

**Design, synthèse et caractérisation
pharmacologique de modulateurs allostériques
positifs des récepteurs AMPA : application du
concept de dimérisation à la famille des
1,2,4-benzothiadiazines 1,1-dioxydes**

Drapier Thomas

Promoteurs:

Pr. B. Pirotte & Dr. P. Francotte

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

-Remerciements-

Le temps des remerciements lors de l'écriture est toujours un moment particulier, le moment de prendre quelques lignes de liberté pour se souvenir et faire le point...

Je commencerai par remercier le professeur Bernard Pirotte, qui m'a accueilli dans son équipe en 2013 pour un stage de mémoire qui s'est par la suite transformé en thèse de doctorat. Ses recommandations, sa rigueur et sa justesse sont pour beaucoup dans la réalisation de ce manuscrit.

Au cours de ces années, les conseils précis et l'humour du Dr Pierre Francotte ont été pour moi une lanterne pour me repérer dans les incontournables moments de doutes qu'implique la réalisation d'un tel travail. Merci.

Je désirerais aussi faire une mention spéciale à Eric Goffin, homme de l'ombre, avec qui la maxime « la théorie c'est quand ça ne marche pas, mais que l'on sait pourquoi. La pratique, c'est quand ça marche, mais qu'on ne sait pas nécessairement pourquoi. » n'a jamais été aussi vraie. Ses conseils, toujours pratiques, ont été une aide précieuse au jour le jour pour les synthèses de composés.

Plus qu'un lieu de travail, le labo a été comme une seconde famille et je souhaiterais remercier tous ses membres pour leurs conseils, pour leur soutien et pour leur bonne humeur au quotidien. Merci à Pascal De Tullio, Deniz Arslan, Matthieu Schoumacher, Justine Leenders, Stéphane Counerotte et Alexandra Manos Turvey.

Je voudrais aussi remercier le professeur Christophe Mulle et son équipe pour leur accueil au sein du centre interdisciplinaire de neurosciences de l'Université de Bordeaux, et plus particulièrement Sabine Fièvre, qui m'a appris tant de choses sur les méthodes électrophysiologiques avec patience et justesse.

J'ai eu la chance de pouvoir voyager durant cette thèse, que ce soit vers la France ou juste vers le bâtiment d'en face. Ainsi, je souhaite remercier le Dr Julien Hanson pour m'avoir accueilli et encadré avec son équipe du laboratoire de pharmacologie moléculaire. Ses raisonnements, questionnements et avis m'ont beaucoup aidé pour mon apprentissage de la pharmacologie. Je voudrais aussi remercier son équipe : Nadine

Dupuis, Céline Laschet et Céline Piron. Ensuite je souhaiterais remercier tout spécialement Julie Gilissen pour tout ce qu'elle a pu m'apprendre, parfois à la dure, mais toujours avec le sourire ; et Pierre Geubelle pour avoir pris le relais et terminé avec moi les mises en place des tests et m'avoir guidé dans l'analyse de mes résultats. Sans eux, ce travail aurait difficilement abouti sur son axe pharmacologique.

Même s'il n'est pas commun de le faire, je souhaiterais remercier mes trois stagiaires : Antoine, Alice et Matthieu, qui ont contribué à ces travaux.

Merci à ma famille de m'avoir soutenu tout au long de l'aventure, depuis le jour où la chimie s'est emparée de moi vers 15 ans, en passant par les premiers moments d'angoisse en premier bachelier, aux blocus interminables où je n'étais pas de bonne compagnie, jusqu'à aujourd'hui. Merci d'avoir mis en place un cadre serein dans lequel j'ai pu m'épanouir et finir par obtenir ce titre de PhD.

Et pour terminer, je soulignerai simplement l'importance de l'apaisement et du soutien que m'a procurés ma compagne, Gwenaëlle. À elle, un tout grand merci !

À Xavier...

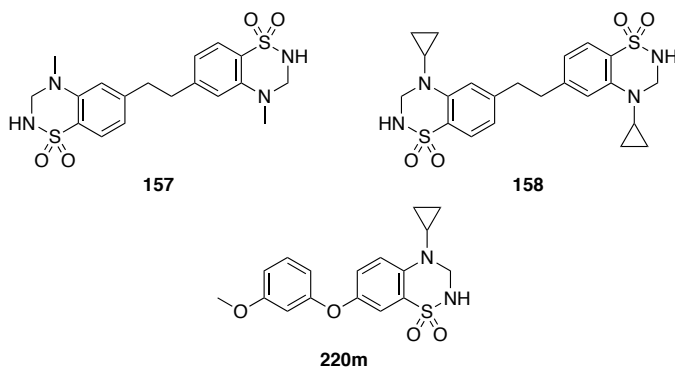
Design, synthesis and pharmacological characterisation of positive allosteric modulator for AMPA receptors: dimeric compounds of the 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide family.

-Abstract- L-Glutamic acid is the key excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). It exerts its biological activity through the activation of either metabotropic or ionotropic receptors. The diminution of the signalling pathway through AMPA receptors (an ionotropic glutamatergic receptor) seems to be related to diverse pathologies such as attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's diseases. The use of positive allosteric modulators on AMPA receptors has been postulated to be a promising option for a therapeutic approach.

The results described hereafter follow the researches conducted by Professor Pirotte's team (LCP - ULiège) on benzothiadiazine dioxides (BTD) structurally related to IDRA-21. These compounds act as positive allosteric modulators of AMPA receptors. Some recent crystallographic studies with active BTDs showed that two molecules simultaneously occupy the allosteric pocket. Moreover the disposition of both compounds seems to allow the design of dimeric molecules.

This work focused first on the synthesis of dimeric compounds that could lie in both sub-sites at once; another aim of this work was the development of a pharmacological assay allowing the characterisation of their activity on glutamatergic receptors (AMPA or kainate).

Partnership with the UNamur allowed modelling studies that identified the best dimeric candidates (**157 - 158**) to be synthesized.



The biological assay, based on fluorimetric measurements, allowing medium-throughput-screening, gave the opportunity to characterise several compounds previously designed in the laboratory as positive allosteric modulators on either AMPA or KA receptors.

It appeared that the compounds bearing a phenoxy substituent at the 7-position of the BTD ring system were active on AMPA receptors, especially compound **220m**. A crystallographic study showed this compound used to lie in the two sub-sites, as it could be expected for a dimeric molecule.

The pharmacological evaluation of the dimeric compounds showed they have an activity in a the nM range of concentration (**158**), thus 10,000 times more potent than the corresponding monomeric molecules. Moreover the crystallographic studies for the dimeric molecules (**157**) and (**158**) showed they both occupy the two sub-sites in the allosteric pocket of the AMPA receptors at once.

We reported here the success of the dimerisation process adapted to the benzothiadiazine dioxide family of compounds as AMPA modulators. The fluorimetric assays performed will allow the screening of new potential families of compounds active either on the AMPA or the kainate receptors.

Design, synthèse et caractérisation pharmacologique de modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA : application du concept de dimérisation à la famille des 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes

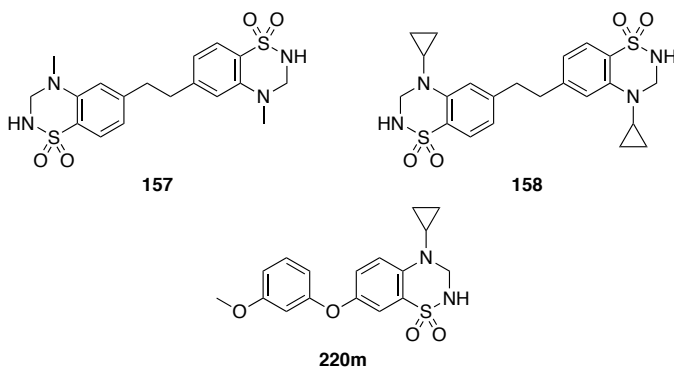
-Résumé- Le L-glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Il exerce son activité sur différents types de récepteurs, tant métabotropiques qu'ionotropiques. Il semblerait qu'une diminution de l'intensité des signaux via les récepteurs du sous-type AMPA (récepteurs glutamatergiques ionotropiques) soit en lien avec diverses pathologies, telles que les troubles du déficit de l'attention (*attention-deficit hyperactivity disorder* ; ADHD), la schizophrénie, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. L'utilisation de modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA permettant leur potentialisation semble être une approche thérapeutique intéressante.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des recherches débutées par notre équipe dans les années 90 sur la famille des benzothiadiazine dioxydes, structurellement apparentés à l'IDRA-21 en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Différentes études cristallographiques récentes ont été réalisées avec plusieurs composés actifs du laboratoire et ont permis d'élucider l'interaction des modulateurs au sein de la poche allostérique des récepteurs AMPA. Elles mettent en évidence l'occupation simultanée de cette poche par deux molécules de benzothiadiazine dioxyde. La disposition spatiale de ces composés semble permettre la réalisation de composés dimériques.

Ce travail s'est concentré d'une part sur la synthèse de composés pouvant occuper simultanément les deux sous-sites d'interaction, et d'autre part sur la mise au point de tests pharmacologiques permettant la

caractérisation *in vitro* de leurs propriétés sur les différents types de récepteurs glutamatergiques (AMPA ou kaïnate).

Des études de modélisation, en partenariat avec l'UNamur, ont permis d'établir un ordre de priorité concernant les synthèses des meilleurs candidats dimères (**157** - **158**).



La mise au point de méthodes de *screening* à moyen rendement basées sur des mesures fluorimétriques permet l'évaluation de divers composés issus de la chimiothèque du laboratoire, tant sur les récepteurs AMPA que kaïnate. Les résultats obtenus par ces méthodes sont proches de ceux déjà décrits dans la littérature pour des composés de référence.

Lors du *screening*, les composés porteurs d'un groupement phénoxy en position 7 se sont révélés être particulièrement actifs sur les récepteurs AMPA, notamment le composé (**220m**). La résolution cristallographique de ce dernier montra que cette molécule occupe les deux sous-sites d'interaction, comme attendu pour les dimères.

L'évaluation des composés dimériques révéla qu'ils disposent d'une activité de l'ordre du nanomolaire (**158**), soit 10 000 fois plus actifs que les monomères ayant servi à leur création. D'autre part, les résultats de cocrystallisation démontrent formellement que les dimères (**157**) et (**158**) occupent bien les deux sous-sites d'interaction au niveau de la poche allostérique des récepteurs AMPA.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de démontrer avec succès l'applicabilité du concept de dimérisation aux benzothiadiazine dioxydes en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Les tests fluorimétriques à moyen débit mis en place permettront l'évaluation pharmacologique de futures familles de composés actifs sur les récepteurs AMPA et kaïnate.

-Sommaire-

CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1-4
1.1 Les neurotransmetteurs.....	1-5
1.1.1 Les neuropeptides.....	1-8
1.1.2 Les monoamines.....	1-9
1.1.3 L'acétylcholine.....	1-12
1.1.4 Les acides aminés.....	1-13
1.2 Excitotoxicité.....	1-16
1.3 La synapse glutamatergique.....	1-19
1.3.1 Les récepteurs glutamatergiques.....	1-21
1.3.1.1 Les récepteurs métabotropiques.....	1-21
1.3.1.2 Les récepteurs ionotropiques.....	1-23
1.4 Les récepteurs AMPA.....	1-26
1.4.1 Structures des sous-unités GluA.....	1-27
1.4.2 Assemblage, modifications secondaires et migration.....	1-32
1.4.3 Internalisation rapide et protéines auxiliaires.....	1-35
1.5 Potentialisation et dépression à long terme.....	1-39
1.5.1 Mécanisme de la potentialisation à long terme.....	1-40
1.5.2 Mécanisme de la dépression à long terme.....	1-42
1.6 Potentialiser les récepteurs AMPA.....	1-44
1.6.1 Méthode d'action.....	1-44
1.6.2 Les familles structurelles de modulateurs.....	1-46
1.6.2.1 Benzamides et structures apparentées.....	1-46
1.6.2.2 N-biarylpropanesulfonamides et dérivés.....	1-47
1.6.2.3 Autres classes.....	1-49
1.6.2.4 Benzothiadiazines et autres thiazines.....	1-50
1.7 La poche d'allostérie.....	1-56

CHAPITRE 2	BUT DU TRAVAIL	2-62
2.1	Concept préliminaire et faisabilité.....	2-63
2.1.1	Présence d'un motif double.....	2-63
2.1.2	La dimérisation.....	2-65
2.1.3	Approche thermodynamique de la dimérisation	2-69
2.1.4	Application du concept	2-70
2.2	Axes d'étude	2-73
2.2.1	Synthèse.....	2-73
2.2.2	Pharmacologie	2-74
2.3	Résumé.....	2-75

CHAPITRE 3	RESULTATS ET DISCUSSION	3-78
3.1	Synthèses chimiques	3-79
3.1.1	Stratégies de synthèse.....	3-79
3.1.2	Premières tentatives avec un lien alkylène.....	3-81
3.1.3	Série présentant un lien amide.....	3-88
3.1.3.1	Approche directe	3-88
3.1.3.2	Approche convergente.....	3-91
3.2	Modélisation.....	3-97
3.2.1	Molécules testées.....	3-97
3.2.2	Résultats	3-100
3.3	Synthèse des molécules cibles	3-104
3.3.1	Pont éthylène.....	3-104
3.3.1.1	Synthèse du dimère 157.....	3-109
3.3.1.2	Synthèse du dimère 158.....	3-111
3.3.1.3	Synthèse des homologues supérieurs.....	3-114
3.3.1.4	Synthèse des monomères	3-120

3.4	Pharmacologie	3-122
3.4.1	Historique et mise en place.....	3-122
3.4.2	Lignée stable.....	3-125
3.4.3	Principe du test	3-126
3.4.4	Mise au point du test.....	3-128
3.4.5	Courbe concentration/réponse du composé de référence	3-133
3.4.6	Évaluation de la famille des benzothiadiazines substituées par un groupement phénoxy en position 7	3-134
3.4.6.1	Validation du test.....	3-136
3.4.6.2	Relations structure/activité.....	3-136
3.4.6.3	Coefficient de Hill.....	3-137
3.4.6.4	Cocrystallisation	3-139
3.4.6.5	Patch-clamp.....	3-140
3.4.6.6	Techniques de patch-clamp.....	3-141
3.4.6.7	Évaluation des composés présentant un groupement 7- phénoxy.....	3-143
3.4.6.8	Évaluation du composé (64) sur les récepteurs AMPA.....	3-144
3.4.7	Évaluation des molécules dimères	3-146
3.4.7.1	Cocrystallisation.....	3-149
3.4.8	Un détour par le kaïnate.....	3-151
3.4.9	Screening des composés issus de la chimiothèque potentiellement actifs sur les récepteurs KA	3-154

CHAPITRE 4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 4-160

4.1 Conclusions 4-161

4.2 Perspectives 4-166

CHAPITRE 5	MATERIELS ET METHODES.....	5-168
5.1	Matériels et méthodes	5-169
5.1.1	Chimie.....	5-169
5.1.2	Synthèse.....	5-170
5.1.3	Modélisation	5-188
5.1.4	Pharmacologie	5-189
5.1.4.1	Western blot.....	5-189
5.1.4.2	Immunofluorescence	5-190
5.1.4.3	Lignées stables	5-190
5.1.4.4	Test fluorimétrique AMPA	5-191
5.1.4.5	Test fluorimétrique kaïnate.....	5-192
5.1.4.6	Patch-clamp	5-193
CHAPITRE 6	REFERENCES.....	6-196
CHAPITRE 7	PUBLICATIONS.....	7-218

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les neurotransmetteurs

A la fin du XIX^e siècle, deux théories expliquant le passage de signaux depuis le système nerveux central (SNC) aux nerfs sont en opposition. D'un part celle de Camillo Golgi qui considérait que le système entier (cerveau et nerfs) s'organisait en un réseau continu et que le message voyageait tout du long sans interruption, comme le sang dans le réseau des vaisseaux sanguins. Son modèle reposait sur des observations, rendues possibles grâce à l'aide du colorant qu'il avait développé, des cellules qui constituent le SNC. Il observait que ces dernières se comportaient comme les fils entrelacés d'une installation électrique. D'autre part Santiago Ramon Y. Cajal, en se basant sur des observations semblables à celles réalisées par Golgi, soutenait une organisation discontinue du système et constituée de cellules individuelles, appelées neurones, communiquant entre elles par contact. Il fallut attendre cinquante années de plus et l'invention du microscope électronique pour valider la théorie de Cajal [Bear *et al.*, 2006].

L'existence de ces deux théories sur la nature du réseau impliquait la formulation de deux théories sur la manière dont les informations sont transmises dans ce réseau. La première, qui supposait un stimulus de nature électrique, s'ajustait bien avec la description du réseau de Golgi et pouvait pareillement s'accommoder à la théorie de Cajal où la modification du potentiel de membrane passait de neurone en neurone par contact. La seconde soutenait que les informations étaient transmises via des molécules chimiques. Cette vision, appuyée par une série d'expériences rapportées par Claude Bernard ou Thomas Elliott, ne trouvait pas sa place dans la théorie du réseau de Golgi. En effet, à l'époque, on pensait déjà que des actions spécifiques, telles que

l'activation des neurones et le transfert d'informations, nécessitaient des molécules précisément assignées à cette tâche [Bear *et al.*, 2006]. C'est cette dernière qui s'imposera avec la découverte des molécules activant les neurones, nommées « neurotransmetteurs ».

Si la théorie actuelle est en accord avec une stimulation chimique des neurones entre eux, elle ne se base pas que sur cette dernière. La conception de Cajal concernant les neurones, en tant qu'unités de base du SNC, est toujours acceptée. Quant aux fentes entre les neurones, les synapses, ce sont des points particulièrement importants pour le transfert de l'information. Une majorité de ces communications se déroule au moyen de neurotransmetteurs. Néanmoins, il existe aussi des points de rencontre entre neurones où l'influx est véhiculé de manière électrique (*tight-junction* réalisant alors des synapses éphaptiques). De même, le long d'un axone, c'est une modification du potentiel membranaire qui circule et qui provoque finalement la libération des neurotransmetteurs. Enfin, d'autres voies de signalisation, telles que la transmission mixte, autocrine, paracrine, ou à longue distance (hormonale entre autres), existent également. Ainsi, les deux hypothèses n'étaient finalement pas exclusives, mais complémentaires.

Une série de critères fut établie pour permettre la caractérisation des neurotransmetteurs. Pour qu'une molécule puisse être considérée comme telle, elle doit répondre aux critères suivants :

- être synthétisée et stockée dans les neurones présynaptiques, ce qui implique la présence dans le neurone de la molécule et de son enzyme de synthèse ;
- être libérable dans l'espace synaptique sous une forme chimiquement identifiable ;

- reproduire sur la cellule postsynaptique l'événement spécifique (dépolarisation, internalisation d'un récepteur...) observé après stimulation du neurone présynaptique ;
- être bloquée de manière pharmacologique par des antagonistes compétitifs ;
- posséder un mécanisme de neutralisation pour achever l'action sur la cellule postsynaptique (recapture, inhibition enzymatique...).

Bien qu'entre 20 et 40 molécules soient communément admises comme neurotransmetteurs, seuls l'acétylcholine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) remplissent actuellement l'ensemble de ces conditions. Ces molécules sont regroupées en trois grandes familles de neurotransmetteurs selon leur nature chimique : les acides aminés, les monoamines et les peptides.

Évoquons ici la complexité des phénomènes liés à la neurotransmission. Elle ne se limite pas seulement à l'action des différents neurotransmetteurs. En effet, outre la molécule stimulante, il faut garder à l'esprit que chacun possède son propre système d'action et de régulation ; ils disposent de machineries propres, de méthodes de stockage, de recapture, de dégradation et de synthèse. Finalement, les neurotransmetteurs ne sont qu'un rouage dans la mécanique, et s'ils sont nécessaires à la transmission, leur action seule n'est pas suffisante.

1.1.1 Les neuropeptides

Les peptides sont les neurotransmetteurs avec les structures les plus complexes et les plus volumineuses. Contrairement aux acides aminés et monoamines, les peptides n'ont pas une action directe sur les récepteurs du neurone postsynaptique, ce qui a conduit à des difficultés pour l'étude et la compréhension de leurs mécanismes. Ces transmetteurs agissent plus comme des hormones et possèdent un rayon d'action plus large autour des neurones qui les sécrètent. Une des différences avec les petites molécules, c'est qu'ils se lient presque exclusivement à des récepteurs de type métabotrope (ou GPCR, *G-protein coupled receptors*, pour récepteurs couplés aux protéines G), ce qui implique un mode d'action plus lent, mais plus durable dans le temps, de manière analogue aux hormones. Ces différences avec les neurotransmetteurs font que ces peptides sont aussi repris sous l'appellation de neuromodulateurs. Par exemple, les peptides hypothalamiques agissent sur le stress [Reichman *et al.*, 2015], les peptides opioïdes et la substance P (**1**) ont un rôle en lien avec la douleur [Bove *et al.*, 1997].

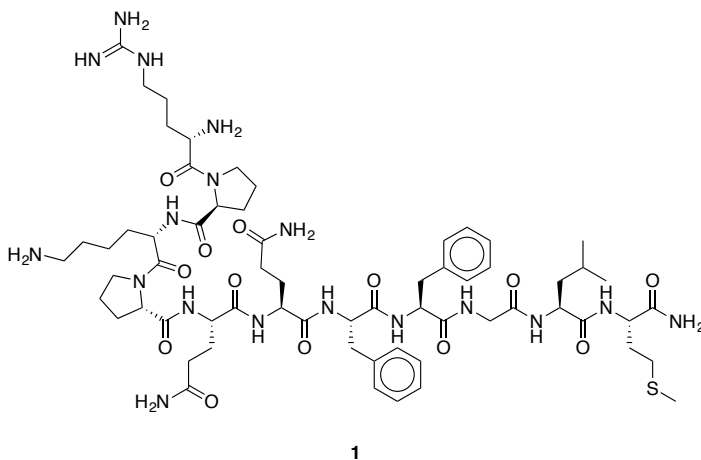


Figure 1. Substance P.

Il a été établi que des peptides sont engagés dans des systèmes de contrôle du sommeil, de l'excitation, des sentiments, de l'anxiété, de récompense, de mémorisation... Bien que ceux-ci appartiennent à la classe de neurotransmetteurs pour laquelle les connaissances sont les plus limitées, leurs implications potentielles comme cibles thérapeutiques futures éveillent un grand intérêt [Brain *et al.*, 2006].

1.1.2 Les monoamines

Les monoamines constituent une deuxième classe de neurotransmetteurs ; ces dernières sont toutes dérivées d'acides aminés.

Cette classe regroupe les catécholamines, comme la dopamine (3), l'adrénaline (4) et la noradrénaline (5), toutes dérivées de la tyrosine (2) par l'action de la tyrosine hydroxydase afin d'obtenir la fonction catéchol. La dopamine (3) est principalement responsable du contrôle moteur, de l'humeur, de l'attention et des circuits de la récompense.

L'adrénaline (4) et la noradrénaline (5) ont également un impact périphérique en agissant comme neurotransmetteurs du système orthosympathique. L'adrénaline peut aussi être excrétée au niveau des glandes surrénales dans le flux sanguin, comme les hormones. Cette libération conduit à des réponses viscérales coordonnées [Bear *et al.*, 2006].

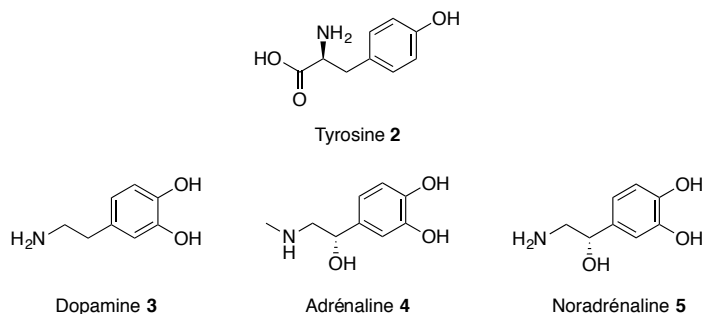


Figure 2. Tyrosine (2) et ses dérivés.

