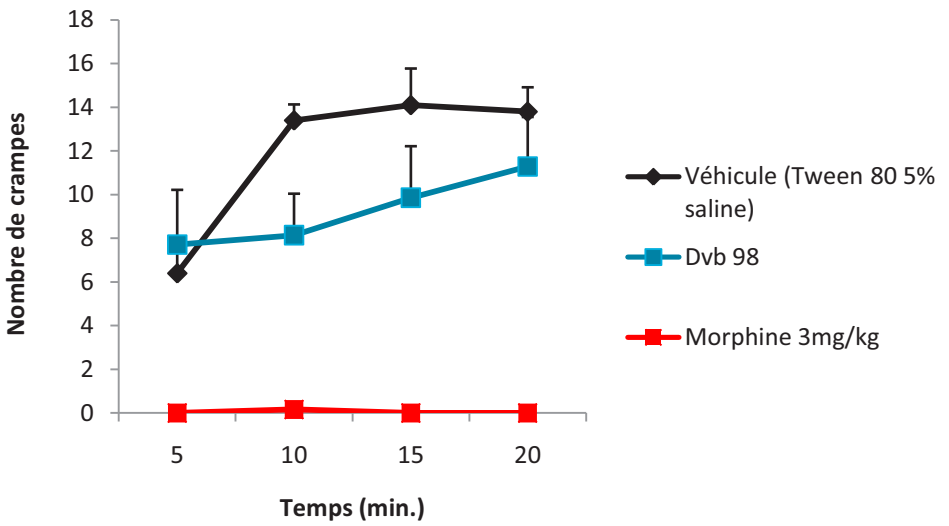


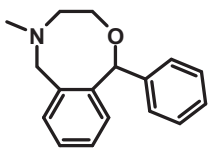
Figure 72 : Nombre de crampes au cours du temps pour l'amide 91

Il est possible que notre molécule, trop polaire, ait été excrétée trop rapidement pour que l'on observe un effet antalgique. Il pourrait être intéressant de remplacer les groupements hydoxyl par des acétates pour diminuer la polarité. De même, il pourrait être envisagé de remplacer le noyau catéchol par un autre noyau aromatique plus performant, tel que le furane. Par ailleurs, une étude de stabilité métabolique (cf chapitre 5) pourrait nous permettre d'évaluer le temps de demi-vie de ce composé.

7.3 *Bi-drug* avec le Néfopam

7.3.1 Choix du Néfopam

Le Néfopam (Figure 73), commercialisé par les laboratoires BIOCODEX sous le nom Acupan®, est un analgésique non opioïde de palier I, bien que sa puissance analgésique soit au moins équivalente à un antalgique de palier II.

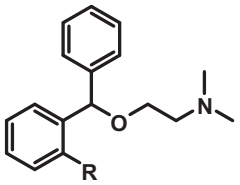


5-méthyl-1phényl-3,4,5,6-tétrahydro 1H-2,5-benzoxazocine

Figure 73 : Néfopam

Chimiquement, le néfopam appartient à la famille des benzoxazocines et peut-être relié structurellement à l'orphénadrine (médicament antiparkinson/ anticholinérgique, antagoniste des récepteurs muscariniques et H_1, bloqueur des canaux sodiques $Na_v1.7$, 1.8, 1.9

et des canaux potassiques hERG) ou à la diphenhydramine (antihistaminique, agoniste inverse du récepteur H_1). Cependant, il ne présente aucune activité commune avec ces deux molécules.



R = CH_3 **diphenhydramine**
R = H **orphénadrine**

Figure 74

Utilisé à partir des années 1970, il connait un regain d'intérêt grâce à l'existence d'un puissant effet analgésique associé à l'absence de dépression respiratoire ou d'effet sur l'hémostase.

7.3.1.1 Mécanisme d'action

L'activité antalgique du néfopam a été démontrée sur la plupart des modèles de douleur animale mais son mécanisme d'action n'a pas été clairement identifié. Cependant, on suppose qu'il s'agit d'un analgésique central, agissant au niveau spinal et supra-spinal. Son effet s'exercerait principalement sur les voies sérotoninergiques descendantes où il inhiberait la recapture des monoamines telles que la sérotonine et la noradrénaline.[146] En effet, la déplétion de la synthèse de sérotonine dans tous les systèmes sérotoninergiques au moyen d'un prétraitement par la parachlorophénylalanine (PCPA) diminue l'action anti-nociceptive du néfopam. En revanche, la lésion sélective des voies sérotoninergiques ascendantes avec la parachloroamphétamine (PCA) ne modifie pas l'activité du néfopam. Les effets analgésiques dépendent donc, au moins en partie, de l'activation des voies sérotoninergiques descendantes.[147] Des études plus récentes ont montré que l'activation des voies adrénergique, sérotoninergique et dopaminergique via les récepteurs adrénergiques α_1 et α_2, les récepteurs dopaminergiques D_2, et les récepteurs à la sérotonine 5-HT_{1B} et 5-HT_{2C} pouvait intervenir dans le mécanisme du néfopam.[148]

Plus récemment, un effet du néfopam sur les canaux sodiques à voltage dépendant[149] a été mis en évidence, modulant ainsi indirectement la libération de glutamate qui est également un élément important dans la transmission de la nociception.

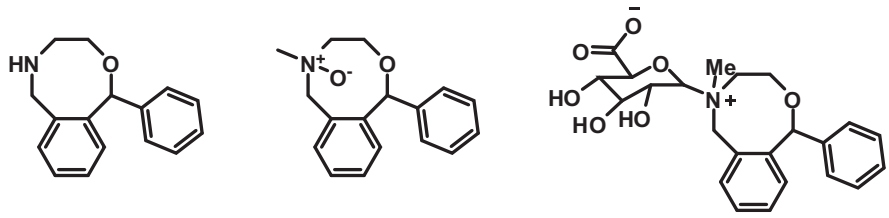
L'activité analgésique du néfopam ne s'effectue pas par l'intermédiaire des récepteurs opioïdes. Lors du test de la plaque chaude, l'activité du néfopam, administré par voie intrapéritonéale ou intracérébroventriculaire, n'est pas modifiée par l'injection de naloxone,

principal antagonsite des récepteurs morphiniques.[150] Son activité n'est pas non plus liée à la biosynthèse des prostaglandines, contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

7.3.1.2 Propriétés pharmacocinétiques

Le néfopam correspond au mélange racémique des deux énantiomères bien que des études aient démontré que l'énantiomère (+) soit le plus actif.[151,152] Ces énantiomères peuvent être résolus simplement par recristallisation sélective à partir de sels de diastéréoisomères (agent de résolution : acide *O,O*-dibenzoyl-L-tartrique).[153]

La biotransformation est importante et trois métabolites majeurs ont été identifiés: le déméthyl-néfopam (DMN ou *nor*-nefopam), le *N*-oxyde-néfopam et le *N*-glucuronide-néfopam (Figure 75).



DMN **N-oxyde-néfopam** **N-glucoronide-néfopam**

Figure 75 : Métabolites du néfopam

Lorsque le néfopam est administré par voie veineuse (IV), les métabolites sont inactifs. En revanche, par voie orale, le déméthyl-néfopam contribue probablement à l'effet antalgique. Le néfopam et son principal métabolite DMN peuvent être quantifiés dans le plasma grâce à une technique couplée LC-MS-MS.[154]

L'élimination est essentiellement urinaire: 87% de la dose administrée sont retrouvés dans les urines. Moins de 5% de la dose sont excrétés sous forme inchangée; les métabolites identifiés dans les urines représentent respectivement 6%, 3%, et 36% de la dose administrée par voie IV.

Une étude portant sur le mécanisme de dégradation du néfopam en solution dans des conditions de stress[155] a permis d'établir que la molécule est relativement stable bien qu'elle soit plus sensible aux conditions acides que basiques ($t_{1/2}$ (120°C, 0.5M HCl) = 15.6 h contre $t_{1/2}$ (120°C, 0.5M NaOH) = 339.7 h).

7.3.1.3 Propriétés antalgiques

L'absence d'effet sur la fonction respiratoire ainsi que sur l'hémostase procure un indéniable avantage au néfopam pour l'analgésie postopératoire. Le néfopam ne provoque pas d'accoutumance, de dépendance ou de phénomène de sevrage et son utilisation prolongée n'est pas suivie d'un épuisement de son activité antalgique. Les manifestations de surdosage sont de type atropinique avec troubles neurologiques (convulsion, hallucination) et troubles du rythme cardiaque. Les principaux effets indésirables sont les sueurs et les nausées accompagnées ou non de vomissements.[156] Ceux-ci sont moindres lors d'une injection intramusculaire et peuvent être nettement réduits lors d'une administration intraveineuse si la perfusion est lente ou effectuée de manière continue.[156]

Le néfopam est surtout utilisé en chirurgie post-opératoire (douleur aigüe). Il peut être administré seul ou dans le cadre d'une analgésie balancée, associé à la morphine ou à des AINS.
Combiné à la morphine, le néfopam augmente l'effet analgésique de celle-ci tout en diminuant les doses prescrites.[157] La fréquence des nausées et/ou vomissements n'est pas plus importante. Ceci permet d'offrir à un plus grand nombre de patients une bonne analgésie post-opératoire sans augmenter les risques dus aux effets indésirables des opioïdes.
De même, une étude a montré qu'une co-administration du néfopam avec le ketoprofène (AINS) permet d'augmenter l'efficacité analgésique tout en réduisant les effets indésirables.[158]

D'autres études ont mis en évidence la capacité du néfopam de prévenir ou de stopper les frissons postopératoires. Ainsi, une administration préventive de néfopam (0,15 mg/kg) lors de la réalisation de blocs centraux en chirurgie orthopédique permet de réduire significativement la fréquence de survenue des frissons.[159] L'étude chez le volontaire sain montre qu'il agit sur les frissons par le biais de la thermorégulation en abaissant la température seuil. Le mécanisme d'action est probablement en relation avec l'effet inhibiteur de la recapture de la noradrénaline.

7.3.1.4 Conclusion

Le néfopam constitue, en administration intramusculaire, une réponse très intéressante pour obtenir une sédation rapide de douleurs aiguës intenses. En raison de ses caractéristiques (puissance analgésique, court délai d'action et facilité d'utilisation), il convient de le considérer comme un antalgique de première intention. Une autre propriété du néfopam est son effet inhibiteur sur les frissons postopératoires.

Son absence d'effets opioïdes permet de l'associer à d'autres antalgiques appartenant à d'autres classes afin de rechercher des synergies. Il parait donc intéressant d'envisager une combinaison avec notre activateur de TREK-1.

7.3.2 Synthèse

7.3.2.1 Molécule cible

La première combinaison que nous avons envisagée associe une partie CDC avec le *nor*-néfopam grâce à une liaison amide.

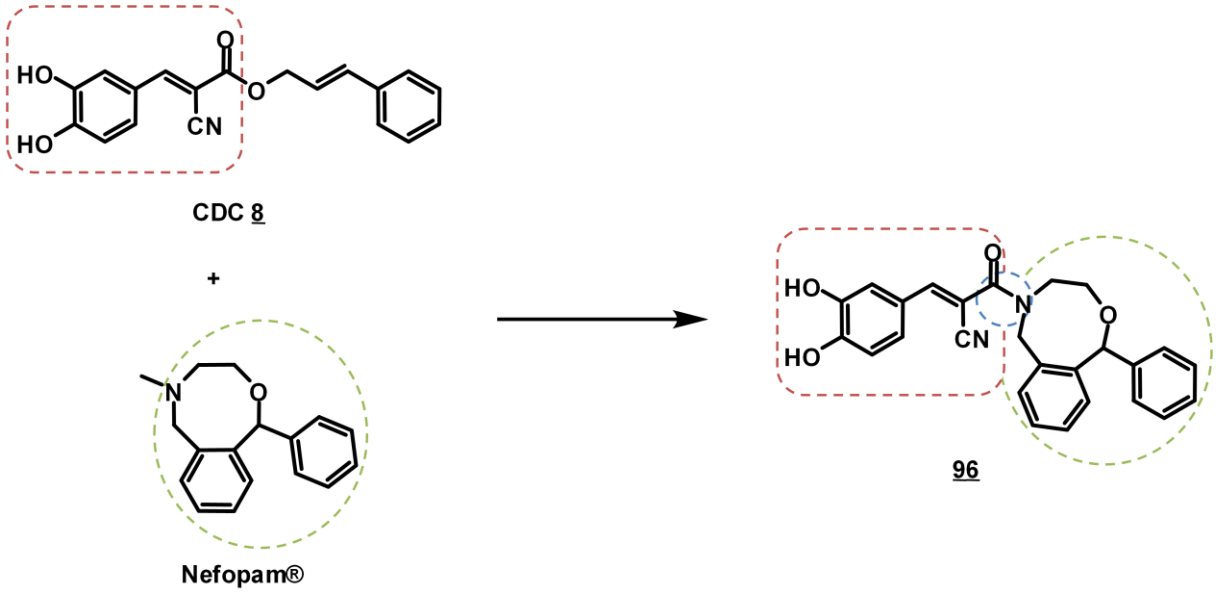


Figure 76 : Stratégie de combinaison du CDC et du Néfopam®

Afin de mimer la réactivité, nous avons d'abord réalisé une synthèse modèle avec la morpholine.

Nous avons préalablement vérifié que notre « *bi-drug* » respectait les règles de Lipinski et Veber (Tableau 49).

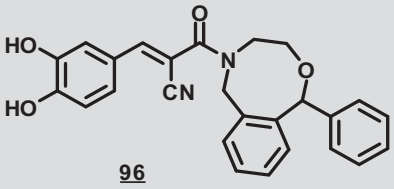
Molécule Envisagée	Règles de Lipinski[104]				Règles de Veber[105]	
	Poids moléculaire (MW, g.mol^{-1})	Nombre de liaisons H accepteurs	Nombre De liaisons H donneurs	clogP	Nombre de liaisons rotatoires	Surface polaire (Å²)
 **96**	426.472	6	2	3.517	3	93.791

Tableau 49 : Propriétés *drug-like* des nouveaux analogues déterminées à l'aide du logiciel molinspiration[108]

7.3.2.2 Synthèse à partir de la morpholine

Dans un premier temps, nous allons mettre au point les conditions expérimentales permettant d'obtenir l'amide **96**. Pour cela, nous allons mimer la réactivité du *nor*-nefopam en utilisant la morpholine (Schéma 34). Le composé **97** sera obtenu par réaction de Knoevenagel entre le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **17a** et l'amide **98**, lui-même issu d'un couplage entre l'acide cyanoacétique **14** et la morpholine **99**.

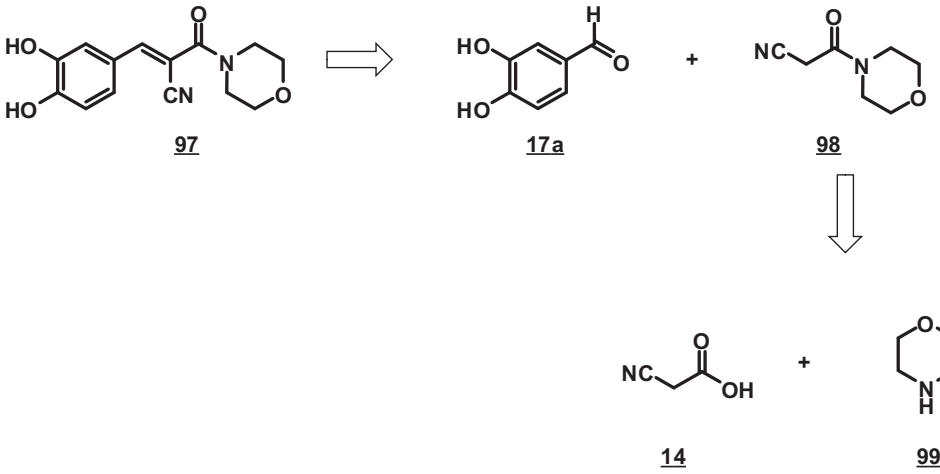
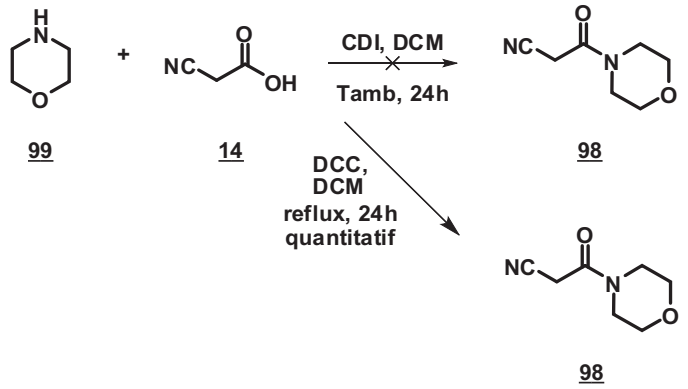


Schéma 34 : Rétrosynthèse de l'amide 96

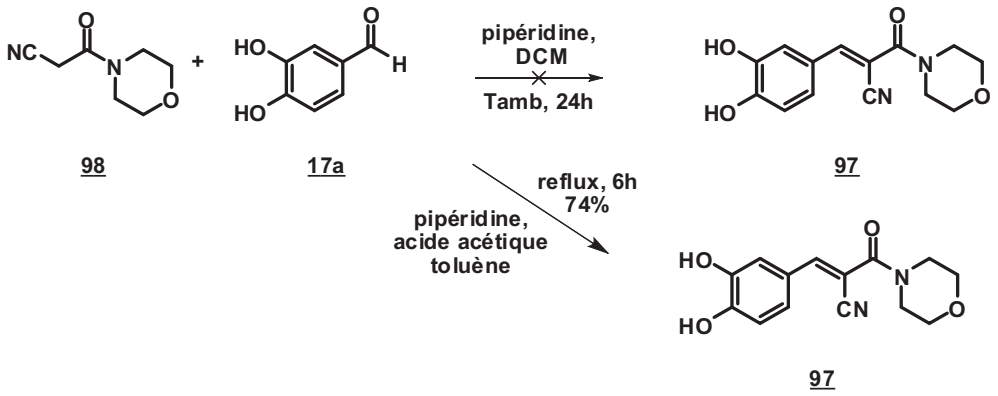
Une première tentative de couplage entre **14** et **99** en présence de CDI dans le dichlorométhane n'a pas donné le produit attendu (Schéma 35). En utilisant un autre agent de couplage, le DCC,[145] on obtient l'amide **98** avec un rendement quantitatif. Sur le spectre RMN ^{1}H, la présence du singulet à 3.5 ppm intégrant pour deux hydrogènes correspondant au CH_2 en alpha du nitrile permet de confirmer l'obtention du produit.



99 14 98 98

Schéma 35

Ensuite, une réaction de Knoevenagel a été lancée, suivant les conditions habituelles (pipéridine, DCM). Cependant, aucun produit n'a été formé (Schéma 36). Nous avons alors effectué une nouvelle tentative en présence d'acide acétique et de pipéridine en quantité catalytique (Schéma 36).[145] Le produit **97**, obtenu avec un rendement global de 73%, a été caractérisé par ses données spectroscopiques (apparition du signal correspondant au proton éthylénique).



98 17a 97 97

Schéma 36

Il semble donc possible de synthétiser une *bi-drug* en formant une liaison amide entre le *nor*-néfopam et le dérivé du CDC.

7.3.2.3 Synthèse de la *bi-drug*

L'amide **96** sera obtenu en 6 étapes à partir de l'acide 2-benzoylbenzoique **105**, selon les conditions développées avec la morpholine (Schéma 37).

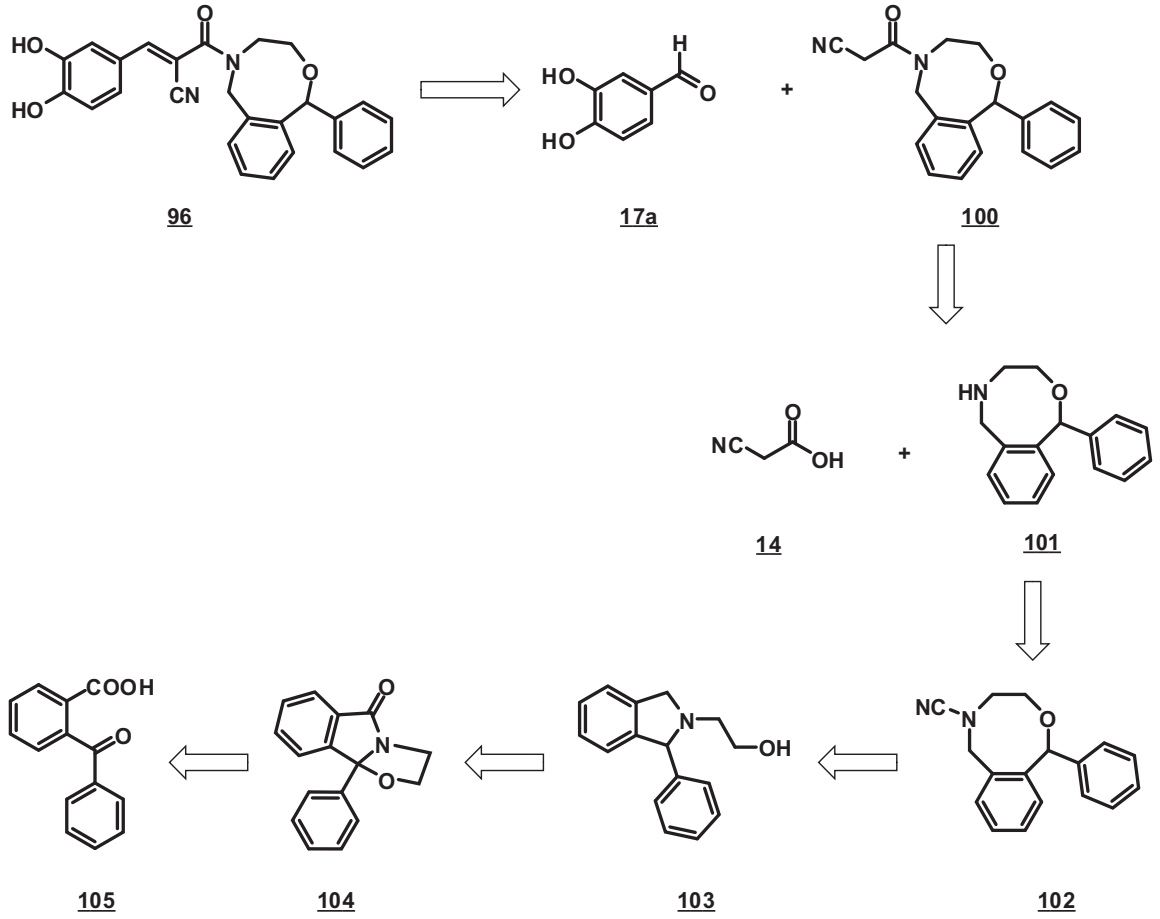


Schéma 37 : Rétrosynthèse de l'amide 93

Le *nor*-nefopam **101** peut être obtenu en quatre étapes à partir de l'acide 2-benzoylbenzoique **105** (Schéma 38) selon protocole décrit par Bremner *et al.*[160]

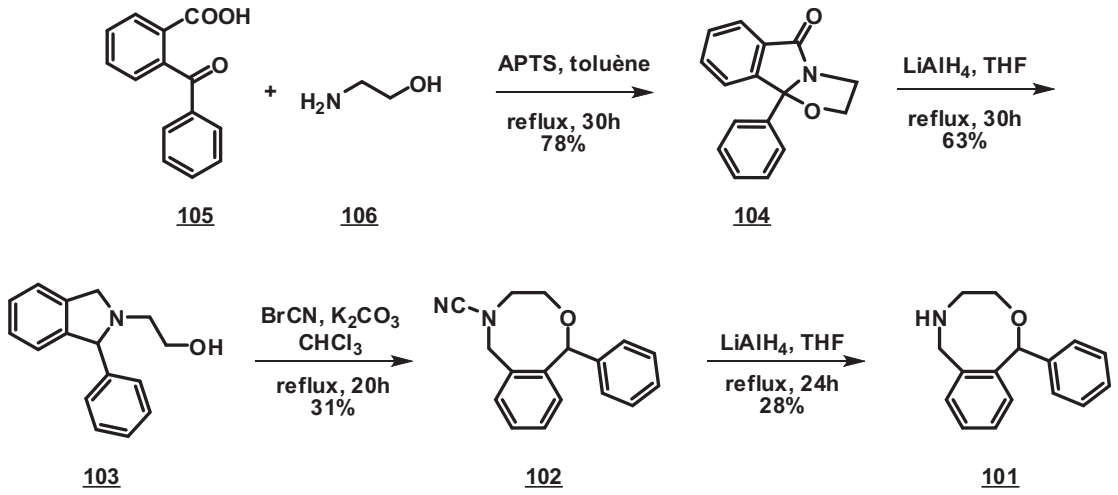


Schéma 38

La première étape de la synthèse consiste en une amidation entre l'éthanolamine **106** et l'acide **105**, en présence d'acide *p*–toluènesulfonique qui permet d'obtenir le composé cyclique **104** avec un rendement de 78%. Le mécanisme de cette réaction, proposé par Aeberli *et al*.,[161] s'appuie sur celui de la formation d'oxazolidines par réaction entre un aminoalcool (1,2- ou 1,3-) et un aldéhyde ou une cétone, *via* l'intermédiaire base de Schiff (Schéma 39).

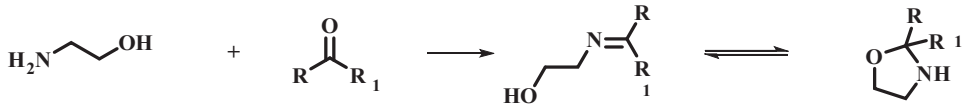


Schéma 39 : Formation d'oxazolidine[161]

Ainsi, Aeberli suggère que le même mécanisme s'applique lors de la réaction entre un aminoalcool et un aldéhyde acide ou un cétoacide. On observe donc tout d'abord la formation du cycle oxazolidine, suivie de la formation de l'amide, par réaction entre l'amine et l'acide. On peut par ailleurs supposer que la première réaction intervenant est une réaction acide-base entre l'éthanolamine et la fonction acide, permettant ainsi la cyclisation de l'oxazolidine et confirmant que l'amide est formé en dernier.

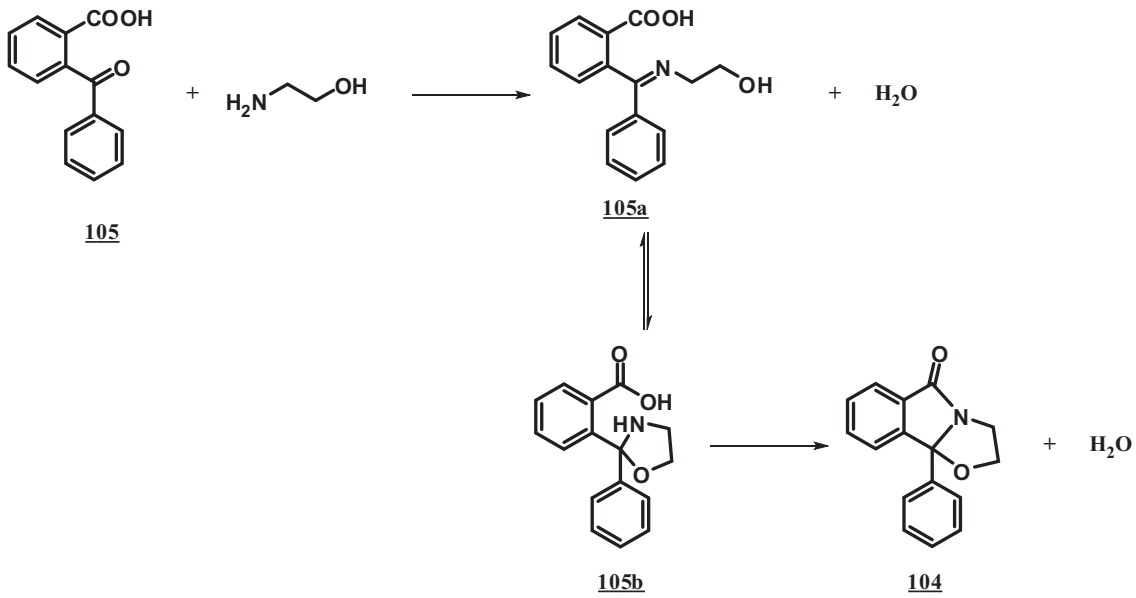


Schéma 40 : Mécanisme de formation de l'amide 104[161]

Ensuite, la réduction de la fonction amide en amine, en présence d'un excès de tétrahydruroaluminate de lithium, entraine l'ouverture du cycle oxazolidine pour conduire à l'alcool **103**.[162]

Puis, nous réalisons une étape de cyclisation en présence de bromure de cyanogène pour donner le nitrile **102** (Schéma 41). La réaction entre le bromure de cyanogène et une amine tertiaire entraînerait la formation de l'ammonium **103a**, selon Fodor *et al.*[163] Ensuite, le groupement quaternaire se réarrangerait pour donner le carbocation le plus stable **103b**.[160] Finalement, l'attaque nucléophile du groupement hydroxyl permettrait la fermeture du cycle.

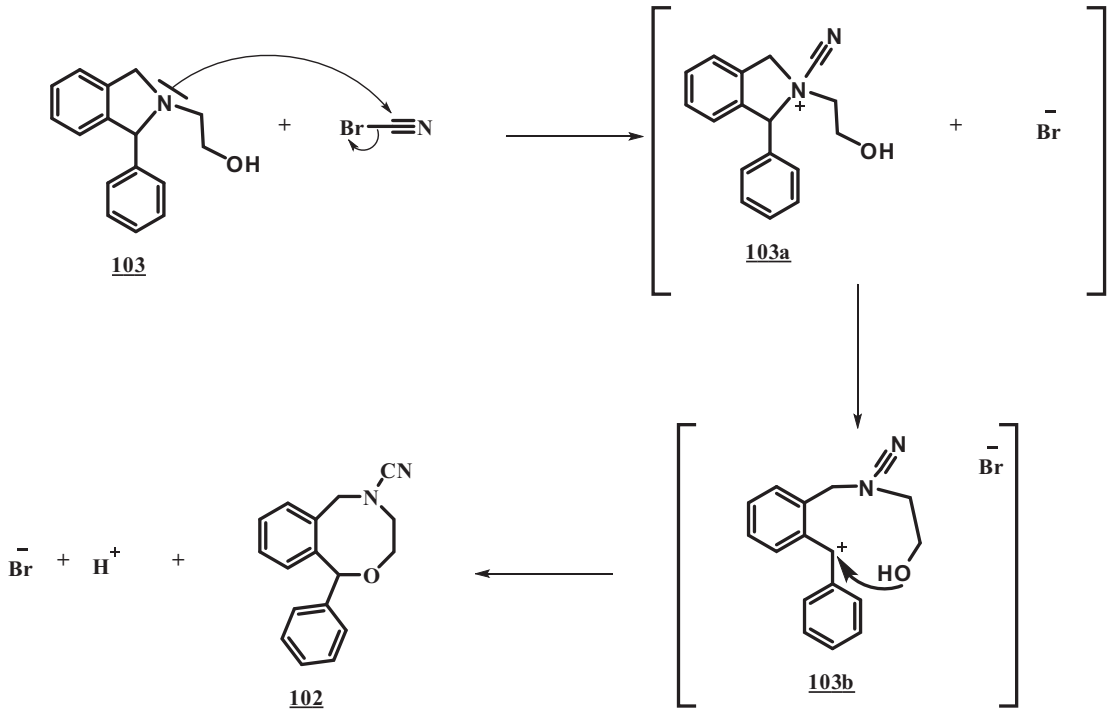


Schéma 41 : formation du cycle benzoxazocine[160]

Une dernière étape de réduction en présence de $LiAlH_4$[164] permet de cliver le groupement nitrile et d'obtenir le *nor*-nefopam **101**. Tous les produits sont caractérisés par leurs données spectroscopiques.

Malheureusement, la première tentative d'amidation, dans les conditions testées sur la morpholine, n'a pas fonctionné (Schéma 42).

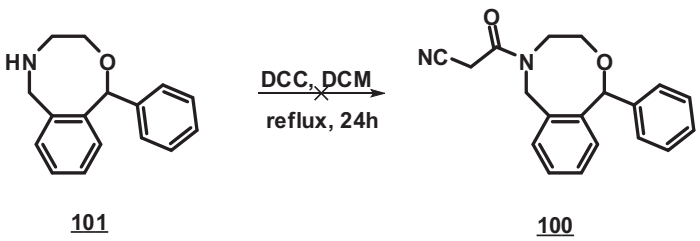


Schéma 42

Nous allons tenter d'activer l'acide en formant un chlorure d'acyle (PCl_5, conditions utilisées pour la formation de l'ester fluoré **48**[115]). En parallèle, nous essaierons une tentative de couplage en présence de DBU.[165]

7.3.3 Evaluation pharmacologique

Bien que la « *bi-drug* » avec le néfopam n'ait pas pu être obtenue, nous avons tout de même réalisé l'évaluation pharmacologique de la molécule modèle **97**. En effet, le groupement morpholine devrait favoriser la biodisponibilité.

Molécules	Tests *in vivo*			Test *in vitro*
N°	% d'inhibition de la douleur AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Formol I/IIb (60 mg/kg)[c]	Cellules[d] (100 µM) R_{TREK}
11	31.8%	25.1% / **63.2%**	44% / 89% (250 mg/kg)	1.50 ± 0.2*
97	40.0%**	28.9%* / 16.1%	21% / 5%	**3.80 ± 0.86*** **

Tableau 50 : Evaluation pharmacologique de la morpholine 97

[a] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (10 mg/kg, IP) au cours du test à l'acide acétique.

[b] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) au cours du test de la plaque chaude.

[c] Activité antinociceptive (% d'inhibition de la douleur) des composés (60 mg/kg, IP) lors de la première (0–10 min) et deuxième (10-45 min) phase du test au formol.

[d] Effet des composés sur les courants TREK-1 exprimés par des cellules HEK-293 et mesurés par la technique du patch-clamp avec cellule entière (whole cell clamp).

Test de Student : *** $p \leq 0.001 \leq$ ** $p \leq 0.01 \leq$* $p \leq 0.05$.

L'amide **97** ne présente pas d'effet antalgique très marqué, quelque soit le test *in vivo.* En revanche, il se révèle capable d'activer les canaux TREK-1 *in vitro* à une concentration de 100 µM (2.5 fois meilleur que l'acide **11**). Il serait donc classé dans la catégorie B, regroupant les molécules activatrices de TREK-1 *in vitro* mais sans effet antalgique. Cependant, il reste moins efficace que les autres composés du groupe B ($4.01 < R < 6.09$ à 20 µM). En analysant ses propriétés (Tableau 51), on remarque que le volume moléculaire est peut-être trop faible pour une interaction optimale avec le site.

N°	Noyau aromatique	LogP	Volume (Å ^{3})	Surface polaire Å²
97	Catéchol	0.615	241.472	93.791

Tableau 51 : Propriétés de l'amide 97[108]

7.4 Conclusion

La synthèse de la *bi-drug p*-aminophénol-acide **11** est réalisée sans encombre, en 4 étapes avec un rendement global de 58%. Malheureusement, l'évaluation pharmacologique se révèle décevante : L'activité *in vivo* caractéristique de l'acide **11**, lors du test de la plaque chaude, est totalement perdue. De même, on n'observe aucun effet antalgique lors du test à l'acide acétique. Il pourrait être pertinent de coupler le *p*-aminophénol à d'autres noyaux aromatiques plus actifs décrits précédemment (furane, indole) afin de conclure sur l'intérêt d'une association paracétamol—activateur de TREK-1.

Concernant la *bi-drug* néfopam-acide **11**, la synthèse s'est avérée moins aisée qu'attendu. Nous avons pu obtenir le *nor*-nefopam, en 4 étapes avec un rendement global de 4%. Cependant, l'étape de couplage avec l'acide cyanoacétique **14** reste à mettre au point. Faute de pouvoir tester la *bi-drug*, nous avons pu effectuer l'évaluation pharmacologique d'une molécule « modèle » **97** nous ayant permis de mettre au point des conditions pour la dernière étape de la synthèse (réaction de Knoevenagel en milieu acide). Cet amide semble capable d'activer les canaux TREK-1 *in vitro* mais ne présente pas d'activité antalgique notable *in vivo*. Là encore, une fois la *bi-drug* obtenue, il pourrait être intéressant de coupler le néfopam avec d'autres noyaux aromatiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

8.1 Conclusion générale

La douleur, motif de deux consultations médicales sur trois, représente un enjeu majeur de santé publique. Bien que des progrès considérables aient été réalisés dans la prise en charge de la douleur (échelle de douleur numérique ou autre, méthodes non médicamenteuse telles que l'acuponcture ou l'hypnose, création de centre antidouleur), il existe un réel besoin d'innovation en terme de médicaments. En effet, la plupart des antalgiques prescrits de nos jours ont été découverts, pour les plus récents, dans les années 1950-1960. De plus, la prise de ses molécules s'accompagne d'effets indésirables non négligeables. Il est donc urgent de proposer de nouveaux antalgiques ayant une meilleure efficacité et tolérabilité ; le but ultime étant d'obtenir une molécule aussi efficace que la morphine mais ne présentant pas les effets indésirables liés aux opioïdes. Pour cela, les chercheurs tentent d'identifier de nouvelles cibles, parmi lesquelles on retrouve les canaux ioniques. Faisant l'objet de nombreuses études, ils semblent prometteurs dans le traitement de la douleur mais aussi dans d'autres domaines variés tels que l'épilepsie, la dépression ou encore l'hypertension.

Des travaux réalisés par les équipes du Pr Ladzdunski et du Dr Lesage (IPMC, UMR 6097) et du Pr Eschalier et du Dr Busserolles (Neuro-Dol, UMR 1107) ont démontré l'implication des canaux potassiques TREK-1 dans l'effet antalgique de la morphine alors qu'ils ne participent pas aux effets indésirables.[79] L'utilisation d'activateurs des canaux potassiques K_{2P} en général a d'ailleurs fait l'objet d'un brevet.[166] Ces découvertes nous ont incités à axer la recherche des nouveaux antalgiques sur le développement d'activateurs des canaux TREK-1.

Les premiers travaux ont permis l'identification de quatre structures « tête de série » : le CDC **8**, et les acides avec un noyau catéchol **11**, furane **12** et indole **13**, ainsi que le début d'une étude de relation structure-activité.[89] A partir de ces résultats, nous avons entamé l'optimisation des composés « tête de série » et ainsi continué l'étude SAR. Trente-huit composés ont été préparés et évalués *in vivo* et *in vitro* : quinze esters (**18b-c**, **24-27** et **36-43**) analogues des acides **11**, **12** et **13**, huit analogues (**45-47**, **54-56** et **58-59**) isostères des esters précédents, dix esters (**73-78**, **80-81** et **83-84**) portant des noyaux aromatiques différents ainsi que deux *bi-drug* (**91** et **97**). Nous avons d'ailleurs développé et validé une nouvelle stratégie de criblage, afin d'affiner la sélection des molécules : test de l'acide acétique (stimulus chimique), test de la plaque chaude (stimulus thermique) et électrophysiologie sur cellules

HEK-293 surexprimant TREK-1, plus adaptée et plus sensible que les ovocytes. Ces nouveaux analogues ont été classés en quatre groupes selon leurs résultats aux tests précédents (Tableau 52).

	***In vivo* +**	***In vivo* -**
***In vitro* +**	Groupe A **12**, **25**, **42**, **55** et **59**	Groupe B **18b-c**, **26**, **40-41**, **97**
***In vitro* -**	Groupe C **11**,**13**, **37-38**, **45-47**, **54**, **56**, **58**, **73-75**, **77-78**, **80-81**, **84**	Groupe D **18a**, **24**, **27**, **36**, **39**, **43**, **76**, **83**, **91**

Tableau 52 : Classement des 38 analogues en fonction de leurs activités *in vivo* et *in vitro*

En considérant les molécules les plus intéressantes (groupe A), on peut distinguer deux profils, nous conduisant à émettre l'hypothèse de l'existence de deux orientations spatiales possibles dans le site d'interaction :

- Une orientation 1 nécessitant la présence d'un noyau aromatique HBD (indole, catéchol), d'une fonction acceptant les liaisons hydrogène et d'un volume moléculaire voisin de 260 $Å^3$.
- Une orientation 2 nécessitant la présence d'un noyau aromatique HBA (furane), d'une fonction possédant des hydrogènes capables de former des liaisons hydrogène et d'un volume moléculaire inférieur à 220 $Å^3$.

Ces critères s'appliquent aussi aux molécules appartenant à la catégorie B. Il semblerait donc que la nature des esters (orientation spatiale, encombrement stérique) soit importante pour l'activité antalgique. Ainsi le groupement *t*butyl ne serait pas favorable, contrairement au groupement phényl. Les molécules du groupe C_2 possèderaient quant à elles des volumes moléculaires trop faibles ou trop importants selon le sens d'interaction privilégié (fonction de la nature du noyau aromatique) ce qui pourrait expliquer qu'elles activent le canal TREK-1 par le biais d'un autre système.

Nous avons par ailleurs complété l'évaluation pharmacologique des composés intéressants (groupes A, B, C). En effet, un autre modèle de douleur a été testé chez les rats : le test à la carraghénine. Nous avons ainsi pu constater que certaines molécules sont aussi efficaces sur les douleurs inflammatoires. De plus, des tests sur souris invalidées pour le gène TREK-1 nous ont permis de valider le concept activateur de TREK-1/antalgique et nous ont permis de nous rendre compte que certains composés activent le canal indirectement. A l'aide de souris KO pour le gène codant pour le récepteur métabotropique $mGluR_4$, nous avons pu observer que cette activation indirecte semble impliquer ce récepteur pour l'acide **13**. Enfin,

l'utilisation de souris KO pour le canal TREK-2 nous a permis de vérifier que ce canal n'était pas impliqué dans le mécanisme *in vivo* des acides « tête de série » **12** et **13**.

En plus des courbes I-V servant à déterminer le coefficient d'activation des canaux TREK-1en électrophysiologie, des courbes effet-dose ont été réalisées, nous permettant d'obtenir des valeurs de concentration efficaces médianes EC_{50}. Les valeurs obtenues pour nos analogues, de l'ordre de la dizaine de micromoles, sont très encourageantes.

Les molécules les plus prometteuses sont rassemblées dans le Tableau 53.

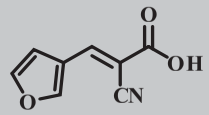
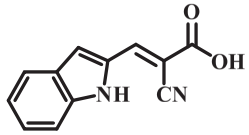
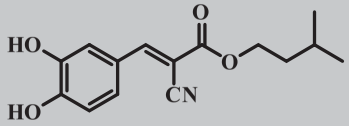
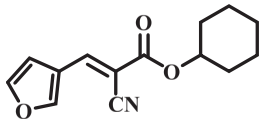
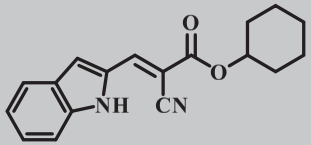
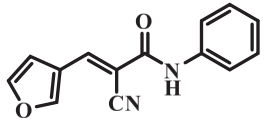
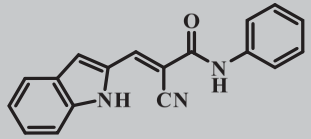
	Structures	EC_{50} (µM)	AcOH[a] 10mg/kg	Plaque chaude[b] 60 mg/kg (30/45min)	Activation due à TREK-1	Activation due à $mGluR_4$	Test à la carraghénine
12		49	30.7%	56.4%* / 119.5%***	35.6% / 19.4%	17.3% / 10.7%	9525
13		NC	25.8%	52.8%* / 63.4%*	100% / 56.6%	98.8% / 75.8%	6969
25		13	27.2%	20.3% / 87.5%*	En cours	NC	NC
38		NC	91.2%***	18.4% / 96.7%***	9.6% / 31.3%	En cous	3184
42		NS	83.6%***	65.7% / 52.6%*	68.1% / 0%	En cours	4749
55		En cours	48%*	107.7%*** / 148.6%**	En cours	NC	2060
59		En cours	52%*	49.5%* / 49.5%*	En cours	NC	2049

Tableau 53 : Récapitulatif des molécules les plus prometteuses

8.2 Perspectives

En termes d'optimisation du profil pharmacologique, il reste encore des pistes à explorer. Les modifications portant sur le noyau aromatique ne nous ayant pas permis de découvrir un cycle aromatique plus intéressant, il peut être envisagé de substituer les noyaux furane et indole. Ainsi, l'ajout d'une chaine hydrophobe au noyau furane, en position 4 et/ou 5 pourrait peut-être améliorer l'interaction avec la poche S_3 (Figure 77, **B**). On peut aussi envisager d'utiliser un noyau benzofurane. Concernant les analogues privilégiant l'orientation 1, on peut remplacer le noyau aromatique **B** par un autre noyau : thiophène, naphtalène…(Figure 77,**A**).

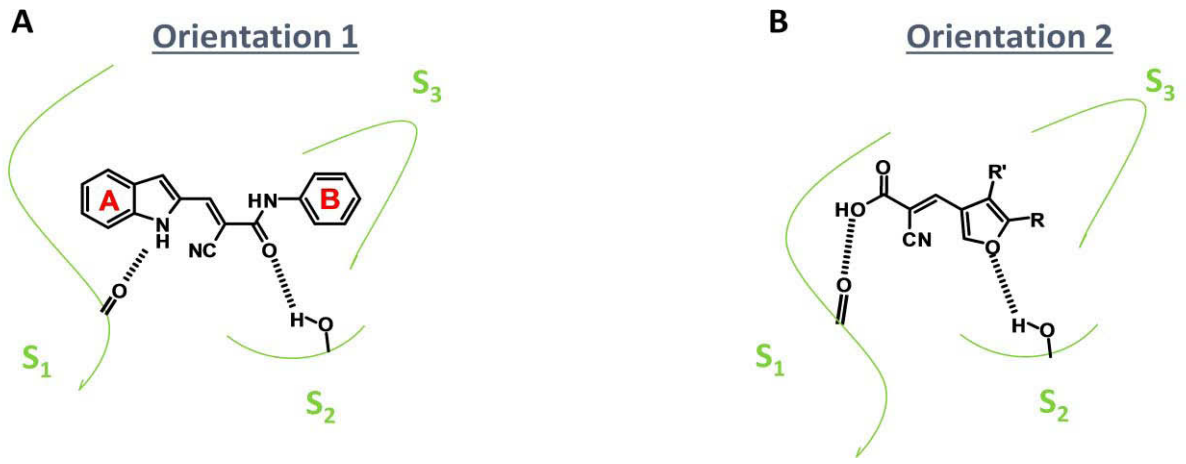


Figure 77 : Perspectives

Concernant l'évaluation pharmacologique, des tests sur souris TREK-$1^{-/-}$ auront lieu prochainement pour cinq molécules des groupes A et B (prouver l'implication *in vivo* du canal TREK-1) et quatre molécules du groupe C (afin de déterminer s'il y a une activation indirecte du canal ou aucune implication). Ensuite, des tests sur souris mGluR$_4^{-/-}$ nous permettront d'émettre une hypothèse sur l'implication du récepteur métabotropique dans l'activation indirecte du canal TREK-1.

Suite aux tests à la carraghénine, trois molécules devront être sélectionnées pour subir un « Algogram », en partenariat avec ANSBiotech. Pour les deux amides n'ayant pas donné de résultats probants chez le rat, il pourra être envisagé d'essayer d'autres modèles de douleur tels que la douleur neuropathique ou viscérale.

Au niveau des tests *in vitro*, il nous reste à vérifier la sélectivité des meilleurs composés (**12**, **25**, **55**) vis-à-vis des canaux TREK-2 / TRAAK / TASK. Ces résultats devraient être connus prochainement.

Ensuite, nous envisagerons d'utiliser les protéines chimères (comportant des mutations localisées par rapport à la protéine native) mises au point par l'équipe du Dr Lesage afin de déterminer quels résidus de la protéine sont importants pour l'activation du canal et ainsi identifier le site d'interaction de nos molécules. La connaissance de ce site pourrait alors nous permettre de réaliser une étude de docking dans le site actif et ainsi de nous aider à comprendre l'influence des modifications structurales sur l'activité.

Des études visant à étudier la cardiotoxicité de nos composés (menées sur les canaux potassiques hERG : human *Ether-à-go-go*-Related Gene) devraient aussi avoir lieu.

Finalement, une collaboration avec l'équipe du Dr Goudet à Montpellier pourrait nous permettre de valider l'hypothèse de l'implication des récepteurs métabotropiques $mGluR_4$ dans le mécanisme d'activation indirect du canal TREK-1.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 9 PARTIE EXPERIMENTALE

La partie expérimentale est rédigée en anglais pour faciliter la rédaction des futures publications.

General remarks:

Solvents were distilled prior to use. Other reagents were used as received. Producst in organic solutions were dried over anhydrous sodium sulphate prior to evaporation of the solvent under reduced pressure.

Thin layer chromatography were performed on pre-coated aluminium backed silica plates Kieselgel 60 F254 (Merk) or glass backed silica Duracil 25 UV 254 (Macherreynagel). Spots were visualized using UV light (254 nm) before using an ethanolic solution of phosphomolybdic acid (heating).

Purifications by column chromatography were carried out on silica gel (70-230 mesh) or on C18 (30µm).

Melting points were measured by a Reichert plate-heating microscope.

^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Brücker Avance 400 spectrometer at 400.13 and 100.61 MHz respectively. Chemical shifts δ are reported in ppm relative to solvent residual signal (^{1}H, ^{13}C). The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz). The abbreviations used for signal descriptions are as follows:

-s: singlet
-bs: broad singlet
-d: doublet
-t: triplet
-q: quartet
-dd: doublet of doublets
-dt: doublet of triplets
-td: triplet of doublet
-m: multiplet

Electron Impact Mass Spectra (EI-MS) were obtained on a spectrometer Hewlett Packard 5989B at 70 eV.

High Resolution Electro-spray Ionisation Mass Spectra (HR-ESI-MS) were obtained from the ―Service de Spectrométrie de masse du service UBP-START, (Université Blaise Pascal)".

GC/MS analysis conditions used for progress of the reaction; column: UB 1701 (14% cyanopropylphenyl)-methylpolysiloxane, injector temperature : 250°C; oven temperature : 50°C for 2 min then heating 50°C/min until 290°C.