La sérotonine (7) est un neurotransmetteur dérivé du tryptophane (6) agissant sur les récepteurs sérotoninergiques (5-hydroxytryptamine ou 5-HT). Les neurones sérotoninergiques sont peu nombreux, comparativement aux récepteurs glutamatergiques par exemple, mais ont un rôle déterminant dans la régulation de l'humeur, les émotions et le sommeil [Folk *et al.*, 1988].

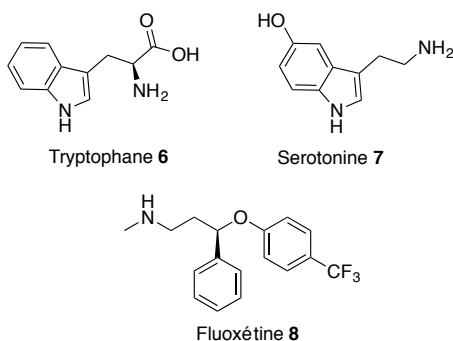


Figure 3. Tryptophane (6), sérotonine (7) et fluoxétine (8).

La régulation de l'activité des neurotransmetteur sur les neurones est crucial pour l'organisme (voir le point 1.2 portant sur l'excitotoxicité). Dès lors, toute une série de mécanismes s'activent pour limiter le temps de vie des neurotransmetteurs dans la synapse une fois leur action effectuée. Ces mécanismes peuvent entraîner la dégradation, inhiber ou recycler ces molécules. Pour la sérotonine (7), son recyclage, ou sa

recapture, est l'opération d'un transporteur spécifique. L'inhibition de l'activité de ce dernier permet d'augmenter les taux de sérotonine et d'avoir une action antidépressive, faisant de lui une cible thérapeutique. La fluoxétine (Prozac®) (**8**) est un exemple d'antidépresseur inhibant la recapture de la sérotonine [Rossi *et al.*, 2004].

Enfin, la dernière molécule de la famille des monoamines est un dérivé de l'histidine (**9**) : l'histamine (**10**). Son action se fait sur quatre récepteurs métabotropiques (H₁₋₄). Les récepteurs H₁₋₂ sont présents dans le SNC et de manière périphérique. Leurs actions au sein du SNC sont à la base des effets indésirables des anti-H₁ : la sédation. Leur inhibition a permis le développement de nombreux composés thérapeutiques actifs : soit antiallergiques (anti-H₁), soit antiacides gastriques (anti-H₂). Les récepteurs H₃ sont présents dans le SNC. Leur activation est en lien avec la mémorisation, le cycle veille-sommeil et l'homéostasie énergétique générale du corps. Il n'y a, pour le moment, aucun composé thérapeutique pour ce récepteur. Enfin, les récepteurs H₄ sont absents du SNC. En périphérie, les connaissances sur leurs mécanismes d'action et leurs implications restent limitées [Shahid *et al.*, 2009].

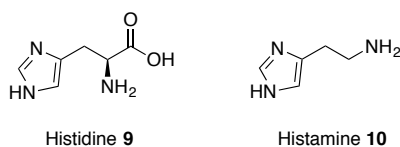


Figure 4. Histidine (**9**) et histamine (**10**).

1.1.3 L'acétylcholine

Premier neurotransmetteur découvert par Otto Loewi [Bear *et al.*, 2006], l'acétylcholine (**11**) est connue comme le neurotransmetteur du système nerveux autonome et des jonctions neuromusculaires.

L'acétylcholine se distingue des autres neurotransmetteurs par sa nature chimique. Elle n'est ni un acide aminé, ni une monoamine, ni une protéine. Néanmoins, certaines classifications la rapprochent des acides aminés puisqu'elle partage avec ces composés, la simplicité structurale et l'abondance. En effet, les molécules servant à sa synthèse, la choline et l'acétyl-CoA, sont facilement disponibles et ubiquitaires dans l'organisme (la première est fournie par l'alimentation comme les acides aminés, et la seconde est produite par la dégradation des glucides et des lipides) [Waxham *et al.*, 1997]. Enfin, l'action d'une seule enzyme, la choline acétyltransférase, permet d'obtenir le neurotransmetteur.

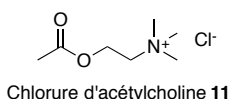


Figure 5. Acétylcholine (**11**).

L'action de l'acétylcholine (**11**) se fait par les récepteurs nicotiniques et muscariniques [Tiwari *et al.*, 2013]. Le premier est un récepteur ionotropique perméable aux ions sodiques, composé de cinq sous-unités. Il se caractérise par une réponse excitatrice postsynaptique rapide et brève [Otto *et al.*, 2017]. Le second est un GPCR. L'effet de ce dernier peut, entre autres, inhiber l'adénylate cyclase, stimuler la phospholipase C ou activer des canaux potassiques. Ces réponses peuvent être excitatrices ou inhibitrices, dépendant de la présence présynaptique ou postsynaptique du récepteur.

1.1.4 Les acides aminés

Enfin, les acides aminés sont la classe de neurotransmetteurs la plus importante et la mieux décrite à l'heure actuelle. Cependant, l'idée que des acides aminés puissent jouer le rôle de neurotransmetteurs fut au centre d'importants débats. La première idée fut que pour des phénomènes aussi importants que la neurotransmission, des molécules spécifiquement dédiées à cette action devaient être utilisées. Il ne semblait pas concevable que des molécules, présentes dans toutes les cellules pour la synthèse peptidique, puissent être utilisées pour cette tâche si spécifique. Il s'est finalement avéré que les neurotransmetteurs doivent être présents en quantité et facilement disponibles.

Sur base de leur action excitatrice ou inhibitrice sur le système nerveux, la classe des acides aminés neurotransmetteurs se sépare en deux sous-classes. C'est le chercheur Hayashi qui mit en avant les propriétés excitatrices de l'acide L-glutamique (**12**) [Hayashi T., 1954]. Il observa qu'une injection de ce composé dans les carotides ou dans le cerveau conduisait à des épisodes épileptiques. Ceux-ci traduisaient donc le lien entre cet acide aminé et une action physiologique. Ainsi, il fut le premier à démontrer l'action excitatrice d'un acide aminé sur le SNC [Watkin *et al.*, 2006]. Par la suite, d'autres acides aminés ont été caractérisés comme molécules excitatrices ; toutefois, leur mode d'action se fait au moyen des récepteurs glutamatergiques. Ainsi, l'acide L-aspartique (**13**), homologue inférieur de l'acide L-glutamique (**12**), a pareillement montré une activité excitatrice [Gundersen *et al.*, 1998]. De plus, d'autres molécules, naturelles ou synthétiques, ont dévoilé une activité excitatrice, comme le NMDA (**14**) (acide N-méthyl-D-aspartique), les acides L- et D-homocystéiques (**15 - 16**), l'acide β -N-oxaly-L- α,β -diaminopropionique

(17) (ou β -ODAP, extrait végétal de *Lathyrus sativus*), l'acide quisqualique (19) (isolé de *Quisqualis sp.*), l'acide kaïnique (18) (isolé de *Digenia simplex*), ou plus tardivement son analogue, l'AMPA (20) (l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique) [Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1980]. Ces deux derniers acides manifesteront plus tard leur importance dans la classification des sous-types de récepteurs.

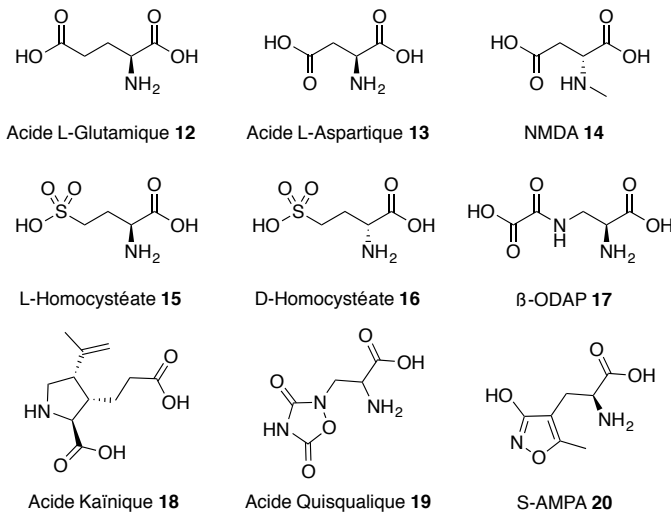


Figure 6. Acide L-glutamique (12) et quelques dérivés.

Le GABA (21), structurellement proche de l'acide L-glutamique (12), constitue quant à lui le neurotransmetteur inhibiteur de référence dans le SNC. De manière analogue à l'acide L-glutamique (12), d'autres composés inhibiteurs, actifs sur les récepteurs GABA, ont aussi été caractérisés, comme la β -alanine (22) homologue inférieur direct du GABA. La taurine (24), bioisostère de la β -alanine (22), est supposée agir comme inhibiteur [Wu and Prentice, 2010]. La glycine (23) bien qu'homologue inférieur du GABA et molécule inhibitrice, n'agit pas sur ces récepteurs. Elle est cependant le principal inhibiteur au niveau de la moelle épinière mais en agissant sur des récepteurs dédiés.

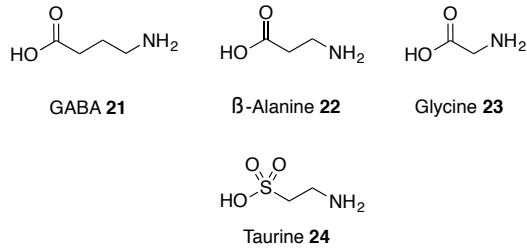


Figure 7. GABA (**21**) et autres inhibiteurs.

D'un point de vue métabolique, le GABA (**21**) est obtenu au départ de L-glutamate (**12**) grâce à une seule enzyme : l'acide glutamique décarboxylase (*glutamic acid decarboxylase* ou GAD) [Defelipe *et al.*, 2013]. Donc, en une seule étape, le glutamate, principal neurotransmetteur excitateur, peut donc être converti en GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur.

Les différents neurotransmetteurs agissent de manière à conserver l'homéostasie de l'organisme. Pour que celle-ci soit préservée, il faut que les espèces actives soient extrêmement bien régulées par des enzymes spécifiques dans les synapses, comme déjà mentionné. Une action prolongée, non contrôlée de ces transmetteurs, peut conduire à des effets particulièrement délétères, même si dans certains cas, comme pour la sérotonine, cette augmentation est recherchée à des fins thérapeutiques. Dans le cas du L-glutamate, une action prolongée peut s'avérer désastreuse pour le SNC. L'ensemble des conséquences en lien avec cette action non contrôlée et prolongée du L-glutamate est repris sous le terme d'excitotoxicité.

1.2 Excitotoxicité

Comme nous l'avons déjà mentionné, le L-glutamate est le principal responsable de l'excitation et donc de la transmission de messages entre les neurones. Cependant, il peut se révéler particulièrement néfaste lorsqu'il est libéré de manière excessive et prolongée. L'excitotoxicité est un processus pathologique, autoentretenu, au cours duquel une cellule nerveuse est endommagée, voire détruite à la suite d'une action prolongée de molécules excitatrices (naturelles ou de synthèse). Dans les conditions homéostatiques, la concentration en L-glutamate au sein de la synapse ne dépasse pas l'ordre du millimolaire, et ce, pour une durée très courte de l'ordre de la milliseconde, grâce à l'action d'enzymes qui le recapturent ou le neutralisent.

L'excès de L-glutamate conduit à une dépolarisation prolongée du neurone. Celle-ci mène à une cascade d'événements qui finit par la mort neuronale. Parmi ces phénomènes, trois éléments interdépendants peuvent être cités. Premièrement, la dépolarisation permet un afflux d'ions sodiques dans le neurone. Ceux-ci sont suivis, par diffusion passive, d'ions chlorures pour maintenir l'équilibre ionique. Cet afflux d'ions provoque un déséquilibre osmotique qui conduit à l'entrée d'eau dans le neurone selon le nouveau gradient. L'eau provoque alors un gonflement cellulaire qui aboutit à la rupture membranaire et donc à la mort cellulaire. Ce gonflement est généralement réversible, si la dépolarisation du neurone s'arrête dans un délai de l'ordre de la minute [Choi, 1985]. Deuxièmement, la dépolarisation, accentuée par l'afflux d'ions sodiques, conduit à l'activation de canaux glutamatergiques voltage-dépendants qui sont perméables aux ions calciques. La concentration cytosolique en ions calciques est de l'ordre de la centaine de nanomolaires. L'augmentation

de cette concentration est le point de non-retour pour le neurone, car les mécanismes de contrôle de celle-ci ont été atténués ou rendus inopérants par le déséquilibre ionique (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Cet afflux d'ions renforce encore le gonflement osmotique, mais surtout active des enzymes dépendants de la concentration en ions calciques, notamment des peptidases [Siman et al., 1989], des nucléases [Orrenius et al., 1989] et des lipases [Doble, 1999], qui vont provoquer la digestion du neurone et donc sa mort. Troisièmement, la quantité de L-glutamate dans la fente synaptique va augmenter. Cette augmentation est due à la dépolarisation, à l'afflux d'ions calciques, au ralentissement ou à l'arrêt de ses transporteurs et à la lyse des neurones. Si les concentrations de L-glutamate dans la synapse sont de l'ordre du millimolaire, les concentrations dans les vésicules du bouton axonique peuvent atteindre jusqu'à 100 mM.

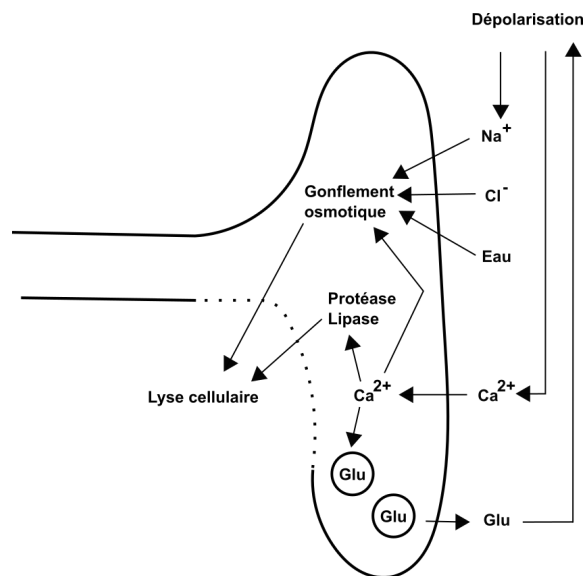


Figure 8. Résumé des mécanismes d'excitotoxicité [Doble, 1999].

Ce L-glutamate répandu au voisinage du neurone va pouvoir diffuser vers d'autres cellules proches et provoquer une dépolarisation prolongée, et ainsi redémarrer la cascade d'événements mortels, à tel point que le phénomène devient un cercle vicieux [Beal *et al.*, 1992] [Doble, 1999] [Kristensen *et al.*, 2001] [Bear *et al.*, 2006] [Deng *et al.*, 2006] [Liu *et al.*, 2007]. Divers éléments peuvent déclencher ce processus, comme un accident vasculaire cérébral (AVC) ou un arrêt cardiaque [Benveniste *et al.*, 1984].

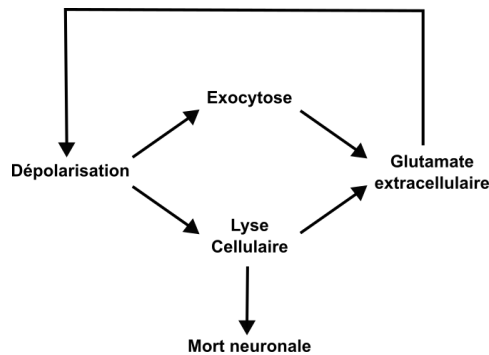


Figure 9. Cercle vicieux du L-glutamate dans l'excitotoxicité.

1.3 La synapse glutamatergique

L'activité du L-glutamate s'exerce au travers des synapses glutamatergiques. Ces synapses sont constituées par l'interaction entre deux neurones et des cellules gliales. Ce type de synapse est appelé « synapse tripartite ».

La cellule gliale impliquée dans cet ensemble s'occupe principalement de la régulation du L-glutamate libre dans la fente synaptique. La régulation de ce dernier est un paramètre clé dans le système nerveux central vu les graves problèmes liés à l'excitotoxicité. Le processus principal est appelé cycle glutamate-glutamine. Il permet la neutralisation de L-glutamate en le transformant en L-glutamine, inactive sur les récepteurs glutamatergiques. La libération du L-glutamate est déclenchée suivant un mécanisme dépendant de la concentration en ions calciques. L'entrée de ces ions s'opère par les canaux N et P/Q voltage-dépendants qui se trouvent au plus près des vésicules de stockage [Birnbaumer *et al.*, 1994]. D'autres récepteurs interviennent aussi dans la régulation, tels que les récepteurs glutamatergiques métabotropiques des groupes II et III, les récepteurs cholinergiques, les récepteurs k-opioïdes ou les récepteurs GABA, entre autres [Meldrum *et al.*, 1998]. Une fois le L-glutamate libéré dans la fente synaptique, il peut interagir avec ses récepteurs et les activer. Sa présence et son action prennent fin grâce à des transporteurs présents sur la cellule gliale. Ces derniers sont repris sous l'appellation générique des EAAT 1-5 (*excitatory amino acid transporters*) [Kataoka *et al.*, 1997]. Le type de transporteur rencontré dépend du type cellulaire et de l'emplacement dans le SNC [Lehre *et al.*, 1998]. EAAT-1 et 2 sont aussi respectivement nommés GLAST (*glial glutamate and aspartate transporter*) et GLT1 (*glial glutamate*

transporter) et sont spécifiques à la cellule gliale, tandis que les trois derniers sont propres aux neurones. La force motrice du transport est le gradient de concentration sodique/potassique ; pour GLT1, une molécule de glutamate associée à trois ions Na^+ et un H^+ rentre dans la cellule pour la sortie d'un ion K^+ [Levy *et al.*, 1998]. Ces transporteurs sont particulièrement importants dans la mesure où ils représentent 2 % de la quantité totale des protéines du SNC [Martinez-Lozada *et al.*, 2015]. Une fois le glutamate internalisé, il est très rapidement converti en glutamine sous l'action de la glutamine synthétase. La glutamine est ensuite menée des cellules gliales vers les neurones au travers des SNAT (*sodium-dependent neutral amino acid transporter*). Dès qu'elle se trouve dans les neurones, la glutamine régénère le L-glutamate sous l'action de la glutaminase neuronale. Le L-glutamate est ensuite stocké dans les vésicules du bouton synaptique par les VGLUT 1-3 (*vesicular glutamate transporter*), terminant ainsi le cycle. Bien que le L-glutamate puisse être synthétisé par les neurones via le cycle de Krebs, la majorité du L-glutamate utilisé provient du cycle glutamate/glutamine [Hamberger *et al.*, 1979]. Enfin, la glutamine est aussi un intermédiaire clé dans la synthèse du GABA et agit comme lien entre les deux principaux systèmes excitateur et inhibiteur. Lorsqu'elle peut être transportée dans des neurones GABAergiques, convertie par la glutaminase, elle devient le L-glutamate et est ensuite directement transformée en GABA sous l'action de la GAD. Une fois le GABA utilisé dans la synapse, il est internalisé par les GAT1-2 (*GABA transporter 1* pour les neurones et 2 pour les cellules gliales). Il y est métabolisé par la GABA-T (*GABA-transaminase*) en L-glutamate. Celui-ci peut soit être utilisé pour régénérer du GABA au moyen de la GAD, soit être transformé en glutamine.

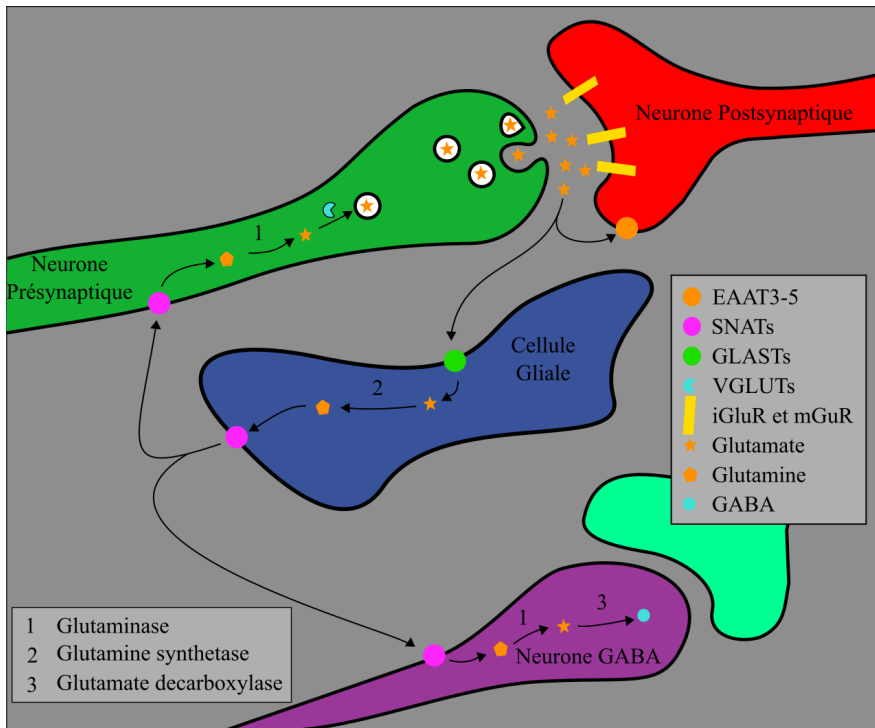


Figure 10. Cycle glutamatergique.

1.3.1 Les récepteurs glutamatergiques

Après avoir décrit la biosynthèse du L-glutamate, il semble important de présenter ses différentes protéines cibles. Ces derniers sont soit des récepteurs métabotropiques soit ionotropiques.

1.3.1.1 Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), ou récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), ou récepteurs à sept domaines transmembranaires, sont capables de moduler l'activité de la phospholipase C (voie G_q) ou de l'adénylate cyclase (voie G_i/G_o). Leur agissement nécessitant l'intervention de seconds messagers, il est plus

lent que celui des récepteurs ionotropiques, mais permet une action prolongée dans le temps.

Huit types de récepteurs différents ont été isolés (mGluR1-8) [Niswender, *et al.*, 2010]. Sur base de leur homologie de séquence, ces récepteurs peuvent être classés en trois familles. Cette classification sur base séquentielle s'avère aussi être fonctionnelle, les récepteurs des différentes familles recrutant les mêmes seconds messagers.

- Le groupe I comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 ; ils recrutent G_q .
- Le groupe II comprend les récepteurs mGluR2 et mGluR3 ; ils recrutent G_i/G_o .
- Le groupe III comprend les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 ; ils recrutent aussi G_i/G_o .

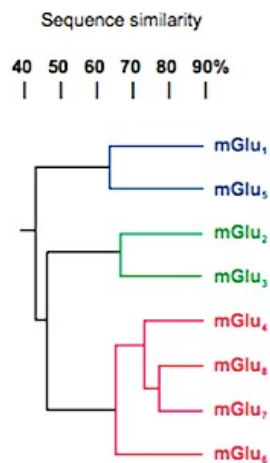


Figure 11. Classification des sous-types des mGluR (adapté de [Archer *et al.*, 2006]).

Les récepteurs du groupe I sont localisés de manière postsynaptique. Leur activation, qui aboutit à une libération d'ions calciques intracellulaire, augmente l'excitabilité du neurone. *A contrario*,

ceux du groupe II et III se trouvent du côté présynaptique et leur activation est inhibitrice, en limitant la libération de L-glutamate dans la fente synaptique. Ils permettent un rétrocontrôle afin de limiter la libération de L-glutamate. Les récepteurs du groupe III sont localisés exclusivement dans la partie terminale de l'axone, où ils sont des autorécepteurs. Les récepteurs du groupe II sont localisés de manière plus diffuse sur l'axone et semblent faire partie d'un des mécanismes de protection contre l'excitotoxicité en cas d'accumulation de L-glutamate [Simeone *et al.*, 2004].