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis conditions used for purity of the product; column: Poroschell 120 EC-C18 2.7 µm (3.0 x 50 mm), temperature column: 40 °C; injection: 10 µL, 1 mL/min.; solvents used A- water with 0.1% formic acid and B-

methanol (95:5 to 5:95, KBNUNO) or A-water and B-acetonitrile (95:5 to 5:95, KBDV), method UV using 254 nm and 280.5 nm).
Numbers placed in figure refers to NMR attributions, and were given independently from IUPAC nomenclature.

Biological assays

Electrophysiology

Cell culture and transfection: HEK-293 cells were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The coding sequence of the human TREK-1 (kcnk2) gene (GenBank Acc. No. NM_014217) was cloned into pIRES2-eGFP vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). In order to obtain a cell line that stably expresses the TREK-1 channel, the plasmid was transfected (25 ng) into HEK-293 cells using the Calcium Phosphate method as described by the manufacturer protocol in the presence of 1.5 mg/mL Geneticin (G418) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After 20–30 days of culture in G418 selection medium, individual colonies of resistant cells were isolated by using cloning cylinders (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).
The human-TREK-1/HEK-293 (h-TREK-1/HEK) cells, which are a HEK-293 cells stably expressing the TREK-1 channel, were cultured in Dulbecco‘s modified Eagle‘s medium(Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10 % fetal calf serum (Hyclone, Thermo Fisher Scientific GMBH, Ulm, Germany), 1 % penicillin-streptomycin (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France), and were grown in the presence of a h-TREK-1/HEK cell selection antibiotic (G418) (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) at 0.5 mg/mL, in a humidified incubator at 37 °C and 5 % CO2.
Cells were passaged using 0.25 % trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) after reaching a maximal confluence of 80 % and were used for up to 10 consecutive passages after thawing.

Patch-clamp recording: Electrophysiological experiments were performed on h-TREK-1/ HEK- cells plated on 35-mm dishes with a density of 30,000 cells/dish and used between 4 and 48 h after plating. Dishes were placed in the patch-clamp chamber and continuously perfused with the control bath solution containing (in millimol per litre): 140 NaCl, 10 TEA-Cl, 5 KCl, 3 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES and adjusted to pH 7.4 with NaOH. The pipette solution contained (in millimol per litre): 155 KCl, 3 $MgCl_2$, 5 EGTA, 10 HEPES and adjusted to pH 7.2 with KOH. All experiments were performed at room temperature (21–22°C).
TREK-1 current was observed using RK 400 patch clamp amplifier (Bio-Logic Science Instruments), low-pass filtered at 3 kHz and digitized at 10 kHz using a 12-bit analog-to-digital converter Digidata-1322 (Axon Instrument, Sunnyvale, CA, USA). For current

visualization and stimulation protocol application, we used commercial software (Clampex 8.2).

The patch pipettes were double-step-pulled from haematocrit-capillaries (Hirschmann Laborgeraete, Germany) using a vertical puller (PC-10, Narishige International, London, UK). Filled pipettes had resistances of 1–2 MΩ. Whole-cell patch-clamp configuration was obtained at a holding potential of −80 mV. Voltage ramp protocols consisted of a step to −100 mV (20 ms in duration) followed by a ramp going from −100 to +100 mV over 400 ms. Ramps were applied every 5 s. Current amplitudes were expressed as current densities (pico Amper per pico Farad) and results are presented as mean±standard error of the mean (SEM).

Current was recorded under control bath solution perfusion and under bath solution perfusion supplemented with different test molecules. The evaluation of the molecules effects was obtained by the ratio between currents under control perfusion and currents after molecules application. The ratio values were calculated at +60mV of the current/voltage (I/V) curves. Molecules were prepared as stock solutions in DMSO (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (20 mM) and were used at a final concentration of 100µM.

Those experiments were carried out by Dr Ismail Ben Soussia (IPMC).

Voltage-clamp recording : *Xenopus* oocytes deprived of their follicular cells are injected with 50 ng cRNA encoding TREK-1channel.[6] 18-24 hours after injection, TREK-1currents are recorded by the technique of the two microelectrode voltage-clamp technique. In a perfusion chamber of 0.3mL, the oocyte is impaled with two microelectrodes standards (1-2.5 M resistance) filled with 3M KCl solution nd maintained at a voltage clamp with a Dagan TEV200 amplifier in a solution standard ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$,5 mM HEPES, pH 7.4 with NaOH).Then a solution of compound [20 µM, compounds were dissolved in DMSO then diluted in extracellular recording solution (The DMSO concentration in this solution having to be kept below 5%, some compounds were not soluble at concentrations exceeding 10 mM)] is perfused for 15 minutes, followed by rinsing with ND96 for 6 minutes. Stimulation of the preparation, data acquisition and analysis were performed using pClamp software.

Animals

Male Sprague Dawley rats (150-175g) were purchased from Charles River, and CD1 mice (20-25 g) were purchased from Elevage Janvier. Animals were housed under controlled environmental conditions (22°C; 55% humidity) and kept under a 12/12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum* for a week before start the experiments to acclimatize.The behavioural experiments were performed blind to the treatment, in a quiet room, by the same experimenter taking great care to avoid or minimize discomfort of the animals. Animals were randomly divided in groups of 8 mice each and each animal was used only once per compound and euthanized. Animal care and experiments were performed in accordance with

the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983).All animal procedures were approved by the local Animal Ethics Committee of Auvergne (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne).

Behavioral testing in mice

Acetic acid writhing assay: Mice were pretreated with the compound (10 mg / kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in saline (0.9%)) 15 minutes before injection of acetic acid (0.6% solution, 10 mL/kg) into the peritoneal cavity of the animal. This activates nociceptors directly and / or produces inflamed viscera (subdiaphragmaticorgans) and subcutaneous (muscle wall) of tissus.[3] The number of induced abdominal writhes was determined during 20 min after the injection of acetic acid. The inhibition of abdominal writhes (analgesic effect) is determined by determining the percentage of the number of cramps induced in the presence of compound reported to the number of cramps induced in the presence of vehicle.

Formalin test: After acclimatization for 20 min in the test chamber, mice were pretreated with the compound (s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in saline (0.9%)) 10 min before injection of 2.5% formalin (25µl) subcutaneously into the plantar surface of the hindpaw. They were then placed in a Plexiglas box. Biting and licking of the injected paw were monitored, and the total duration of these actions in seconds was measured during the two peaks of the typical biphasic pain behavior. The spontaneous aversive response corresponding to the early phase was assessed during the first 10 min. The second peak of aversive behavior was observed from 20 to 35 min after formalin administration. Data were analyzed by a two-way ANOVA and Bonferroni‘s *post hoc* test. Mean and standard error values for the time spent licking during the two phases were calculated for each group of mice. Comparisons between control and treatment groups were made. Results are expressed as the time spent licking the paw and as a percent (%) inhibition of licking time as compared to the control group values.

Hot-plate test: After acclimatization for 5 min on a plate at room temperature, mice were placed on a plate set at 52°C until they started licking their forepaws (Latencies) (cut-off time: 30 s). After having obtained two consecutive stable latencies, treatment effects were assessed after 30 and 45 min. The results were expressed as:

$$\frac{(postdrug\ latency) - (predrug\ latency)}{predrug\ latency} \times 100 = \%\ analgesic\ effect$$

Those experiments were carried out in part by Laëtitia Prival.

Behavioral testing in rats

Paw pressure test in rats: Rats were submitted to the paw pressure test previously described by Randall and Selitto (1957). Nociceptive thresholds, expressed in grams, were

measured with an Ugo Basile analgesimeter (Apelex, tip diameter of the probe 1 mm, weight 30 g) by applying an increasing pressure to the right hindpaw of rats until a squeak (vocalization threshold, VT) was obtained (cutoff was 500 g). Before treatments, rats were habituated to the test by handling without submitting them to paw pressure. Then, after having obtained two consecutive stable vocalization threshold values, treatment effects were assessed after 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min. The results are expressed as vocalization thresholds, ing rams. To investigate global effects, areas under the time course curves (AUCs, g.min) of the antihyperalgesic effects were calculated from individual scores at each time, using the trapezoidal method. Data were analyzed by a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's test, when the time course of the effects was studied. One-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls' test was used to analyze the effect of the different treatments determined by the AUCs. The level of statistical significance was set at $p<0.05$.

Carrageenan-induced inflammatory mechanical hyperalgesia: Thresholds to mechanically induced vocalization were assessed with animals presenting hyperalgesia elicited by a 200µl subcutaneous injection of 2% λ-carrageenan into the right hindpaw.
Those experiments were carried out by Eric Chapuy.

Microsomal stability

Materials: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (Alfa aesar, lot no. 61400692); acetonitrile (HPLC grade, VWR Chemicals); Phosphate buffer pH 7.4 (Sigma-aldrich); rat liver microsomes (Fischer).

Requirement: Required items were as follows: rat liver microsomes (20 mg/mL protein concentration), NADPH (40 mM solution), Phosphate buffer (pH 7.4, 84.8 mM), Eppendorf tubes and solutions of various compounds (40 mM).

Experimental conditions: Incubation period: 5 min; incubation conditions: 37°C with stirring; protein precipitation solvent: acetonitrile.

Procedure: In 30 µL of rat liver microsomes (20 mg/mL), 237 µL Phosphate buffer was added, with 30 µL of NADPH solution (40 mM), and were mixed thoroughly. To this mixture, 3 µL prodrug solution (40 mM in DMSO) were injected and vortexed well. At specific time points (2, 5, 15, 30, 60 min and 24 hours), the 300 µL assay mixture was withdrawn and vortexed in equal volume of cold acetonitrile. The mixture was then filtered with microfilter (0.45µm) prior to HPLC analysis (wavelength: 254.4 nm).

Chemistry

Procedure A: Steglich esterification

Under an argon atmosphere, cyanoacetic acid **14** (1 to 1.1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane and cooled to 0 °C. At this temperature, DMAP (cat.) is added to the mixture, followed by a dropwise addition of the appropriate alcohol (1.0 to 1.3 equiv.). After 5 minutes of stirring, DCC (1.0 equiv.) is added in portion to the mixture. The mixture is allowed to reach room temperature and stirred overnight. The white precipitate is filtered and the resulting solution was concentrated *in vacuo*. Chromatography purification of the residue on silica gel with cyclohexane / ethyl acetate gave the desired ester.

Procedure B: Fischer esterification

To a solution of cyanoacetic acid **14** (1.0 equiv.) and alcohol (1.5 equiv.) in toluene were added a few drops of concentrated H_2SO_4. The mixture was stirred at reflux for 24 hours, using a Dean-Stark apparatus to remove water. The reaction mixture was concentrated to half its initial volume under reduced pressure, diluted with ethyl acetate (20 mL), and washed with saturated $NaHCO_3$ solution (3 x 8 mL), water and brine. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate) on silica gel to give the desired.

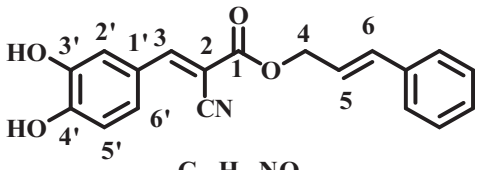
Procedure C: Knoevenagel reaction

To a solution of 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17** (1.1 equiv.) in anhydrous DCM (60 mL) under argon atmosphere were added 4-methylpentyl-2-cyanoacetate (1.0 equiv.) and piperidine (0.9 equiv.). The reaction was carried out at room temperature for 20 hours. The mixture was then quenched by the addition of a saturated aqueous solution of NH_4Cl (20 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 8 mL). The combined organic fractions were dried (Na_2SO_4). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product.

Procedure D: Hydrolysis reaction with TFA

The *t*-butyl ester (1 eq) was dissolved in 3.6 mL of trifluoroacetic acid. The resulting solution was stirred for 1 h 30 at room temperature before removal of the TFAunder reduced pressure. The residue was triturated with ether and the solvent was evaporated under reduce pressure. This work up was repeated three times to give the desired acid.

(*E*)-Cinnamyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 8



$C_{19}H_{15}NO_4$
M = 321.10 gmol^{-1}

CDC **8** was prepared following procedure C using cinnamyl 2-cyanoacetate **16** (82.4 mg, 0.41 mmol, 1.1 eq), 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **17a** (50 mg, 0.373 mmol, 1.0 eq), piperidine (cat) in anhydrous DCM (2.4 mL) to give the desired product as an orange powder (119.8 mg, quantitative).

R_f : 0.50 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v)

Melting point: 164 °C.

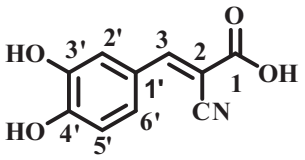
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.12 (s, 1H, H-3), 7.70 - 6.70 (m, 8H, H-ar), 6.60 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H-6), 6.40 (dt, J = 6.0 and 15 Hz, 1H, H-5), 4.25 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-4).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 163.10 (C-1), 154.18 (C-3), 146.64 and 145.86 (C-3‘and C-4‘), 133.55 (C-2), 126.50 to 129.15 (C-ar), 120.64 (C-6), 120.22 (*C*N), 117.26 (C-5), 114.20 to 116.00 (C-ar), 65.72 (C-4).

HR –ESI-MS: calcd for $C_{19}H_{15}NO_4$ ($M + Na^+$) = 344.0899; found 344.0902.

CAS Registry Number: 132465-11-3

(*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid 11



$C_{10}H_7NO_4$
M = 205.03 gmol^{-1}

(*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylic acid **11** was prepared following procedure D using (*E*)-ter-butyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **18a** (75.5 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.), TFA (1 mL) to give the desired product as a yellow powder (53.5 mg, 90%).

R_f : 0 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 261 °C

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.11 (s, 1H, H-3), 7.65 (s, 1H, H-2‘), 7.37 (2 x d, J = 8.0 Hz, 2H, H-5‘ and H-6‘).

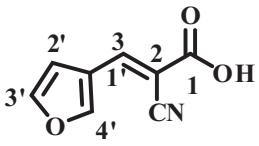
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 166.26 (C-1), 156.42 (C-3), 153.09 and 147.29 (C-3‘ and C-4‘), 127.99 - 116.86 (C-ar), 99.43 (CN), 85.2 (C-2).

HPLC: 100% (t_R = 12.422 min.)

HR –ESI-MS: calcd for $C_{10}H_7NO_4$ (M + Na^+) = 228.0273; found 228.0263.

CAS Registry Number: 122520-79-0

***(E)*-2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylic acid 12**



$C_8H_5NO_3$
M = 163.02 gmol^{-1}

(*E*)-2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylic acid **12** was prepared following procedure D using (*E*)-ter-butyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **18b** (75.5 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.), TFA (1 mL) to give the desired product as a pale yellow powder (53.5 mg, 90%).

R_f : 0 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)

Melting point: 218 °C

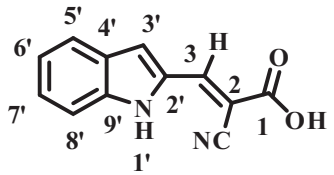
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.28 (s, 1H, H-2‘), 8.26 (s, 1H, H-3), 7.73 (m, 1H, H-5‘), 7.27 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-4‘).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 165.23 (C-1), 152.23 (C-2‘ or C-4‘), 146.98 (C-5‘), 146.80 (C-3), 122.31 (C-1‘), 117.01 (CN), 109.00 (C-2‘ or C-4‘), 103.32 (C-2).

HPLC: 100% (t_R = 9.249 min.)

HR –ESI-MS: calcd for $C_8H_5NO_3$ ($M + Na^+$) = 186.0167; found 186.0170.

(*E*)-2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylic acid 13



$C_{12}H_8N_2O_2$
M = 212.06 gmol^{-1}

(*E*)-2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylic acid **13** was prepared following procedure D using (*E*)-ter-butyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **18c** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 equiv.) and TFA (3 mL) to give the desired product as a pale yellow powder (121.7 mg, 78%)

R_f : 0.15 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 252 °C

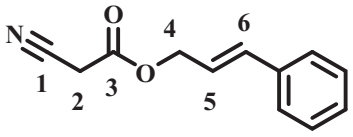
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 11.17 (br s, 1H, H-1‘), 8.27 (s, 1H, H-3), 7.68 and 7.46 (2 x d, J = 8.2 Hz, 2H, H-5‘ and H-8‘), 7.65 (s, 1H, H-3‘), 7.32 and 7.12 (2 x t, J = 7.5 Hz, 2H, H-6‘ and H-7‘).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 165.71 (C-1), 144.86 (C-3), 131.87 - 111.54 (C-ar), 99.92 (CN), 89.76 (C-2).

HPLC: 97% (t_R = 14.866 min.)

HR –ESI-MS: calcd for $C_{12}H_8N_2O_2$ ($M - H^+$) = 211.0508; found 211.0514.

Cinnamyl 2-cyanoacetate 16



$C_{12}H_{11}NO_2$
M = 201.07 gmol^{-1}

To a solution of commercially available cyanoacetic acid **14** (157.6 mg, 1.85 mmol, 1.1 equiv.) and cynnamic alcohol **15** (192.07 mg, 1.43 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous DCM (8 mL) under argon at 0 °C were added DCC (383 mg, 1.85 mmol, 1.1 equiv.) and DMAP (cat.). The reaction mixture was stirred for 4 h at 0 °C. The precipitate was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Chromatographic purification of the residue (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v) gave the ester as a yellow liquid (296.7 mg, 98%).

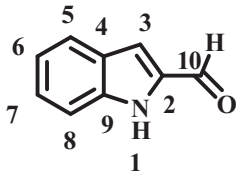
R_f : 0.5 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 3:7, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.40 - 7.30 (m, 5H, H-ar-ar), 6.75 (d, J = 15.0 Hz, 1H, H-6), 6.30 (dt, J = 15.0, 7.0 Hz, 1H, H-5), 4.66 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H-4), 3.51 (s, 2H, H-2).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 162.82 (C-3), 135.83 - 126.76 (C-ar), 126.20 (C-6), 121.40 (C-5), 113.10 (C-1), 68.12 (C-4), 23.88 (C-2).

CAS Registry Number: 132465-21-5

1*H*-indole-2-carbaldehyde 17c



C_9H_7NO
M = 145.05 gmol^{-1}

(1*H*-indol-2-yl)-methanol **23** (386.7 mg, 2.63 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) and treated with MnO_2 (2.7 g, 30.24 mmol, 11.5 equiv.). After stirring for 18 hours, the mixture reaction was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure and obtained gold powder (302 mg, 79%).

R_f: 0.4 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

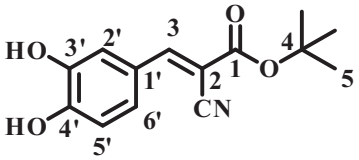
Melting point: 138 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9.86 (s, 1H, H-10), 9.30 (br s, 1H, H-1), 7.76 and 7.48 (2 x d, J = 8.1 Hz, 2H, H-5 and H-8), 7.40 and 7.19 (2 x t, J = 7.6 Hz, 2H, H-6 and H-7), 7.29 (s, 1H, H-3).

CAS Registry Number: 19005-93-7

The NMR is in agreement with the literature.[167]

***(E)-tert*-butyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 18a**



$C_{14}H_{15}NO_4$
M = 261.27 gmol-1

(E)-tert-butyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **18a** vas prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (1.11 g, 8.00 mmol, 1.0 equiv.), *tert*-butyl-2-cyanoacetate **19** (1.13 g, 8.00 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (710 µL, 7.20 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (150 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a pale yellow solid (1.09 g, 52%).

R_f: 0.20 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 4:6, v/v).

Melting point: 211 °C.

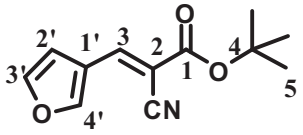
^{1}H NMR (400 MHz, , MeOD-*d_4*): δ 8.03 (s, 1H, H-3), 7.63 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 7.36 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5‘),1.56 (s, 9H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, , MeOD-*d_4*): δ 163.6 (C-1), 155.6 (C-3), 152.9 and 147.1 (C-3‘ and C-4‘), 127.8 (C-6‘), 125.1 (C-1‘), 117.7 (C-2‘), 117.5 (CN), 116.7 (C-5‘), 100.2 (C-2), 84.1 (C-4), 28.3 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{15}NO_4$ ($M + Na^+$) = 284.0899; found 284.0905.

HPLC: 254.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 18.681 min. (method KBNUNO)
280.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 18.681 min. (method KBNUNO)

***(E)-tert*-butyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate 18b**



$C_{12}H_{13}NO_3$
M = 219,24 g.mol^{-1}

((E)-tert-butyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **18b** was prepared following procedure C using 3-furaldehyde **17b** (0.28 mL, 3.21 mmol, 1.0 equiv.), *tert*-butyl 2-cyanoacetate **19** (500 mg, 3.53 mmol, 1.1equiv.) and piperidine (0.29 mL, 2.89 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (50 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v in cyclohexane) gave the desired product as light pink crystals (297 mg, 42%).

R_f: 0.43 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 121-123 °C.

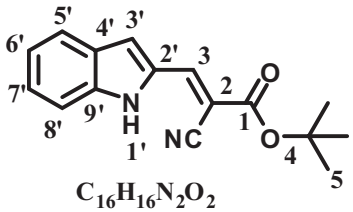
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d_4*): δ 8.28 (s, 1H, H-4‘), 8.18 (s, 1H, H-3), 7.72 (bs,1H, H-3‘), 7.25 (d, J = 2 Hz ,1H, H-2‘) ,1.56 (s, 9H, H-5) .

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d_4*): δ 162.7 (C-1), 152.3 (C-4‘), 147.0 (C-3‘), 146.2 (C-3), 122.3 (C-1‘), 116.9 (CN), 109.0 (C-2‘), 104.2 (C-2), 84.5 (C-4), 28.2 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{12}H_{14}NO_3$ ($M + H^+$) = 220.0974 found 220.0968.

HPLC: 254.4 nm: 99% (H_2O/MeOH) t_r = 19.330 min.
280.4 nm: 99% (H_2O/MeOH) t_r = 19.308 min.

***(E)-tert*-butyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 18c**



$C_{16}H_{16}N_2O_2$
M = 268,31 g.mol^{-1}

(E)-tert-butyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **18c** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (600 mg, 4.13mmol, 1.0 equiv.) *tert*-butyl-2-cyanoacetate **19** (642 mg, 4.55 mmol, 1.1 equiv.) and piperidine (0.37 mL, 3.72 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (75 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a bright yellow solid (406 mg, 42%).

R_f: 0.52 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 173-175 °C.

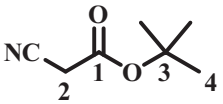
^{1}H NMR (400 MHz,DMSO-d_6): δ11.88 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-3), 7.76 (d,*J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.66 (s, 1H, H-3‘), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-ar), 7.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 1.56 (s, 9H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-d_4): δ163.2 (C-1), 144.3 (C-3), 140.3, 131.8, 129.7 (C_{IV}-ar), 127.5, 123.4, 122.2 (CH-ar), 117.5 (CN), 113.2 (CH-ar), 112.4 (C-3‘), 100.8 (C-2), 84.3 (C-4), 28.3 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{17}N_2O_2$ ($M + H^+$) = 269.1290 found 269.1301.

HPLC: 254.4 nm: 93% (H_2O/CH_3CN) t_r = 26.631 min. (method KBDV)
280.4 nm: 92% (H_2O/CH_3CN) t_r = 26.631 min. (method KBDV)

***Tert*-butyl 2-cyanoacetate 19**



$C_7H_{11}NO_2$
M = 141.17 gmol^{-1}

Tert-Butyl 2-cyanoacetate **19** was prepared following procedure A using *tert*-butanol **20** (1.86 mL, 19.40 mmol, 1.1 equiv.), cyanoacetic acid **14** (1.5 g, 17.63 mmol, 1.0 equiv.) and DCC (3.64 g, 17.63 mmol, 1.0 equiv.) in dry dichloromethane (20 mL). Chromatography purification of the residue on silica gel with 9:1, v/v, cyclohexane/ ethyl acetate gave the desired product as a pale liquid (1.13 g, 45%).

R_f: 0.36 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)

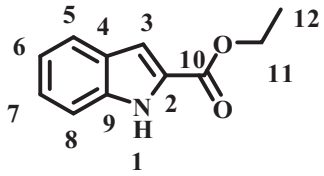
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.36 (s, 2H, H-2), 1.48 (s, 9H, H-4).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ161.9 (C-1), 113.6 (CN), 84.3 (C-3), 27.8 (C-4), 25.9 (C-2).

CAS Registry Number: 1116-98-9

The NMR is in agreement with the literature.[168,169]

Ethyl 1*H*-indole-2-carboxylate 22



$C_{11}H_{11}NO_2$
$M = 189.08\ gmol^{-1}$

248 µL of sulphuric acid was added to a solution of indole-2-carboxylic acid **21** (400 mg, 2.48 mmol, 1.0 equiv.) in 8 mL of absolute ethanol. The reaction mixture was heated under reflux for 15 hours, it was added 248 µL of sulphuric acid and the reaction mixture was refluxed for 3 hours. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure, the residue was dissolved in 10 mL of DCM, and the resulting solution was washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (3 x 20 mL), water (10 mL) and brine (10 mL). The organic phase was dried ($MgSO_4$), filtered, evaporated under reduced pressure and the desired product was obtained as a white powder (365.8 mg, 77%).

R_f: 0.66 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 6:4, v/v).