1.3.1.2 Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques (iGluR) sont constitués de quatre sous-unités ; ce sont des récepteurs canaux homo- ou hétéromériques. La perméabilité des canaux est spécifique à certains cations (Na^+ , K^+ ou Ca^{2+}) et celle-ci varie selon le sous-type de récepteur. Il existe trois sous-types de récepteurs ionotropiques, baptisés selon le nom des molécules d'intérêt pharmacologique ayant servi durant leur caractérisation.

1.3.1.2.1 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (**14**) furent les premiers récepteurs canaux de la famille des iGluR à être caractérisés [Watkins *et al.*, 2000]. Ces canaux tétramériques peuvent être constitués au départ de sept sous-unités distinctes (NR1, NR2A-D et NR3A-B). Ce sont des hétéromères stricts, toujours constitués de deux sous-unités NR1 capables de lier la glycine (**23**) qui agit ici comme co-agoniste du L-glutamate (**12**), et de deux autres sous-unités liant le L-glutamate (NR2-3). La liaison seule des co-agonistes est une condition nécessaire, mais non suffisante à l'ouverture du pore du canal. En effet, les récepteurs NMDA sont inhibés par la présence d'un ion magnésique. Pour chasser

l'ion Mg^{2+} et ouvrir le canal ionique, une dépolarisation préalable du neurone est nécessaire. Les canaux NMDA sont donc des canaux voltage- et ligand-dépendants. La dépolarisation neuronale est réalisée par l'activation des autres iGluR ligand-dépendants. Le récepteur NMDA, bien que ne participant pas directement à la transmission rapide du signal glutamatergique, a un rôle important dans ce dernier à cause de sa grande perméabilité calcique et de sa faible et plus lente désensibilisation. Ce récepteur NMDA est difficile à activer, mais c'est lui qui fournit la majorité de l'influx ionique (calcique en particulier). Enfin, sur la base historique et sur base des propriétés pharmacologiques, les iGluR sont classés dans deux familles : les récepteurs NMDA et non-NMDA qui reprennent les récepteurs kaïnate et AMPA.

1.3.1.2.2 Les récepteurs kaïnate

Les récepteurs kaïnate (2-carboxy-3-carboxyméthyl-4-isopropenylpyrrolidine ou acide kaïnique) (**18**) sont des canaux tétramériques assemblés au départ de cinq sous-unités différentes dénommées KA1-5 (respectivement référencées GluR5-7 et KA1-2 par le passé) [Kew *et al.*, 2005]. Toutes les sous-unités peuvent lier le L-glutamate, mais seules les sous-unités KA1-3 peuvent former des homomères fonctionnels. D'un point de vue pharmacologique, les canaux KA et AMPA présentent des similitudes dans leur mécanisme d'activation, leur cinétique (inférieure à la dizaine de millisecondes) ou leur perméabilité aux ions Na^+ et K^+ . Ils constituent les récepteurs les moins bien connus de la famille iGluR.

Enfin, les récepteurs AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazolepropionique) (**20**) sont la cible pharmacologique de ce travail.

C'est pour cette raison que leurs propriétés vont être développées plus en détail au cours des points suivants.

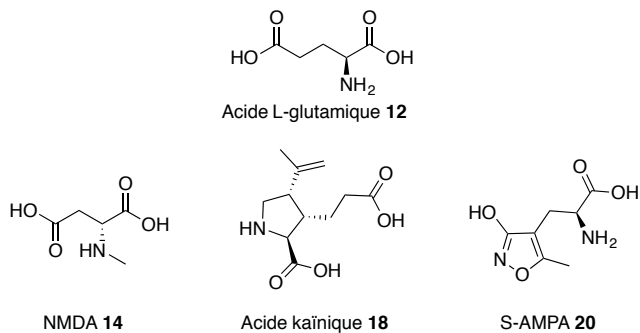


Figure 12. Acide glutamique (**12**) et ses agonistes de synthèse

1.4 Les récepteurs AMPA

Comme les autres iGluR, les récepteurs AMPA sont des canaux tétramériques. Ils s'organisent en réalité structurellement comme un dimère de dimères. Chacune des sous-unités constitutives peut être sélectionnée parmi quatre protéines GluA1-4. Contrairement aux récepteurs KA, toutes les différentes sous-unités AMPA forment des homomères fonctionnels. Ils présentent une perméabilité aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Ces protéines peuvent ensuite être soumises à des modifications post-traductionnelles. La première intervenant pour ces protéines est la variante flip (pas d'épissage) ou flop (après épissage). Un autre épissage peut aussi être observé sur la partie C-terminale de la protéine, conduisant à des formes courtes et longues pour les unités GluA2, 3 et 4. Outre les variations de plusieurs acides aminés, certaines modifications ponctuelles peuvent être mises en avant. Deux sites d'édition sont reconnus pour avoir des impacts significatifs sur les récepteurs : les sites R/G et Q/R. Toutes les protéines GluA sauf GluA1 sont ainsi modifiées au niveau de leur site R/G où la glycine est remplacée par une arginine. La position de ce site étant juste en amont de la zone flip/flop, les sous-unités GluA3-4 ont un délai de récupération plus élevé par rapport à GluA1. Enfin, l'édition du site Q/R, localisé sur la boucle rentrante M2 au cœur du pore du canal, sur la sous-unité GluA2, a pour conséquence une modification de sa perméabilité vis-à-vis des ions calciques. En effet, la présence d'une seule sous-unité GluA2(R) dans un assemblage conduit à un arrêt des flux calciques au travers de ce récepteur. D'autres modifications, de nature post-traductionnelle, impliquent des phénomènes de glycosylation, de palmitoylation ou de phosphorylation.

Les récepteurs AMPA présentent une grande hétérogénéité de constructions possibles conduisant à des canaux fonctionnels. Ces variations d'assemblage sont d'ailleurs observées dans l'ensemble du SNC [Hollmann *et al.*, 1994]. C'est pour cette raison que depuis le début de cet ouvrage, nous avons parlé des récepteurs AMPA et non du récepteur AMPA.

1.4.1 Structures des sous-unités GluA

Les sous-unités GluA sont des protéines contenant environ 900 acides aminés et d'un poids moléculaire de 100 kDa selon la nature de la sous-unité [Hollmann *et al.*, 1994]. Elles sont encodées par quatre gènes différents et présentent en moyenne 70 % de conservation. Le degré de conservation en acides aminés est cependant très variable selon le domaine.

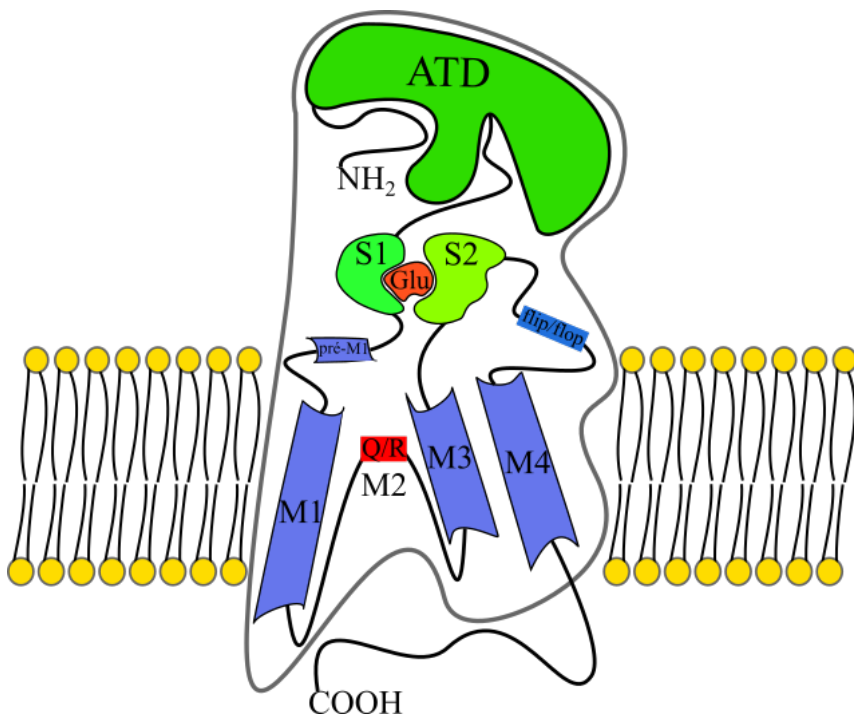


Figure 13. Structure interne d'une sous-unité AMPA.

Comme représenté sur la figure 13, la protéine se compose de différents domaines :

- **Le domaine N-terminal** (ATD pour *amino terminal domain*) contient entre 400 et 450 résidus. La séquence primaire de cette partie ressemble fortement à celle du domaine de fixation du ligand du mGluR1a, mais les repliements et les différents ponts disulfures mènent à des structures secondaires totalement différentes. Cependant, cette observation reste intéressante à souligner, car les deux parties des protéines ont des rôles totalement différents selon le type de récepteur glutamatergique. Le rôle de l'ATD n'est pas encore bien compris, quoique des expériences visant à réaliser des mutants où il était supprimé ont montré que ces canaux étaient aussi efficaces que leur pendant *wild-type* [Pasternack *et al.*, 2002] [Matsuda *et al.*, 2005]. L'ATD ne jouerait donc pas de rôle dans le fonctionnement strict du canal. Néanmoins, d'autres études démontrent que l'absence d'ATD aurait un impact sur la cinétique d'activation [Jin *et al.*, 2002] [Pasternack *et al.*, 2002]. Si son rôle dans l'activation reste mal compris, l'implication de l'ATD dans les phénomènes de *trafficking* et d'assemblage des récepteurs est bien établie [Kuusinen *et al.*, 1999] [Leuschner *et al.*, 1999] [Ayalon *et al.*, 2001] [Bredts *et al.*, 2003] [Ayalon *et al.*, 2005] [Qiu *et al.*, 2009]. Des résultats cristallographiques montrent que les ATD forment spontanément des dimères [Sobolevsky *et al.*, 1999] [Clayton *et al.*, 2009] [Jin *et al.*, 2009] [Kumar *et al.*, 2009]. Ce sont, par la suite, les travaux de Sobolevsky qui ont prouvé que l'assemblage en dimère de dimères des récepteurs débute à partir de l'ATD. Outre cette fonction structurelle, l'ATD possède des sites de

fixation pour le Zn^{2+} et pour certains types de modulateurs allostériques négatifs [Rassendren *et al.*, 1990] [Bresink *et al.*, 1996] [Dreixler *et al.*, 1997]. Enfin, la conservation de la séquence est ici relativement faible et est de 35 % entre les différentes sous-unités GluA [Traynelis *et al.*, 2010].

- **Le domaine transmembranaire** (TMD pour *transmembrane domain*) est constitué de trois hélices α nommées M1, M3 et M4, qui traversent la membrane de part en part, ainsi que d'une boucle rentrante M2. Cette partie du récepteur présente entre 85 % (M1-M2-M3) et 93 % (M4) de similitude de séquence entre les différentes sous-unités [Traynelis *et al.*, 2010]. En suivant la séquence d'acides aminés, la première structure du canal est une petite hélice pré-M1, parallèle à la membrane, qui joue un rôle structurant essentiel entre les hélices M3 et M4. Puis vient l'hélice M1, première structure transmembranaire ; elle se trouve sur la partie extérieure du pore. Directement après se trouve la boucle rentrante M2. C'est au niveau de la boucle M2 que l'épissage alternatif du site Q/R a lieu, menant au changement de perméabilité calcique des sous-unités GluA2. Cette sélection vis-à-vis des ions calciques vient de l'exposition des acides aminés de la boucle M2 au cœur du pore du canal. Le remplacement de la glutamine (Q), ne présentant pas de charge, par l'arginine (R), présentant une charge positive, change drastiquement les propriétés du canal. En effet, la charge positive empêche le passage des ions calciques, alors que la présence de glutamine permettait un mécanisme de transition aisé des ions Ca^{2+} . L'édition du site Q/R est aussi un facteur de rétention des sous-unités dans le réticulum endoplasmique. De fait, les homomères

GluA2 ont tendance à être retenus, alors qu'en association avec une autre sous-unité, le récepteur sortirait sans difficulté [Barry *et al.*, 2002]. Après la boucle M2 se trouve l'hélice M3 qui est la deuxième hélice structurante du pore ; cette hélice est orientée dans le sens inverse de l'hélice M1. L'hélice M3 se trouve au centre du pore et interagit sur la fin de sa séquence avec l'hélice pré-M1 au niveau de l'interface de la membrane. La dernière hélice M4 se situe bien plus loin dans la séquence. Elle est liée aux autres parties structurantes du pore au travers du site de fixation du L-glutamate (sous-partie S2). L'hélice M4 se trouve le plus à l'extérieur du canal. Cette dernière hélice interagit grandement avec les hélices de la sous-unité adjacente, remplissant ici un rôle de pont entre les différentes protéines constituant le canal [Wollmuth *et al.*, 2004].

- **La zone flip/flop** précède directement l'hélice M4 et relie le canal à S2, une partie du domaine de fixation du ligand. Cette zone n'est pas à strictement parler un domaine constitutif comme l'ATD ou le TMD. Toutefois, elle a un impact élevé sur la cinétique des récepteurs et mérite donc d'être signalée. En effet, la variante flop des sous-unités GluA2-4 se désensibilise trois fois plus vite, mais se désactive plus lentement que son équivalent flip. Par contre, les variantes flip/flop de GluA1 se désensibilisent à des vitesses similaires, rendant la sous-unité GluA1 différente cinétiquement des autres sous-unités. La variante flop provient de l'épissage d'une séquence de 38 acides aminés ; la variante flip représente la forme native. Toutes les sous-unités sont soumises à ce processus et peuvent donc prendre les deux formes. L'expression d'une forme ou d'une autre varie selon divers facteurs (l'âge, le type

cellulaire, la localisation dans le SNC...) [Partin *et al.*, 1996]. Certaines études montrent aussi que cette zone a un impact sur la vitesse d'ouverture du canal [Pei *et al.*, 2009] [Sobolevsky *et al.*, 2009].

- **Le domaine de fixation du ligand** (LBD pour *ligand binding domain*) est situé de manière extracellulaire et consiste en l'assemblage de deux sous-parties S1 et S2 [Stern-Bach *et al.*, 1994]. Par rapport à la séquence, la partie S1 se trouve entre l'ATD et l'hélice pré-M1 tandis que la partie S2 se trouve entre M3 et la zone flip/flop. L'assemblage des deux parties est généralement décrit comme ayant une forme de coquillage bénitier. Les deux parties de ce coquillage sont nommées D1 et D2 ; ils sont majoritairement et respectivement situés sur S1 et S2. La poche de coordination du glutamate se trouve dans la gorge du bénitier. Les acides aminés interagissant avec les fonctions α -amino et α -carboxy du glutamate sont particulièrement bien conservés entre les quatre sous-unités [Amstrong *et al.*, 1998-2000] [Bjerrum *et al.*, 2003] [Pentikäinen *et al.*, 2003] [Gill *et al.*, 2008]. Des variations un peu plus importantes sont remarquées concernant le reste du LBD ; cependant, une conservation de 80 % des acides aminés est observée entre les quatre sous-unités, traduisant une excellente conservation de ce domaine [Mayer *et al.*, 2004].
- **Le domaine carboxy-terminal** (CTD pour *carboxy-terminal domain*) est situé à l'intérieur de la cellule. Ce domaine est le plus variable de tous, tant en conservation (9 %) qu'en longueur (variant pour les unités GluA2 et 4) [Traynelis *et al.*, 2010]. Étant

donné son caractère peu structuré et sa grande flexibilité, aucune donnée cristallographique n'est disponible, à notre connaissance, pour ce domaine. Sa séquence est particulière et ne correspond à aucune autre protéine connue. Elle présente néanmoins divers sites d'interaction qui permettent à différentes protéines intracellulaires de venir se coordonner, ainsi que des sites de phosphorylation. Il est donc supposé que ce domaine joue un rôle prédominant en ce qui concerne la régulation membranaire, les modifications post-traductionnelles et l'internalisation/dégradation du récepteur.

1.4.2 Assemblage, modifications secondaires et migration

Une fois les protéines des différentes sous-unités synthétisées dans les neurones, elles subissent diverses modifications visant à la formation de canaux fonctionnels. Tout d'abord, divers glycosylations de l'ATD au sein du réticulum endoplasmique semblent permettre un bon repliement de ce domaine et autoriser la première étape de dimérisation [Everts *et al.*, 1997] [Mah *et al.*, 2005] [Gill *et al.*, 2009].

Deux sous-unités distinctes commencent à dimériser via leurs ATD respectifs. Ceux-ci étant directement reliés à la partie S1 du LBD, les LBD vont aussi pouvoir se rapprocher et ainsi commencer à stabiliser l'assemblage. La partie suivante étant ancrée dans la membrane, c'est le corps du canal qui s'aligne avec les hélices M1 et M3. Dès que cette partie du canal est alignée, D2 vient se coordonner avec D1, formant ainsi la zone d'interaction avec le glutamate et le cœur de la machine moléculaire du canal. C'est l'étape la plus importante, car un mauvais alignement conduirait à un canal non-fonctionnel voire à un risque d'apparition de phénomènes d'excitotoxicité. Arrivé à ce stade, l'hélice

M4 vient s'aligner à sa place. La boucle M2 ne se forme que plus tard lors de la finalisation du pore, une fois que les dimères interagissent pour former le tétramère. Toutes les étapes précédemment décrites sont réversibles. Les protéines ont tendance à former des homodimères, mais il est possible de rencontrer à cet instant des hétérodimères. L'assemblage dimérique est aussi influencé par l'épissage ou non de nombreux sites. Selon l'épissage subi, l'assemblage se fait plutôt en homomères ou en hétéromères [Mansour *et al.*, 2001].

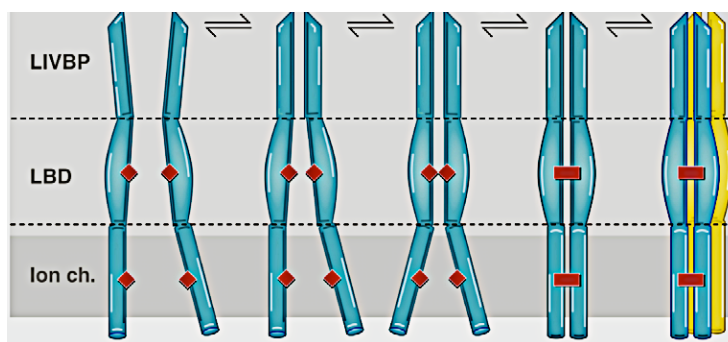


Figure 14. Représentation de l'assemblage d'un récepteur AMPA en dimère de dimères (adapté de [Greger *et al.*, 2007]).

L'édition de certains sites est très importante pour les récepteurs AMPA, en particulier les sites d'édition R/G et Q/R des unités GluA2. Les protéines non éditées (GluA2 Q/R R/G) forment sans difficulté des homotétramères qui sortent facilement du réticulum endoplasmique (RE). Certes, il en sera de même si elles sont éditées au site R/G, mais les canaux seront retenus un peu plus longtemps dans le RE [Greger *et al.*, 2003]. Cependant, lorsque GluA2 est éditée en Q/R, ce qui est majoritairement le cas, les unités ne semblent pas pouvoir former de tétramères. En effet, la présence des quatre arginines dans le pore induit une répulsion due à la charge, mais également à un encombrement stérique. En ajoutant à cela que la sous-unité GluA2 a un temps de vie relativement long dans le RE (12 h), les dimères GluA2(R) s'y

accumulent. Ils sont donc disponibles en grande quantité pour former des hétérotétramères, et statistiquement, les dimères des autres sous-unités auront plus de chances de se lier à un dimère GluA2(R) qu'à un autre. Or, la sous-unité GluA2 est celle qui est responsable de la perméabilité calcique grâce au site Q/R. Il est remarquable de constater comment cette modification induit une sélection et une introduction de la sous-unité dans les récepteurs par un facteur cinétique en étant prépondérante dans le RE. Tout ceci démontre que l'assemblage des récepteurs n'est pas un processus stochastique [Greger *et al.*, 2007].

Un autre type de modification survient pour l'ATD, le LBD ou le CTD. Elle consiste en l'introduction de résidus palmitoylé (processus de palmitoylation). Dans le cas du CTD, ce phénomène va réguler l'ancrage du récepteur à la membrane ainsi que la disponibilité de sites de phosphorylation [Hayashi *et al.*, 2005].

La migration et l'insertion des récepteurs dans la membrane suivent un processus bien régulé [Barry *et al.*, 2002] [Malinow *et al.*, 2002] [Bredt *et al.*, 2003], dépendant de l'ATD, de la nature des unités constitutives et des signaux portés par le CTD. De même, une fois dans la membrane, la durée de vie d'un récepteur y est variable. Par exemple, des neurones de l'hippocampe expriment deux types d'hétérotétramères, les GluA1-GluA2 et GluA2-GluA3. Il s'avère que les GluA2-GluA3 voyagent de manière continue entre les endosomes et la membrane synaptique [Passafaro *et al.*, 2001] [Shi *et al.*, 2001], alors que les GluA1-GluA2 sont retenus dans les endosomes et ne sont mis à la disposition de la synapse que lors d'une réponse à un stimulus [Hayashi *et al.*, 2000]. Concernant le stockage des récepteurs dans les endosomes et leur migration/insertion dans la membrane via la machinerie du cytosquelette, les hypothèses restent variables et encore floues. Néanmoins, il semblerait

qu'il y ait une sélectivité selon les sous-unités [Gerges *et al.*, 2004] [Park *et al.*, 2004] [Greger *et al.*, 2007].

1.4.3 Internalisation rapide et protéines auxiliaires

Jusqu'il y a une vingtaine d'années, il était communément admis que les récepteurs synaptiques étaient fixes au niveau de la synapse. Or, avec l'affinement des méthodes expérimentales et le développement des techniques optiques, chimiques et électrophysiologiques, plusieurs laboratoires démontrèrent le recyclage rapide des récepteurs dans un cycle constant d'endo/exocytose [Malenka *et al.*, 1999] [Carroll *et al.*, 2001] [Song, 2002] [Bredt *et al.*, 2003] [Collingridge *et al.*, 2004]. Cette démonstration fut suivie par de nombreuses expériences sur les récepteurs AMPA, car leur localisation « fixe » était à l'époque la base de beaucoup de théories sur la mémorisation [Carroll *et al.*, 1999] [Luscher *et al.*, 1999] [Luthi *et al.*, 1999] [Ehlers *et al.*, 2000] [Heynen *et al.*, 2000].

À la suite de l'évolution des technologies, il a pu également être constaté que la localisation des récepteurs variait sous l'impulsion de flux calciques, un élément reconnu pour son rôle dans la transmission neuronale [Borgdoff *et al.*, 2002]. Ainsi, les théories ont pu évoluer, et passer d'une représentation basée sur l'immobilité des récepteurs à un modèle mobile. Ce dernier, appelé « insertion latérale » [Meier *et al.*, 2001] [Serge *et al.*, 2002], est actuellement celui qui est accepté. Il est basé sur un recyclage perpétuel des récepteurs entre la membrane et des vésicules intraneuronales. Pourtant, il n'y a pas de cycle direct entre les récepteurs localisés au niveau de la synapse et ces vésicules [Ashby *et al.*, 2006] [Jaskolski *et al.*, 2009] [Makino *et al.*, 2009]. L'insertion des récepteurs se fait le long de l'axone et non au bouton synaptique. Ainsi, les récepteurs insérés dans la membrane doivent migrer vers la synapse où

ils sont ancrés afin d'exercer leur rôle. Pour l'internalisation, le processus inverse se produit. Les récepteurs doivent quitter le bouton synaptique et se relocaliser sur la partie présynaptique de l'axone pour être relocalisés vers les vésicules [Lin *et al.*, 2007] [Gong *et al.*, 2008] [Petrini *et al.*, 2009] [Thorsen *et al.*, 2010].

Pour maintenir une signalisation cohérente et avoir une régulation fluide des AMPAR au niveau de la membrane synaptique, les récepteurs interagissent avec un grand nombre de protéines annexes. Ces protéines permettent la localisation des récepteurs. La plupart de ces protéines sont cytosoliques et interagissent avec le CTD des AMPAR [Garner *et al.*, 2000] [Scannevin *et al.*, 2000] [Malinow *et al.*, 2002]. Les protéines ABP (*AMPA receptors binding protein*), GRIP (*glutamate receptor interacting protein*) et PICK1 (*protein interacting with C-kinase*) sont des « protéines à PDZ », nommées ainsi en référence aux trois premières protéines présentant ce motif : *Post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), et *Zonula occludens-1 protein* (zo-1). Le motif PDZ est un domaine de 80-90 acides aminés impliqué dans l'ancrage des protéines au niveau membranaire. Ces dernières agissent au niveau du CTD pour ancrer les récepteurs et les assembler en *clusters* à la membrane. Cependant, dans une étude menée par Bats *et al.*, des récepteurs GluA2 dont une partie du CTD a été supprimée ont montré une mobilité similaire aux récepteurs *wild-type* [Bats *et al.*, 2007]. Cette observation appuierait l'hypothèse selon laquelle ce type d'interaction n'affecte pas tant la mobilité dans la membrane, mais bien la modulation de l'expression des récepteurs à la membrane [Choquet *et al.*, 2010]. D'autres protéines telles que NSF (*NEM sensitive factor*) [Nishimune *et al.*, 1998] [Song *et al.*, 1998] [Luthi *et al.*, 1999] ou AP2 interagissent aussi avec le site PDZ et agissent sur la régulation des unités GluA2 via

les phénomènes d'exo/endocytose [Lee *et al.*, 2002]. Dans la lumière de la fente synaptique, d'autres protéines ont aussi manifesté une utilité envers la fixation des récepteurs. Dans cette catégorie se retrouvent la protéine Narp (*neuronal activity-regulated pentraxin*) [O'Brien *et al.*, 1999], la pentraxine NP1 et les N-cadhérines [Sia *et al.*, 2007]. Ces protéines interagissent avec l'ATD des sous-unités des récepteurs. Il semblerait que la majorité de la régulation et de la fixation soit le fruit d'interactions non spécifiques lorsqu'il s'agit de protéines extracellulaires [Frischknecht *et al.*, 2010] [Gundelfinger *et al.*, 2010]. Enfin, une dernière régulation de position des récepteurs peut avoir lieu avec des protéines transmembranaires. C'est notamment le cas avec la stargazine (ou γ -2). La stargazine fait partie des TARP (*transmembrane AMPAR regulatory proteins*) avec les autres protéines γ (3, 4 et 8). L'interaction avec les sous-unités Glu se fait via la partie C-terminale des TARP. Contrairement aux autres protéines auxiliaires, qui ont une spécificité envers certaines sous-unités, la stargazine interfère avec toutes les sous-unités et est donc presque indissociable des récepteurs AMPA [Tomita *et al.*, 2005]. Pourtant, si le mécanisme de recrutement n'est pas encore bien défini, l'absence de stargazine conduit à une nette baisse du signal glutamatergique [Bredt *et al.*, 2003]. Si au sein des neurones, la stargazine est presque indispensable, il est tout à fait possible d'obtenir des signaux AMPA dans des cellules non neuronales où la stargazine est absente [Hollmann *et al.*, 1994]. Néanmoins, lors de la coexpression de cette dernière avec les AMPAR dans des ovocytes ou des cellules non neuronales, une nette augmentation du signal est observée. Ce gain de signal est dû à l'accroissement de la densité de récepteurs à la membrane des cellules non neuronales [Chen L. *et al.*, 2000] [Chen L.W. *et al.*, 2000]. En revanche, comme signalé par les travaux de Schnell, la

surexpression de stargazine dans les neurones n'augmente pas la densité de récepteurs à la synapse, mais élève de cinq à dix fois la proportion totale de récepteurs à la membrane, ce qui implique que c'est la stargazine qui est le facteur limitant de l'expression des récepteurs AMPA à la membrane [Schnell *et al.*, 2002].

Toutes ces interactions avec ces différentes protéines montrent à quel point la mobilité et la localisation des récepteurs AMPA sont essentielles. De plus, leur mobilité est intrinsèquement liée à deux phénomènes extrêmement importants que sont la potentialisation et la dépression à long terme (LTP et LTD).

1.5 Potentialisation et dépression à long terme

Les neurones, comme les autres cellules, régulent activement la concentration en ions dans le cytosol et le milieu extracellulaire. Cette régulation conduit à une différence relative de concentrations pour les principales espèces ioniques (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- et K^+). Au repos, un neurone aura une plus forte concentration intracellulaire qu'extracellulaire en K^+ , et inversement pour les trois autres espèces ioniques. De ce déséquilibre de concentrations d'espèces ioniques résulte un potentiel membranaire au repos qui est de l'ordre de -70 mV. Une augmentation de potentiel se traduit par la dépolarisation de la membrane, jusqu'à devenir positif. Une cellule sera dépolarisée à la suite d'un stimulus et répondra à ce dernier par divers processus (apparition d'un potentiel d'action, libération de neurotransmetteurs...). À l'inverse, une cellule qui voit son potentiel fortement réduit est hyperpolarisée. Lors de ce phénomène, la cellule est beaucoup plus difficile à stimuler et la possibilité de déclencher un potentiel d'action est moindre, car le stimulus requis est bien plus considérable que dans des conditions de repos. Les neurones dans cet état sont en période réfractaire.

Les ions calciques sont particulièrement importants dans le transfert d'informations neuronales. Leur concentration intracellulaire est de l'ordre de 100 nM et est rigoureusement contrôlée et régulée en les stockant dans des organites spécifiques. L'ouverture de canaux laissant entrer un flux calcique accroît la concentration intracytoplasmique dans des valeurs de l'ordre du micromolaire. Cette concentration en ions calciques⁺ conduit à l'activation de plusieurs protéines telles que les *Ca²⁺/calmodulin-dependent proteine kinases* (CaM-kinases), la

calcineurine, la protéine kinase C, les phospholipases A2 et C, l'oxyde nitreux synthase et d'autres protéases. Relevons le cas de CaMKII ou *calcium/calmoduline-dependent kinase* de type 2. Cette kinase intervient grandement dans les phénomènes en lien avec la LTP [Maletic-Savatic *et al.*, 1998] [Lisman *et al.*, 2012] [Huganir *et al.*, 2013]. Selon Barria, elle est supposée être le point d'entrée d'une cascade de phosphorylation qui permet l'ancrage de récepteurs à la membrane [Barria *et al.*, 2005] [Zhou *et al.*, 2007] [Halt *et al.*, 2012]. Elle fut décrite par Lisman, comme étant la « molécule de la mémoire » dont la stimulation prolongée menait à l'autophosphorylation, la rendant indépendante des flux calciques, limitant ainsi son temps de recrutement et facilitant la phosphorylation des récepteurs et le processus vaste de la LTP [Lisman *et al.*, 2012]. Cette théorie ne serait pourtant pas correcte au vu des expériences de Lee [Lee *et al.*, 2009], qui montrent que l'activation n'est que transitoire. Quoiqu'il en soit, son lien avec la LTP n'est pas remis en cause, ni son action, transitoire ou continue, sur les récepteurs canaux ainsi que sur d'autres protéines du bouton synaptique [Roche *et al.*, 1996] [Barria *et al.*, 1997a-b] [Mammen *et al.*, 1997] [Yoshimura *et al.*, 2000] [Yoshimura *et al.*, 2002] [Vinade *et al.*, 2010].

1.5.1 Mécanisme de la potentialisation à long terme

Au niveau de la synapse glutamatergique, en ne s'intéressant qu'aux récepteurs canaux, la majorité du flux calcique provient exclusivement des récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA et KA étant rendus imperméables à cause d'unités éditées sur le site Q/R. En tenant compte que les récepteurs NMDA sont voltage- et ligand-dépendants, il faut une première activation des récepteurs AMPA et KA pour obtenir une faible dépolarisation membranaire pour éliminer la présence d'ion Mg^{2+}

bloquant ainsi le pore des canaux NMDA ; le neurone est alors en état de dépolarisation. Une fois le magnésium hors du pore, les canaux NMDA s'ouvrent et conduisent à l'augmentation du flux calcique. Ceci induit l'activation des diverses protéines dépendantes de ces ions. Suite à cette activation et à des flux répétés, ces mécanismes mènent au phénomène de potentialisation à long terme (LTP).

Le principal sujet d'étude de la LTP est la mobilité des récepteurs AMPA et leur ancrage dans la membrane synaptique, car ce sont eux qui permettent la suite d'activation, et finalement, tout le mécanisme de signalisation neuronale. En l'absence de récepteurs AMPA, il n'y a pas de dépolarisation, pas d'élimination du Mg^{2+} du pore des canaux NMDA, et pas de signal. Or une kinase, la CaMKII [Kessels *et al.*, 2009] [Anggono *et al.*, 2012] [Lisman *et al.*, 2012] [Lüscher *et al.*, 2012], semble être la clé de voûte du contrôle du trafic et de l'ancrage des AMPAR à la membrane, même si la méthode exacte d'action, l'autophosphorylation et la désensibilisation calcique [Lisman *et al.*, 2012] ou la cascade de phosphorylation [Lee *et al.*, 2009] sur diverses protéines, ne semble pas réellement connue. Néanmoins, depuis les années 1980, il est généralement accepté que l'action de CaMKII sur les AMPAR est critique pour la plasticité neuronale [Kennedy *et al.*, 1989] [Wyllie *et al.*, 1993] [Nicoll *et al.*, 1999]. Lorsque les sous-unités d'un récepteur AMPA sont phosphorylées, elles ont tendance à rester figées dans la synapse, ou à défaut, leur insertion y est facilitée [Barria *et al.*, 1997a] [Kameyama *et al.*, 1998] [Lee *et al.*, 1998] [Lee *et al.*, 2000] [Barry *et al.*, 2002].

Ainsi, une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse permet de la rendre plus sensible aux stimuli. Lorsqu'un neurone est constamment stimulé, les phénomènes de démarrage pour les LTP se mettent en place, via les cascades de phosphorylation dépendant de la

concentration calcique. L'insertion de récepteurs est alors plus aisée. Une concentration plus importante de récepteurs est alors rencontrée à la membrane, mais plus faible dans les vésicules intracellulaires. Si ce neurone est toujours stimulé, il répondra d'autant plus qu'il y a de récepteurs AMPA ; il sera plus sensible. Suite à cela, un deuxième phénomène, appelé LTP tardive, se met en place. Il comprend la resynthèse de nouveaux récepteurs et implique de nombreux seconds messagers, mais surtout permet à la LTP de se maintenir durant des jours, des mois ou des années, là où les phosphorylations ne conservent cet état que pour quelques heures [Bear *et al.*, 2006]. Au vu de ces différents points, il est couramment accepté que le processus de mémorisation est sous-tendu par le phénomène de LTP [Silva *et al.*, 1998] [Barco *et al.*, 2002] [Lonze *et al.*, 2002].

1.5.2 Mécanisme de la dépression à long terme

A contrario, il existe aussi un phénomène de dépression à long terme. Ce mécanisme se traduit par une diminution de l'activité synaptique, suite à un manque de stimulation de cette synapse. De même, à la manière du LTP soutenu par le phénomène d'exocytose des récepteurs AMPA et le renforcement de leur concentration à la synapse, c'est le phénomène d'endocytose des récepteurs, et donc un appauvrissement de la synapse en récepteurs AMPA, qui étaye le LDP [Malinow *et al.*, 2002]. Cet amoindrissement va rendre la synapse moins sensible au glutamate, puisque lorsqu'il y aura libération, moins de récepteurs AMPA pourront être activés (car moins présents) jusqu'à une limite de dépolarisation où le neurone ne pourra plus activer les récepteurs NMDA. En l'absence d'activation de ces récepteurs, une plus

grande quantité de récepteurs AMPA sont internalisés, la rendant encore moins sensible, jusqu'à devenir une synapse silencieuse.

1.6 Potentialiser les récepteurs AMPA

L'impact des récepteurs AMPA dans les phénomènes de mémorisation a contribué à les convertir en cibles pharmacologiques pour pallier diverses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou la maladie de Parkinson, ainsi que certains troubles cognitifs tels que l'ADHD (*attention deficit hyperactivity disorder*) ou la dépression [Goff *et al.*, 2001] [Lynch *et al.*, 2004] [O'Neill *et al.*, 2004] [Alt *et al.*, 2006] [Sanacora *et al.*, 2008] [Adler *et al.*, 2012].

Pour des raisons évidentes liées à l'excitotoxicité, l'utilisation de molécules de la classe des agonistes n'est pas souhaitée. Si ces dernières ne peuvent être employées dans un but thérapeutique, elles restent d'excellents outils pharmacologiques.

Par contre, l'utilisation de modulateurs allostériques positifs, qui occupent un site allostérique et non le site orthostérique du ligand naturel (ici le L-glutamate), semble être une approche plus judicieuse pour la potentialisation des AMPAR. En effet la plupart des modulateurs allostériques conduisent à un effet qu'en présence d'un ligand dans la poche orthostérique.

1.6.1 Méthode d'action

En interagissant avec la poche d'allostérie, les différentes familles de modulateurs vont stabiliser le récepteur dans une configuration active. Selon le type de modulateur, l'action peut influencer sur la désactivation ou la désensibilisation du récepteur [Sun *et al.*, 2002] [Jin *et al.*, 2005] [Harpsøe *et al.*, 2007] [Harpsøe *et al.*, 2008]. En agissant sur la **désactivation**, c'est-à-dire le processus de fermeture du canal par

élimination du glutamate du site orthostérique, les modulateurs augmentent l'affinité du récepteur pour le glutamate dans sa configuration liée et canal ouvert. Ou alors, en agissant sur la **désensibilisation**, c'est-à-dire le processus au cours duquel le canal se ferme malgré la présence de L-glutamate au sein du site orthostérique, les modulateurs stabilisent le canal dans sa forme ouverte.

Les modulateurs semblent agir sur trois axes [Lynch *et al.*, 2006] pour avoir un effet global :

- Ils augmentent la transmission AMPA en causant moins d'effets secondaires qu'un agoniste pur [Luebke *et al.*, 2004].
- Ils facilitent tant l'induction du LTP que sa force, permettant ainsi une amélioration du processus de mémorisation [Lynch *et al.*, (2002)].
- Ils permettent une synthèse et une libération accrue de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) qui augmente la plasticité synaptique [Kramar *et al.*, 2004] [Bramham *et al.*, 2005] [Lu *et al.*, 2005].

Dans cette optique, un certain nombre de familles de modulateurs ont été caractérisées et brevetées [Pirrotte *et al.*, 2013]. Les pages suivantes décrivent les principales familles répertoriées à ce jour.

1.6.2 Les familles structurales de modulateurs

1.6.2.1 **Benzamides et structures apparentées**

Cette famille de composés est historiquement la plus ancienne. En effet, l'aniracétam (**25**) fut la première molécule référencée comme modulateur allostérique des AMPAR. Pourtant, cette molécule présentait un très mauvais profil pharmacologique avec une faible activité et une métabolisation très rapide. Les modifications de *drug design* rationnel lui furent appliquées pour développer des molécules bien plus intéressantes.

En 1994, Cortex propose CX516 (**26**), qui présente une perte du lactame et un agrandissement du cycle contenant l'azote de l'amide, mais aussi un deuxième cycle fusionné aux noyaux aromatiques. CX546 (**27**), l'isostère présentant deux atomes d'oxygène de CX516 (**26**), suivra très vite dans la production. Paradoxalement, bien que très proches structurellement, ces deux molécules ont des modes et des sites d'action différents [Arai *et al.*, 2002]. Cette distinction sépare d'ailleurs cette famille en deux catégories selon le site de fixation.

L'étape suivante pour le développement de cette famille fut de rigidifier la structure en fusionnant les deux parties cycliques, ce qui donna CX554 (**28**) et CX614 (**29**). Cette structure rigide tétracyclique servit encore au développement de molécules de cette famille jusqu'en 2011 [Mueller *et al.*, 2011]. Le squelette rigide y est conservé et une chaîne avec un noyau aromatique y est apposée. Ce type de molécules présente une activité centrée sur une gamme de concentrations de l'ordre du nanomolaire. Néanmoins, aucune d'entre elles n'est arrivée au stade thérapeutique. Les pathologies cibles potentielles visées par ces familles couvrent divers troubles et maladies du SNC, comme la schizophrénie, la

maladie d'Alzheimer, les troubles du rythme circadien ou les troubles légers de l'attention.

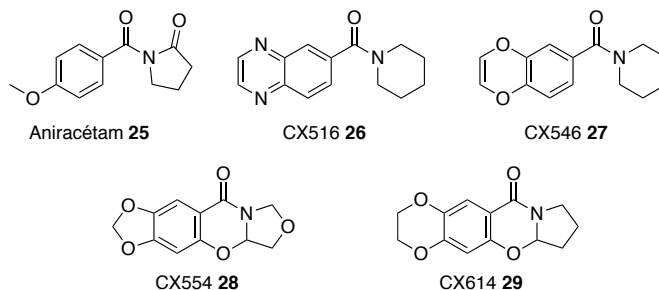


Figure 15. Aniracétam (21) et dérivés.

1.6.2.2 *N*-biarylpropanesulfonamides et dérivés

Eli Lilly disposait d'un test pharmacologique permettant l'évaluation de la réponse des récepteurs AMPA. Leurs laboratoires ont ainsi pu réaliser le *screening* de composés précédemment synthétisés n'ayant pas montré d'activité sur une autre cible. Pas ces *screenings* de leurs chimiothèques, la molécule (30) fut le premier « composé *hit* » de cette nouvelle série. Des pharmacomodulations ont permis d'aboutir à l'obtention du LY392098 (31) et du LY404187 (32) qui montrèrent une excellente activité *in vitro* [Gates *et al.*, 2001] [Miu *et al.*, 2001] et *in vivo* [Vandergriff *et al.*, 2001]. De son côté, GSK a développé deux types de molécules, l'un où l'espacement entre les cycles et l'azote est un pont éthylène inclus dans un cycle comme sur les molécules (33) et (34), et l'autre introduisant un cycle juxtaposé au noyau aromatique (35) [Bradley *et al.*, 2006].

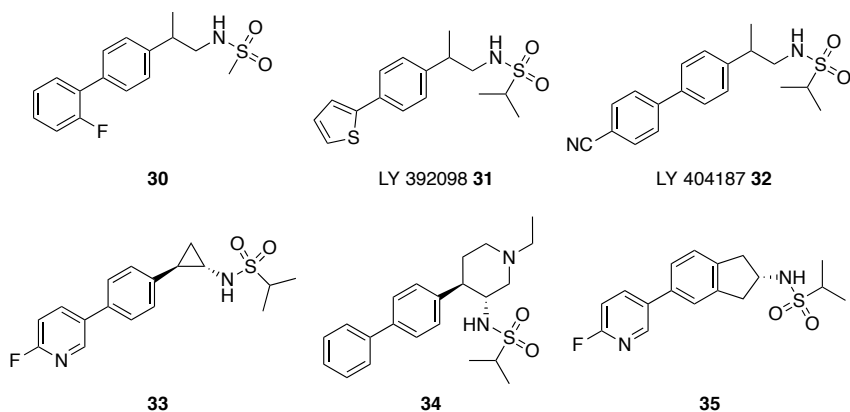


Figure 16. *N*-biarylpropanesulfonamides.

Ce modèle d'indanyl-2-propanesulfonamide (**35**) servit aussi chez Organon comme l'attestent les molécules (**36**) et (**37**). Pfizer proposa des molécules de la série et conserva plutôt le système bicyclique en développant les molécules (**38**) et (**39**). Ces dernières montrent une très forte activité *in vitro* ; pourtant, elles furent excessivement décevantes lors du passage *in vivo* à cause de leur faible distribution dans le cerveau. C'est définitivement la molécule (**35**) qui présente encore le meilleur profil pharmacocinétique [Ward *et al.*, 2010]. Pour terminer, il y a aussi la molécule (**40**) développée par H. Kaae [Kaae *et al.*, 2007] qui est la première et seule autre molécule dimérique décrite dans la littérature à être active comme modulateur AMPA. Son cas sera traité plus en détail ultérieurement.

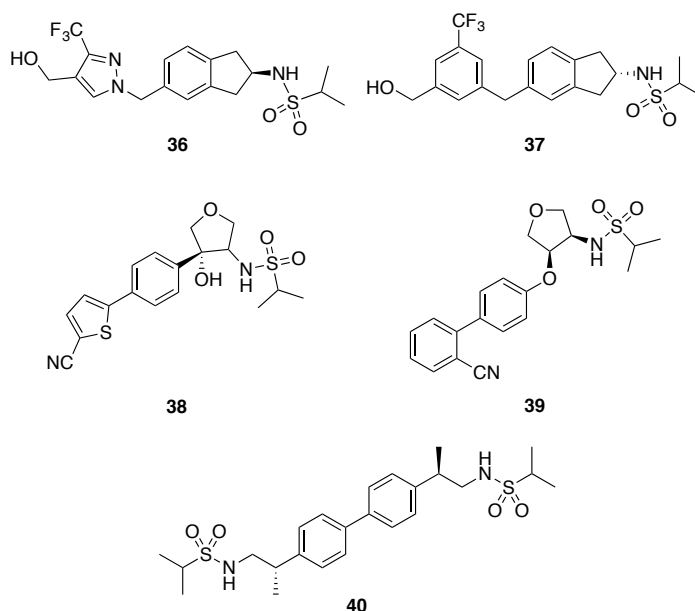


Figure 17. Seconde génération de *N*-biarylpropanesulfonamides.

1.6.2.3 Autres classes

Eli Lilly a démontré l'activité potentiatrice sur les récepteurs AMPA d'acides thiophénecarboxyliques ou pyrrolocarboxyliques, dont deux exemples sont (41) et (42). Toutefois, il n'y a plus eu de brevets déposés sur cette classe de molécules depuis 2012.

GSK a aussi développé une série de phényliminothiazoles (43). Ici aussi, la recherche semble être au point mort depuis 2009.

Enfin, il reste la classe des 3-trifluorométhylpyrazoles qui furent développés en parallèle par Organon (44), GSK (45 - 46) et Takeda (47) au cours des années 2000. La molécule (48) fut développée et caractérisée par l'équipe du Dr Partin [Harms *et al.*, 2013].

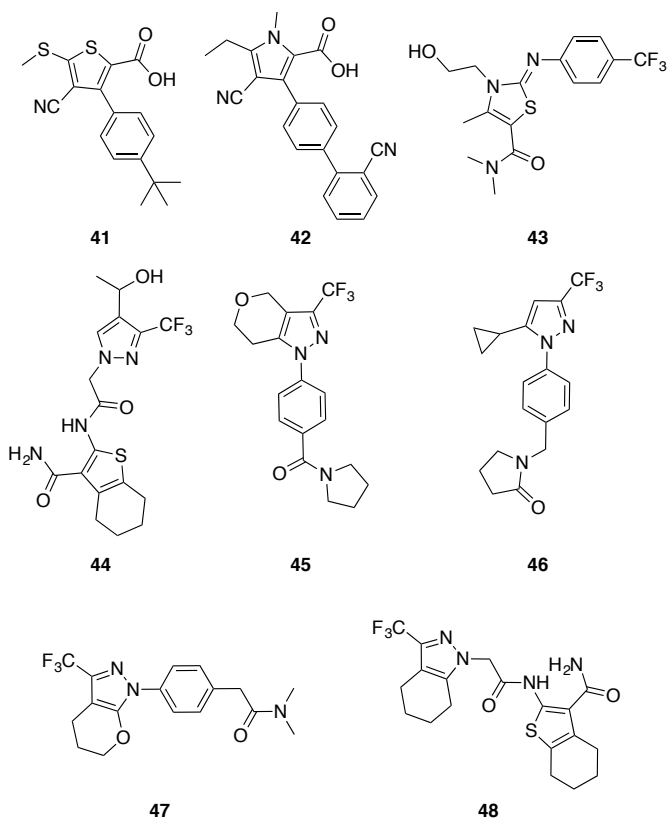


Figure 18. Autres modulateurs allostériques positifs.