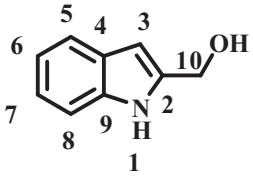
Melting point: 122 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.93 (s, 1H, H-1), 7.70 and 7.43 (2 x d, J = 8.1 Hz, 2H, H-ar), 7.36 - 7.24 (m, 2H, H-ar and H-3), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-ar), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H-11), 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-12).

CAS Registry Number: 3770-50-1

The NMR is in agreement with the literature.[170]

(1*H*-indol-2-yl)methanol 23



C_9H_9NO
$M = 147.07\ gmol^{-1}$

Ethyl 1*H*-indole-2-carboxylate **22** (501.7 mg, 2.65 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous THF (10 mL) was added dropwise to a cooled (0 °C) suspension of LAH (139.1 mg, 3.98 mmol, 1.5equiv.) in anhydrous THF (10 mL) and stirred for 2 hours. The reaction was quenched by dropwise addition of methanol (5 mL) and washed with water (20 mL). The organic layer was

dried ($MgSO_4$) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO_2, 4 ethyl acetate/ 6 cyclohexane) and obtained the white powder (386.7 mg, 99.5%).

R_f: 0.19 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 3:7, v/v).

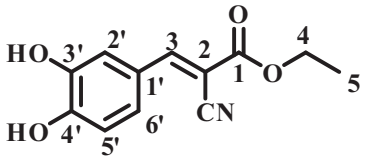
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.38 (br s, 1H, H-1), 7.61 and 7.37 (2 x d, J = 8.0 Hz, 2H, H-ar), 7.21 and 7.13 (m, 2H, H-3 and H-ar), 6.43 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-6), 4.84 (br s, 2H, H-10), 1.93 (br s, 1H, OH).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 137.55 - 100.55 (C-Ar), 58.77 (C-10).

CAS Registry Number: 24621-70-3.

The NMR is in agreement with the literature.[171]

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 24**



$C_{12}H_{11}NO_4$
M = 233.22 gmol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **24** was prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (2.08 g, 15.03 mmol, 1.0 equiv.), ethyl 2-cyanoacetate **28** (1.7mg, 15.03 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (1.4 mL, 13.53 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (250 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (1.9 g, 55%).

R_f: 0.24 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 4:6, v/v)

Melting point: 166 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d_4*): δ 8.11 (s, 1H, H-3), 7.64 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-2‘), 7.37 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H, H-6‘), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5‘), 4.33 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 164.7 (C-1), 156.3 (C-3), 153.1, 147.1 (C_{IV}-ar), 128.0 (CH-ar), 125.1 (C_{IV}-ar), 117.7 (CH-ar), 117.3 (CN), 116.7 (CH-ar), 98.6 (C-2), 63.3 (C-4), 14.5 (C-5).

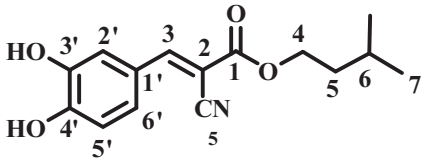
HR –ESI-MS calcd for $C_{12}H_{12}NO_4$ ($M + Na^+$) = 234.0766; found 234.0759.

HPLC: 254.4 nm: 98% (H_2O/MeOH) t_r = 16.580 min. (method KBNUNO)
280.4 nm: 96% (H_2O/MeOH) t_r = 16.580 min. (method KBNUNO)

CAS Registry Number: 132464-92-7

The NMR is in agreement with the literature.[172]

_(E)_-4-methylpentyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 25



$C_{15}H_{17}NO_4$
M = 275.30 gmol^{-1}

(E)-4-methylpentyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **25** was prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (392 mg, 2.84 mmol, 1.0 equiv.), 4-methylpentyl-2-cyanoacetate **29** (440 mg, 2.84 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (250 µl, 2.56 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (60 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a pale yellow solid (517 mg, 66%).

R_f: 0.26 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 4:6, v/v)

Melting point: 141 °C.

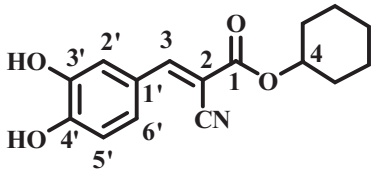
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.10 (s, 1H, H-3), 7.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 7.38 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 6.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5‘), 4.32 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1.86 - 1.70 (m, 1H, H-6); 1.65 - 1.55 (m, 2H, H-5), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H-7).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 164.7 (C-1), 156.3 (C-3), 153.2 and 147.1 (C_{IV}-ar), 128.1 (CH-ar), 125.1 (C_{IV}-ar), 117.7 (CH-ar), 117.3 (CN), 116.7 (CH-ar), 98.6 (C-2), 65.8 (C-4), 38.4 (C-5); 26.3 (C-6), 22.8 (C-7).

HR –ESI-MS calcd for $C_{15}H_{17}NO_4$ ($M + Na^+$) = 298.1055; found 298.1062.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 19.885 min. (method KBNUNO)
280.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 19.885 min. (method KBNUNO)

_(E)_-cyclohexyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 26



$C_{16}H_{17}NO_4$
M = 287.31 gmol^{-1}

(*E*)-cyclohexyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **26** was prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (125 mg, 0.75 mmol, 1equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **30** (104 mg, 0.75mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (66 µL, 0.67 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (15 mL) under. After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (150 mg, 71%).

R_f: 0.46 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 6:4, v/v)).

Melting point: 177 °C.

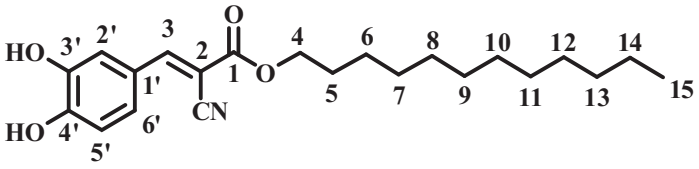
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.09 (s, 1H, H-3), 7.65 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 7.38 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5‘), 4.93 (m, 1H, H-4), 1.97-1.73 (m, 4H, H-cyclo), 1.66-1.36 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 164.1 (C-1), 156.1 (C-3), 153.1 and 147.1(C_{IV}-ar), 128.0 (CH-ar), 125.1 (C_{IV}-ar), 117.7 (CH-ar), 117.4 (CN), 116.7 (CH-ar), 99.0 (C-2), 75.9 (C-4), 32.4, 26.5, 24.5 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{17}NO_4$ ($M + Na^+$) = 310.1055; found 310.1067.

HPLC: 254.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 19.984 min. (method NUNO)
280.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 19.984 min. (method NUNO)

***(E)*-dodecyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate 27**



$C_{22}H_{31}NO_4$
M = 373.49 gmol^{-1}

(E)-dodecyl 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylate **27** was prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (305 mg, 2.21 mmol, 1.0 equiv.), dodecyl-2-cyanoacetate **31** (560 mg, 2.21 mmol, 1equiv.) and piperidine (196 µL, 1.99 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mLAfter removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (630 mg, 76%).

R_f: 0.23 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 4:6, v/v))

Melting point: 119 °C.

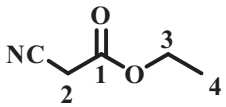
^{1}H NMR (400 MHz, , MeOD-*d_4*): δ 8.11 (s, 1H, H-3), 7.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-2‘), 7.38 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H, H-6‘), 6.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5‘), 4.28 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-4), 1.80-1.64 (m, 2H, H-5), 1.44-1.22 (m, 18H, H-6-14), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-15).

^{13}C NMR (101 MHz, , MeOD-*d_4*): δ 164.8 (C-1), 156.3 (C-3), 153.2 and 147.1 (C_{IV}-ar), 128.1 (CH-ar), 125.1 (C_{IV}-ar), 117.7 (CH-ar), 117.3 (CN), 116.7 (CH-ar), 98.6 (C-2), 67.3 (C-4), 33.1, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 29.7, 27.0, 23.6 (C-5 to C-14),14.5 (C-15).

HR –ESI-MS calcd for $C_{22}H_{32}NO_4$ ($M + Na^+$) = 374.2331; found 374.2343.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/MeOH) t_r = 21.445 min. (method KBNUNO)
280.4 nm: 96% (H_2O/MeOH) t_r = 21.445 min. (method KBNUNO)

Ethyl 2-cyanoacetate 28



$C_5H_7NO_2$
M = 113.11 gmol^{-1}

Ethyl 2-cyanoacetate **28** was prepared following procedure A using ethanol **32** (0.310 mL, 5.34 mmol, 1.0 equiv.), cyanoacetic acid **14** (500 mg, 5.88 mmol, 1.1 equiv.), DMAP (cat.) and DCC (1.213g, 5.88 mmol, 1.1 equiv.) in dry dichloromethane (30 mL). Chromatography

purification of the residue on silica gel with ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v (SiO2) gave the desired product as a pale yellow liquid (400 mg, 66%).

R_f: 0.32 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

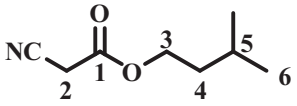
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H-3), 3.45 (s, 2H, H-2), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H-4).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ162.9 (C-1), 113.1 (CN), 63.0 (C-3), 24.8 (C-2), 14.0 (C-4).

CAS Registry Number: 105-56-6.

The NMR is in agreement with the literature.[173]

***Iso*-pentyl 2-cyanoacetate 29**



$C_8H_{13}NO_2$
M = 155.19 gmol^{-1}

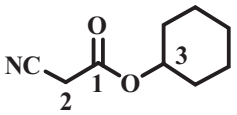
Iso-pentyl 2-cyanoacetate **29** was prepared following procedure A using cyanoacetic acid **14** (500 mg, 5.88 mmol, 1.0 equiv.) in dry dichloromethane (6 mL), DMAP (cat.), *iso*-pentanol **33** (830 µL, 7.64 mmol, 1.3 equiv.). Chromatography purification of the residue on silica gel with 9:1, v/v, cyclohexane/ ethyl acetate gave the desired product as yellow oil (440 mg, 48%).

R_f: 0.38 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):δ 4.26 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H-3), 3.47 (s, 2H, H-2), 1.72 - 1.68 (m, 1H, H-5), 1.60 - 1.58 (m, 2H, H-4), 0.95 (d, J = 6.6 Hz, 6H, H-6).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$):δ163.0 (C-1), 113.1 (CN), 65.7 (C-3), 37.0 (C-4), 24.9 (C-5), 24.8 (C-2), 22.4 (C-6).

Cyclohexyl 2-cyanoacetate 30



$C_9H_{13}NO_2$
M = 167.21 gmol^{-1}

Cyclohexyl 2-cyanoacetate **30** was prepared following procedure B using cyanoacetic acid **14** (1.5 g, 17.64 mmol, 1.0 equiv.), a few drops of concentrated H_2SO_4 and cyclohexanol **34** (2.75 mL, 26.46 mmol, 1.5equiv.) in toluene (75 mL). Chromatography purification of the residue on silica gel with 9:1, v/v cyclohexane/ ethyl acetate gave the desired product as colourless oil (125 mg, 77%).

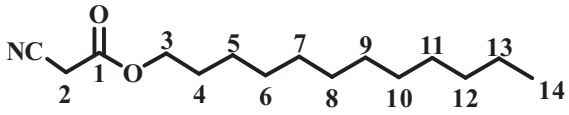
R_f: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.90 - 4.66 (m, 1H, H-3), 3.38 (s, 2H, H-2), 1.95-1.59 (m, 4H, H-cyclo), 1.53-1.13 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ162.4 (C-1), 113.3 (CN), 75.8 (C-3), 31.3, 25.1, 23.5 (C-cyclo), 25.1 (C-2).

CAS Registry Number: 52688-11-6

The NMR is in agreement with the literature.[111]

Dodecyl 2-cyanoacetate 31



$C_{15}H_{27}NO_2$
M = 253.38 gmol^{-1}

Dodecyl 2-cyanoacetate **31** was prepared following procedure A using dodecanol **35** (1.2 mL, 5.34 mmol, 1.0 equiv.), cyanoacetic acid **14** (500 mg, 5.88 mmol, 1.1 equiv.), DMAP (cat.) and DCC (1.213g, 5.88 mmol, 1.1 equiv.) in dry dichloromethane (30 mL). Chromatography purification of the residue on silica gel with 9:1, v/v cyclohexane/ ethyl acetate gave the desired product as a pale yellow solid (1.178 g, 87%).

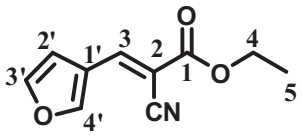
R_f: 0.40 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.21 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H-3), 3.47 (s, 2H, H-2), 1.74-1.62 (m, 2H, H-4), 1.42-1.20 (m, 18H, H-5 to H-13), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H-14).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ163.0 (C-1), 113.1 (CN), 67.1 (C-3), 31.9, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 29.1, 28.3, 24.7, 22.7 (C-4 to C-13), 25.7 (C-2),14.1 (C-14).

CAS Registry Number: 60180-50-9

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate 36**



$C_{10}H_9NO_3$
M = 191,18 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **36** was prepared following procedure C using 3-furaldehyde **17b** (350 µL, 4.02mmol, 1.0 equiv.), ethyl 2-cyanoacetate **28** (500 mg, 4.4mmol, 1.1 equiv.) and piperidine (360 µL, 3.62mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (90 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as an off-white solid (250mg, 33%).

R_f: 0.20 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v)

Melting point: 86 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d_4*): δ 8.29 and 8.27 (2 x s, 2H, H-4‘ and H-3), 7.73 (bs, 1H, H-3‘), 7.26 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H-2‘), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

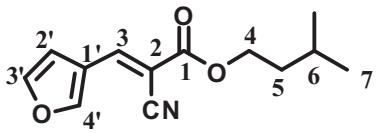
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d_4*): δ 163.7 (C-1), 152.6 (C-4‘), 147.1 (C-3‘), 147.0 (C-3), 122.3 (C-1‘), 116.7 (CN), 109.0 (C-2‘), 102.7 (C-2), 63.5 (C-4), 14.5 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{10}H_{10}NO_3$ ($M + H^+$) = 192.0661 found 192.0654.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/MEOH) t_r = 14.055 min. (method KBNUNO)
280.4 nm: 96% (H_2O/MEOH) t_r = 14.055 min. (method KBNUNO)

The NMR is in agreement with the literature.[174]

***(E)-iso*pentyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate 37**



$C_{13}H_{15}NO_3$
M = 233,26g.mol^{-1}

*((E)-iso*pentyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **37** was prepared following procedure C using 3-furaldehyde **17b** (0.56 mL, 6.44 mmol, 1.0 equiv.), isopentyl-2-cyanoacetate **29** (1.00g, 6.44 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (570 µL, 5.80 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (100 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as an off-white solid (477 mg, 32%).

R_f: 0.56 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 36-37 °C.

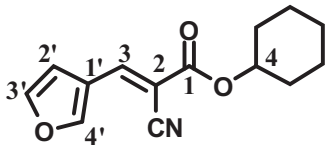
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ 8.59 (s, 1H, H-4‘), 8.34 (s, 1H, H-3), 7.97 (bs,1H, H-3‘), 7.19 (bs,1H, H-2‘) ,4.28 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1-78 - 1.64 (m, 1H, H-6), 1.60 - 1.55 (m, 2H, H-5), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz 6H, H-7) .

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ 161.9 (C-1), 152.4, 146.4, 107.4 (CH-ar), 146.2 (C-3), 120.5 (C-1‘), 115.7 (CN), 100.6 (C-2), 64.5 (C-4), 36.7 (C-5), 24.6 (C-6), 22.3 (C-7).

HR –ESI-MS calcd for $C_{13}H_{16}NO_3$ ($M + H^+$) = 234.1130 found 234.1126.

HPLC: 254.4 nm: 97% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.472 min. (method KBDV)
280.4 nm: 97% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.472 min. (method KBDV)

***(E)*-cyclohexyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate 38**



$C_{14}H_{15}NO_3$
M = 245,27 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **38** was prepared following procedure C using 3-furaldehyde **17b** (0.47 mL, 5.38 mmol, 1.0 equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **30** (1.00g, 5.98 mmol, 1.1 equiv.) and piperidine (0.48 mL, 4.84 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (100 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v in cyclohexane) gave the desired product as pink crystals (440 mg, 33%).

R_f: 0.41 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 56-59 °C.

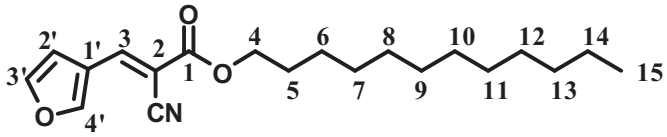
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.30 (s, 1H, H-4‘), 8.26 (s, 1H, H-3), 7.73 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-3‘), 7.27 (bs,1H, H-2‘), 4.93 (m, 1H, H-4), 1.98 - 1.74 (m, 4H, H-cyclo), 1.67 - 1.33 (m, 6H, H-cyclo) .

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 163.1 (C-1), 152.5 (C-4‘), 147.0 (C-3‘), 146.8 (C-3), 122.3 (C-1‘), 116.7 (CN), 111.4 (C-2), 109.0 (C-2‘), 76.1 (C-4), 32.4, 26.4, 24.5 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{16}NO_3$ ($M + H^+$) = 246.1130 found 246.1120.

HPLC: 254.4 nm: 98% (H_2O/MeOH) t_r = 20.643 min.
280.4 nm: 98% (H_2O/MeOH) t_r = 20.643 min.

_(E)_-dodecyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate 39



$C_{20}H_{29}NO_3$
M = 331,45 g.mol^{-1}

(E)-dodecyl 2-cyano-3-(furan-3-yl)acrylate **39** was prepared following procedure C using 3-furaldehyde **17b** (190 µL, 2.15mmol, 1.0 equiv.), dodecyl-2-cyanoacetate **31** (600 mg, 2.37mmol, 1.1equiv.) and piperidine (190 µL, 1.94 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (50 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a white solid (250 mg, 35%).

R_f: 0.51 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 64-65 °C.

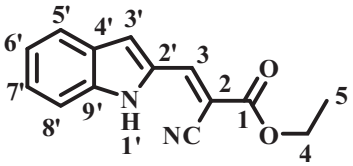
^{1}H NMR (400 MHz,C_6D_6): δ 7.82 (s, 1H, H-3), 7.10 (bs, 1H, H-2‘), 6.98 (bs, 1H, H-4‘), 6.72 (bs,1H, H-3‘), 4.07 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1.52 - 1.42 (m, 2H, H-5), 1.35 - 1.18 (m, 18H, 9x CH_2), 0.92 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H-15).

^{13}C NMR (101 MHz, C_6D_6): δ 162.6 (C-1), 149.9 (C-4‘), 145.2 (C-3‘), 145.0 (C-3), 121.1 (C-1‘), 115.9 (CN), 108.5 (C-2‘), 102.6 (C-2), 66.5 (C-4), 32.4, 30.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.6 (10x CH_2), 28.9 (C-5), 26.1, 23.1 (CH_2), 14.4 (C-15).

HR –ESI-MS calcd for $C_{20}H_{30}NO_3$ ($M + H^+$) = 332.2226 found 332.2237.

HPLC: 254.4 nm: 98% (H_2O/CH_3CN) t_r = 32.016 min. (method KBDV)
280.4 nm: 98% (H_2O/CH_3CN) t_r = 32.016 min. (method KBDV)

<u>*(E)*-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 40</u>



$C_{14}H_{12}N_2O_2$
M = 240,26 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **<u>40</u>** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **<u>17c</u>** (583 mg, 4.02mmol, 1.0 equiv.), ethyl-2-cyanoacetate **<u>28</u>** (500 mg, 4.42mmol, 1.1equiv.) and piperidine (1360 µL, 3.62mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (90 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (650mg, 61%).

R_f: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 189 °C. The melting point is in agreement with the literature.[175]

^{1}H NMR (400 MHz,DMSO-d_6): δ11.88 (s, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, H-3), 7.76 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.69 (s,1H, H-3‘), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-ar), 7.34 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.12 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-5).

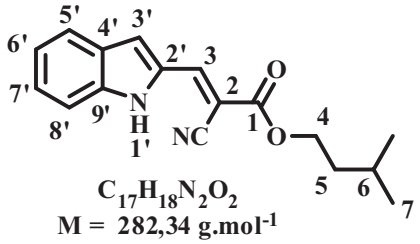
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ162.3 (C-1), 143.9 (C-3), 138.9, 138.3, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.3, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.3 (CN), 112.5, 109.8 (CH-ar), 97.9 (C-2),62.1 (C-4), 14.1 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{13}N_2O_2$ $(M + H^+)$ = 241.0977 found 241.0978.

HPLC: 254.4 nm: 98% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.747 min. (method KBDV)
280.4 nm: 98% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.747 min. (method KBDV)

CAS Registry Number: 65828-71-9

***(E)-iso*pentyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 41**



*(E)-iso*pentyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **41** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (500 mg, 3.44 mmol, 1.0 equiv.), isopentyl-2-cyanoacetate **29** (535 mg, 3.44 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (310 µL, 3.10 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (70 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (260 mg, 27%).

R_f: 0.19 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 151 – 152 °C.

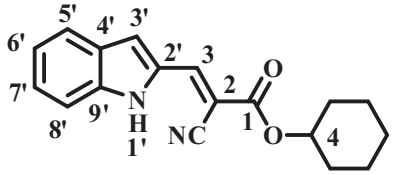
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11.88 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-3), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.68 (s, 1H, H-3‘), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-ar), 7.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 4.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1.88 - 1.68 (m, 1H, H-6), 1.61 – 1.55 (m, 2H, H-5), 0.92 (2 × s, 6H, H-7).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ162.3 (C-1), 143.9 (C-3), 138.3, 130.4, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.3, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.2 (CN), 112.5, 109.7 (CH-ar), 97.8 (C-2), 64.4 (C-4), 36.7 (C-5), 24.6 (C-6), 22.3 (C-7).

HR –ESI-MS calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_2$ $(M + H^+)$ = 283.1447; found 283.1437.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.616 min. (method KBDV)
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.616 min. (method KBDV)

***(E)*-cyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 42**



$C_{18}H_{18}N_2O_2$
M = 294,35 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **42** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (300 mg, 2.07 mmol, 1.0 equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **30** (350 mg, 2.07 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (185 µL, 1.86 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (600 mg, 98%).

R_f: 0.61 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

Melting point: 179-180 °C.

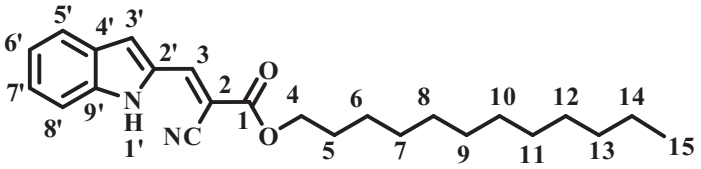
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ 11.89 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-3), 7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-ar), 7.68 (s,1H, H-3‘), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-ar), 7.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 4.97 - 4.87 (m, 1H, H-4), 1.87 - 1.71 (m, 4H, H-cyclo), 1.53 - 1.31 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ161.6 (C-1), 143.7 (C-3), 138.2, 130.3, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.2, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.2 (CN), 112.5, 109.6 (CH-ar), 98.2 (C-2), 74.1 (C-4), 30.8, 24.8, 22.8 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{18}H_{19}N_2O_2$ $(M + H^+)$ = 295.1447 found 295.1448.

HPLC: 254.4 nm: 90% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.843 min. Isomer 10% t_r= 27.567. (method KBDV)

***(E)*-dodecyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 43**



$C_{24}H_{32}N_2O_2$
M = 380,52 g.mol^{-1}

(E)-dodecyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **43** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (450 mg, 3.10 mmol, 1.0 equiv.), dodecyl-2-cyanoacetate **31** (863 mg, 3.41 mmol, 1.1 equiv.) and piperidine (276 µL, 2.79 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (50 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as a yellow solid (460 mg, 39%).

R_f: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

Melting point: 129-130 °C.

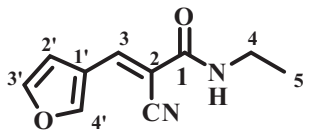
^{1}H NMR (400 MHz, benzene-d_6): δ 8.86 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, H-3), 7.36 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-ar), 7.04 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 6.93 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-ar), 6.73 (s,1H, H-3‘), 6.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-ar), 4.12 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-4), 1.55 - 1.47 (m, 1H, H-dod), 1.33 - 1.21 (m, 18H, H-dod), 0.92 (t, J = 6.7 Hz, 3H, H-15).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ162.2 (C-1), 143.9 (C-3), 138.3, 130.4, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.3, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.2 (CN), 112., 109.7 (CH-ar), 97.8 (C-2), 65.9 (C-4), 31.3, 29.0, 28.9, 28.9, 28.7, 28.6, 28.0, 25.3, 22.1 (C-dod), 13.9 (C-15).

HR –ESI-MS calcd for $C_{24}H_{33}N_2O_2$ (M + H^+) = 381.2542 found 381.2528.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 31.988 min. (method KBDV)
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 31.988 min. (method KBDV)

***(E)*-2-cyano-*N*-ethyl-3-(furan-3-yl)acrylamide 45**



$C_{10}H_{10}N_2O_2$
M = 190,20 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-*N*-ethyl-3-(furan-3-yl)acrylamide **45** was prepared following procedure C using furan-3-carbaldehyde **17b** (720 µL, 8.13 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-*N*-ethylacetamide **49** (847 mg, 7.56 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (675 µL, 6.84 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (50 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as an off-white solid (611 mg, 46%).