1.6.2.4 Benzothiadiazines et autres thiazines

Cette importante classe de modulateurs allostériques positifs se base sur la pharmacomodulation de trois molécules historiques que sont le diazoxide (**49**) [Piroette *et al.*, 1995], un ancien agent antihypertenseur agissant sur l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants, son analogue saturé IDRA-21 (**50**) et le cyclothiazide (**51**), un composé connu pour ses propriétés diurétiques. Ils agissent tous les trois sur les AMPAR en inhibant leur **désensibilisation** [Yamada *et al.*, 1992] [Randle *et al.*, 1993] [Yamada *et al.*, 1993]. L'IDRA-21 (**50**) se révèle être le plus intéressant des trois ; bien qu'il ne soit pas le plus puissant *in vitro*, il se montre le plus actif *in vivo*. Cette forte différence d'activité provient du

fait que le cyclothiazide, de par ses propriétés physico-chimiques, ne parvient pas à passer la barrière hématoencéphalique.

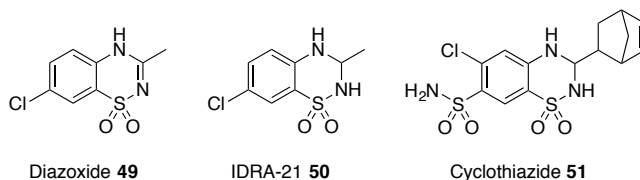


Figure 19. Molécules historiques.

Le groupe Servier fut le principal instigateur concernant le développement de cette famille. En 1996, le composé (**52**) pyrrolo-benzothiadiazine émergea. Sa caractérisation pharmacologique complète [Lockhart *et al.*, 2000] [Rosi *et al.*, 2004] permit de mettre en avant son mode d'action et de démontrer son effet *in vivo* chez le rat [Lebrun *et al.*, 2000] [Dicou *et al.*, 2003]. Ce premier succès engendra la réalisation d'une seconde génération (**53** - **54**) de composés pyrrolobenzothiadiazines [Desos *et al.*, 2004] [Desos *et al.*, 2006]. L'ajout d'un groupement aromatique en position 7 sera d'ailleurs repris plus tard par l'équipe du professeur Pirotte et montrera aussi un gain d'activité [Goffin *et al.*, 2017]. Le composé (**53**) fut le seul de cette catégorie à entrer en phase clinique, mais il n'atteignit pas la mise sur le marché ; son développement est à ce jour arrêté [Pirotte *et al.*, 2013].

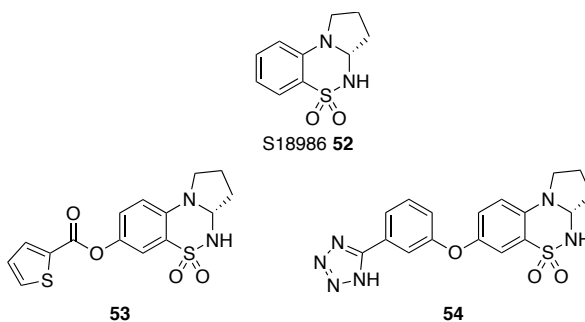


Figure 20. S18986 (**52**) et ses dérivés.

En parallèle à ces recherches, Neurosearch Company déposa un brevet sur des analogues du cyclothiazide (**51**) [Gouliaev *et al.*, 1999] [Gouliaev *et al.*, 2003]. Le squelette global du cyclothiazide (**51**) y est conservé comme en atteste (**55**) et (**56**) ; cependant, divers changements sont apportés sur la nature des cycles donnant des benzothiazines, des benzothiadiazines ou des quinazolines. Cette famille tend aussi à conserver un substituant cycloalcane sur sa position 3 (dans les exemples présentés, le substituant norbornène du cyclothiazide est simplifié en cyclohexane).

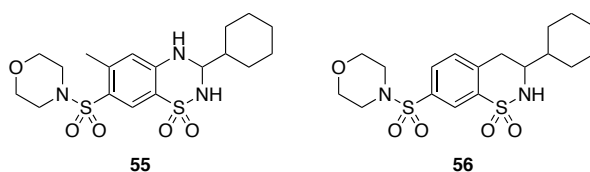


Figure 21. Variants du cyclothiazide (**51**).

Le Laboratoire de Chimie Pharmaceutique du Pr Pirotte (LCP-ULiège), en partenariat avec Servier au cours des années 90, a travaillé à la pharmacomodulation de l'IDRA-21 (**50**). La première série investiguée est celle des pyridothiadiazines dioxydes, équivalents bioisostériques, où le noyau benzène est substitué par un noyau pyridine (**57** - **58** - **59**) [Pirotte *et al.*, 1998]. Le meilleur des composés de ces séries, tant sur la position de l'azote que sur la nature du substituant en positions 2, 3 et 4, est la molécule (**60**). Malheureusement, elle montra peu d'activité *in vivo* dans le cadre du test de reconnaissance des nouveaux objets chez le rat.

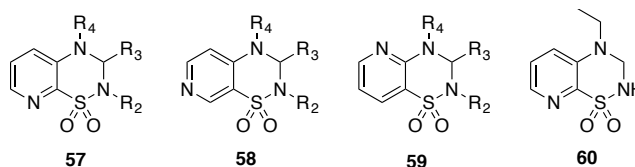


Figure 22. Série pyridothiadiazine dioxyde et composé *hit* (**60**).

Sur base de ces résultats, l'équipe du Pr Pirotte est revenue sur le cycle benzénique et étudia divers substituants. En série halogénée, les composés **(61)** et **(62)** apparurent comme des « composés *hits* » [Pirotte *et al.*, 2001] [Francotte *et al.*, 2007]. L'étude *in vivo*, en administration orale chez le rat, démontra que le **(62)** montrait un impact important sur l'amélioration des performances cognitives. Néanmoins, il s'avéra toxique (convulsions) une fois donné à une dose de 30 mg/kg.

Ensuite, les travaux de l'équipe se concentrèrent sur l'amélioration du profil pharmacocinétique de cette famille, menant au composé **(63)**. La voie de métabolisation principale conduit à la rupture de la liaison entre la chaîne alkyle et l'atome d'azote en position 4. L'introduction d'un seul atome de fluor en bout de chaîne a permis d'augmenter grandement le temps de demi-vie (métabolisation plus lente) du composé **(63)** par rapport à son parent **(61)**. Cette modification structurale n'a pour ainsi dire pas d'impact négatif sur l'activité du composé [Francotte *et al.*, 2010].

L'introduction en position 4 d'un groupement cyclopropyle augmente l'activité des différents composés. Un gain d'environ un log peut être observé en passant de la molécule **(62)** à la molécule **(64)** [Nørholm *et al.*, 2013]. Cette amélioration relative s'observe quelle que soit la nature du substituant sur le cycle aromatique et est uniquement liée à l'interaction du groupement cyclopropyle, qui vient probablement occuper une petite poche hydrophobe du site de *binding*. Signalons aussi que le composé **(64)** est la première molécule à avoir montré une activité en tant que modulateur allostérique positif sur les récepteurs KA [Larsen *et al.*, 2017].

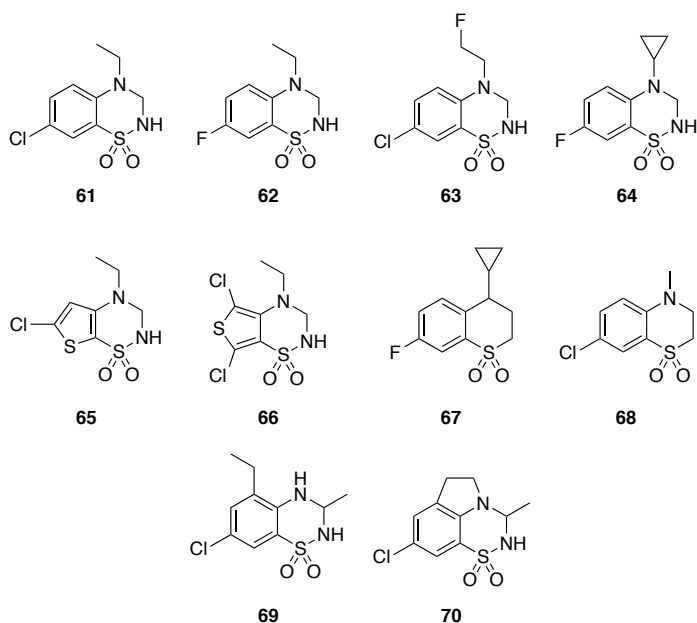


Figure 23. Dérivés de l'IDRA-21 (**50**).

En parallèle à ces améliorations pharmacocinétiques, d'autres composés isostériques ont été développés. En effet, le remplacement isostérique par un cycle pyridinique ayant montré de bons résultats, la possibilité de remplacer ce cycle benzène par un noyau thiophène a également été examinée. Leurs recherches aboutirent à des composés tels que (**65**) ou (**66**) [Graindorge, 2004].

Plus récemment, des dérivés de type 1,4-benzothiazine (**68**) et thiochromane (**67**), où soit l'un, soit les deux atomes d'azote sont remplacés par des atomes de carbone, se sont montrés d'excellents modulateurs AMPA [non publiés]. Les remplacements isostériques sur ce cycle semblent donc tout aussi prometteurs, et pourraient être la cible de pharmacomodulations ultérieures.

Une autre voie dans cette série a été étudiée par Chamberlin et ses collaborateurs. Ils rapportent que des dérivés de l'IDRA-21 (**50**) portant

un substituant sur la position 5 et non en 4 sont des candidats actifs en tant que modulateurs AMPA (**69**) [Philips *et al.*, 2002].

Enfin, des travaux récents font mention de composés substitués en position 5 par un cycle furane (**72**) [Citti *et al.*, 2016]. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que le composé (**72**) pourrait être un nouveau point de départ pour des molécules originales. En effet, les auteurs indiquent qu'au cours du processus métabolique, la liaison 2 de certains analogues de l'IDRA-21 (**50**) est oxydée, fournissant des dérivés insaturés structurellement plus proches du diazoxide (**49**). Ces composés insaturés présentent une plus grande stabilité métabolique et sont achiraux. Ces deux qualités sont recherchées lors du développement de candidats médicaments. De manière similaire, ces phénomènes d'oxydation du noyau thiadiazine avaient été observés pour les séries du LCP [Francotte *et al.*, 2010].

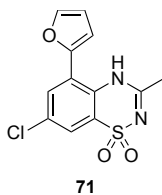


Figure 24. Nouveau composé insaturé.

1.7 La poche d'allostérie

Les différentes familles de molécules précédemment citées ont comme point commun de toutes interagir avec la même zone des AMPAR. Cette dernière est dès lors reprise sous le nom de **poche allostérique**. Toutefois, les acides aminés de cette zone, impliqués lors des interactions avec les modulateurs, varient selon les familles de modulateurs. Ces différences expliquent les modes d'action hétéroclites rencontrés.

Diverses données cristallographiques de modulateurs, cocrystallisés avec le LBD du récepteur, ont été réalisées afin d'étudier leurs interactions. Les travaux de Jin portent sur la cocrystallisation de l'aniracétam (**25**) et de CX614 (**29**) avec le LBD d'une sous-unité GluA2_o [Jin *et al.*, 2005]. Ils montrent que ces deux molécules occupent le même site et interagissent avec les mêmes acides aminés, ce qui conduit à des mécanismes d'action similaires. Les travaux de Sun permirent quant à eux de mettre en évidence la zone d'interaction du cyclothiazide (**51**) au sein du LBD par cocrystallisation [Sun *et al.*, 2002]. Contrairement à l'aniracétam (**25**) ou au CX614 (**30**) qui présentent une stœchiométrie d'une molécule par maille cristalline (interface entre deux protéines), le cyclothiazide possède une stœchiométrie de deux molécules par maille. Ces résultats prouvèrent pour la première fois l'existence de plusieurs sites d'interaction possibles au sein du LBD pour les modulateurs allostériques positifs de l'AMPA (AMPApam pour *AMPA positif allosteric modulators*). Plus tardivement, en 2007, les travaux de Kaae [Kaae *et al.*, 2007] ont mis en évidence un autre mode de fixation au niveau de l'interface de deux LBD. Comme illustré sur la figure 25, leur molécule (**40**) place ses deux cycles aromatiques à l'endroit de fixation de

l'aniracétam et les acides aminés interagissant avec les parties hydrophobes du cyclothiazide (en particulier, le groupement norbornène) vont, dans le cas du composé (40), plutôt entrer en interaction avec les groupements sulfonamides.

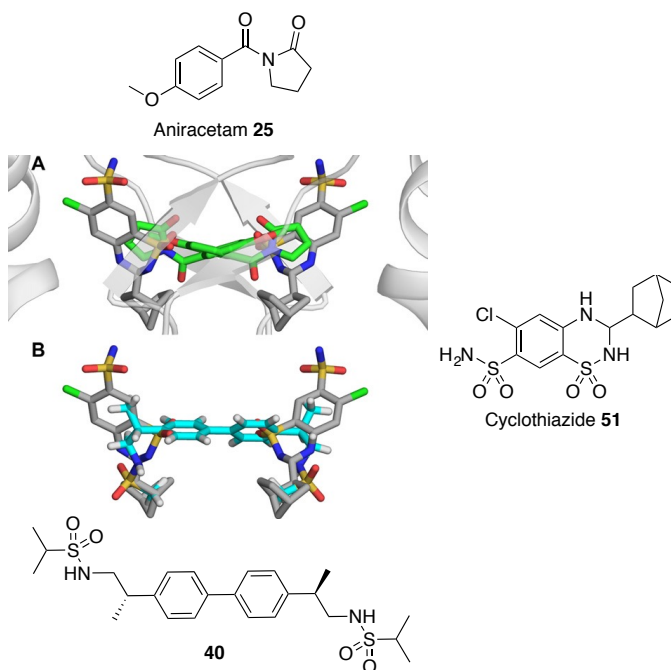


Figure 25. (A) Mode de fixation du cyclothiazide (51) (gris) et de l'aniracétam (25) (vert : deux orientations sont possibles et se recourent) dans la poche d'allostérie du GluA2. (B) Mode de fixation de (40) (cyan) superposé à la méthode de fixation du cyclothiazide (gris) (adapté de [Kaae *et al.*, 2007]).

Il est remarquable de constater que les différentes classes d'AMPApam se lient dans une zone relativement restreinte du LBD des AMPAR. C'est Ptak, en 2009, qui a rationalisé les différentes méthodes de *binding* et décrit en détail la structure de cette zone unique [Ptak *et al.*, 2009]. La caractérisation de la zone ou de la poche d'allostérie est celle qui est aujourd'hui acceptée (figure 26).

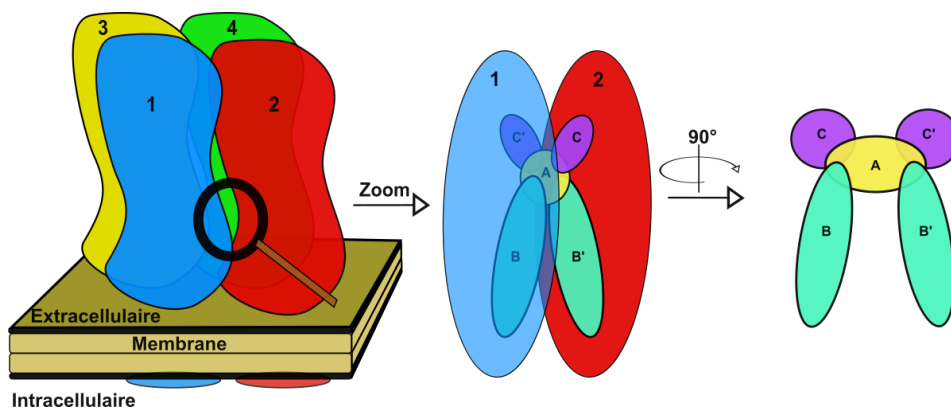


Figure 26. Gauche : représentation simplifiée de la structure tétramérique d'un récepteur AMPA. Centre : zoom sur la poche d'allostérie. La protéine 1 est positionnée devant la poche, la protéine 2 se trouve derrière. B et C' sont majoritairement constitués d'acides aminés de 1 et *vice versa* pour leurs correspondants. Droite : rotation de 90° de la poche montrant une forme de U et sa structure en cinq sous-poches.

Comme précédemment évoqué, les AMPAR sont des canaux résultant d'un assemblage de dimères de dimères. C'est à l'interface de ces dimères que se trouve la poche allostérique (figure 26 - gauche). Ainsi, chaque canal comprend deux poches d'allostérie. Ces poches sont situées de part et d'autre des deux sous-unités (figure 26 - centre). Ptak et ses collaborateurs décrivent la poche comme ayant la forme d'un U renversé [Ptak *et al.*, 2009]. Il apparaît enfin que la poche est subdivisée en trois sous-sites de fixation qui permettent d'expliquer les observations précédentes (figure 26 - droite).

Le site A dispose d'une localisation centrale à l'interface des deux sous-unités. Il est symétrique par rapport aux deux sous-unités et fait donc intervenir les mêmes acides aminés. C'est le site de fixation de l'aniracétam et de ses dérivés. Généralement, les modulateurs qui s'y fixent le font avec une stœchiométrie de deux molécules par récepteur (une dans chaque poche de part et d'autre de ce dernier) comme l'aniracétam.

Les branches du U qui sont constituées par quatre sous-sites symétriques deux à deux (B, B', C, C') de telle sorte que chaque branche est le reflet de l'autre. Les sites B et C' sont majoritairement constitués d'acides aminés de la protéine 1, tandis que les sites B' et C sont constitués d'acides aminés de la protéine 2 (figure 26 - centre). La branche constituée de B et de C se trouve sur la gauche du site A, tandis que la branche constituée de B' et de C' se trouve à la droite de A (figure 26 - droite). Le site B est plus large et hydrophile, car plus exposé au cytosol. Le site C est donc plus petit que le B, constitué de résidus plus hydrophobes et plus enfoui dans la protéine. Les AMPApam qui se lient dans ces sites le font généralement avec une stœchiométrie de 4 molécules par récepteur [Ptak *et al.*, 2014]. C'est notamment le site de fixation du cyclothiazide (**51**) et des benzothiadiazines dioxides.

La bonne activité du cyclothiazide (**51**) s'explique par sa structure, qui s'adapte particulièrement bien aux sites B et C' [Phillips *et al.*, 2001] [Harpsoe *et al.*, 2007]. Le groupement hydrophobe norbornène se loge dans la poche C. Des travaux antérieurs avaient par ailleurs déjà mis en évidence que le reste bien plus hydrophile était en contact avec le cytosol au niveau du site B dans le modèle de Ptak [Yamada *et al.*, 1993]. Pourtant, lorsque le substituant norbornène est retiré, comme dans le cas des dérivés de l'IDRA-21, le modulateur modifie ses interactions et vient loger son cycle aromatique dans le site C. Ainsi, bien que faisant partie de la même famille de molécules, elles se fixent dans la même poche, mais avec une géométrie différente [Kessler *et al.*, 1996] [Arai *et al.*, 1998] [Arai *et al.*, 2002]. Cette différence dans le mode de liaison suffit à lui seul à expliquer les profils pharmacologiques différents au sein d'une même famille. Ces hypothèses peuvent être confirmées à l'examen du comportement d'un dérivé tel que (**69**) ; un substituant en position 5 sera

favorable dans le cas des dérivés de l'IDRA-21 [Phillips D., 2002], ce dernier pouvant interagir avec le site B, alors que sur le cyclothiazide, la substitution en 5 même par un petit groupe (méthyle) (**72**) est fortement défavorable, et en effet, elle se traduira par un clash stérique et une perte d'activité [Ptak *et al.*, 2014].

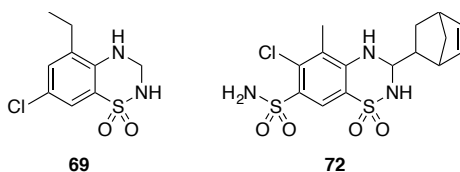


Figure 27. Composés substitués en position 5.

Chapitre 2

But du travail

2.1 Concept préliminaire et faisabilité

2.1.1 Présence d'un motif double

La littérature de ces dernières décennies semble montrer que l'utilisation de motifs protéiques répétés s'associant sous la forme de dimères est favorisée. Les récepteurs canaux pour être fonctionnels sont issus de l'association de plusieurs sous-unités pour générer le pore, il est donc logique d'observer un motif répétitif. D'un autre côté, dans la famille des GPCR, certains récepteurs stéroïdiques, bien que ne présentant pas de symétrie dans leur état natif, sont connues pour dimériser au cours de leur activation [Bergmann *et al.*, 1994] [Bérubé *et al.*, 2006]. Ainsi, même si elles ne sont pas clairement symétriques dans un premier temps, la symétrie apparaît au cours de l'activation.

Une proportion importante de molécules naturelles ou synthétiques, présentant une activité sur le vivant, possède au moins un axe de symétrie. Par exemple, 22 % des molécules naturelles qui présentent une symétrie bilatérale produisent une inhibition enzymatique. Ce pourcentage est plus faible (8 %) pour des composés non dotés de symétries intramoléculaires [Voloshchuk *et al.*, 2004] [Geer *et al.*, 2006]. Pour les molécules synthétiques, des composés appartenant à plusieurs classes thérapeutiques (la plupart ayant une action sur le SNC), comme les anxiolytiques (**73** - **74**), les anesthésiques (**75**) ou les narcotiques (**76**), possèdent un axe de symétrie [Bérubé *et al.*, 2006].

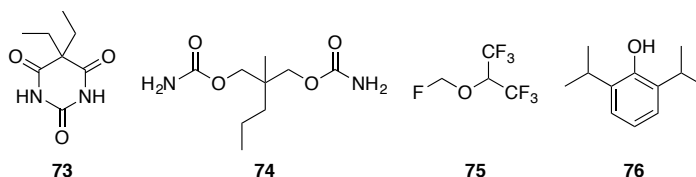


Figure 28. Molécules de synthèses bivalentes.

La littérature rapporte un ensemble assez vaste de molécules bivalentes. Il faut cependant faire attention au terme de « dimère ». Trois cas de figure peuvent se manifester :

- Les molécules présentent un centre ou un axe de symétrie. D'un point de vue structure/activité, elles ne proposent pas nécessairement deux pharmacophores distincts reliés par un pont. Par exemple, le propofol (**76**) constitue un exemple de choix de cette catégorie. Il présente un plan de symétrie, mais pas deux pharmacophores distincts [Greer *et al.*, 2006].
- Ensuite, des molécules synthétiques issues de la pharmacomodulation de molécules naturelles présentent un pharmacophore double. Ce type de « dimère » à deux pharmacophores n'en est pas un ; en effet, le pharmacophore actif implique l'existence des deux unités. L'exemple le plus parlant est la famille des curarisants. Ces composés possèdent deux ammoniums quaternaires qui leur permettent d'interagir avec deux sites distants des récepteurs muscariniques. Ils possèdent donc deux pharmacophores distants, mais ceux-ci sont présents dans l'extrait de curare, dont l'alcaloïde actif est la tubocurarine (**77**). Ils ont été conservés au cours de la pharmacomodulation, et ils se retrouvent dans le pancuronium (**78**) ou le suxaméthonium (**79**), qui sont les produits pharmaceutiques.

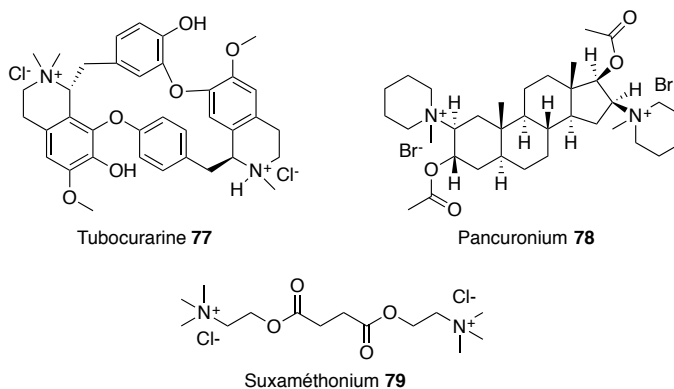


Figure 29. Molécules de la classe des curarisants.

- Enfin, les dimères *sensu stricto* sont constitués par l'assemblage de deux pharmacophores identiques reliés par un pont en une seule molécule.

2.1.2 La dimérisation

La dimérisation est un processus classique de pharmacomodulation et un cas particulier de l'hybridation.

L'hybridation consiste à assembler deux pharmacophores pour obtenir une troisième entité. Un exemple bien connu est l'estramustine (**80**), utilisé dans le traitement de cancers hormono-dépendants, il découle de l'assemblage de l'œstradiol et d'un agent alkylant. L'agent alkylant, de type « moutarde à l'azote », est la partie active de la molécule et permet un effet cytotoxique. L'œstradiol permet d'atteindre sélectivement la cible (fonction d'adressage). L'hybridation peut aussi conduire à la formation de *prodrug*. Citons ici le bénorylate (**82**) constitué d'une part de paracétamol (**83**) et d'acide acétylsalicylique (**81**). Cet hybride est la *prodrug* de ses espèces constitutives antalgiques.

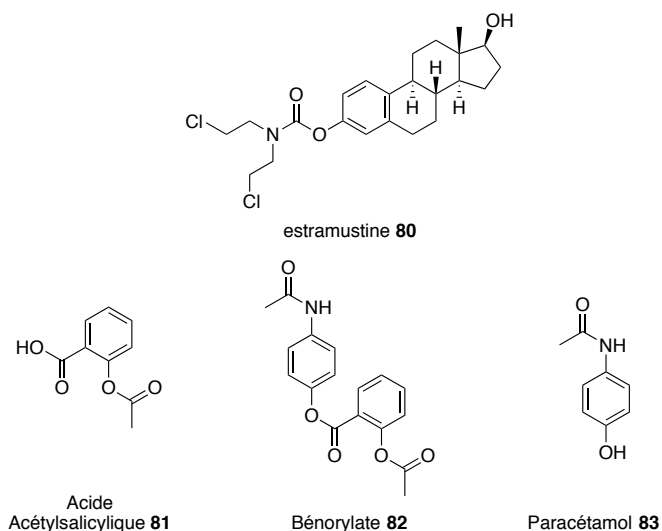


Figure 30. Exemple d'hybrides.

La conception de dimères semble trouver son origine vers le milieu des années quatre-vingt [Zhang *et al.*, 2007]. Cette stratégie dérive de l'hybridation, mais utilise le même pharmacophore repris deux fois séparé par un pont. Sur cette base qui semble simple et rationnelle, un certain nombre de molécules dimères ont vu le jour et ont démontré une amélioration significative par rapport à leurs monomères constitutifs [Halazy *et al.*, 1999] [Messer *et al.*, 2004] [Bérubé *et al.*, 2005].

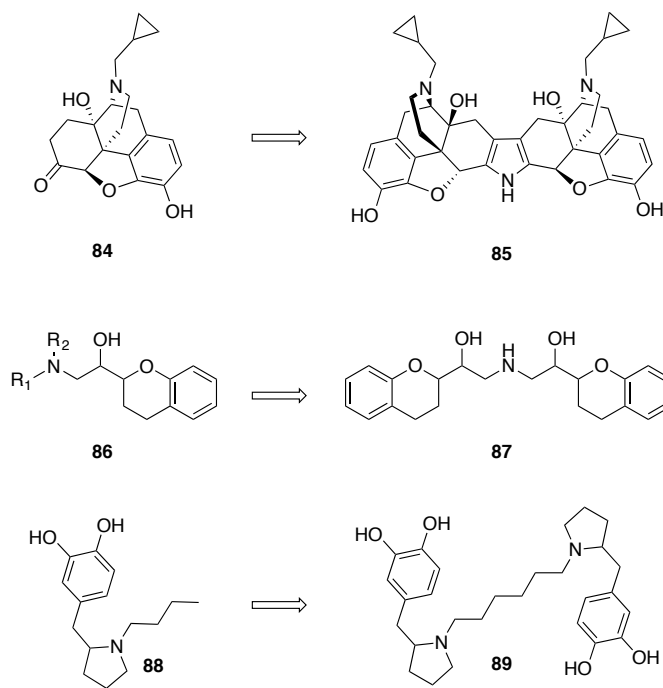


Figure 31. Exemples de succès dans la réalisation de molécules dimères et leurs monomères constitutifs.

La figure 31 reprend quelques exemples de molécules pour lesquelles l'approche de la dimérisation s'est avérée être un succès. Dans le cadre des récepteurs aux enképhalines, la norbinaltorphimine (**85**) est un antagoniste spécifique des récepteurs morphiniques κ . Elle est le résultat des travaux des équipes de Portoghese. C'est à la suite de la découverte de la dimérisation des récepteurs morphiniques que des études de pharmacomodulation ont été menées [Lipowski *et al.*, 1987] [Portoghese *et al.*, 1987] [Portoghese *et al.*, 1988] [Halazy *et al.*, 1999]. Le nebivolol (**87**) est un deuxième exemple d'application avec succès de la dimérisation. Ce dernier est un antagoniste spécifique des récepteurs β_1 adrénergiques. Dans ce cas, les deux sous-unités chromanyles (**86**) étaient référencées comme de faibles antagonistes β -adrénergiques, surtout comparativement à des produits commerciaux comme le propranolol. Le concept de dimérisation permit un net gain d'activité et une utilisation

thérapeutique. La formation d'un dimère peut aussi permettre de modifier le profil pharmacocinétique d'un agent thérapeutique. En effet, la molécule (**88**) est un agoniste dopaminergique qui agit sur les récepteurs D1 et D2 [Fisher *et al.*, 1995]. Elle présente toutefois une mauvaise biodisponibilité orale et une métabolisation rapide. Le dimère résultant (**89**) présente une nette augmentation de la biodisponibilité orale et une métabolisation plus lente. De plus, le composé (**89**) n'est pas capable de passer la barrière hématoencéphalique, permettant ainsi de n'avoir qu'une action périphérique.

La formation de molécules dimères ne peut donc s'envisager que tardivement dans le *drug design*, et ceci, pour affiner l'action d'une molécule dont les caractéristiques ont été optimisées. Le concept de dimérisation peut s'appliquer à toutes les classes d'agents pharmacologiques ; la littérature montre d'ailleurs des exemples tant d'agonistes que d'antagonistes ou de modulateurs allostériques. Cependant, le concept de dimère s'applique bien plus sur des molécules qui interagissent avec des GPCR qu'avec des récepteurs canaux.

De manière générale, pour pouvoir réaliser une molécule dimère, il faut répondre aux conditions suivantes :

- Il faut posséder un ligand monomérique qui présente une bonne sélectivité vis-à-vis d'un récepteur.
- Ce ligand doit posséder plusieurs sites de fixation sur la protéine et ceux-ci doivent être proches.
- Le pont chimique ne doit pas dénaturer les interactions entre les monomères et leurs poches (point d'ancrage sur le monomère, nature de la chaîne...).
- La longueur de la chaîne doit être optimisée.

2.1.3 Approche thermodynamique de la dimérisation

La conception de ligand dimère repose sur un concept thermodynamique rationnel. En effet, l'interaction entre une molécule dimère et les deux sites de coordination distincts du récepteur est entropiquement plus favorable que l'interaction du même récepteur avec deux monomères [Hargittai *et al.*, 1987] [Portoghese *et al.*, 1992] [Tamiz *et al.*, 2000] [Voloshchuk *et al.*, 2004]. Murray *et al.* font une démonstration succincte pour deux composés distincts qui interagissent dans deux poches juxtaposées [Murray *et al.*, 2002]. Cette démonstration peut être adaptée pour les dimères en considérant que les deux entités sont identiques.

La formule $\Delta G_{Total}^M = \Delta G_{int}^M + \Delta G_{rigid}^M$ décrit l'énergie libre de liaison d'un monomère M avec une protéine. L'énergie libre peut être décomposée en deux termes : l'énergie libre intrinsèque (ΔG_{int}^M) qui est favorable à l'interaction, ainsi qu'un terme représentant la perte de liberté translationnelle et rotationnelle que le monomère subit lors de l'interaction avec la protéine (ΔG_{rigid}^M) qui, lui, est défavorable. Ensuite, $\Delta G_{Total}^D = \Delta G_{int}^D + \Delta G_{rigid}^D$ reprend la même formulation pour un dimère D constitué de deux monomères M. L'approximation $\Delta G_{int}^D \approx 2\Delta G_{int}^M$ est vérifiée si les deux monomères sont liés avec un pont de longueur adéquate. La justification de cette approximation est le cœur de l'article de Murray *et al.* et ne sera pas développée dans ce manuscrit [Murray *et al.*, 2002]. Ainsi, $\Delta G_{Total}^D < 2\Delta G_{Total}^M$ montre que l'énergie libre d'interaction d'un dimère, ponté de manière adéquate, est plus petite que la somme des énergies libres d'interaction de ses monomères constitutifs.

Les travaux présentés par Murray [Murray *et al.*, 2002] sont basés sur ceux de Page et Jencks. Ils ont été les premiers à supposer et à

démontrer que « la totalité est plus que la somme des parties » [Page *et al.*, 1971] [Jencks *et al.*, 1981]. Le gain pour ces molécules dimères a pu être calculé et donne une valeur de **15-20 kJ/mol**, ce qui permet d'obtenir des gains en affinité allant de **1,5 à 5 log** centrés sur une valeur moyenne de **3 log**.

2.1.4 Application du concept

Comme exposé dans l'introduction, le laboratoire du Pr Pirotte a développé plusieurs séries d'AMPAPam de la famille des benzothiadiazine dioxydes (BTD) depuis une vingtaine d'années.

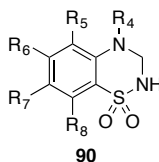


Figure 32. Structure générale d'une BTD.

Grâce à une collaboration avec le Pr Kastrop (Université de Copenhague), les composés synthétisés au LCP-ULiège ont permis d'investiguer les interactions entre les BTD et les AMPAR. Ainsi, au cours de leur développement, divers BTD ont été cocristallisés avec le LBD d'une sous-unité GluA2_o, notamment les composés (62) [Krintel *et al.*, 2012] et (64) [Nørholm *et al.*, 2013].

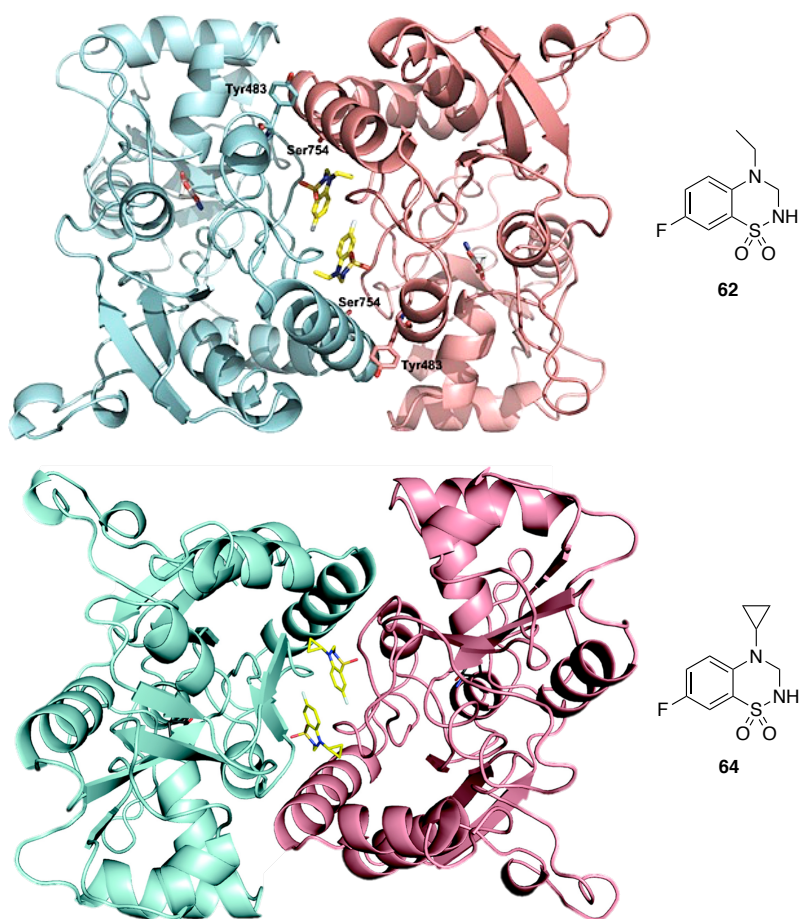


Figure 33. Cristallisation des composés (62) (haut) et (64) (bas) avec le LBD d'une sous-unité GluA2_o (adapté de [Krintel *et al.*, 2012] et [Nørholm *et al.*, 2013]).

Au vu de la disposition des molécules (62) et (64) au sein du récepteur, il semblerait que l'application du concept de la dimérisation soit envisageable. Pour valider cette approche, une modélisation fut réalisée par le Dr Dilly sur base des résultats cristallographiques obtenus avec le composé (62) [Krintel *et al.*, 2012]. Cette étude préliminaire reprend l'arrangement spatial de deux molécules (64) et envisage la possibilité de les lier par un simple pont hydrocarboné. La méthode expérimentale suivie est décrite par [Halgren *et al.*, 1996]. Il ressort de

cette étude qu'une molécule dimère, pontée par un groupement éthylène (figure 34B) ou propylène (figure 34C), peut adopter la même géométrie que les monomères (figure 34A).

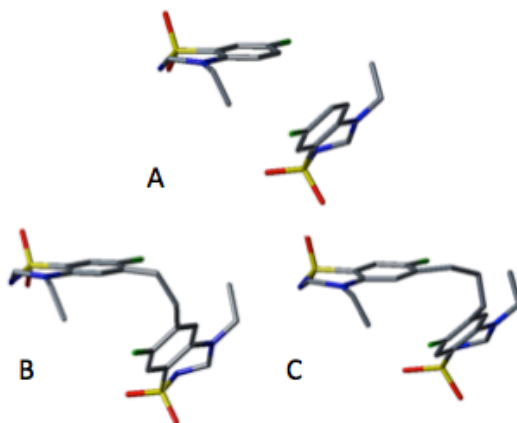


Figure 34. A) Position du composé (**62**) dans la poche allostérique. B) Dimère potentiel lié par un pont éthylène. C) Dimère potentiel lié par un pont propylène (adapté de [Drapier *et al.* 2018]).

2.2 Axes d'étude

2.2.1 Synthèse

Les conditions nécessaires du principe de dimérisation semblent être réunies pour s'appliquer avec succès aux BTD comme aux AMPApam. Les molécules dimères envisagées correspondent à la représentation de la figure 35 (**91**). Un pont de nature alkylène, limitant ainsi au maximum les interactions entre celui-ci et la protéine, serait le meilleur candidat. Néanmoins, l'introduction d'hétéroatomes (oxygène et azote) au sein du lien, s'ils risquent de générer plus d'interactions (pont H...) avec la protéine, peut aussi mener à des composés intéressants. De même, certains intermédiaires réactionnels, des amides impliqués dans la synthèse des amines, pourront être évalués.

Compte tenu des difficultés d'accès et des surprises qui peuvent survenir lors de l'évaluation d'intermédiaires de synthèse, il a semblé également intéressant d'évaluer des composés « simplifiés ». Ces derniers sont simplifiés dans le sens où ils ne portent qu'un seul motif BTD et un cycle aromatique porteur d'un groupement sulfonamide de l'autre côté du pont (**92**).

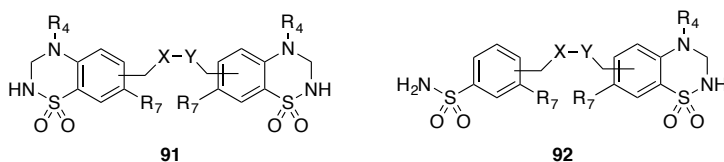


Figure 35. Modèle pour les molécules dimères (**91**) et modèle de molécules simplifiées (**92**) envisageables. $R_4 = -\text{Me}, -\text{cPr}$; $R_7 = -\text{H}, -\text{F}$; $X\text{-}Y = -\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ $n = 1,2$, $-\text{NH-CO-}$, $-\text{NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, $-\text{O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$...

2.2.2 Pharmacologie

Outre la préparation de ces molécules dimériques, nos travaux de recherche doivent aussi comprendre le développement d'un protocole permettant leur évaluation pharmacologique dans un test de criblage moyen débit. Par « moyen débit » nous entendons que ce test doit permettre le *sreening* des composés au moyen de plaques 96 ou 384 puits où une partie importante de manipulation est réalisée par un opérateur humain. En opposition au *sreening* à « haut débit » où le processus est automatisé dans sa globalité et au *sreening* à « bas débit » qui permet de faire des analyses de composés de manière individuelle avec de nombreuses manipulations de la part de l'opérateur.

La méthode de référence utilisée pour l'évaluation de composés sur des récepteurs ionotropiques repose sur des techniques électrophysiologiques de *patch-clamp*. Elle permet de mesurer les paramètres électriques cellulaires. Diverses techniques d'enregistrement existent en fonction du canal ou du paramètre étudié [Joffre *et al.*, 2001]. Les techniques d'électrophysiologie représentent le *gold-standard*, car elles permettent une étude pharmacologique complète des composés (obtention de courbes concentration *vs* réponse) et l'obtention de paramètres physiologiques (paramètres cinétiques de désactivation et désensibilisation). Cependant, ces méthodes sont chronophages et ne permettent pas la mise en place de méthode de *sreening* rapide (criblage moyen débit), elles entrent dans la catégorie des *sceenings* à « bas débit ». Pour pallier ce problème, des méthodes spectroscopiques basées sur la fluorimétrie ont été développées [Varney *et al.*, 1998] [Francotte *et al.*, 2010]. Si ces méthodes permettent un gain de temps et un criblage moyen

(voire haut) débit, elles ne permettent plus d'obtenir autant d'informations physiologiques qu'avec le *patch-clamp*.

Dans ce travail, des évaluations électrophysiologiques des AMPApam furent réalisées afin d'obtenir des informations physiologiques en collaboration avec les laboratoires des Pr V. Seutin (ULiège) et C. Mulle (Université de Bordeaux). Par ailleurs, une méthode criblage moyen débit fut développée en parallèle, avec le laboratoire du Dr Hanson, pour permettre les *screenings* préliminaires.

2.3 Résumé

Ce travail s'articule en **deux axes**.

L'axe pharmacologique doit permettre la caractérisation et l'évaluation des molécules synthétisées pour valider le concept de molécules dimères actives comme AMPApam. Ce *screening* doit aussi être à « moyen débit » pour évaluer d'autres classes de molécules de la chimiothèque du laboratoire de chimie pharmaceutique.

L'axe chimique se concentrera sur la réalisation de molécules dimères. Celles-ci devraient se montrer actives et meilleures que leur correspondant monomérique, car elles répondent aux quatre conditions requises pour cela.

- ✓ La molécule (**64**) est un ligand monomérique dont les propriétés ont été optimisées pour la cible d'intérêt.

- ✓ Ce ligand doit posséder plusieurs sites de fixation sur la protéine et ceux-ci doivent être proches. Comme représenté sur la figure 33, la protéine dispose bien de plusieurs sites de fixation couplés deux à deux et proches.

- ✓ La longueur de la chaîne doit être optimisée. La chaîne optimale semble être un pont soit éthylène, soit propylène.

- ✓ Le pont chimique ne doit pas dénaturer les interactions entre les monomères et leurs poches (point d'ancrage sur le monomère, nature de la chaîne...). Comme exposé par la modélisation du Dr Dilly, le point optimal d'ancrage semble être en position 6. Et la nature peu réactionnelle du dérivé alkylène ne devrait pas générer d'interactions supplémentaires avec le récepteur.

Chapitre 3

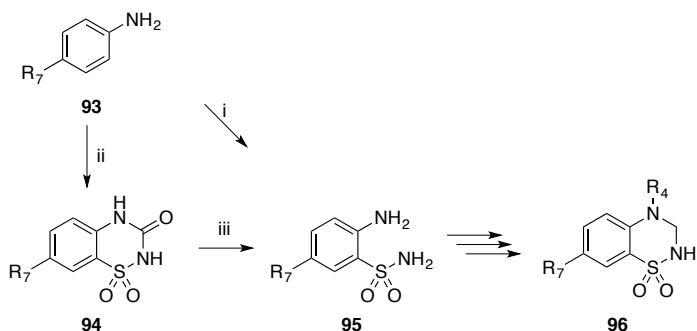
Résultats et

discussion

3.1 Synthèses chimiques

3.1.1 Stratégies de synthèse

Les *o*-aminobenzènesulfonamides (**95**) constituent les intermédiaires clés permettant l'accès au noyau 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde. L'obtention de ce synthon peut se faire classiquement par deux grandes méthodes. La première est la méthode d'Heindel, où une aniline réagit avec l'acide chlorosulfonique en présence de PCl_5 ou de SOCl_2 [Heindel *et al.*, 1971]. Le chlorure de sulfonyle, intermédiaire très réactionnel qui en résulte, est neutralisé avec une solution aqueuse diluée d'ammoniaque et donne le 2-aminobenzènesulfonamide correspondant. Une autre stratégie est celle de Girard dans laquelle l'aniline (**93**) réagit avec l'isocyanate de chlorosulfonyle. Le composé ainsi généré cyclise par réaction de Friedl-Crafts grâce au chlorure d'aluminium [Girard *et al.*, 1979]. La sulfonylurée (**94**) peut ensuite être convertie en l'*o*-aminobenzènesulfonamide correspondante (**95**) par hydrolyse acide au moyen d'une solution aqueuse 50 % (v/v) d' H_2SO_4 .



i) (1) HSO_3Cl , PCl_5 , (2) NH_3
ii) (1) ClSO_2NCO , CH_3NO_2 , (2) AlCl_3 ; (iii) H_2SO_4 50%, Δ

Figure 36. Méthodes de et de Heindel (i) Girard (ii et iii).

Une troisième méthode a été mise au point par le LCP-ULiège. Elle permet d'obtenir des BTD diversement substitués qui ne peuvent être synthétisées par les deux voies susmentionnées [Nørholm *et al.*, 2013]. Cette méthode est celle employée tout au long de ce travail.

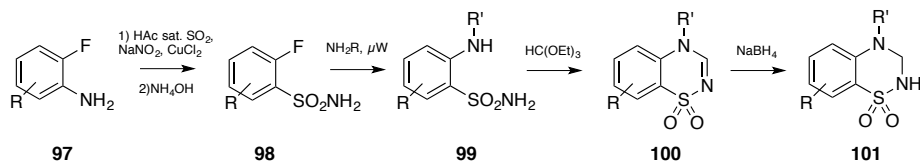


Figure 37. Schéma de synthèse général pour une BTD.

Sur base de cette stratégie, la réflexion doit porter sur l'étape de synthèse qui conduit à la dimérisation. Naturellement, la réponse dépend de divers facteurs, tels que la nature des réactions qui sont utilisées et les conditions expérimentales.

Deux approches peuvent être envisagées pour aboutir aux molécules dimères.