R_f: 0.23 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 121 °C.

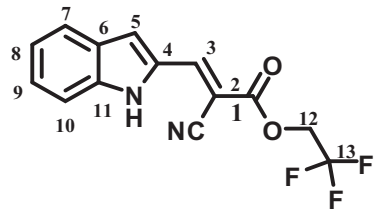
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d_4*): δ 8.23 (s, 1H, H-ar), 8.11 (s, 1H, H-3), 7.74 – 7.67 (m, 1H, H-ar), 7.26 – 7.23 (m, H-ar), 3.35 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H-4), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d_4*): δ 163.2 (C-1), 151.4, 146.8, 143.5, 108.9 (C-3 and CH-ar), 122.3 (C-1‘), 117.3 (CN), 105.2 (C-2), 36.2 (C-4), 14.8 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{10}H_9N_2O_2$ ($M - H^+$) = 189.0664 found 189.0665.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 11.675 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 11.675 min. (method KBDV).

***(E)*-2,2,2-trifluoroethyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 46**



$C_{14}H_9F_3N_2O_2$
M = 294,23 g.mol^{-1}

(E)-2,2,2-trifluoroethyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **46** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (455 mg, 3.13 mmol, 1.1 equiv.), 2,2,2-trifluoroethyl 2-cyanoacetate **48** (474 mg, 2.84 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (250 µL, 2.56 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (20 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as an orange solid (146 mg, 17%).

R_f: 0.27 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 194 °C.

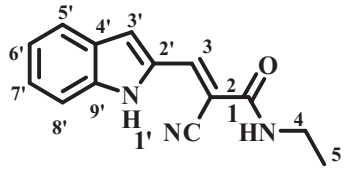
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11.97 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, H-3), 7.78 (m, 2H, H-ar), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-ar), 7.41 – 7.31 (m, 1H, H-ar), 7.18 – 7.09 (m, 1H, H-ar), 5.00 (q, J = 8.9 Hz, 2H, H-12).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 161.1 (C-1), 1445.2 (C-3), 138.6, 130.2, 127.9 (C_{IV}-ar), 127.4 – 119.2 (q, J_{C-F} = 282.5 Hz, C-5), 126.9, 122.6, 121.3, 112.6, 110.8 (CH-ar), 115.8 (CN), 95.7 (C-2), 61.6 – 60.6 (q, J_{C-F} = 35.0, C-4).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_8N_2O_2F_3$ ($M - H^+$) = 293.0538 found 293.0529.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 24.927 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 24.927 min. (method KBDV).

***(E)*-2-cyano-*N*-ethyl-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylamide 47**



$C_{14}H_{13}N_3O$
M = 239,27 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-*N*-ethyl-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylamide **47** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (285 mg, 1.96 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-*N*-ethylacetamide **49** (200 mg, 1.78 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (160 µL, 1.60 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (20 mL). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (300 mg, 70%).

R_f: 0.14 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 238-239 °C.

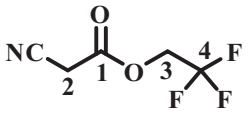
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11.76 (s, 1H, NH), 8.37 (t, J = 8.1 Hz, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H-3), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.54 (s, 1H, H-3‘), 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 1H H-ar), 7.28 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.10 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 3.30 – 3.21 (m, 2H, H-4), 1.10 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 160.5 (C-1), 140.5 (C-3), 137.6, 130.7, 127.9 (C_{IV}-ar), 125.4, 122.1, 120.8, 112.3, 107.8(CH-ar), 117.0 (CN), 102.0 (C-2), 34.6 (C-4), 14.6 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{13}N_3O$ ($M + H^+$) = 240.1137 found 240.1132.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 18.595. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 18.595. (method KBDV).

2,2,2-Trifluoroethyl 2-cyanoacetate 48



$C_5H_4F_3NO_2$
M = 167,09 g.mol^{-1}

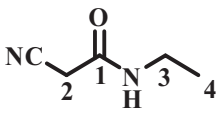
To a solution of phosphorus pentachloride (1.35 g, 6.5 mmol, 1.1 equiv.) in dry dichloromethane (30 mL) was added portionwise 2-cyanoacetic acid **14** (500 mg, 5.9 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 45 minutes. After cooling down to room temperature, a solution of trifluoroethanol **50** (0.47 mL, 6.5 mmol, 1.1 equiv.) and triethylamine (1.23 mL, 8.85 mmol, 1.5 equiv.) in 30 mL of dichloromethane were added dropwise and the reaction mixture was heated under reflux for two hours and then stirred at room temperature overnight. The mixture was then quenched by the addition of water and extracted with dichlorormethane (3 x 8 mL). The combined organic fractions were dried ($MgSO_4$). After removal of the solvent under reduced pressure (b_p = 76-78 °C à 1 Torr), an under pressure distillation gave the desired product as colourless liquid (470 mg, 48%).

R_f: 0.43 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 4.59 (q, J = 8.1 Hz, 2H, H-3), 3.61 (s, 2H, H-2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 161.9 (C-1), 126.3 – 118.3 (q, $J_{C\text{-}F}$ = 274.8, C-4), 112.0 (CN), 62.6 – 61.4 (q, $J_{C\text{-}F}$ = 37.8, C-3), 24.5 (C-2).

2-Cyano-*N*-ethylacetamide 49



$C_5H_8N_2O$
M = 112,13 g.mol^{-1}

2-Cyanoacetic acid **14** (1.02 g, 12 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in DCM (30 mL). A catalytic amount of DMF (0.03 mL) was added at 0 °C following by oxalyl chloride

(1.02 mL, 12 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at 0 °C for another 5 minutes and then at room temperature for 2 hours. The reaction mixture was added to another flask containing the corresponding amine **51** (6 mL, 12 mmol, 1.00 equiv.) and triethylamine (3.34 mL, 24.0 mmol, 2.00 equiv.) in DCM (60 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 5 minutes and then at room temperature for 3 hours. The solvent was removed *in vacuo* and the crude residue was purified by column chromatography over silica gel with cyclohexane and ethyl acetate to give the pure product as an orange solid (400 mg, 30%).

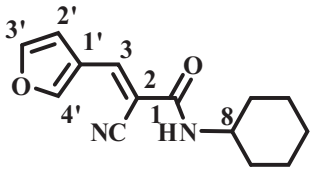
R_f: 0.06 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.21 (bs, 1H, NH), 3.58 (s, 2H, H-2), 3.16 – 3.02 (m, 2H, H-3), 1.02 (t, J = 7.3 Hz, 3H, H-4).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 161.7 (C-1), 116.3 (CN), 34.0 (C-3), 25.3 (C-2), 14.4 (C4).

CAS Registry Number: 15029-36-4.

***(E)*-2-cyano-*N*-cyclohexyl-3-(furan-3-yl)acrylamide 54**



$C_{14}H_{16}N_2O_2$
M = 244,289 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-*N*-cyclohexyl-3-(furan-3-yl)acrylamide **54** was prepared following procedure C using furan-3-carbaldehyde **17b** (180 µL, 2.10 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-N-cyclohexylacetamide **62** (315 mg, 1.89 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (170 µL, 1.70 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as white solid (200 mg, 43%).

R_f: 0.41 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 134 °C.

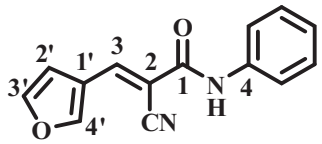
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.43 (s, 1H, H-4‘), 8.14 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H-3), 7.95 – 7.88 (m, 1H, H-3‘), 7.17– 7.12 (m, 1H, H-2‘), 3.70 – 3.60 (m, 1H, H-4), 1.83-1.56 (m, 5H, H-cyclo), 1.37 – 1.20 (m, 4H, H-cyclo), 1.17-1.02 (m, 1H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 160.1 (C-1), 150.1 (C-4‘), 145.9 (C-3‘), 141.1 (C-3), 120.4 (C-1‘), 116.6 (CN), 107.5 (C-2‘), 105.0 (C-2), 48.9 (C-4), 32.0, 25.1, 22.8 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{15}N_2O_2$ (M - H^+) = 243.1134 found 243.1119.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 17.934 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 17.934 min. (method KBDV).

***(E)*-2-cyano-3-(furan-3-yl)-*N*-phenylacrylamide 55**



$C_{14}H_{10}N_2O_2$
M = 238,24 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-3-(furan-3-yl)-*N*-phenylacrylamide **55** was prepared following procedure C using furan-3-carbaldehyde **17b** (150 µL, 1.72 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-*N*-phenylacetamide **63** (250 mg, 1.56 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (140 µL, 1.40 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as white solid (40 mg, 11%).

R_f: 0.81 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

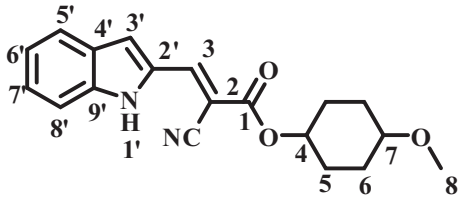
Melting point: 192 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.29 (s, 1H, NH), 8.49 (bs, 1H, H-ar (furane)), 8.23(s, 1H, H-3), 7.91 (bs, 1H, H-ar (furane)), 7.65 (ld, J = 7.6 Hz, 2H, H-ar), 7.37 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-ar), 7.21 (bs, 1H, H-ar (furane)), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-ar).
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 160.3 (C-1), 150.6, 146.2, 142.2, 124.3, 107.6 (CH-ar), 142.2 (C-1‘), 128.8, 120.7 (CH-ar), 120.5 (C-4), 116.5 (CN), 105.3 (C-2).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{10}N_2O_2$ (M + H^+) = 239.0821 found 239.0844.

HPLC: 254.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.196 min. (method KBDV).
280.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.196 min. (method KBDV).

***(E)*-4-methoxycyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate 56**



$C_{19}H_{20}N_2O_3$
M = 324,37 g.mol^{-1}

(E)-4-methoxycyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylate **56** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (195 mg, 1.34 mmol, 1.1 equiv.), 4-methoxycyclohexyl 2-cyanoacetate **60** (240 mg, 1.22 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (110 µL, 1.10 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (20 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow-green solid (250 mg, 63%).

R_f: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 153-154 °C.

Isomer 1:

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 11.89 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-3), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.68 (s, 1H, H-ar), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 7.13 ((t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 4.93 – 4.87 (m, 1H, H-4), 3.32 – 3.26 (m, 1H, H-7), 3.24 (s, 3H, H-8), 1.99 – 1.37 (m, 8H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 161.7 (C-1), 148.8 (C-3), 138.3, 130.4, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.3, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.3 (CN), 112.5, 109.7 (CH-ar), 98.1 (C-2), 75.8 (CH-cyclo), 73.4 (CH-cyclo), 55.2 (C-16), 27.1, 26.9 (CH_2-cyclo).

Isomer 2:

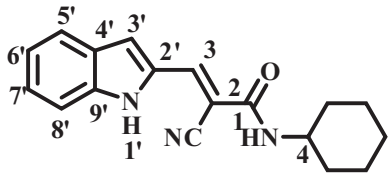
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 11.89 (s, 1H, NH), 8.33 (s, 1H, H-3), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.68 (s, 1H, H-ar), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 7.13 ((t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 5.01 – 4.95 (m, 1H, H-4), 3.32 – 3.26 (m, 1H, H-7), 3.25 (s, 3H, H-8), 1.99 – 1.37 (m, 8H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 161.6 (C-1), 148.7 (C-3), 138.3, 130.4, 127.9 (C_{IV}-ar), 126.3, 122.4, 121.1 (CH-ar), 116.3 (CN), 112.5, 109.6 (CH-ar), 98.3 (C-2), 75.2 (CH-cyclo), 72.3 (CH-cyclo), 54.9 (C-16), 27.1, 26.6 (CH_2-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{19}H_{20}N_2O_3$ (M + H^+) = 325.1552 found 325.1559.

HPLC: 2 isomers: -70% (H_2O/CH_3CN) t_r = 25.495 min. (method KBDV).
- 27% (H_2O/CH_3CN) t_r = 27.555 min.

***(E)*-2-cyano-*N*-cyclohexyl-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylamide 58**



$C_{18}H_{19}N_3O$
M = 294,35 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-*N*-cyclohexyl-3-(1*H*-indol-2-yl)acrylamide **58** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (290 mg, 1.99 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-*N*-cyclohexylacetamide **62** (300 mg, 1.80 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (160 µL, 1.62 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (300 mg, 57%).

R_f: 0.22 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

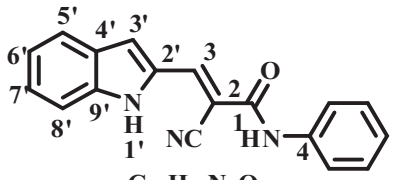
Melting point: 262-263 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ 11.74 (s, 1H, NH), 8.19 - 8.09 (m, 2H, H-3 and NH), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-ar), 7.53 (s, 1H, H-3‘), 7.48 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-ar), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 7.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 3.78 – 3.60 (m, 1H, H-4), 1.77 – 1.70 (m, 4H, H-cyclo), 1.60 – 1.58 (m, 1H, H-cyclo), 1.44 – 1.20 (m, 4H, H-cyclo), 1.20 – 1.03 (m, 1H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ 160.2 (C-1), 140.3 (C-3), 137.7, 130.8, 127.9 (C_{IV}-ar), 125.3, 122.0, 120.7, 112.3, 107.6 (CH-ar), 117.0 (CN), 102.5 (C-2), 49.3 (C-4), 32.0, 25.1, 22.8 (CH_2-cyclo).
HR –ESI-MS calcd for $C_{18}H_{19}N_3O$ (M + H^+) = 294.1606 found 294.1627.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/MeOH) t_r = 17.659. (method KBnuno).
280.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 17.659. (method KBnuno).

***(E)*-2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)-*N*-phenylacrylamide 59**



$C_{18}H_{13}N_3O$
M = 287,32 g.mol^{-1}

(E)-2-cyano-3-(1*H*-indol-2-yl)-*N*-phenylacrylamide **59** was prepared following procedure C using 1*H*-indole-2-carbaldehyde **17c** (250 mg, 1.72 mmol, 1.1 equiv.), 2-cyano-*N*-phenylacetamide **63** (250 mg, 1.56 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (140 µL, 1.40 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (20 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (330 mg, 74%).

R_f: 0.83 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

Melting point: 263 °C.

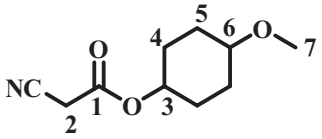
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11.81 (s, 1H, NH), 10.32 (s, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, H-3), 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.69 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-ar), 7.63 (s, 1H, H-3‘), 7.53 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-ar), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-ar), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-ar), 7.18 – 7.10 (m, 2H, H-ar).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 160.4 (C-1), 141.0 (C-3), 138.3, 137.9, 130.7, 127.9 (C_{IV}-ar), 128.7, 120.7, 125.6, 124.3, 122.1, 120.8, 112.4, 108.3 (CH-ar), 116.9 (CN), 102.6 (C-2).

HR –ESI-MS calcd for $C_{18}H_{13}N_3O$ ($M + H^+$) = 288.1137 found 288.1121.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 24.016 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 24.016 min. (method KBDV).

4-Methoxycyclohexyl 2-cyanoacetate 60



$C_{10}H_{15}NO_3$
M = 197,23 g.mol^{-1}

4-Methoxycyclohexyl 2-cyanoacetate **60** was prepared following procedure B using cyanoacetic acid **14** (200 mg, 2.3 mmol, 1.0 equiv.) and 4-methylcyclohexano **64**l (450 mg,

3.45 mmol, 1.5 equiv.) in toluene (10 mL). The crude product was purified by chromatography (SiO2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v) on silica gel to give the product as yellow oil (150 mg, 31%).

R_f: 0.22 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Isomer 1:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.90 - 4.66 (m, 1H, H-3), 3.44 (s, 2H, H-2), 3.31 (s, 3H, H-7), 3.30 – 3.22 (m, 1H, H-6), 1.95-1.13 (m, 8H, H-cyclo).

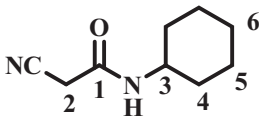
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 162.5 (C-1), 113.2 (CN), 75.2 (CH-cyclo), 74.2 (CH-cyclo), 55.7 (C-7), 27.6, 27.1 (CH_2-cyclo), 25.1 (C-2).

Isomer 2:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.90 - 4.66 (m, 1H, H-3), 3.43 (s, 2H, H-2), 3.31 (s, 3H, H-7), 3.30 – 3.22 (m, 1H, H-6), 1.95-1.13 (m, 8H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 162.5 (C-1), 113.2 (CN), 76.5 (CH-cyclo), 74.9 (CH-cyclo), 56.0 (C-7), 27.1, 26.9 (CH_2-cyclo), 25.1 (C-2).

2-Cyano-*N*-cyclohexylacetamide 62



$C_9H_{14}N_2O$
M = 166,220 g.mol^{-1}

To a solution of sodium ethoxide (6.9 mg, 0.1 mmol, 0.01 equiv.) in dry ethanol (3 mL), were added cyclohexylamine **66** (1.0 g, 10 mmol, 1.0 equiv.) and ethyl 2-cyanoacetate **29** (1.13 g, 0.10 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 72 hours. The precipitate was filtered and washed with ether to give the desired product as white solid (570 mg, 34%).

R_f: 0.20 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

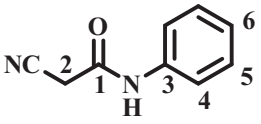
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.11 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 3.57 (s, 2H, H-2), 3.54 – 3.46 (m, 1H, H-3), 1.78-1.49 (m, 5H, H-cyclo), 1.32 – 1.07 (m, 5H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 161.0 (C-1), 116.3(CN), 48.2 (C-3), 32.1 (C-2), 25.4 (C-cyclo), 25.1 (C-6), 24.3 (C-cyclo).

CAS Registry Number: 15029-38-6

The NMR is in agreement with the literature.[124]

2-Cyano-*N*-phenylacetamide 63



$C_9H_8N_2O$
M = 160,17 g.mol^{-1}

To a solution of phosphorus pentachloride (1.2 g, 5.9 mmol, 1.0 equiv.) in dry dichloromethane (100 mL) was added portionwise 2-cyanoacetic acid **14** (500 mg, 5.9 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was heated under reflux for 30 minutes. After cooling down to room temperature, aniline **67** (0.54 mL, 5.9 mmol, 1.0 equiv.) was added and the reaction mixture was heated under reflux overnight. Solvents were removed *in vacuo* and water was poured. The solid was filtered and washed with a saturated solution of sodium hydrogen carbonate and water. The product was obtained as a yellow solid (890 mg, 94%).

R_f: 0.48 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:1, v/v).

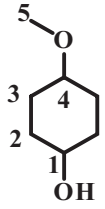
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-*d_6*): δ 9.51 (bs, 1H, NH), 7.62 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-4), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-5), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-6), 3.82 (s, 2H, H-2).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d_4*): δ 162.7 (C-1), 139.3 (C-3), 129.9, 125.7, 121.1 (CH-ar), 115.9 (CN), 27.1 (C-2).

CAS Registry Number: 621-03-4.

The NMR is in agreement with the literature.[176]

4-Methoxycyclohexanol 64



$C_7H_{14}O_2$
M = 130,185 g.mol^{-1}

A mixture of 1,4-dihydroxycyclohexane **68** (5 g, 43.1 mmol, 1.0 equiv.), KOH (2.65 g, 47.4 mmol, 1.1 equiv.), and water (5 mL) was heated under reflux until it became a clear solution. After removal of water *in vacuo*, iodomethane (4 mL, 64.3 mmol, 1.5 equiv.), was added and the mixture was heated under reflux for 5 hours. The mixture was then quenched by the addition of water and extracted with DCM (3 x 8 mL). The combined organic fractions were dried ($MgSO_4$). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow oil (2 isomers, 1.4 g, 25%).

R_f: 0.15 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Isomer 1:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.30 (s, 3H, H-5), 3.27 – 3.20 (m, 2H, H-1 and H-4), 1.82 – 1.66 (m, 4H, H-cyclo), 1.63 – 1.47 (m, 4H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 78.2 (CH-cyclo), 69.6 (CH-cyclo), 55.6 (C-5), 30.4 and 27.1 (CH_2-cyclo).

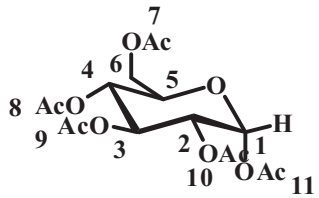
Isomer 2:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.30 (s, 1.5H, H-5), 3.21 – 3.13 (m, 1H, H-1 and H-4), 2.06 – 1.94 (m, 2H, H-cyclo), 1.33 – 1.20 (m, 2H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 75.7 (CH-cyclo), 68.4 (CH-cyclo), 56.0 (C-5), 32.7 and 29.0 (CH_2-cyclo).

CAS Registry Number: 18068-06-9

α -D-glucose pentaacetate 69



$C_{16}H_{22}O_{11}$
M = 390.34 g.mol^{-1}

To a solution of acetic anhydride (41.1 mL, 499.5 mmol, 9.0 equiv.) and pyridine (67 mL, 832.5 mmol, 15.0 equiv.) at 0°C was added D-Glucose **65** (10.0 g, 55.5 mmol, 1.0 equiv.). The solution was allowed to warm at room temperature and stirred for 24 hours. After TLC control, cold water and ice were added to quench the reaction. The solution was filtered and

the solid was recristallized in ethanol. The product was obtained as a white solid (16.6 g, 78%).

R_f: 0.1 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

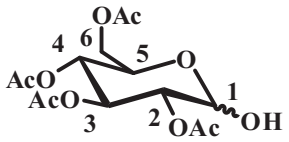
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.33 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.47 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3), 5.16 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-4), 5.11 (dd, J= 9.9, 3.7 Hz, 1H, H-2), 4.27 (dd, J=12.7, 4.3 Hz, 1H, H-6), 4.15-4.04 (m, 2H, H-5 and H-6‘), 2.18 (s, 3H, H-7), 2.09 (s, 3H, H-9), 2.04 (s, 3H, H-8), 2.03 (s, 3H, H-10), 2.02 (s, 3H, H-11).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 170.8 (C_{IV}-11), 170.4 (C_{IV}-9), 169.8 (C_{IV}-10), 169.5 (C_{IV}-8), 168.9 (C_{IV}-7), 89.2 (C-1), 70.0 (C-3), 69.3 (C-2), 68.0 (C-4), 61.6 (C-6), 21.0 (**C**H_3-11), 20.9 (**C**H_3-9), 20.8 (**C**H_3-10), 20.7 (**C**H_3-8), 20.6 (**C**H_3-7).

CAS Registry Number: 604-68-2.

The NMR is in agreement with the literature.[177]

2, 3, 4, 6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose 71



$C_{14}H_{20}O_{10}$
M = 348.30g.mol^{-1}

To a solution of imidazole (177 mg, 2.60 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (15mL), was added peracetylated glucose **69** (1.0 g, 2.60 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred for 24h at room temperature. After TLC control, the solution was concentrated and the residue was washed with water and extracted with EtOAc (3x15 mL). The combined extracts were washed with 1N HCl. The organic layer was dried, concentrated and purified by flash column (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/). The product was obtained as light yellow oil (649 mg, 71%, α/β: 4/1).

R_f: 0.3 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

Isomer α:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.54 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.47 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-1), 5.13 – 5.03 (m, 1H, H-4), 4.89 (dd, *J* = 9.5 Hz, 3.4 Hz, 1H, H-2), 4.32 – 4.19 (m, 2H, H-5 and H-6), 4.11 – 4.04 (m, 1H, H-6‘), 2.09, 2.08, 2.04, 2.03 (s, 12H, 4 × Ac).

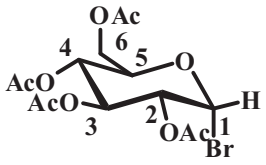
Isomer β:

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.26 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.13 – 5.03 (m, 1H, H-4), 4.88 (dd, *J* = 9.5 Hz, 8.1 Hz, 1H, H-2), 4.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-1), 4.32 – 4.19 (m, 2H, H-5 and H-6), 4.11 – 4.04 (m, 1H, H-6‘), 2.09, 2.08, 2.03, 2.02 (s, 12H, 4 × Ac).

CAS Registry Number: 10343-06-3.

The NMR is in agreement with the literature.[178]

2, 3, 4, 6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide 72



$C_{14}H_{19}BrO_9$
Mol = 411.20 g.mol^{-1}

To an hydrogen bromide solution (33% w/t AcOH, 200 mL) was added peracetylated glucose **69** (3.9 g, 9.99 mmol). The reaction mixture was stirred for 5h at room temperature. After TLC control, the solution was concentrated and the residue was diluted with DCM, washed with water and sodium carbonate until pH 7. The organic layer was dried with magnesium sulfate. The product was obtained as yellow oil (4.17 g, quantitatif).

R_f: 0.7 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 5:5, v/v).