Soit une **approche directe** où la dimérisation a lieu dès les premières étapes du schéma et où l'hétérocycle thiazidiazinique est construit de manière concomitante de part et d'autre du lien. Elle présente comme intérêt d'offrir un nombre assez large de possibilités de couplage, car les réactifs portent peu de substituants et sont inertes vis-à-vis des diverses conditions expérimentales qui peuvent leur être appliquées. Cependant, les réactions impliquées dans la méthode de synthèse du LCP-ULiège peuvent ne pas convenir sur un modèle bivalent et mener à des produits non désirés ou être inefficaces.

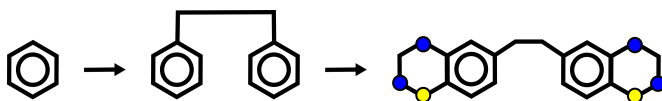


Figure 38. Schéma d'approche directe.

Soit une **approche convergente** où le motif BTM est d'abord construit et l'étape de dimérisation prend place en fin de processus. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les réactions à mettre en œuvre sont déjà bien maîtrisées au LCP-ULiège. Il faut réaliser des BTM porteuses de groupements fonctionnels permettant les réactions de couplage. Toutefois, réaliser la dimérisation en fin de processus peut être problématique pour certaines réactions. En effet, la BTM présente des fonctions potentiellement gênantes, comme la fonction sulfonamide et son proton labile, ainsi que les paires libres des atomes d'azote en positions 2 et 4. Il serait possible d'envisager la dimérisation sur une BTM non réduite, ce qui résout le problème du proton labile et des paires libres. Mais ces composés sont généralement peu réactionnels ou difficilement manipulables, car très peu solubles dans la plupart des solvants [Freeman *et al.*, 1950] [de Tullio *et al.*, 1995].

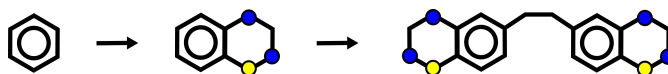


Figure 39. Schéma d'approche convergente.

3.1.2 Premières tentatives avec un lien alkylène

Pour cette première approche, la méthode de liaison choisie est une réaction de Wittig. Elle implique la présence d'une base forte. Le proton présent sur la BTM finale étant incompatible avec les conditions expérimentales, il n'est pas possible de réaliser la dimérisation en ultime étape du processus. De même, l'intermédiaire non réduit (**100**) étant très sensible aux conditions basiques, il n'est pas possible de réaliser cette réaction sur cette espèce sans la dénaturer. Ensuite, les espèces porteuses de protons labiles ne sont pas des substrats compatibles avec les conditions expérimentales. Suite à ces observations préliminaires, c'est

donc l'**approche directe** qui est choisie. Le premier dimère désiré (**102**) ainsi que ses anilines précurseurs (**103 - 104**) sont représentés sur la figure 40.

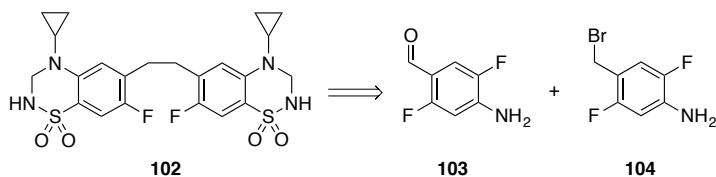


Figure 40. Premier dimère désiré et ses synthons.

Lors de précédents travaux réalisés au LCP-ULiège [Drapier, 2013], la faisabilité de couplage via la réaction de Wittig fut démontrée. Cependant, pour des raisons de disponibilité commerciale des produits, il n'était pas possible d'obtenir les anilines (**103 - 104**). Celles-ci peuvent néanmoins être obtenues après réduction de fonctions nitros par hydrogénation catalytique ou par l'action du fer (0) [Clayden *et al.*, 2001]. En tenant compte du fait que les fonctions nitros peuvent être introduites sur un noyau aromatique par réaction de nitration, les réactifs commerciaux (**105 - 106**), respectivement le 2,5-difluorobenzaldéhyde (**105**) et le bromure de 2,5-difluorobenzyle (**106**), nous ont servi de premiers synthons.

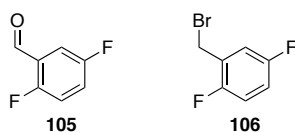


Figure 41. Synthons.

La première étape consiste en la synthèse du sel de phosphonium au départ du bromure de benzyle. L'obtention de ce sel est aisée et se fait, comme déjà décrit, en présence de triphénylphosphine dans le toluène [Bae *et al.*, 2007]. Le sel obtenu étant insoluble, il est récupéré par filtration et peut être engagé après séchage dans la réaction de Wittig.

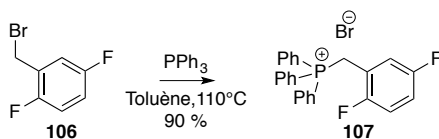


Figure 42. Synthèse du sel de phosphonium.

Le sel (**107**) est ensuite activé en milieu basique (KOTBu) et ajouté à de l'aldéhyde (**105**) pour former l'alcène (**108**) via la réaction de Wittig. L'alcène ainsi formé est isolé après purification sur une colonne de silice [Pirrung *et al.*, 2007].

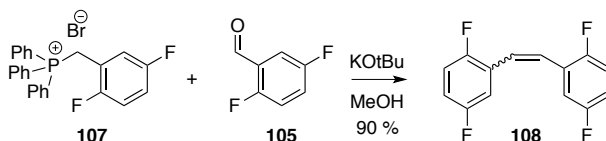


Figure 43. Réaction de Wittig.

L'étape suivante consiste à réduire la double liaison présente entre les deux cycles aromatiques. À ce stade, la présence d'alcène *cis* ou *trans* n'a pas d'importance étant donné que l'hydrogénation des deux isomères conduit au même alkylène (**109**).

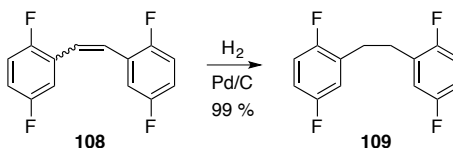


Figure 44. Hydrogénation catalytique.

Ensuite, il faut introduire une fonction amine primaire sur le cycle. Cette dernière y est greffée en deux étapes : une nitration, suivie de la réduction des fonctions nitros en fonctions aminos.

La réaction de nitration peut se montrer sélective selon les conditions expérimentales utilisées. Comme montré lors du stage de 2^e master [Drapier, 2013], la nitration est sélective pour les deux positions d'intérêt tant que le milieu n'est pas chauffé. Ainsi, une mononitration se produit par cycle en *para* du pont éthylène.

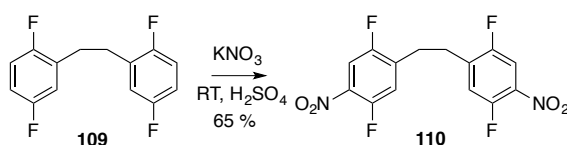


Figure 45. Nitration.

Enfin, l'obtention de l'aniline pouvant être utilisée dans la méthode d'obtention des BTB, peut être obtenue par réduction des deux fonctions nitros. Cependant, la méthode classique d'hydrogénation catalytique [Nørholm *et al.*, 2013] ne fonctionnant pas dans notre cas, c'est donc une réduction au fer (0) en présence de chlorure ammoniac [Francotte *et al.*, 2008] qui a été mise en place et a permis d'isoler l'aniline désirée (111).

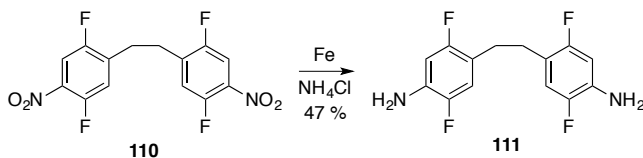


Figure 46. Réduction au fer (0).

Cette réaction conclut les travaux réalisés lors du stage de 2^e master. Elle permet l'obtention du synthon dimère prêt à pouvoir générer le dimère BTB.

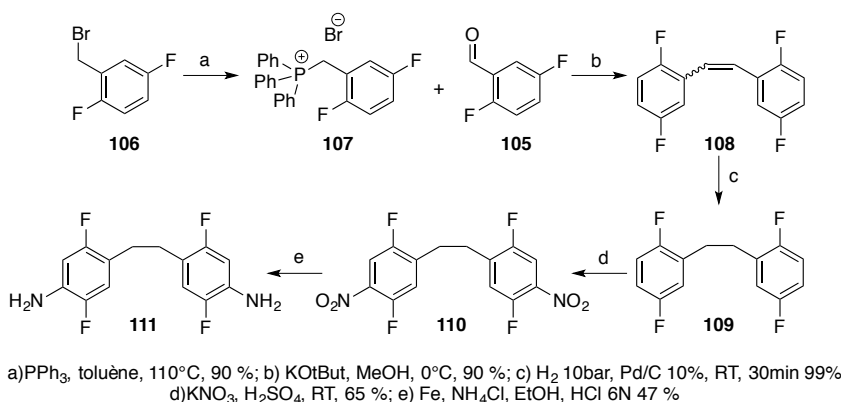


Figure 47. Réactions permettant la formation du synthon dimérique.

Lors de divers essais de la réaction de Sandmeyer-Meerwein, il ne fut pas possible d'isoler le produit désiré (**112**).

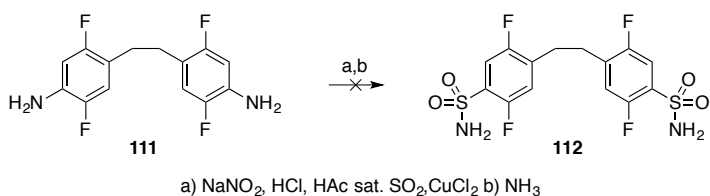
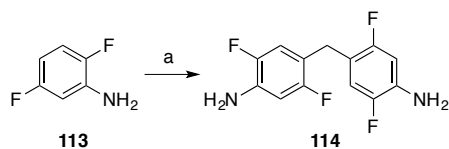


Figure 48. Réaction impossible de Sandmeyer-Meerwein.

Nous avons deux hypothèses pour expliquer cette observation. Premièrement, nous n'engagions pas assez de réactifs (**111**) dans cette réaction. En effet, cette réaction présente des rendements très variables (de 10 à 90 %) selon la nature du substrat. Deuxièmement, cette réaction ne peut faire un substrat dimérique.

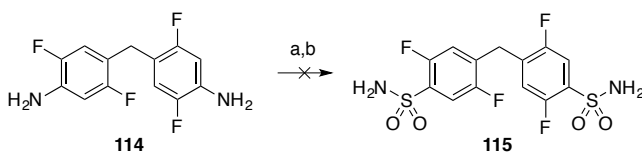
Pour investiguer nos hypothèses, nous nous sommes tourné vers l'homologue inférieur du composé (**111**) dont la synthèse se fait en une seule étape et est bien décrite dans la littérature [Delvigs *et al.*, 2001]. Ce synthon (**114**) relié par un lien méthylène devait nous permettre de savoir si la nature dimérique du substrat est problématique lors de cette réaction.



a) Paraformaldéhyde, CF_3COOH , 100°C , 1h30, 75 %

Figure 49. Dimérisation au paraformaldéhyde.

L'obtention de ce produit fut aisée et avec des rendements supérieurs à ceux décrits. Il était aussi possible de réaliser cette synthèse sur plusieurs grammes, permettant d'avoir une quantité substantielle de réactifs pour la réaction de Sandmeyer-Meerwein.



a) NaNO_2 , HCl , HOAc sat. SO_2 , CuCl_2 b) NH_3

Figure 50. Réaction de Sandmeyer-Meerwein.

Malheureusement, il s'avéra que cette étape conduisit à plusieurs produits. La trop faible résolution lors de leur élution chromatographique ne permit pas leur isolement ni leur caractérisation. L'utilisation de divers traitements acide/base ou de recristallisation n'améliora pas la pureté du composé. Malgré la présence de plusieurs produits, nous avons aussi tenté une approche « *one-pot* ». Cette méthode fut déjà utilisée pour certaines BTD. Bien qu'il ne soit pas possible de caractériser chaque intermédiaire individuellement, elle permet l'obtention de la BTD désirée. La réaction de cyclisation avec l'orthoformiate de triéthyle est très spécifique. En effet, cette réaction ne peut se faire que si la fonction sulfonamide et la fonction amine en *ortho* sont présentes. De plus, le produit qui en résulte manifeste une très faible solubilité dans la plupart des solvants organiques. Cette faible solubilité rend son isolement aisé. La stratégie

one-pot ne fonctionna pas pour la molécule (115). Les différentes réactions conduisirent à trop de sous-produits pour permettre la cyclisation.

Sur base de cette observation, il semblerait que la proportion de produits engagés ne soit pas le point bloquant. En effet, le réactif est entièrement consommé, mais sa disparition conduit à de nombreux sous-produits non caractérisés. Dès lors, la nature dimérique de la molécule semble poser problème à ce stade du schéma de synthèse.

Dans le cas de la molécule (115), le pont est constitué d'un atome de carbone. Les dimères désirés sont liés par des ponts d'au moins deux atomes de carbone. Le pont plus court, comme pour le composé (115), présente une plus grande rigidité que ses homologues supérieurs. Cette faible flexibilité peut être la cause de l'échec rencontré. Nous nous sommes donc dirigé vers la synthèse de liens amide. Ces liens d'une longueur de deux atomes devraient permettre d'évaluer si la longueur du pont influence les réactions. De plus, les amides peuvent permettre tant l'approche directe que l'approche convergente. Outre la possibilité d'étudier ces paramètres expérimentaux, les composés liés par une fonction amide (-NH-CO-) peuvent conduire après réduction à un groupement amino-éthylène (NH-CH₂-). Ce dernier peut être défini comme l'isostère du groupement éthylène. La présence de ce motif pourrait conduire à des molécules possédant des activités proches de celle portant un groupement éthylène.

3.1.3 Série présentant un lien amide

3.1.3.1 *Approche directe*

Nous voulions dans un premier temps vérifier s'il était possible de réaliser la réaction de Sandmeyer-Meerwein sur un substrat dont le lien était plus grand qu'un groupement $-\text{CH}_2-$. Nous avons donc réalisé la synthèse d'un dimère au départ de deux produits disponibles dans la chimiothèque du laboratoire. L'aniline (**116**) et l'acide carboxylique (**117**) utilisés ont fourni un dimère (**118**) lié par des positions qui, après formation du cycle BTD, correspondent aux positions 6-7. Ces positions ne sont pas optimales, mais le but premier de ces synthèses était surtout d'examiner la faisabilité de la réaction de Sandmeyer-Meerwein avec une molécule dimère.

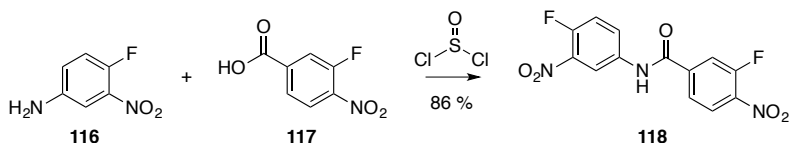


Figure 51. Réaction d'amidation.

La réaction de dimérisation s'opère en suivant une stratégie de couplage peptidique. L'acide (**117**) est converti en chlorure d'acide correspondant au moyen du chlorure de thionyle [Francotte *et al.*, 2009]. Cette espèce est ensuite mise en contact avec l'aniline (**116**) pour conduire à l'amide désiré. L'aniline (**116**) fut utilisée en léger excès pour permettre la conversion totale du chlorure d'acide. Cet excès fut ensuite éliminé par traitement acide afin d'isoler uniquement l'amide (**118**).

La réduction des fonctions nitros donnant ainsi accès au synthon désiré se fit au moyen de fer (0) en présence de chlorure ammonique.

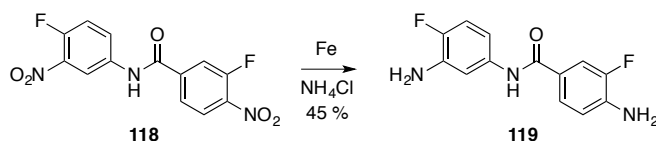


Figure 52. Réduction des fonctions nitros.

À ce stade, nous disposons du produit en quantité suffisante pour tenter la réaction de Sandmeyer-Meerwein sur une fraction suffisante de substrat. La réaction sur cette molécule dimérique (**119**) mena au produit attendu, remplaçant les anilines des deux sites par les fonctions sulfonamides (**120**).

La réaction de Sandmeyer-Meerwein présente des rendements de 10 % à 90 % selon le substrat. Le rendement est de l'ordre de 30 % sur une molécule dimère. Celui-ci s'explique par un faible taux de conversion du réactif. Le principal produit secondaire n'est autre que le réactif qui n'a pas réagi, malgré la présence en excès des autres espèces réactionnelles. Cette observation permet de dire qu'il est possible de réaliser cette réaction Sandmeyer-Meerwein sur une molécule dimérique, mais que les dimères ne sont pas un substrat de choix pour cette réaction.

Une fois le sulfonamide positionné en *ortho* de l'atome de fluor, ce dernier se voit activé vis-à-vis des conditions de réaction de la substitution nucléophile sur aromatique (S_NAr). Il ne fut pas possible d'isoler le composé d'intérêt (**121**) lors de cette étape. La réaction de S_NAr conduit à plusieurs produits, dont les R_f très proches ne permettent pas une séparation sur colonne de silice. Ici aussi l'approche *one-pot* fut tentée pour isoler un solide après cyclisation dans l'orthoformiate de triéthyle. Aucun solide n'apparut. Il semblerait que la S_NAr soit aussi sensible à la nature dimérique du substrat.

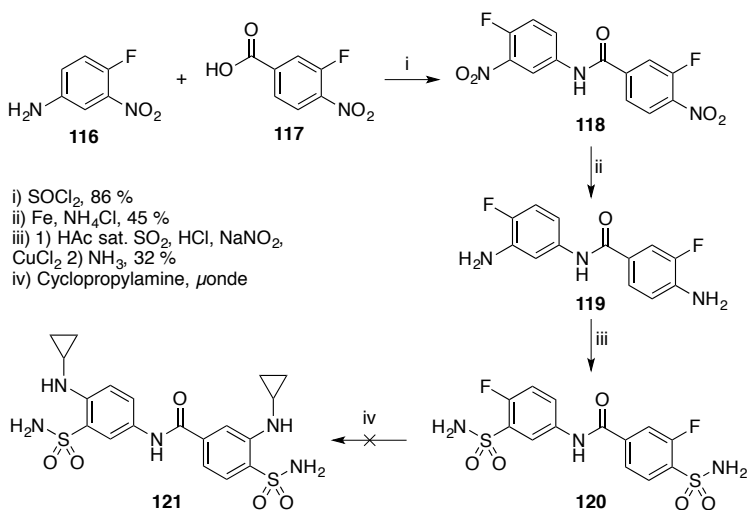


Figure 53. Récapitulatif.

Afin de confirmer ces observations, nous avons réalisé la même série de réactions sur un autre amide dimérique. Cet amide donnerait un dimère lié par les positions 7 - 7'.

Les mêmes observations ont été faites et les mêmes conclusions que précédemment peuvent être tirées. Il semblerait que l'approche dimérique soit une voie qui ne convient pas aux conditions expérimentales rencontrées lors des réactions de Sandmeyer-Meerwein et de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$. Dès lors, c'est l'**approche convergente** qui fut privilégiée.

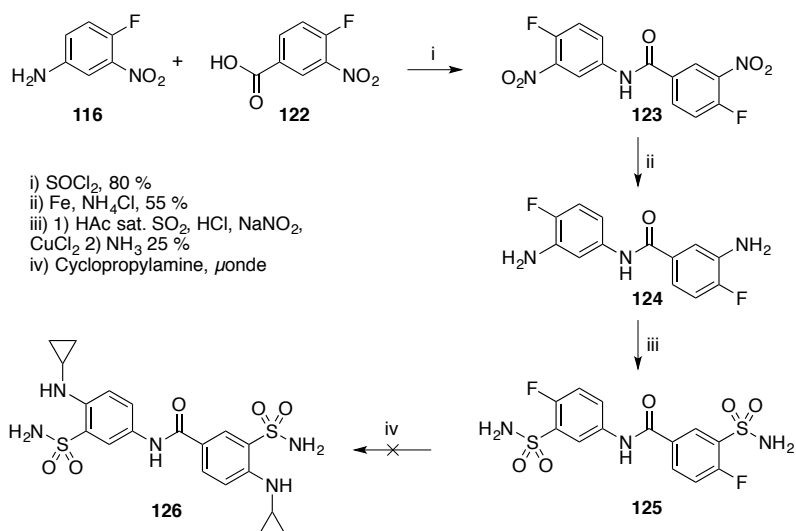


Figure 54. Test sur l'amide lié par un pont 7 - 7'.

3.1.3.2 Approche convergente

Dans le cadre de l'approche convergente, il faut dans un premier temps réaliser la synthèse des deux sous-unités BTD de manière distincte. Cette stratégie se rapproche des protocoles mis en place et maîtrisés au LCP-ULiège : la synthèse de petites molécules monomères. Les amines aromatiques (127 - 128) et acides carboxyliques (129 - 130) correspondants ont été synthétisés en suivant le protocole décrit par Nørholm *et al.* [Nørholm *et al.*, 2013]. Toutefois, la synthèse doit s'arrêter avant la réduction donnant la BTD, car cette dernière libérerait la fonction sulfonamide qui conduirait à des réactions secondaires lors du couplage peptidique.

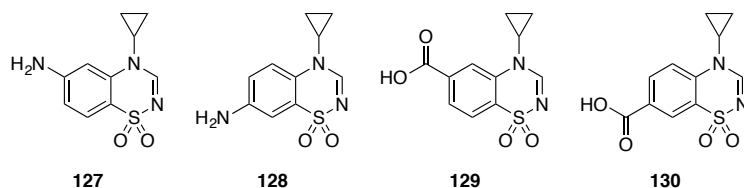


Figure 55. BTD monomériques porteuses de fonctions amine et acide carboxylique.

La présence de groupement $-NH_2$ peut être gênante vis-à-vis de certaines réactions du protocole. C'est pour cette raison qu'il est dissimulé sous la forme de fonction nitro, inerte tout au long du protocole expérimental. La fonction nitro est finalement réduite en dernière étape par hydrogénation catalytique.

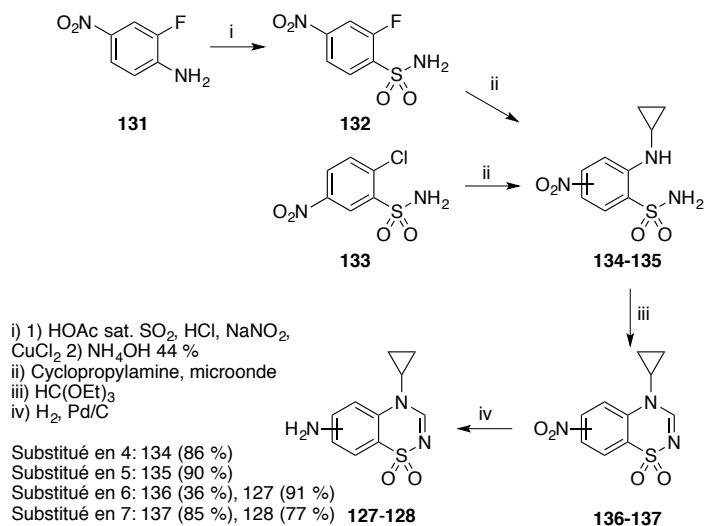


Figure 56. Synthèse des amines aromatiques (127 - 128).

La fonction acide est protégée sous forme d'ester méthylique afin d'éviter des réactions secondaires. La fonction acide est rendue en fin de processus par hydrolyse acide. Les conditions classiques, à savoir un chauffage modéré en présence d'acide en quantité catalytique, laissent l'ester intact. Une augmentation de la température conduit à la dégradation du produit. C'est en utilisant une solution à 50 % en acide sulfurique chauffée à 90 °C qu'il fut possible d'isoler le produit d'intérêt sans dégradation.