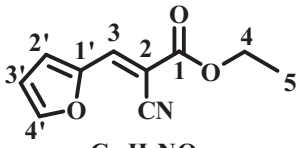
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-1), 5.55 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-4), 5.14 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-3), 4.83 (dd, *J* = 10.2, 4.0 Hz, 1H, H-2), 4.36 – 4.25 (m, 2H, H-5 and H-6), 4.16 – 4.11 (m, 1H, H-6‘), 2.09, 2.08, 2.04, 2.03 (s, 12H, 4×Ac).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.7, 170.0, 169.9, 169.6 (C_{IV}-Ac), 86.7 (C-1), 72.2 (C-5), 70.7 (C-2), 70.3 (C-3), 67.3 (C-4), 61.0 (C-6), 20.8 - 20.7 (4 ×CH_3, Ac).

CAS Registry Number: 3068-32-4.

The NMR is in agreement with the literature.[179]

(*E*)-ethyl 2-cyano-3-(furan-2-yl)acrylate 73



$C_{10}H_9NO_3$
M = 191.18 g.mol^{-1}

To a solution of furan-2-carbaldehyde **85** (450 µL, 5.20 mmol, 1.0 equiv.) in water (20 mL) was added ethyl-2-cyanoacetate **28** (590 mg, 5.20 mmol, 1.0 equiv.). The reaction was carried out at room temperature for 72 hours. The solid produced was isolated by filtration and dried to give the desired product as a pale yellow solid (160 mg, 16%).

Melting point: 91 – 92 °C.

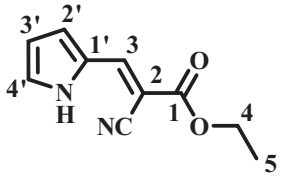
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.22 (dd, *J* = 1.1 Hz, 0.6 Hz, 1H, H-ar), 8.14 (s, 1H, H-3), 7.52 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-ar), 6.87 (dd, *J* = 3.6 Hz, 1.7 Hz, 1H, H-ar), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 162.2 (C-1), 150.1 (CH-ar), 148.2 (C-1‘), 139.2 (C-3), 124.7 (CH-ar), 115.4 (CN), 114.4 (CH-ar), 96.9 (C-2), 62.2 (C-4), 14.0 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{10}H_{10}NO_3$ ($M + H^+$) = 192.0661 found 192.0654.

HPLC: 254.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 15.603 min. (method KBDV)
280.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 15.603 min. (method KBDV)

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-pyrrol-2-yl)acrylate 74**



$C_{10}H_{10}N_2O_2$
M = 190,20 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-pyrrol-2-yl)acrylate **74** was prepared following procedure C using 1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde **86** (250 mg, 2.63 mmol, 1.1 equiv.), ethyl-2-cyanoacetate **28** (270 mg, 2.39 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (213 µL, 2.15 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (300 mg, 66%).

R_f: 0.14 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 136-138 °C.

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.12 (s, 1H, H-3), 7.46 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-ar), 7.30 (dd, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H, H-ar), 6.51 - 6.44 (m, 1H, H-ar), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 165.4 (C-1), 143.9 (C-3), 129.0 (CH-ar), 128.1 (C-1‘), 120.1 (CH-ar), 118.2 (CN), 114.2 (CH-ar), 92.7 (C-2), 62.9 (C-4), 14.6 (C-5).

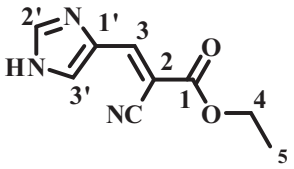
HR –ESI-MS calcd for $C_{10}H_{11}N_2O_2$ ($M + H^+$) = 191.0821 found 191.0822.

HPLC: 97% (H_2O/CH_3CN) t_r = 15.590 min. (method KBNUNO).

CAS Registry Number: 123293-46-9.

The NMR is in agreement with the literature.[180]

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-imidazol-4-yl)acrylate 75**



$C_9H_9N_3O_2$
M = 191,19 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(1*H*-imidazol-4-yl)acrylate **75** was prepared following procedure C using 1*H*-imidazole-4-carbaldehyde **87** (250 mg, 2.60 mmol, 1.1 equiv.), ethyl-2-cyanoacetate **28** (270 mg, 2.37 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (210 µL, 2.13 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (350 mg, 77%).

R_f: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 8:2, v/v).

Melting point: 176-177 °C.

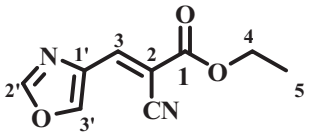
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 12.93 (bs, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H-3), 8.09 (s, 1H, H-ar), 7.99 (s, 1H, H-ar), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 162.9 (C-1), 146.6 (C-3), 139.1 (CH-ar), 134.1 (C-1‘), 128.3 (CH-ar), 115.9 (CN), 96.0 (C-2), 61.7 (C-4), 14.0 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{10}H_{11}N_2O_2$ (M + H^+) = 191.0821 found 191.0822.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 12.382 min. (method KBDV).
280.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 12.382 min. (method KBDV).

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(oxazol-4-yl)acrylate 76**



$C_9H_9N_3O_2$
M = 191,187 g.mol^{-1}

To a solution of 4-oxazolecarboxaldehyde **88** (250 mg, 2.58 mmol, 1.0 equiv.) in water (10 mL) was added ethyl-2-cyanoacetate **28** (291 mg, 2.58 mmol, 1.0 equiv.). The reaction was carried out at room temperature for 72 hours. The solid produced was isolated by filtration and dried to give the desired product as a pale beige solid (200 mg, 41 %).

Melting point: 132 – 134 °C.

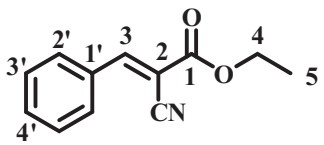
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.68 (s, 1H, H-3), 8.36 (s, 1H, H-ar), 8.22 (s, 1H, H-ar), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 154.5 (C-1), 151.5 (CH-ar), 144.5 (C-3), 136.7 (CH-ar), 136.1 (C-1‘), 115.9 (CN), 105.4 (C-2), 64.0 (C-4), 14.6 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_9H_9N_2O_3$ (M + H^+) = 193.0613 found 193.0605.

HPLC: 254.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 11.865 min. (method KBDV)
280.4 nm: 99% (H_2O/CH_3CN) t_r = 11.865 min. (method KBDV)

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-phenylacrylate 77**



$C_{12}H_{11}NO_2$
M = 201,22 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-phenylacrylate **77** was prepared following procedure C using benzaldehyde **89** (0.30 mL, 2.92 mmol, 1.1 equiv.), ethyl-2-cyanoacetate (300 mg, 2.65 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (236 µL, 2.39 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (450 mg, 84%).

R_f: 0.55 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 46 °C.

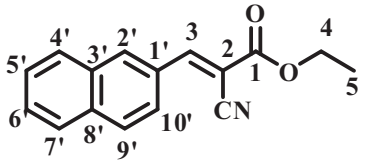
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.25 (s, 1H, H-3), 8.02-7.95 (d, J = 6.8 Hz, 2H, H-2‘), 7.59 - 7.47 (m, 3H, H-3‘, H-4‘), 4.39 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 162.5 (C-1), 155.1 (C-3), 133.3 (C-4‘), 131.5 (C-1‘), 131.1 and 129.3 (CH-ar), 115.5 (CN), 103.1 (C-2), 62.8 (C-4), 14.2 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{12}H_{12}NO_2$ ($M + H^+$) = 202.0868 found 202.0863.

HPLC: 254.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 18.613 min. (method KBnuno).
254.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 18.613 min. (method KBnuno).

***(E)*-ethyl 2-cyano-3-(naphthalen-2-yl)acrylate 78**



$C_{16}H_{13}NO_2$
M = 251,28 g.mol^{-1}

(E)-ethyl 2-cyano-3-(naphthalene-2-yl)acrylate **78** was prepared following procedure C using 2-naphthaldehyde **90** (400 mg, 2.56 mmol, 1.1 equiv.), ethyl-2-cyanoacetate **28** (263 mg, 2.33 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (210 µL, 2.10 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as beige solid (380 mg, 65%).

R_f: 0.43 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 114-115 °C.

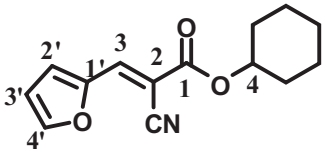
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 8.60 (s, 1H, H-2‘), 8.53 (s, 1H, H-3), 8.21 (dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 1H, H-ar), 8.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-ar), 8.03 (m, 2H, H-ar), 7.71 (td , *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-ar), 7.65 (td , *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-ar), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-4), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 162.0 (C-1), 155.0 (C-3), 134.8 (C_{IV}-ar), 134.4 (CH-ar), 132.4 (C_{IV}-ar), 129.3, 129.3 (CH-ar), 129.0 (C_{IV}-ar), 129.0, 127.9, 127.5, 124.6 (CH-ar), 115.8 (CN), 102.4 (C-2), 62.4 (C-4), 14.0 (C-5).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{14}NO_2$ ($M + H^+$) = 252.1025 found 252.1013.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.820 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.820 min. (method KBDV).

***(E)*-cyclohexyl 2-cyano-3-(furan-2-yl)acrylate 79**



$C_{14}H_{15}NO_3$
M = 245,27 g.mol^{-1}

To a stirred solution of 2-furaldehyde **85** (225 µl, 2.60 mmol, 1.5 equiv.), ester **30** (289 mg, 1.73 mmol, 1 equiv.) and dry THF (13 mL) was added TiCl4 (1M in DCM, 3.46 ml, 3.46 mmol, 2 equiv.) at room temperature. The mixture was vigorously stirred for 0.5 h, followed by adding dropwise Et_3N (965 µL, 6.92 mmol, 4 equiv.). After being kept for an additional 40 h, the reaction was quenced by adding water (3 mL), and the obtained mixture was extracted with DCM. The organic layer was washed with a solution of 15% $NaHSO_3$ and dried over anhydrous Na_2SO_4, followed by concentration under reduced pressure. The product was obtained as a yellow solid (370 mg, 85%).

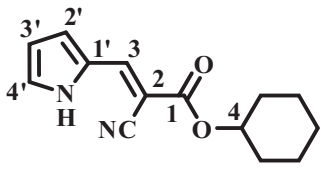
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.06 (s, 1H, H-3), 7.94 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-ar), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz,, 1H, H-ar), 6.77 (dd, *J* = 3.7, 1.7 Hz, 1H, H-ar), 4.98 – 4.89 (m, 1H, H-4), 1.99 – 1.70 (m, 4H, H-cyclo), 1.66 – 1.32 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 163.3 (C-1), 150.3 (C-3), 150.2 (C_{IV}-ar), 140.3 (CH-ar), 123.7 (CH-ar), 116.3 (CN), 115.0 (CH-ar), 99.6 (C-2), 76.2 (C-4), 32.4, 26.4, 24.5 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{14}NO_2$ $(M + H^+)$ = 252.1025 found 252.1013.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.820 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 21.820 min. (method KBDV).

_(E)_-cyclohexyl 2-cyano-3-(1_H_-pyrrol-2-yl)acrylate 80



$C_{14}H_{16}N_2O_2$
M = 244,29 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-pyrrol-2-yl)acrylate **80** was prepared following procedure C using 1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde **86** (250 mg, 2.63 mmol, 1.1 equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **30** (400 mg, 2.39mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (212 µL, 2.15 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (300 mg, 51%).

R_f: 0.43 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v).

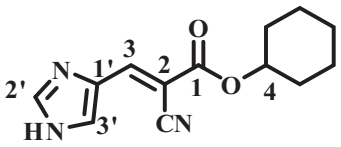
Melting point: 146 °C.
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 12.07 (bs, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H-3), 7.48 – 7.36 (m, 2H, H-ar), 6.52 – 6.40 (m, 1H, H-ar), 4.91 – 4.76 (m, 1H, H-4), 1.89 – 1.62 (m, 4H, H-cyclo), 1.57 – 1.26 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 162.7 (C-1), 142.6 (C-3), 128.3 (CH-ar), 126.5 (C-1‘), 117.3 (CH-ar), 117.2 (CN), 113.4 (CH-ar), 91.3 (C-2), 73.4 (C-4), 31.0, 24.9, 22.9 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{17}N_2O_2$ $(M + H^+)$ = 245.1223 found 245.1345.

HPLC: 254.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 20.038 min. (method KBDV).
280.4 nm: 96% (H_2O/CH_3CN) t_r = 20.038 min. (method KBDV).

(_E_)-cyclohexyl 2-cyano-3-(1_H_-imidazol-4-yl)acrylate 81



$C_{13}H_{15}N_3O_2$
M = 245,28 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-(1*H*-imidazol-4-yl)acrylate **81** was prepared following procedure C using 1*H*-imidazole-4-carbaldehyde **87** (300 mg, 3.12 mmol, 1.1 equiv.), cyclohexanol-2-cyanoacetate **30** (475 mg, 2.84 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (255 µL, 2.55 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (40 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (440 mg, 63%).

R_f: 0.26 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 8:2, v/v).

Melting point: 172-173 °C.

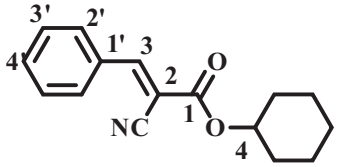
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ 12.94 (bs, NH), 8.17 (s, 1H, H-3), 8.10 (s, 1H, H-ar), 8.00 (s, 1H, H-ar), 4.80 (m, 1H, H-4), 1.90 – 1.26 (m, 10H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ 162.3 (C-1), 146.9, 146.8, 146.7 (C-3 and CH-ar), 115.9 (CN), 96.6 (C-2), 73.7 (C-4), 30.9, 24.8, 22.9 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{13}H_{15}N_3O_2$ $(M + H^+)$ = 246.1243 found 246.1235.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 18.724 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 18.724 min. (method KBDV).

_(E)_-cyclohexyl 2-cyano-3-phenylacrylate 83



$C_{16}H_{17}NO_2$
M = 255,117 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-phenylacrylate **83** was prepared following procedure C using benzaldehyde **89** (240 µL, 2.36 mmol, 1.1 equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **30** (360 mg,

2.14 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (190 µL, 1.93 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as white solid (400 mg, 73%).

R_f: 0.56 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 1:9, v/v).

Melting point: 72-73 °C.

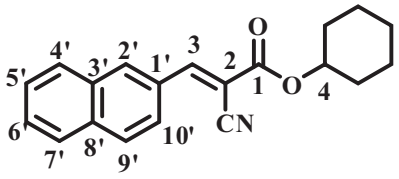
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d_6*): δ 8.39 (s, 1H, H-3), 8.09 – 8.01 (m, 2H, H-2‘), 7.69 – 7.54 (m, 3H, H-3‘ and H-4‘), 4.96 – 4.86 (m, 1H, H-4), 1.93 - 1.65 (m, 4H, H-cyclo), 1.60 – 1.28 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d_6*): δ 161.1 (C-1), 155.0 (C-3), 133.3 (CH-ar), 131.4 (C-1‘), 130.8, 129.3 (CH-ar), 115.5 (CN), 103.0 (C-2), 74.4 (C-4), 30.7, 24.8, 22.8 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{18}NO_2$ ($M + H^+$) = 256.1268 found 256.1396.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.714 min. (method KBDV).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 23.714 min. (method KBDV).

<u>*(E)*-cyclohexyl 2-cyano-3-(naphthalen-2-yl)acrylate 84</u>



$C_{20}H_{19}NO_2$
M = 305,37 g.mol^{-1}

(E)-cyclohexyl 2-cyano-3-(naphthalene-2-yl)acrylate **<u>84</u>** was prepared following procedure C using 2-naphthaldehyde **<u>90</u>** (400 mg, 2.56 mmol, 1.1 equiv.), cyclohexyl-2-cyanoacetate **<u>30</u>** (390 mg, 2.33 mmol, 1.0 equiv.) and piperidine (210 µL, 2.10 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (30 mLFlash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: cyclohexane - ethyl acetate: 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as white solid (515 mg, 73%).

R_f: 0.67 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

Melting point: 97-98 °C.

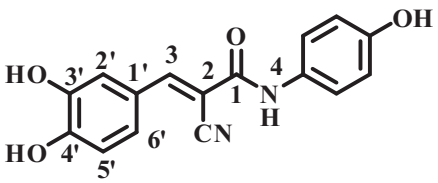
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.59 (s, 1H, H-2‘), 8.51 (s, 1H, H-3), 8.21 (dd, J = 8.7, 1.5 Hz, 1H, H-ar), 8.10 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-ar), 8.03 (m, 2H, H-ar),), 7.71(td, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-ar), 7.64 (td, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-ar), 5.01 - 4.84 (m, 1H, H-4), 1.93-1.67 (m, 4H, H-cyclo), 1.61 – 1.28 (m, 6H, H-cyclo).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 161.2 (C-1), 154.8 (C-3), 134.8 (C_{IV}-ar), 134.4 (CH-ar), 132.3 (C_{IV}-ar), 129.3, 129.2, 128.9, 127.8, 127.4, 124.5 (CH-ar), 115.8 (CN), 102.7 (C-2), 74.4 (C-4), 30.7, 24.8, 22.8 (C-cyclo).

HR –ESI-MS calcd for $C_{20}H_{20}NO_2$ ($M + H^+$) = 306.1494 found 306.1508.

HPLC: 254.4 nm: 97% (H_2O/MeOH) t_r = 23.897 min. (method KBNUNO).
280.4 nm: 95% (H_2O/MeOH) t_r = 23.897 min. (method KBNUNO).

(*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*-(4-hydroxyphenyl) acrylamide 91



$C_{16}H_{12}N_2O_4$
M = 296,28 g.mol^{-1}

To a solution of (*E*)-*N*-(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide **95** (490 mg, 1.19 mmol, 1.0 equiv.) in anhydrous THF (8 mL) under argon atmosphere was added a solution of 1M TBAF in THF (2.38 mL, 2.38 mmol, 2.0 equiv.). The reaction was carried out at room temperature for 15 hours. The mixture was then quenched by the addition of saturated aqueous solution NaCl and water (50/50) and extracted with Ethyl acetate (3 x 8 mL). The combined organic fractions were dried ($MgSO_4$). After removal of the solvent under reduced pressure, flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate, 1:0 to 0:1, v/v) gave the desired product as yellow solid (300 mg, 84%).

R_f: 0.14 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 6:4, v/v).

Melting point: 256-257 °C.

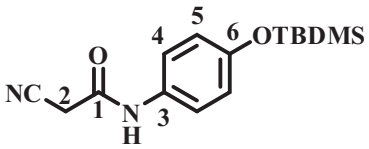
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ 8.05 (s, 1H, H-3), 7.63 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-2‘), 7.41 - 7.33 (m, 3H, H-ar), 6.89 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-ar), 6.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-ar).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 163.0 (C-1), 156.2 (C_{IV}-ar), 153.1 (C-3), 152.3 and 147.0, 130.8 (C_{IV}-ar), 127.0 (CH-ar), 125.4 (C-1‘), 124.7 (CH-ar), 118.0 (CN), 117.5, 116.7, 116.3 (CH-ar), 102.1 (C-2).

HR –ESI-MS calcd for $C_{16}H_{19}N_2O_4$ ($M + H^+$) = 297.0875; found 297.0865.

HPLC: 96% (H_2O/MeOH) t_r = 13.081 min. (method KBNUNO).

<u>*N*-(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)-2-cyanoacetamide 92</u>



$C_{15}H_{22}N_2O_2Si$
M = 290,43 g.mol^{-1}

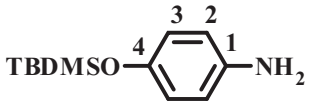
To a mixture of 4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)aniline **<u>94</u>** (1.53 g, 6.85 mmol, 1.0 equiv.) in 6 mL dichloromethane was added dropwise a solution of cyanoacetic acid **<u>14</u>** (0.58 g, 6.85 mmol, 1.0 equiv.) in 12 mL dichloromethane at room temperature. After the addition, a solution of DCC (1.41 g, 6.85 mmol, 1.0 equiv. in 9 mL of dichloromethane) was added to the mixture. Then the mixture was heated to reflux for 24 hours. After cooling down, the precipitate was filtrated and the filtrate was concentrated under vacuum and purified by column chromatography to give the pure product (1.57 g, red powder, 79%).

Rf: 0.23 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.03 (bs, 1H, NH); 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-ar); 6.80 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-ar); 3.54 (s, 2H, H-2); 0.97 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$); 0.19 (s, 6H, CH_3×2).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 159.2 (C-1), 153.5 (C-6); 130.2 (C-3); 122.3 and 120.6 (CH-ar), 114.8 (CN), 26.8 (C-2), 25.8 (C(**C**H$_3$)$_3$); 18.3 (**C**(CH$_3$)$_3$); 4.3 (CH_3×2).

<u>4-(*Tert*-butyldimethylsilyloxy)aniline 94</u>



$C_{12}H_{21}NOSi$
M = 223,39 g.mol^{-1}

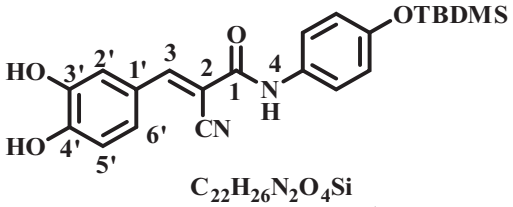
To a solution of 4-aminophenol **93** (1.00 g, 9.16 mmol, 1.05 equiv.) in THF (40 mL) was added imidazole (1.19 g, 17.44 mmol, 2 equiv.). The reaction was cooled to 0 °C and TBDMSCl (1.31 g, 8.72 mmol, 1.0 equiv.) was added. The solution was warmed to ambient temperature and stirred overnight. The mixture was washed with NaOH (0.5 N aq.). The basic aqueous phases were back-extracted with ethyl acetate (10 mL) and the combined organics were washed with brine (10 mL). The organics were dried over MgSO4, filtered, and concentrated to give 4-(tert-butyldimethylsilyloxy)aniline (1.53 g, red oil, 97%).

Rf: 0.33 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v)

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 6.68-6.59 (m, 4H, H-ar); 0.98 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$); 0.15 (s, 6H, CH_3×2).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 1495 (C-4), 142.2 (C-1), 121.5, 118.1 (CH-ar), 26.32 (C(**C**H$_3$)$_3$); 19.0 (**C**(CH$_3$)$_3$); 4.4 (CH_3×2).

(*E*)-*N*-(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide 95



$C_{22}H_{26}N_2O_4Si$
M = 410,54 g.mol^{-1}

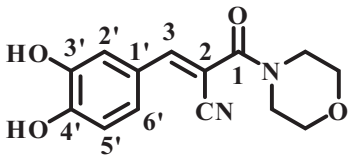
(*E*)-*N*-(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide **95** was prepared following procedure C using 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (238 mg, 1.72 mmol, 1.0 equiv.), *N*-(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)-2-cyanoacetamide **92** (550 mg, 1.89 mmol, 1.1 equiv.) and piperidine (155 µl, 1.55 mmol, 0.9 equiv.) in anhydrous DCM (35 mL). Flash chromatography purification of the residue on silica gel (cyclohexane - ethyl acetate: 0% to 100% ethyl acetate) gave the desired product as an orange powder (635 mg, 90%).

R_f: 0.23 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 8.06 (s, 1H, H-3), 7.64 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-2‘), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-ar), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H-6‘), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5‘), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-ar), 1.00 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$), 0.21 (s, 6H, CH_3×2).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 163.0 (C-1), 154.3 (C_{IV}-ar), 153.3 (C-3), 152.6 and 147.1 (C_{IV}-ar), 132.8 (C-4), 127.2 (CH-ar), 125.3 (C-1‘), 124.4 and 121.2 (CH-ar), 118.0 (CN), 117.5 and 116.7 (CH-ar), 101.9 (C-2), 26.2 (C(**C**H_3)$_3$), 5.9 (**C**(CH_3)$_3$), -4.3 (CH_3×2).

(*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(morpholine-4-carbonyl)acrylonitrile 97



$C_{14}H_{14}N_2O_4$
M = 274,27 g.mol^{-1}

To a mixture of 3-morpholino-3-oxopropanenitrile **98** (500 mg, 3.24 mmol, 1.1 equiv.), 3,4-dihydroxybenzaldehyde **17a** (407 mg, 2.95 mmol, 1.0 equiv.) and 15 mL toluene were added 0.10 mL piperidine (1.03 mmol, 0.35 equiv.) and 0.40 mL acetic acid (6.79 mmol, 2.3 equiv.). Then the mixture was heated to reflux until the TLC test shows the reaction is complete. Cooled the mixture to room temperature, then the precipitate was filtered, washed to afford yellow solid (600 mg, 74%).

Rf : 0.14 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 7:3, v/v).

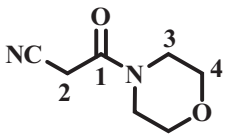
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 7.56 (m, 2H, H-3 and H-2‘) ; 7.28 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H-6‘); 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5‘); 3.77-3.64 (m, 8H, H-morph).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d*$_4$): δ 166.1 (C-1), 153.4 (C-3), 151.9 and 147.0 (C_{IV}-ar), 126.3, 116.9, 116.6 (CH-ar), 125.6 (C-1‘), 117.7 (CN), 101.3 (C-2), 67.6 (C-morph).

HR –ESI-MS calcd for $C_{14}H_{15}N_2O_4$ ($M + H^+$) = 275.1032; found 275.1019.

HPLC: 254.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 13.697 min. (method KBnuno).
280.4 nm: 95% (H_2O/CH_3CN) t_r = 13.697 min. (method KBnuno).

3-Morpholino-3-oxopropanenitrile 98



$C_7H_{10}N_2O_2$
M = 154,17 g.mol^{-1}

To a mixture of morpholine **99** (1 mL, 11.8 mmol, 1.0 equiv.) in 4 mL dichloromethane was added dropwise a solution of cyanoacetic acid **14** (1.0 g, 11.8 mmol, 1.0 equiv. in 8 mL dichloromethane) at room temperature. After the addition, a solution of DCC (2.4 g, 11.8

mmol, 1.0 equiv.) in 5 mL of dichloromethane was added to the mixture. Then the mixture was heated to reflux for 24 hours. After cooling down, the precipitate was filtrated and the filtrate was concentrated under vacuum to give pure product (beige solid, 1.8 g, 100%).

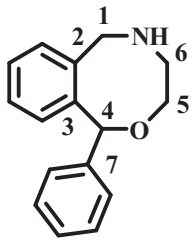
Rf : 0.08 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 4:6, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.75-3.65 (m, 4H, H-morph); 3.65-3.59 (m, 2H, H-morph); 3.49 (s, 2H, H-2); 3.48-3.42 (m, 2H, H-morph).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 160.4 (C-1), 113.9 (CN), 66.6, 66.3 (C-4), 46.8, 42.9 (C-3), 24.8 (C-2).

CAS Registry Number: 15029-32-0.

1-Phenyl-3,4,5,6-tetrahydro-1*H*-benzo[*f*][1,4]oxazocine 101



$C_{16}H_{17}NO$
M = 239.31g.mol^{-1}

To a solution of 1-phenyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*f*][1,4]oxazocine-5(6*H*)-carbonitrile **102** (200 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv.) in 5mL of THF under argon was added dropwise lithium aluminum hydride (86.5 mg, 2.28 mmol, 3.0 equiv.) at 0°C. Then the mixture was heated under reflux for 24h. The reaction mixture was quenched with a solution of MeOH/H_2O. The solution was concentrated and purified on C-18 flash column. The product was obtained as a brown/yellow oil (50 mg, 28%).

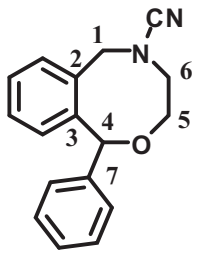
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ 7.29 – 7.16 (m, 8H, H-Ar), 7.05 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-Ar), 5.82 (s, 1H, H-4), 4.72 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-1), 4.01 (ddd, J = 12.3, 6.3, 3.1 Hz, 1H, H-5), 3.87 (d, J = 13.0 Hz, 1H, H-1), 3.82 (ddd, J = 12.3, 6.3, 3.1 Hz, 1H, H-5), 2.94 – 2.78 (m, 2H, H-6).

^{13}C NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ 144.2, 142.1, 138.0 (C_{IV}-ar), 133.3, 130.0, 129.3, 129.2, 128.8, 128.5, 128.4 (CH-Ar), 85.2 (C-4), 71.7 (C-5), 51.5 (C-1), 47.1 (C-6).

CAS Registry Number: 46868-19-3.

The NMR is in agreement with the literature.[164]

1-phenyl-3,4,5,6-tetrahydro-1*H*-2,5-benzoxazocine-5-carbonitrile 102



$C_{17}H_{16}N_2O$
M = 264,32 g.mol^{-1}

To a solution of cyanogen bromide (443 mg, 4.18 mmol, 2 equiv.), in dry ethanol-free chloroform (110 mL) was added anhydrous potassium carbonate (3.75g, 27.20 mmol, 13 equiv.). A solution of 2-(1-phenylisoindolin-2-yl)ethanol **103** (500 mg, 2.09 mmol, 1.0 equiv.), in dry ethanol-free chloroform (35 mL) was added dropwise over a period of 30 minutes. The mixture was heated under reflux under nitrogen overnight, cooled and filtered. The filtrate was washed with water. The organic layer was then dried and the residue was purified by flash chromatography to give the product as a white solid (90 mg, 31%).

Rf: 0.21 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

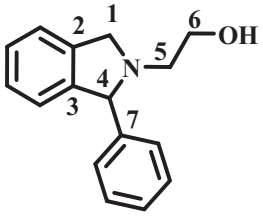
^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ 7.37 – 7.32 (m, 3H, H-Ar), 7.31 – 7.19 (m, 6H, H-Ar), 5.88 (s, 1H, H-4), 5.05 (d, J = 13.9 Hz, 1H, H-1), 4.26 (d, J = 13.9 Hz, 1H, H-1), 4.11 (ddd, J = 12.3, 4.0, 2.6 Hz, 1H, H-5), 3.86 (ddd, J = 12.3, 9.2, 2.1 Hz, 1H, H-5), 3.50 (ddd, J = 14.6, 9.2, 2.5 Hz, 1H, H-6), 3.39 – 3.32 (m, 1H, H-6).

^{13}C NMR (400 MHz, MeOD-d_4): δ 143.6, 141.5, 134.6 (C_{IV}-ar), 134.1, 131.1, 130.2, 129.5, 129.3, 128.8, 128.5 (CH-Ar), 119.1 (CN), 85.7 (C-4), 69.5(C-5), 55.0 (C-1), 52.6 (C-6).

CAS Registry Number: 84940-28-3.

The NMR is in agreement with the literature.[160]

2-(1-Phenylisoindolin-2-yl)ethanol 103



$C_{16}H_{17}NO$
M = 239,31 g.mol^{-1}

To a suspension of lithium aluminum hydride $LiAlH_4$ (0.68 g, 17.91 mmol, 3 equiv.) in dry THF (40 mL) was added the amide **104** (1.5 g, 5.97 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was heated under reflux for 30 hours and then cooled in an ice bath. 2M sodium hydroxide (2mL), water (3 mL) and dichloromethane (11 mL) were added. The inorganic salt was filtered; the filtrate was washed with water and dried ($MgSO_4$). The residue was purified by flash chromatography to give the product as red oil (900 mg, 63%).

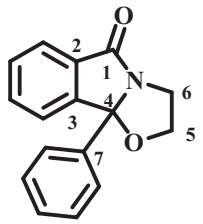
Rf: 0.15 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-*d_4*): δ 7.40 – 7.33 (m, 4H, H-Ar), 7.32 – 7.26 (m, 2H, H-Ar), 7.20 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.71 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-Ar), 4.76 (s, 1H, H-4), 4.46 (d, J = 12.6 Hz, 1H, H-1), 3.79 (dd, J = 12.6, 2.6 Hz, 1H, H-1), 3.70 – 3.56 (m, 2H, H-6), 2.92 (dt, J = 13.3, 6.8 Hz, 1H, H-5), 2.76 – 2.66 (m, 1H, H-5).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD-*d_4*): *δ* 145.3, 143.3, 140.7 (C_{IV}-ar), 129.7, 129.5, 128.8, 128.2, 127.9, 123.8, 123.0 (CH-Ar), 75.8 (C-4), 61.6 (C-6), 59.3 (C-1), 56.6 (C-5).
CAS Registry Number: 18409-76-2.

The NMR is in agreement with the literature.[161]

9*b*-Phenyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-*a*]isoindol-5(9*bH*)-one 104



$C_{16}H_{13}NO_2$
M = 251,28 g.mol^{-1}

Ethanolamine (1.06 mL, 17.68 mmol, 2 equiv.), 2-benzoylbenzoic acid (2 g, 8.84 mmol, 1.0 equiv.) and a catalytic amount of APTS in toluene (40 mL) were stirred at reflux for 30h in a Dean-Stark apparatus. After cooling down, solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash chromatography to give the product as white needles (1.53 g, 78%).

Rf: 0.40 (SiO_2, ethyl acetate/ cyclohexane, 2:8, v/v).

^{1}H NMR (400 MHz, C_6D_6): δ 7.81-7.74 (m, 1H, H-ar) ; 7.53-7.47 (m, 2H, H-ar); 7.13-7.02 (m, 4H, H-ar); 6.93-6.85 (m, 2H, H-ar); 3.87 (ddd, *J*= 11.0, 8.0, 5.7 Hz, 1H, H-5); 3.67 (td, *J*= 8.0, 6.0 Hz, 1H, H-5); 3.51 (td, *J*= 8.0, 5.7Hz, 1H, H-6); 2.71 (ddd, *J*= 11.0, 8.0, 6.0 Hz, 1H, H-6).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 174.1 (C-1), 146.9, 138.1, 131.3 (C_{IV}-ar), 133.3, 130.2, 128.9, 125.9, 124.4, 123.7 (CH-ar), 100.5 (C-4), 70.3 (C-5), 41.7 (C-6).

CAS Registry Number: 17494-19-8.

The NMR is in agreement with the literature.[161]

(1) Sandkühler, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 707–758.
(2) Calvino, B. L'hyperalgésie Induite Par Les Opioïdes. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* **2013**, *14*, 226–233.
(3) O'Connor, T. M.; O'Connell, J.; O'Brien, D. I.; Goode, T.; Bredin, C. P.; Shanahan, F. The Role of Substance P in Inflammatory Disease. *J. Cell. Physiol.* **2004**, *201*, 167–180.
(4) Bartolami, S. Transduction du signal http://schwann.free.fr/transduction_du_signal.htm (accessed Sep 23, 2014).
(5) Merskey, H. The Definition of Pain. *Eur. Psychiatry* **1991**, *6*, 153–159.
(6) Bouhassira, D.; Lantéri-Minet, M.; Attal, N.; Laurent, B.; Touboul, C. Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population. *PAIN* **2008**, *136*, 380–387.
(7) Global Pain Management Market to Reach US$60 Billion by 2015, According to a New Report by Global Industry Analysts, Inc. http://www.prweb.com/releases/2011/1/prweb8052240.htm (accessed May 13, 2014).
(8) O'Brien, T.; Breivik, H. The Impact of Chronic pain—European Patients' Perspective over 12 Months. *Scand. J. Pain* **2012**, *3*, 23–29.
(9) Breivik, H.; Collett, B.; Ventafridda, V.; Cohen, R.; Gallacher, D. Survey of Chronic Pain in Europe: Prevalence, Impact on Daily Life, and Treatment. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* **2006**, *10*, 287–333.
(10) Les plans anti-douleur http://www.irips.org/UPLOAD/rubrique/pages/556/556_rubrique.php (accessed Jun 11, 2014).
(11) Mazzuca, M. Canaux Ioniques, Douleur et Analgésie - Effets Analgésiques Du Blocage d'ASIC1a Par La Psalmotoxine 1, Université Nice Sophia Antipolis, 2007.
(12) Pr Besson, Dr Boccard, Dr Boureau, Pr Calvino, Dr Chast, Dr Delorme, Pr Eschalier, Pr Fletcher, Dr Krakowski, Pr Laurent, Pr Lazorthes, Dr Memran, Dr Meynadier, Dr Salamagne, Dr Serra, Pr Trèves, Dr Wrobel. Pratique Du Traitement de La Douleur - Institut-Upsa-Pratique-Traitement-Douleur.pdf, 2006.
(13) Group, G. CHANGE PAIN - PAIN - Picture Library http://www.change-pain.com/grt-change-pain-portal/GRT-CHANGE-PAIN-PORTAL_Home/Picture_Library/203600166.jsp (accessed Apr 10, 2014).
(14) Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; LaMantia, A.-S.; McNamara, J. O.; Williams, S. M. *Neuroscience*; 2nd edition.; 2004.
(15) Dupuis, J. Couplage Fonctionnel Entre Un Récepteur et Un Canal Ionique: Étude Du Canal KATP et Application Pour La Création de Biocapteurs, UNIVERSITE JOSEPH FOURIER, 2008.
(16) Sandoz, G. Complexes Protéiques et Perméabilité de La Membrane Cytoplasmique: Exemple Du Canal TREK. *Sciences* **2007**, *3*.
(17) Weir, C. J. Ion Channels, Receptors, Agonists and Antagonists. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2010**, *11*, 377–383.
(18) Bagal, S. K.; Brown, A. D.; Cox, P. J.; Omoto, K.; Owen, R. M.; Pryde, D. C.; Sidders, B.; Skerratt, S. E.; Stevens, E. B.; Storer, R. I.; Swain, N. A. Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 593–624.
(19) Trimmer, J. S. Ion Channels and Pain: Important Steps towards Validating a New Therapeutic Target for Neuropathic Pain. *Exp. Neurol.* **2014**, *254*, 190–194.
(20) Woolf, C. J.; Ma, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* **2007**, *55*, 353–364.
(21) Scholz, J.; Woolf, C. J. The Neuropathic Pain Triad: Neurons, Immune Cells and Glia. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1361–1368.

(22) Dubin, A. E.; Patapoutian, A. Nociceptors: The Sensors of the Pain Pathway. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 3760–3772.
(23) Caterina, M. J. Transient Receptor Potential Ion Channels as Participants in Thermosensation and Thermoregulation. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2006**, *292*, R64–R76.
(24) Belvisi, M. G.; Dubuis, E.; Birrell, M. A. Transient Receptor Potential a1 Channels: Insights into Cough and Airway Inflammatory Disease. *CHEST J.* **2011**, *140*, 1040–1047.
(25) Szallasi, A.; Cruz, F.; Geppetti, P. TRPV1: A Therapeutic Target for Novel Analgesic Drugs? *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 545–554.
(26) Premkumar, L. S. Targeting TRPV1 as an Alternative Approach to Narcotic Analgesics to Treat Chronic Pain Conditions. *AAPS J.* **2010**, *12*, 361–370.
(27) Szallasi, A.; Cortright, D. N.; Blum, C. A.; Eid, S. R. The Vanilloid Receptor TRPV1: 10 Years from Channel Cloning to Antagonist Proof-of-Concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 357–372.
(28) Bölcskei, K.; Tékus, V.; Dézsi, L.; Szolcsányi, J.; Pethő, G. Antinociceptive Desensitizing Actions of TRPV1 Receptor Agonists Capsaicin, Resiniferatoxin and N-Oleoyldopamine as Measured by Determination of the Noxious Heat and Cold Thresholds in the Rat. *Eur. J. Pain* **2010**, *14*, 480–486.
(29) Premkumar, L. S.; Sikand, P. TRPV1: A Target for next Generation Analgesics. *Curr. Neuropharmacol.* **2008**, *6*, 151.
(30) Trevisani, M. TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. *Open Pain J.* **2013**, *6*, 108–118.
(31) Brown, B. S.; Keddy, R.; Perner, R. J.; DiDomenico, S.; Koenig, J. R.; Jinkerson, T. K.; Hannick, S. M.; McDonald, H. A.; Bianchi, B. R.; Honore, P.; Puttfarcken, P. S.; Moreland, R. B.; Marsh, K. C.; Faltynek, C. R.; Lee, C.-H. Discovery of TRPV1 Antagonist ABT-116. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3291–3294.
(32) Watabiki, T.; Kiso, T.; Kuramochi, T.; Yonezawa, K.; Tsuji, N.; Kohara, A.; Kakimoto, S.; Aoki, T.; Matsuoka, N. Amelioration of Neuropathic Pain by Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist AS1928370 in Rats without Hyperthermic Effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 743–750.
(33) Honoré, E. The Neuronal Background K2P Channels: Focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 251–261.
(34) Dubé, G. R.; Elagoz, A.; Mangat, H. Acid Sensing Ion Channels and Acid Nociception. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 1750–1766.
(35) Gunthorpe, M. J.; Benham, C. D.; Randall, A.; Davis, J. B. The Diversity in the Vanilloid (TRPV) Receptor Family of Ion Channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 183–191.
(36) Rosenbaum, T.; Simon, S. A. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*; Liedtke, W. B.; Heller, S., Eds.; Frontiers in Neuroscience; CRC Press: Boca Raton (FL), 2007.
(37) Lai, J.; Hunter, J. C.; Porreca, F. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Neuropathic Pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 291–297.
(38) Dib-Hajj, S. D.; Yang, Y.; Black, J. A.; Waxman, S. G. The NaV1.7 Sodium Channel: From Molecule to Man. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 49–62.
(39) Goldberg, Y. P.; Price, N.; Namdari, R.; Cohen, C. J.; Lamers, M. H.; Winters, C.; Price, J.; Young, C. E.; Verschoof, H.; Sherrington, R.; Pimstone, S. N.; Hayden, M. R. Treatment of Na(v)1.7-Mediated Pain in Inherited Erythromelalgia Using a Novel Sodium Channel Blocker. *Pain* **2012**, *153*, 80–85.
(40) Lai, J.; Porreca, F.; Hunter, J. C.; Gold, M. S. Voltage-Gated Sodium Channels and Hyperalgesia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 371–397.

(41) McGaraughty, S.; Chu, K. L.; Scanio, M. J. C.; Kort, M. E.; Faltynek, C. R.; Jarvis, M. F. A Selective Nav1.8 Sodium Channel Blocker, A-803467 [5-(4-Chlorophenyl-N-(3,5-Dimethoxyphenyl)furan-2-Carboxamide], Attenuates Spinal Neuronal Activity in Neuropathic Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *324*, 1204–1211.
(42) Catterall, W. A.; Striessnig, J.; Snutch, T. P.; Perez-Reyes, E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 579–581.
(43) http://theobromine.e-monsite.com/pages/comment-agit-elle.html.
(44) Altier, C.; Zamponi, G. W. Targeting Ca2+ Channels to Treat Pain: T-Type versus N-Type. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 465–470.
(45) Rogawski, M. A. New Evidence Supporting a Role for T-Type Ca2+ Channels in Absence Epilepsy and in the Action of Ethosuximide. *Epilepsy Curr.* **2002**, *2*, 57.
(46) Pores and Selectivity Filters | LettsScience http://lettsscience.com/2012/07/13/pores-and-selectivity-filters/ (accessed May 15, 2014).
(47) Heginbotham, L.; Lu, Z.; Abramson, T.; MacKinnon, R. Mutations in the K+ Channel Signature Sequence. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1061–1067.
(48) Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K+ Conduction and Selectivity. *Science* **1998**, *280*, 69–77.
(49) Morais-Cabral, J. H.; Zhou, Y.; MacKinnon, R. Energetic Optimization of Ion Conduction Rate by the K+ Selectivity Filter. *Nature* **2001**, *414*, 37–42.
(50) Tardy, M. Etude Des Mécanismes de Régulation Des Canaux Potassiques À Deux Domaines P, Université Nice Sophia Antipolis, 2010.
(51) North, R. A. Drug Receptors and the Inhibition of Nerve Cells. *Br. J. Pharmacol.* **1989**, *98*, 13–28.
(52) Sánchez, J. A.; Gonoi, T.; Inagaki, N.; Katada, T.; Seino, S. Modulation of Reconstituted ATP-Sensitive K+ Channels by GTP-Binding Proteins in a Mammalian Cell Line. *J. Physiol.* **1998**, *507*, 315–324.
(53) Mark, M. D.; Herlitze, S. G-Protein Mediated Gating of Inward-Rectifier K+ Channels. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5830–5836.
(54) Blednov, Y. A.; Stoffel, M.; Alva, H.; Harris, R. A. A Pervasive Mechanism for Analgesia: Activation of GIRK2 Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 277–282.
(55) Ocaña, M.; Cendán, C. M.; Cobos, E. J.; Entrena, J. M.; Baeyens, J. M. Potassium Channels and Pain: Present Realities and Future Opportunities. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 203–219.
(56) Tsantoulas, C.; McMahon, S. B. Opening Paths to Novel Analgesics: The Role of Potassium Channels in Chronic Pain. *Trends Neurosci.* **2014**, *37*, 146–158.
(57) Lafrenière, R. G.; Cader, M. Z.; Poulin, J.-F.; Andres-Enguix, I.; Simoneau, M.; Gupta, N.; Boisvert, K.; Lafrenière, F.; McLaughlan, S.; Dubé, M.-P.; Marcinkiewicz, M. M.; Ramagopalan, S.; Ansorge, O.; Brais, B.; Sequeiros, J.; Pereira-Monteiro, J. M.; Griffiths, L. R.; Tucker, S. J.; Ebers, G.; Rouleau, G. A. A Dominant-Negative Mutation in the TRESK Potassium Channel Is Linked to Familial Migraine with Aura. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1157–1160.
(58) Alloui, A.; Zimmermann, K.; Mamet, J.; Duprat, F.; Noel, J.; Chemin, J.; Guy, N.; Blondeau, N.; Voilley, N.; Rubat-Coudert, C.; Borsotto, M.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Reeh, P.; Eschalier, A.; Lazdunski, M. TREK-1, a K+ Channel Involved in Polymodal Pain Perception. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2368–2376.
(59) Zhou, X.-L.; Vaillant, B.; Loukin, S. H.; Kung, C.; Saimi, Y. YKC1 Encodes the Depolarization-Activated K+ Channel in the Plasma Membrane of Yeast. *FEBS Lett.* **1995**, *373*, 170–176.

(60) Fink, M.; Duprat, F.; Lesage, F.; Reyes, R.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M. Cloning, Functional Expression and Brain Localization of a Novel Unconventional Outward Rectifier K+ Channel. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6854–6862.
(61) Medhurst, A. D.; Rennie, G.; Chapman, C. G.; Meadows, H.; Duckworth, M. D.; Kelsell, R. E.; Gloger, I. I.; Pangalos, M. N. Distribution Analysis of Human Two Pore Domain Potassium Channels in Tissues of the Central Nervous System and Periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2001**, *86*, 101–114.
(62) Talley, E. M.; Solórzano, G.; Lei, Q.; Kim, D.; Bayliss, D. A. CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channel Family. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 7491–7505.
(63) UniProt http://www.uniprot.org/blast/?about=O95069[1-426]&key=Chain&id=PRO_0000101742 (accessed Oct 10, 2014).
(64) Fink, M.; Duprat, F.; Lesage, F.; Reyes, R.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M. Cloning, Functional Expression and Brain Localization of a Novel Unconventional Outward Rectifier K+ Channel. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6854–6862.
(65) Treptow, W.; Klein, M. L. The Membrane-Bound State of K2P Potassium Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8145–8151.
(66) Milac, A.; Anishkin, A.; Fatakia, S. N.; Chow, C. C.; Guy, H. R.; Sukharev, S. Structural Models of TREK Channels and Their Gating Mechanism. *Channels* **2011**, *5*, 15–25.
(67) Piechotta, P. L.; Rapedius, M.; Stansfeld, P. J.; Bollepalli, M. K.; Erhlich, G.; Andres-Enguix, I.; Fritzenschaft, H.; Decher, N.; Sansom, M. S. P.; Tucker, S. J.; Baukrowitz, T. The Pore Structure and Gating Mechanism of K2P Channels: K2P Channel Gating. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3607–3619.
(68) Patel, A. J.; Honoré, E.; Maingret, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M. A Mammalian Two Pore Domain Mechano-Gated S-like K+ Channel. *EMBO J.* **1998**, *17*, 4283–4290.
(69) Patel, A. J.; Lazdunski, M.; Honoré, E. Lipid and Mechano-Gated 2P Domain K(+) Channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 422–428.
(70) Maingret, F.; Patel, A. J.; Lesage, F.; Lazdunski, M.; Honoré, E. Lysophospholipids Open the Two-Pore Domain Mechano-Gated K+ Channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10128–10133.
(71) Mathie, A. Neuronal Two-Pore-Domain Potassium Channels and Their Regulation by G Protein-Coupled Receptors. *J. Physiol.* **2007**, *578*, 377–385.
(72) Dedman, A.; Sharif-Naeini, R.; Folgering, J. H. A.; Duprat, F.; Patel, A.; Honoré, E. The Mechano-Gated K2P Channel TREK-1. *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 293–303.
(73) Kennard, L. E.; Chumbley, J. R.; Ranatunga, K. M.; Armstrong, S. J.; Veale, E. L.; Mathie, A. Inhibition of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel, TREK-1, by Fluoxetine and Its Metabolite Norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 821–829.
(74) Nayak, T. K.; Harinath, S.; Nama, S.; Somasundaram, K.; Sikdar, S. K. Inhibition of Human Two-Pore Domain K+ Channel TREK1 by Local Anesthetic Lidocaine: Negative Cooperativity and Half-of-Sites Saturation Kinetics. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 903–917.
(75) Franks, N. P.; Honoré, E. The TREK K2P Channels and Their Role in General Anaesthesia and Neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 601–608.
(76) Heurteaux, C.; Guy, N.; Laigle, C.; Blondeau, N.; Duprat, F.; Mazzuca, M.; Lang-Lazdunski, L.; Widmann, C.; Zanzouri, M.; Romey, G.; Lazdunski, M. TREK-1, a K+ Channel Involved in Neuroprotection and General Anesthesia. *EMBO J.* **2004**, *23*, 2684–2695.
(77) Mazella, J.; Pétrault, O.; Lucas, G.; Deval, E.; Béraud-Dufour, S.; Gandin, C.; El-Yacoubi, M.; Widmann, C.; Guyon, A.; Chevet, E.; Taouji, S.; Conductier, G.; Corinus,

A.; Coppola, T.; Gobbi, G.; Nahon, J.-L.; Heurteaux, C.; Borsotto, M. Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000355.

(78) Buxton, I. L. O.; Singer, C. A.; Tichenor, J. N. Expression of Stretch-Activated Two-Pore Potassium Channels in Human Myometrium in Pregnancy and Labor. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12372.

(79) Devilliers, M.; Busserolles, J.; Lolignier, S.; Deval, E.; Pereira, V.; Alloui, A.; Christin, M.; Mazet, B.; Delmas, P.; Noel, J.; Lazdunski, M.; Eschalier, A. Activation of TREK-1 by Morphine Results in Analgesia without Adverse Side Effects. *Nat. Commun.* **2013**, *4*.

(80) Takahira, M.; Sakurai, M.; Sakurada, N.; Sugiyama, K. Fenamates and Diltiazem Modulate Lipid-Sensitive Mechano-Gated 2P Domain K+ Channels. *Pflüg. Arch.* **2005**, *451*, 474–478.

(81) Harinath, S.; Sikdar, S. K. Trichloroethanol Enhances the Activity of Recombinant Human TREK-1 and TRAAK Channels. *Neuropharmacology* **2004**, *46*, 750–760.

(82) Danthi, S.; Enyeart, J. A.; Enyeart, J. J. Caffeic Acid Esters Activate TREK-1 Potassium Channels and Inhibit Depolarization-Dependent Secretion. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 599–610.

(83) Tertyshnikova, S. BL-1249 [(5,6,7,8-Tetrahydro-Naphthalen-1-Yl)-[2-(1H-Tetrazol-5-Yl)-Phenyl]-Amine]: A Putative Potassium Channel Opener with Bladder-Relaxant Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *313*, 250–259.

(84) Bagriantsev, S. N.; Ang, K.-H.; Gallardo-Godoy, A.; Clark, K. A.; Arkin, M. R.; Renslo, A. R.; Minor, D. L. A High-Throughput Functional Screen Identifies Small Molecule Regulators of Temperature- and Mechano-Sensitive K_{2P} Channels. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1841–1851.

(85) Rodrigues, N.; Bennis, K.; Vivier, D.; Pereira, V.; C Chatelain, F.; Chapuy, E.; Deokar, H.; Busserolles, J.; Lesage, F.; Eschalier, A.; Ducki, S. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Substituted Caffeate Esters as Antinociceptive Agents Modulating the TREK-1 Channel. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 391–402.

(86) Ducki, S.; Bennis, K.; Eschalier, A.; Busserolles, J.; Lesage, F.; Rodrigues, N.; Vivier, D. Pain Relief Compounds. WO2013098416 (A3), August 15, 2013.

(87) Bars, D. L.; Gozariu, M.; Cadden, S. W. Animal Models of Nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597–652.

(88) Schweigert, N.; Zehnder, A. J. B.; Eggen, R. I. L. Chemical Properties of Catechols and Their Molecular Modes of Toxic Action in Cells, from Microorganisms to Mammals. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 81–91.

(89) Rodrigues, N. Recherche et Évaluation D'antalgiques Originaux : Les Activateurs Des Canaux Potassiques TREK-1, Clermont-Ferrand 2, 2011.

(90) Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G. C. Chemoselective Esterification of Phenolic Acids and Alcohols. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3839–3841.

(91) Nahmany, M.; Melman, A. Facile Acylation of Sterically Hindered Alcohols through Ketene Intermediates. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3733–3735.

(92) Gazit, A.; Yaish, P.; Gilon, C.; Levitzki, A. Tyrphostins I: Synthesis and Biological Activity of Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2344–2352.

(93) Barrot, M. Tests and Models of Nociception and Pain in Rodents. *Neuroscience* **2012**, *211*, 39–50.

(94) Irwin, S. Comprehensive Behavioral Assessment: A Systematic Quantitative Procedure for Assessing the Behavioral and Physiologic State of the Mouse. *Psychopharmacologia* **1968**, *13*, 222–257.

(95) Vogel, H. G. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays ; with 125 Tables*; Springer, 2006.

(96) Hunskaar, S.; Fasmer, O. B.; Hole, K. Formalin Test in Mice, a Useful Technique for Evaluating Mild Analgesics. *J. Neurosci. Methods* **1985**, *14*, 69–76.
(97) Duprat, F. fascicule cours electrophysiologie https://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/documents/polyelectrophy.pdf (accessed Jun 30, 2014).
(98) Ogden, D.; Stanfield, P. Patch Clamp Techniques for Single Channel and Whole-Cell Recording. In *Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook*; 1994; Vol. 2.
(99) Clare, J. J. Targeting Ion Channels for Drug Discovery. *Discov. Med.* **2010**, *9*, 253–260.
(100) Cain, S. M.; Meadows, H. J.; Dunlop, J.; Bushell, T. J. mGlu4 Potentiation of K2P2.1 Is Dependant on C-Terminal Dephosphorylation. *Mol. Cell. Neurosci.* **2008**, *37*, 32–39.
(101) De Campos Buzzi, F.; Franzoi, C. L.; Antonini, G.; Fracasso, M.; Filho, V. C.; Yunes, R. A.; Niero, R. Antinociceptive Properties of Caffeic Acid Derivatives in Mice. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4596–4602.
(102) Lipinski, C.; Hopkins, A. Navigating Chemical Space for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *432*, 855–861.
(103) Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. Assessing Drug-Likeness – What Are We Missing? *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 285–294.
(104) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
(105) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
(106) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The Influence of Drug-like Concepts on Decision-Making in Medicinal Chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881–890.
(107) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx* **2005**, *2*, 541–553.
(108) Molinspiration Cheminformatics http://www.molinspiration.com/ (accessed Aug 26, 2014).
(109) Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1452–1464.
(110) Plietker, B.; Dieskau, A.; Möws, K.; Jatsch, A. Ligand-Dependent Mechanistic Dichotomy in Iron-Catalyzed Allylic Substitutions: Σ-Allyl versus Π-Allyl Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 198–201.
(111) Arhin, F.; Bélanger, O.; Ciblat, S.; Dehbi, M.; Delorme, D.; Dietrich, E.; Dixit, D.; Lafontaine, Y.; Lehoux, D.; Liu, J.; McKay, G. A.; Moeck, G.; Reddy, R.; Rose, Y.; Srikumar, R.; Tanaka, K. S. E.; Williams, D. M.; Gros, P.; Pelletier, J.; Parr Jr., T. R.; Far, A. R. A New Class of Small Molecule RNA Polymerase Inhibitors with Activity against Rifampicin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5812–5832.
(112) Mannhold, R.; Rekker, R. F. The Hydrophobic Fragmental Constant Approach Forcalculating Log P in Octanol/water and Aliphatic Hydrocarbon/water Systems. *Perspect. Drug Discov. Des.* **2000**, *18*, 1–18.
(113) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529–2591.
(114) Zhou, L.; Stewart, G.; Rideau, E.; Westwood, N. J.; Smith, T. K. A Class of 5-Nitro-2-Furancarboxylamides with Potent Trypanocidal Activity against Trypanosoma Brucei in Vitro. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 796–806.

(115) Lei, Y. X.; Casarini, D.; Cerioni, G.; Rappoport, Z. Stable Enols of Amides ArNHC(OH)C(CN)CO2R. E/Z Enols, Equilibria with the Amides, Solvent Effects, and Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 947–959.
(116) Huttunen, K. M.; Raunio, H.; Rautio, J. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750–771.
(117) Kaiho, T.; Sannohe, K.; Kajiya, S.; Suzuki, T.; Otsuka, K.; Ito, T.; Kamiya, J.; Maruyama, M. Cardiotonic Agents. 1-Methyl-7-(4-Pyridyl)-5,6,7,8-Tetrahydro-3(2H)-Isoquinolinones and Related Compounds. Synthesis and Activity. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 351–357.
(118) Shimizu, H.; Brown, J. M.; Homans, S. W.; Field, R. A. Chemical Synthesis of 13C-Labelled Ganglioside Gb3 Trisaccharide from [U-13C]-D-Glucose. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9489–9506.
(119) KOBAYASHI, M.; SHIMADATE, T. Synthesis of Glycosyl Trifluoroacetates and Their Reactions with Carboxylic Acids. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, *34*, 4069–4074.
(120) Abbott, S. D.; Gagnon, L.; Lagraoui, M.; Kadhim, S.; Attardo, G.; Zacharie, B.; Penney, C. L. Synthesis and Activity of Dipeptides, Linked to Targeting Ligands, as Specific NK Cell Enhancers. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1909–1926.
(121) Morais, L. L. Synthèse de Thiooligosaccharides, Précurseurs D'analogues de Facteurs de Nodulation, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2004.
(122) Halasya, R. Compositions for Increasing Bioavailability of Peptides or Proteins and Method Thereof. WO2007060692 (A2), May 31, 2007.
(123) Leroux, J.; Perlin, A. S. Synthesis of 1-O-Acylaldoses by the Reaction of Carboxylic Acids with 1,2-Orthoacetates, or with Aldoses in the Presence of Triflouroacetic Anhydride. *Carbohydr. Res.* **1981**, *94*, 108–114.
(124) Cheikh, N.; Bar, N.; Choukchou-Braham, N.; Mostefa-Kara, B.; Lohier, J.-F.; Sopkova, J.; Villemin, D. Efficient Synthesis of New Butenolides by Subsequent Reactions: Application for the Synthesis of Original Iminolactones, Bis-Iminolactones and Bis-Lactones. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1540–1551.
(125) Hazeldine, S.; Pachaiyappan, B.; Steinbergs, N.; Nowotarski, S.; Hanson, A. S.; Casero, R. A.; Woster, P. M. Low Molecular Weight Amidoximes That Act as Potent Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7378–7391.
(126) Deb, M. L.; Bhuyan, P. J. Uncatalysed Knoevenagel Condensation in Aqueous Medium at Room Temperature. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6453–6456.
(127) Liu, Y.; Lai, H.; Rong, B.; Zhou, T.; Hong, J.; Yuan, C.; Zhao, S.; Zhao, X.; Jiang, B.; Fang, Q. Titanium-Mediated Direct Carbon-Carbon Double Bond Formation to A-Trifluoromethyl Acids: A New Contribution to the Knoevenagel Reaction and a High-Yielding and Stereoselective Synthesis of A-Trifluoromethylacrylic Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3161–3165.
(128) Platt, S. R. The Role of Glutamate in Central Nervous System Health and Disease – A Review. *Vet. J.* **2007**, *173*, 278–286.
(129) Pekhletski, R.; Gerlai, R.; Overstreet, L. S.; Huang, X.-P.; Agopyan, N.; Slater, N. T.; Abramow-Newerly, W.; Roder, J. C.; Hampson, D. R. Impaired Cerebellar Synaptic Plasticity and Motor Performance in Mice Lacking the mGluR4 Subtype of Metabotropic Glutamate Receptor. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 6364–6373.
(130) Lesage, F.; Terrenoire, C.; Romey, G.; Lazdunski, M. Human TREK2, a 2P Domain Mechano-Sensitive K+ Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq Protein-Coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28398–28405.

(131) Duprat, F.; Lesage, F.; Patel, A. J.; Fink, M.; Romey, G.; Lazdunski, M. The Neuroprotective Agent Riluzole Activates the Two P Domain K(+) Channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 906–912.
(132) Sandoz, G.; Douguet, D.; Chatelain, F.; Lazdunski, M.; Lesage, F. Extracellular Acidification Exerts Opposite Actions on TREK1 and TREK2 Potassium Channels via a Single Conserved Histidine Residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14628–14633.
(133) Burgess, G.; Williams, D. The Discovery and Development of Analgesics: New Mechanisms, New Modalities. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 3753–3759.
(134) Monographie de La Vicodine : Http://www.rxabbvie.com/pdf/vicodin.pdf.
(135) Delorme, C. Ixprim® : Une Association Antalgique Cohérente, Logique et Efficace. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* **2004**, *5*, 10–14.
(136) Graham, G. G.; Davies, M. J.; Day, R. O.; Mohamudally, A.; Scott, K. F. The Modern Pharmacology of Paracetamol: Therapeutic Actions, Mechanism of Action, Metabolism, Toxicity and Recent Pharmacological Findings. *Inflammopharmacology* **2013**, *21*, 201–232.
(137) Vane, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature* **1971**, *231*, 232–235.
(138) Flower, R. J.; Vane, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthetase in Brain Explains the Anti-Pyretic Activity of Paracetamol (4-Acetamidophenol). *Nature* **1972**, *240*, 410–411.
(139) Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L. COX-3, a Cyclooxygenase-1 Variant Inhibited by Acetaminophen and Other Analgesic/antipyretic Drugs: Cloning, Structure, and Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 13926–13931.
(140) Pickering, G.; Loriot, M.-A.; Libert, F.; Eschalier, A.; Beaune, P.; Dubray, C. Analgesic Effect of Acetaminophen in Humans: First Evidence of a Central Serotonergic Mechanism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, *79*, 371–378.
(141) Mallet, C.; Daulhac, L.; Bonnefont, J.; Ledent, C.; Etienne, M.; Chapuy, E.; Libert, F.; Eschalier, A. Endocannabinoid and Serotonergic Systems Are Needed for Acetaminophen-Induced Analgesia. *PAINÂ®* **2008**, *139*, 190–200.
(142) Mallet, C.; Barrière, D. A.; Ermund, A.; Jönsson, B. A. G.; Eschalier, A.; Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D. TRPV1 in Brain Is Involved in Acetaminophen-Induced Antinociception. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12748.
(143) Palmer, H.; Graham, G.; Williams, K.; Day, R. A Risk-Benefit Assessment of Paracetamol (acetaminophen) Combined with Caffeine. *Pain Med. Malden Mass* **2010**, *11*, 951–965.
(144) Schrader, T. O.; Johnson, B. R.; Lopez, L.; Kasem, M.; Gharbaoui, T.; Sengupta, D.; Buzard, D.; Basmadjian, C.; Jones, R. M. Complementary Asymmetric Routes to (R)-2-(7-Hydroxy-2,3-Dihydro-1H-pyrrolo[1,2-A]indol-1-Yl)acetate. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6306–6309.
(145) Zhou, W.; Li, H.; Xia, C.; Zheng, X.; Hu, W. The Synthesis and Biological Evaluation of Some Caffeic Acid Amide Derivatives: E-2-Cyano-(3-Substituted Phenyl)acrylamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1861–1865.
(146) Tresnak-Rustad, N. J.; Wood, M. E. In Vitro Biochemical Effects of Nefopam Hydrochloride, a New Analgesic Agent. *Biochem. Pharmacol.* **1981**, *30*, 2847–2850.
(147) Hunskaar, S.; Fasmer, O. B.; Broch, O. J.; Hole, K. Involvement of Central Serotogenic Pathways in Nefopam-Induced Antiniciception. *Eur. J. Pharmacol.* **1987**, *138*, 77–82.

(148) Girard, P.; Coppe, M.; Verniers, D.; Pansart, Y.; Gillardin, J. Role of Catecholamines and Serotonin Receptor Subtypes in Nefopam-Induced Antinociception. *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 195–202.
(149) Verleye, M.; André, N.; Heulard, I.; Gillardin, J.-M. Nefopam Blocks Voltage-Sensitive Sodium Channels and Modulates Glutamatergic Transmission in Rodents. *Brain Res.* **2004**, *1013*, 249–255.
(150) Piercey, M. F.; Schroeder, L. A. Spinal and Supraspinal Sites for Morphine and Nefopam Analgesia in the Mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, *74*, 135–140.
(151) Fasmer, O. B.; Berge, O.-G.; Jørgensen, H. A.; Hole, K. Antinociceptive Effects of (±)-, (+)- and (-)-Nefopam in Mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **1987**, *39*, 508–511.
(152) Mather, G. G.; Labroo, R.; Le Guern, M.-E.; Lepage, F.; Gillardin, J.-M.; Levy, R. H. Nefopam Enantiomers: Preclinical Pharmacology/toxicology and Pharmacokinetic Characteristics in Healthy Subjects after Intravenous Administration. *Chirality* **2000**, *12*, 153–159.
(153) A Process for the Resolution of Nefopam.
(154) Hoizey, G.; Goglin, A.; Malinovsky, J.-M.; Robinet, A.; Binet, L.; Kaltenbach, M. L.; Millart, H.; Lamiable, D. Specific and Sensitive Analysis of Nefopam and Its Main Metabolite Desmethyl-Nefopam in Human Plasma by Liquid Chromatography–ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 593–600.
(155) Starek, M.; Dąbrowska, M.; Tarsa, M. Analysis of Nefopam by TLC-Densitometry. A Study of Degradation Mechanism in Solutions Under Stress Conditions. *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58*.
(156) Dacero, J. P. [The Management of Acute Pain in Ambulatory Patients. The Place of Nefopam]. *Presse Medicale Paris Fr. 1983* **2004**, *33*, 277–280.
(157) Girard, P.; Pansart, Y.; Gillardin, J.-M. Nefopam Potentiates Morphine Antinociception in Allodynia and Hyperalgesia in the Rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *77*, 695–703.
(158) Girard, P.; Pansart, Y.; Coppé, M.-C.; Verniers, D.; Gillardin, J.-M. Role of the Histamine System in Nefopam-Induced Antinociception in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *503*, 63–69.
(159) Bilotta, F.; Pietropaoli, P.; Sanita, R.; Liberatori, G.; Rosa, G. Nefopam and Tramadol for the Prevention of Shivering during Neuraxial Anesthesia☆. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2002**, *27*, 380–384.
(160) Bremner, J.; Thirasasana, N. Synthesis of Some 2,5-Benzoxazocine and 2,6-Benzoxazonine Derivatives from Ω-(Dihydroisoindol-2-Yl)alkanol Precursors by Means of Cyanogen Bromide. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 2307–2314.
(161) Aeberli, P.; Houlihan, W. Heterocycles from Keto Acids with Amino Alcohols, Diamines, and Mercaptoamines. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 165–170.
(162) Aeberli, P.; Houlihan, W. J. Lithium Aluminum Hydride Reduction Products from Heterocycles Containing an Isoindolone Nucleus. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1720–1726.
(163) Fodor, G.; Abidi, S.-Y.; Carpenter, T. C. N-Cyanoammonium Salts as Intermediates in the von Braun Cyanogen Bromide Reaction. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1507–1516.
(164) Rosamilia, A. E.; Mayes, P. A.; Papadopoulos, R.; Campi, E. M.; Jackson, W. R.; Rash, L.; Jarrott, B. Synthesis of Some Nefopam Analogues as Potential Analgesics. *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 577–585.
(165) Price, K. E.; Larrivée-Aboussafy, C.; Lillie, B. M.; McLaughlin, R. W.; Mustakis, J.; Hettenbach, K. W.; Hawkins, J. M.; Vaidyanathan, R. Mild and Efficient DBU-Catalyzed Amidation of Cyanoacetates†. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2003–2006.
(166) Eschalier, A.; Busserolles, J.; Alloui, A.; Lazdunski, M. Use of k2p Potassium Channel Activators as Antalgics.

(167) Gore, V.; Patel, P.; Chang, C.-T.; Sivendran, S.; Kang, N.; Ouedraogo, Y. P.; Gravel, S.; Powell, W. S.; Rokach, J. 5-Oxo-ETE Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3725–3732.

(168) Ninomiya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S. Amino Acids and Peptides. XII. Phosphorus in Organic Synthesis. VIII. Reaction of Malonic Acid Half Esters with Diphenyl Phosphorazidate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1974**, *22*, 1398–1404.

(169) Görmar, G.; Radeglia, R.; Scharn, E.; Schulz, M. Zum Substituenteneinfluß Auf Die 13C-NMR-Chemischen Verschiebungen von Percarbonsäure-Tert.-Butylestern. *J. Für Prakt. Chem.* **1983**, *325*, 333–336.

(170) Sudhakara, A.; Jayadevappa, H.; Mahadevan, K. M.; Hulikal, V. Efficient Synthesis of 2-Ethoxycarbonyl Indoles. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 2506–2515.

(171) Carpita, A.; Ribecai, A.; Stabile, P. Microwave-Assisted Synthesis of Indole- and Azaindole-Derivatives in Water via Cycloisomerization of 2-Alkynylanilines and Alkynylpyridinamines Promoted by Amines or Catalytic Amounts of Neutral or Basic Salts. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7169–7178.

(172) Simpson, J.; Rathbone, D. L.; Billington, D. C. New Solid Phase Knoevenagel Catalyst. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7031–7033.

(173) Ouwerkerk, N.; Boom, J. van; Lugtenburg, J.; Raap, J. Synthesis of [1′,2′,5′,2-13C4]-2′-Deoxy-D-Adenosine by a Chemoenzymatic Strategy to Enable Labelling of Any of the 215 Carbon-13 and Nitrogen-15 Isotopomers. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 2356–2362.

(174) A. A. Elbannany, A.; I. Ibrahim, L. Synthesis of Pyrrole, Pyrrolidone, Pyrrolo[3,4-C]pyrazole, Pyrrolo[3,2-B]pyridine and Pyrrolo[3,2-B]pyrrole Derivatives. *HETEROCYCLES* **1988**, *27*, 2071.

(175) Franke, U.; Röder, E. Synthese von 3-(2-Indolyl)-Acrylsäurederivaten. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1977**, *310*, 975–979.

(176) Poradosu, E.; Gazit, A.; Reuveni, H.; Levitzki, A. A-Cyanocinnamide Derivatives: A New Family of Non-Peptide, Non-Sulfhydryl Inhibitors of Ras Farnesylation. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1727–1736.

(177) Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Cocca, J.; Mateo, C.; Moro, P.; Terreni, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Regio-Selective Deprotection of Peracetylated Sugars via Lipase Hydrolysis. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5705–5711.

(178) Dinkelaar, J.; Witte, M. D.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. NIS/TFA: A General Method for Hydrolyzing Thioglycosides. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1723–1729.

(179) Jha, A. K.; Jain, N. Synthesis of Glucose-Tagged Triazolium Ionic Liquids and Their Application as Solvent and Ligand for copper(I) Catalyzed Amination. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4738–4741.

(180) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Sridhar, P.; Reddy, J. S. S.; Nagaiah, K.; Lingaiah, N.; Saiprasad, P. S. Green Protocol for the Biginelli Three-Component Reaction: Ag3PW12O40 as a Novel, Water-Tolerant Heteropolyacid for the Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidinones. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 552–557.

Abstract

Morphine remains the analgesic of reference for the treatment of pain (*nociception*), but it is also responsible for serious adverse effects. Research studies have shown that animals deprived of potassium channels TREK-1 (TWIK-related K+ channels) were over-sensitive to pain. More recently, it has been demonstrated that the TREK-1 potassium channel is a crucial contributor of morphine-induced analgesia in mice, while it is not involved in morphine-induced constipation, respiratory depression and dependence. These results suggest that the TREK-1 channels constitute targets of interest for the design of novel analgesics without opioid-like adverse effects.

Previous studies within our consortium led to the identification of four lead structures as TREK-1 activators exhibiting analgesic activity *in vivo*.Since the 3D structure of TREK-1 was not available at the time, we decided to perform hit optimization by conventional structure-activity relationship (SAR) studies. Thirty six analogs were synthesized *via* Knoevenagel condensation and evaluated for their analgesic effect (writhing test, hot plate assay) and their ability to activate TREK-1 channel (electrophysiology). It turned out that the possibility to form hydrogen bonding interaction (aryl moiety) and the volume of substituents of the amide or ester has a crucial influence on activity. Promising results emerged from this SAR study: 5 molecules display a very good analgesic activity (> 50% inhibition of pain, hot plate assay) as well as a good activation of TREK-1 channels ($R \geq 2$ at 10μM or $R \geq 4$ above 20μM).

Key words: pain, analgesics, potassium channel TREK-1, CDC, Knoevenagel reaction, SAR, microsomal studies, writhing test, hot plate assay, TREK-1$^{-/-}$ mice, electrophysiology.

Résumé

La morphine demeure l'antalgique de référence pour le traitement de la douleur (*nociception*), mais elle est également responsable d'effets secondaires importants. Des études ont montré que les animaux privés de canaux potassiques TREK-1 (TWIK-related K+channels) étaient plus sensibles à la douleur. Plus récemment, il a été démontré que le canal potassique TREK-1 joue un rôle crucial dans l'analgésie induite par la morphine chez les souris, alors qu'il n'est pas impliqué dans les effets secondaires (constipation, dépression respiratoire et dépendance). Ces résultats suggèrent que les canaux TREK-1 constituent des cibles d'intérêt pour la conception de nouveaux antalgiques sans effets indésirables liés aux opioïdes.

Des études antérieures au sein de notre laboratoire ont permis l'identification de quatre structures chefs de file, activatrices des canaux TREK-1, présentant une activité antalgique *in vivo*. La structure 3D du canal TREK-1 n'étant pas élucidée au moment de nos travaux, nous avons décidé d'effectuer une optimisation basée sur une étude de relation structure-activité (RSA). Trente-six analogues ont été synthétisés par condensation de Knoevenagel et évalués pour leur effet antalgique (test de l'acide acétique, test de la plaque chaude) et leur capacité à activer le canal TREK-1 (électrophysiologie). La capacité des substituants du noyau aromatique à établir des interactions de type liaison hydrogène ainsi que le volume de ces substituants ont une influence déterminante sur l'activité. Des résultats prometteurs ont émergé de cette étude RSA: 5 molécules présentent une très bonne activité antalgique (> 50% d'inhibition de la douleur, test de la plaque chaude) ainsi que d'une bonne activation de TREK-1 canaux ($R \geq 2$ à 10 μM ou $R \geq 4$ au-dessus de 20 μM).

Mots Clés: douleur, antalgiques, canaux potassiques TREK-1, CDC, réaction de Knoevenagel, RSA, étude de stabilité microsomale, test de l'acide acétique, test de la plaque chaude, souris TREK-1$^{-/-}$, électrophysiologie.