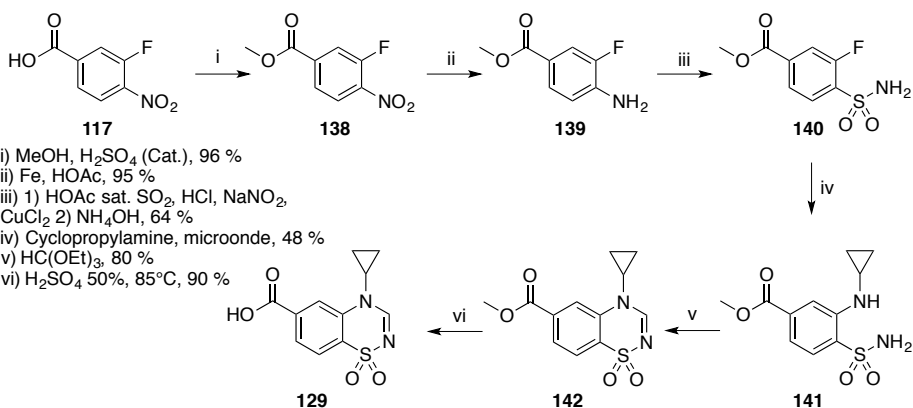


Figure 57. Synthèse de la BTDA portant l'acide carboxylique en position 6 (129).

La BTDA dont la fonction acide carboxylique se trouve en position 7 ne nécessita pas de protection. Elle fut générée par oxydation du groupement -CH₃ situé en *mé*ta de la fonction sulfonamide [Francotte *et al.*, 2009]. La présence de ce proton acide ne gêna ni la réaction de S_NAr ni la réaction de cyclisation.

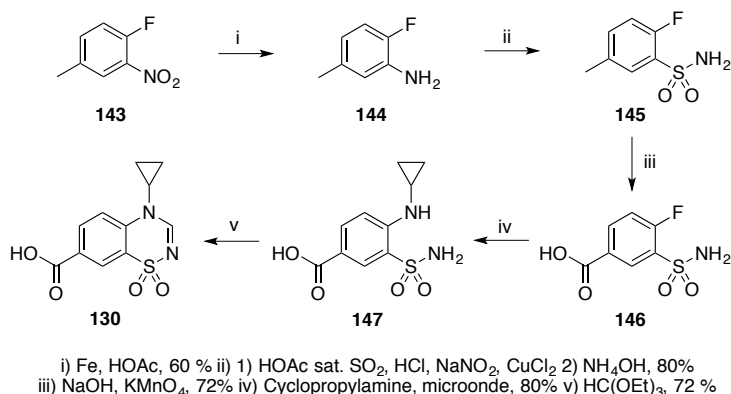


Figure 58. Synthèse de la BTDA portant l'acide carboxylique en position 7 (130).

A partir des quatre monomères isolés, la dimérisation implique la formation d'un lien amide. La méthode classique pour réaliser un lien amide consiste à transformer dans une première étape la fonction acide en une espèce activée, telle qu'un chlorure d'acide, un anhydride d'acide, ou

tout ester « activé ». Dès que cette espèce est générée *in situ*, l'amine aromatique est ajoutée pour réagir.

La première méthode que nous avons envisagée fut de convertir la fonction acide (**129 - 131**) en chlorure d'acide (**148 - 149**) au moyen de chlorure de thionyle.

Il semble qu'il y ait bien conversion, et ce, quelle que soit la position de l'acide sur le cycle. Cependant, lorsque l'amine est ajoutée, il se produit de nombreuses réactions secondaires ; les produits obtenus ne peuvent être séparés sur silice ou par d'autres méthodes compte tenu de leur très faible solubilité, caractéristique des BTD insaturées. De plus, une partie importante de l'acide (**129** ou **130**) n'a pas réagi et a été régénérée après la synthèse. Nous supposons que c'est la nature trop réactionnelle du chlorure d'acide qui conduit aux diverses sous-réactions et sous-produits. Cependant, cette hypothèse n'est pas compatible avec la non-complétion de la réaction, qui pourrait s'expliquer par une faible réactivité de l'amine aromatique en lien avec la faible solubilité du composé. Or, dans ce cas, la réaction se passe dans le DMF sec, un des rares solvants permettant de solubiliser ces produits, invalidant ainsi l'hypothèse. Le DMF, en plus de jouer le rôle de solvant, joue un rôle de catalyseur en réagissant avec les chlorures d'acide, d'autant plus indiqués pour ce type de réaction [Clayden *et al.*, 2001].

Nous sommes ensuite passé à un groupement acyle activé en suivant les conditions de la littérature. L'agent utilisé fut le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), et malheureusement, les mêmes observations furent faites (**150 - 151**).

Un test fut réalisé avec le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), mais dans ce cas, aucune conversion vers l'espèce activée n'était observée (**152 - 153**).

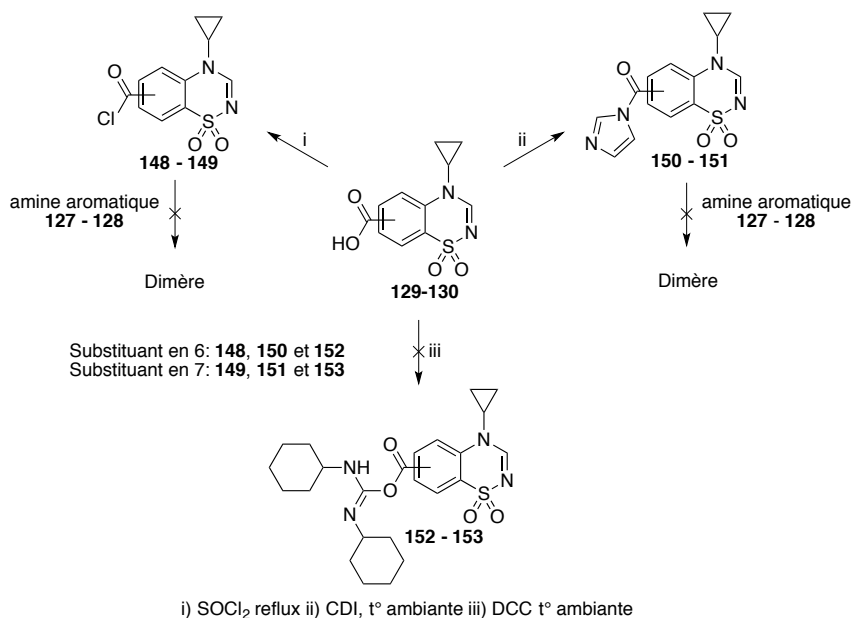


Figure 59. Récapitulatif de la formation de liens amides.

Afin de comprendre ces échecs, nous avons utilisé d'autres acides carboxyliques lors de ce couplage pour déterminer si la réaction était possible avec cette amine aromatique comme substrat. Nous avons testé les différents isomères de l'acide fluorobenzoïque (**154 a-c**). Les composés générés pourraient être valorisés dans la suite du travail comme des molécules hybrides. À cette fin, c'est le passage par le chlorure d'acide que nous avons utilisé. Quelle que soit la nature des isomères de l'acide (**154 a-c**) ou de l'amine aromatique (**127 - 128**), la réaction s'effectue jusqu'à son terme. Nous avons ainsi pu isoler six composés (**155 a-f**) qui ont été réduits et qui donnent des BTD (**156 a-f**) très proches structurellement de certaines molécules déjà réalisées au LCP-ULiège.

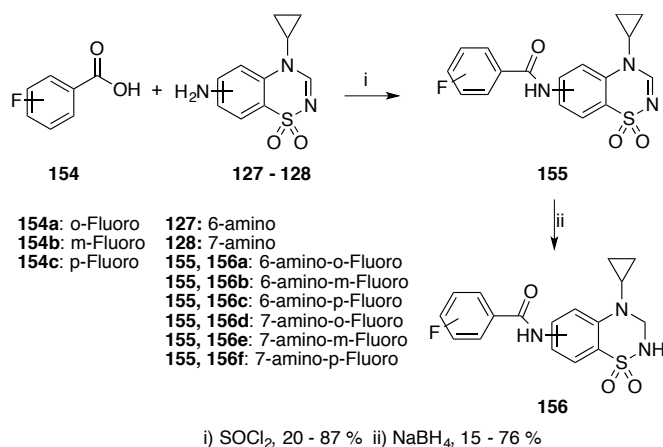


Figure 60. Amides hybrides.

Il semblerait donc que ce soient les acides carboxyliques (**129**) et (**130**) qui bloquent la réaction de couplage. En série amide, l'approche convergente fut aussi un échec.

Après ces premières tentatives et au vu des difficultés de synthèse rencontrées, il nous semblait opportun de focaliser notre approche sur les meilleurs dimères possibles, afin d'optimiser au mieux les protocoles. C'est pour cela qu'une série de dimères potentiels a été soumise à la modélisation moléculaire.

3.2 Modélisation

Un ensemble de structures correspondant aux dimères potentiels fut soumis au Pr Pochet (UNamur) pour qu'il puisse réaliser un *docking*. Le but de ce *docking-scoring* était d'obtenir une information quantitative, qui confirme les informations qualitatives obtenues précédemment par le Dr Dilly.

Les positions relatives des deux monomères (**64**) cocrystallisés avec le LBD comme sur la figure 33 (code pdb 4N07) ont servi de base pour ce *docking*. La molécule (**64**) a servi d'étalon et de contrôle interne vis-à-vis des candidats potentiels [Jones *et al.*, 1997] [Drapier *et al.*, 2018]. Le programme fournit, pour chacune des molécules, les différentes dispositions dans la poche d'allostérie, les énergies de liaison et la fréquence de ces interactions. La disposition présentant la plus haute fréquence d'apparition est celle qui est employée pour les comparaisons.

3.2.1 Molécules testées

Les molécules testées se répartissent en plusieurs catégories selon les variables structurelles qui leur sont appliquées.

1. La **position** : les emplacements de fixation en positions 6 et 7 du lien ont été testés.
2. La **longueur** : les liens de type éthylène ou propylène ont été évalués.
3. La **nature chimique** : la nature chimique du pont est soit une chaîne alkyle, soit un lien amide, soit un lien aminométhyle.
4. Le **substituant en position 4** : deux types de substituant ont été conservés pour être fixés à l'azote en position 4 : un groupement méthyle et un groupement cyclopropyle. Les recherches faites au LCP-ULège ont montré que la présence d'un petit groupement alkyle

(Me et/ou cPr) sur l'atome d'azote est cruciale d'un point de vue structure-activité [Pirotte *et al.*, 1998]. Le dimère est une molécule rigide. Pour éviter les problèmes d'encombrement stérique sur cette position, le plus petit des groupements a été retenu. Bien que le groupement cyclopropyle soit plus volumineux, il a permis d'obtenir les composés les plus actifs. C'est pour cette raison qu'il a aussi été retenu.

5. La **simplification** : en dernière étape, des composés « hybrides », ou dimères simplifiés, ont été testés. Ils présentent une partie benzothiadiazine dioxyde, et de l'autre côté du lien un simple substituant benzènesulfonamide, cette dernière faisant penser à une BTD ouverte, simplifiée, d'où leur appellation.
6. La présence d'un **atome de fluor** : la dernière modulation évaluée est l'introduction d'un atome de fluor sur le cycle aromatique des BTD. Cet ajout permet de se rapprocher de la molécule (**64**) qui présente un atome de fluor en position 7, permettant des interactions favorables avec la poche d'allostérie [Nørholm *et al.*, 2013] [Krintel *et al.*, 2016]. Pour des dimères simplifiés, la présence d'un seul ou de deux atomes de fluor a été évaluée.

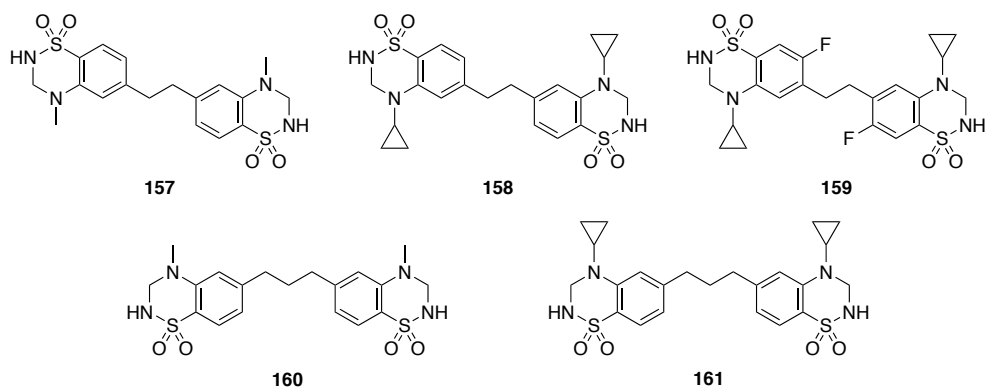


Figure 61. Molécules dimères.

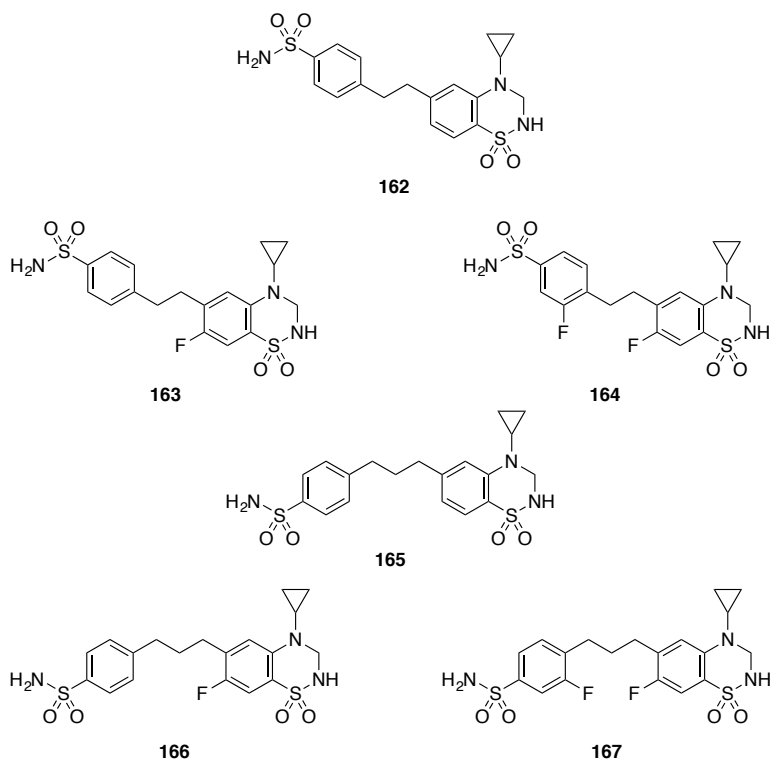


Figure 62. Molécules simplifiées.

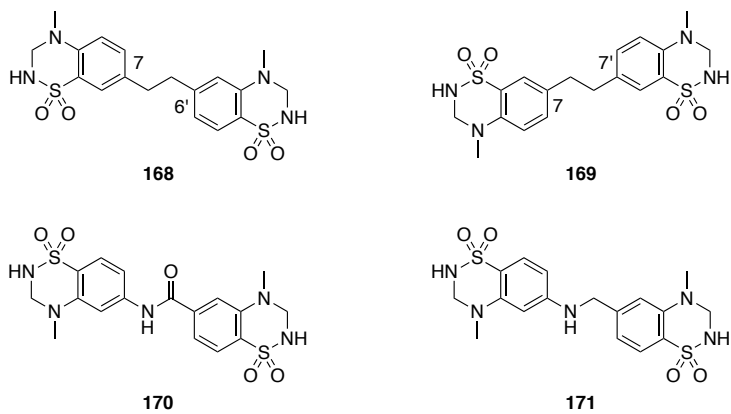


Figure 63. Déclinaison sur la molécule (157).

3.2.2 Résultats

Molécule	Position	2/3 atomes	Nature chimique	Substituant en position 4	Dimère / Simplifié (D/S)	Nombre d'atomes de fluor	Énergie de liaison (kcal/mol)
157	6-6'	2	éthylène	Me	D	/	-55,68
158	6-6'	2	éthylène	cPr	D	/	-54,83
159	6-6'	2	éthylène	cPr	D	2	-46,48
160	6-6'	3	propylène	Me	D	/	-45,41
161	6-6'	3	propylène	cPr	D	/	-53,24
162	6-6'	2	éthylène	cPr	S	/	-26,89
163	6-6'	2	éthylène	cPr	S	1	-31,31
164	6-6'	2	éthylène	cPr	S	2	-30,01
165	6-6'	3	propylène	cPr	S	/	-34,64
166	6-6'	3	propylène	cPr	S	1	-34,51
167	6-6'	3	propylène	cPr	S	2	-36,75
168	7-6'	2	éthylène	Me	D	/	-37,28
169	7-7'	2	éthylène	Me	D	/	-25,00
170	6-6'	2	amide	Me	D	/	-2,74
171	6-6'	2	amino-méthylène	Me	D	/	-50,31

Tableau 1 : Comparatifs des différents dimères potentiels.

Ces résultats proviennent de trois *dockings* successifs. Ceux-ci ont été réalisés au moyen du logiciel GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) au moyen de deux fonctions internes au système : PLP (*Piecewise Linear Potential*) et CHEMPLP. Ces fonctions sont toutes deux des fonctions empiriques optimisées pour déterminer les interactions entre ligands et protéines [O. Korbs *et al.* 2009]. Pour rester simple, la fonction PLP permet d'évaluer l'encombrement stérique entre la protéine et la molécule testée tandis que la fonction CHEMPLP permet l'évaluation des angles et des distances envers les ponts hydrogènes, et est

la fonction par défaut utilisée par GOLD. Les différents paramètres de ces fonctions sont modulables, ceux qui ont été utilisés dans le cadre de ces études utilisent des valeurs moyennes permettant un équilibre entre performances et résultats.

D'un point de vue méthodologique, la première étape fut la préparation, d'une part du site actif (sur base des données de la PDB code 4N07) et d'autre part des molécules. Après avoir vérifié les interactions données par le modèle et celles référencées par la littérature pour des molécules déjà caractérisées. Cent essais ont été réalisés par molécules désirées. Les vingt meilleurs résultats ont été conservés. Parmi ces vingt résultats, les différentes poses prises par les dimères ont été regroupées en *clusters*, ensuite la meilleure pose fut sélectionnée (généralement la pose majoritaire au sein du *cluster*) et l'énergie de liaison associée extraite pour permettre la comparaison entre les différents dimères comme présenté par le tableau 1.

Les énergies de liaison, obtenues par Discovery Studio 4.0, peuvent varier selon différents paramètres. Ainsi, l'utilisation d'autres fonctions auraient pu conduire à d'autres interactions, et donc à d'autres poses au sein des *clusters*. Cependant si dans l'ordre des affinités des différentes molécules peut être affecté, la tendance générale devrait être conservée.

Le premier *docking* était focalisé sur la longueur du lien, la nature du substituant en position 4 et la différence entre dimères et molécules simplifiées (**157, 158, 160, 161, 162 et 165**), le deuxième sur la pertinence d'introduire un atome de fluor (**159, 163, 164, 166 et 167**) et le dernier sur la nature du lien et son point d'attache (**168, 169, 170 et 171**).

L'information importante de ces résultats est l'énergie de liaison entre la molécule testée et la protéine. Plus cette énergie est négative, plus

l'interaction est favorable et meilleur est le *fit*. Ainsi, de ces différents *dockings*, une série de conclusions peuvent être tirées :

1. Entre les dimères vrais et simplifiés, ce sont les vrais dimères qui sont les meilleurs candidats (**158 vs 162, 163, 164** ou **161 vs 165, 166, 167**).
2. La meilleure position pour fixer le *linker* se place entre les positions 6 des noyaux BTB (**157 vs 168 et 169**).
3. Un lien éthylène est le meilleur choix (**157 vs 160 et 158 vs 161**).
4. La nature du groupement sur l'azote en 4 n'a pas d'influence si le pont est de nature éthylénique (**157 vs 158**). En revanche, dans le cas d'un pont de nature propylène, le groupement cyclopropyle est meilleur que le groupement méthyle, comme déjà décrit dans la littérature (**160 vs 161**).
5. L'introduction d'un ou plusieurs atomes de fluor n'apporte pas de gain d'affinité marqué pour les dimères (**158 vs 159**). Dans le cas des composés simplifiés, la série éthylène ne présente pas un gain d'énergie de liaison (**162 vs 163 et 164**), alors que la série propylène manifeste un léger gain (**165 vs 166 et 167**). Enfin, l'introduction d'un deuxième atome de fluor ne modifie pas substantiellement les énergies de liaison (**163 vs 164** ou **166 vs 167**).
6. Enfin, concernant la nature du lien, comme l'atteste la très faible énergie de liaison de l'amide (**170**), des composés reliés par ce pont rigide ne montrent que peu d'intérêt. Pourtant, il semble que le pont aminométhylène (**171**) soit une possibilité intéressante à étudier, comme nous pouvions l'attendre de ce pendant isostérique de la molécule (**157**).

Pour terminer, il ressort clairement que les meilleures molécules sont **(157)**, **(158)**, **(161)** et **(171)** (par ordre décroissant d'énergie de liaison). Ce sont donc ces molécules qui présentent le plus grand intérêt à être synthétisées pour valider le concept de dimère appliqué aux BTD comme modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. La molécule **(171)** présente un plus faible intérêt dans un premier temps. La présence de l'atome d'azote pourrait causer des interactions défavorables entre le récepteur et le pont. Ces interactions doivent être minimisées dans le but d'éviter de dénaturer celles entre les noyaux BTD et leurs sites de liaison. Ce sont donc les 3 molécules avec un pont alkyle qui seront le centre des travaux de synthèse et qui devraient permettre de valider le concept (figure 64).

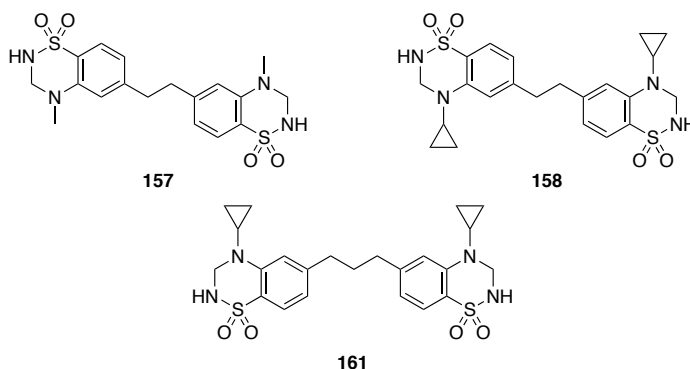


Figure 64. Molécules désirées.

3.3 Synthèse des molécules cibles

3.3.1 Pont éthylène

Fort de l'expérience acquise avec les amides, il semble qu'une **approche directe** ne peut que difficilement aboutir, et que c'est donc une **approche convergente** qu'il faut emprunter. Pour réaliser le pont entre les BTD, nous avons décidé d'utiliser la réaction de métathèse des oléfines [Chatterjee *et al.*, 2002]. Celle-ci nous permet, au moyen du catalyseur d'Hoveyda-Grubbs II (**202**) de faire réagir deux équivalents de monomère sur eux-mêmes pour obtenir un dimère.

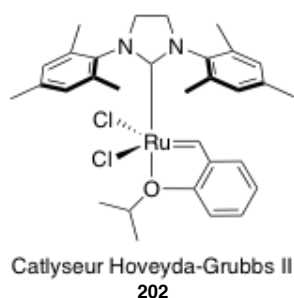


Figure 65. Catalyseur utilisé lors de la métathèse

Le composé dérivé du styrène servant de précurseur sera obtenu par réaction de Suzuki-Miyaura sur un dérivé bromé [Suzuki *et al.*, 1999].

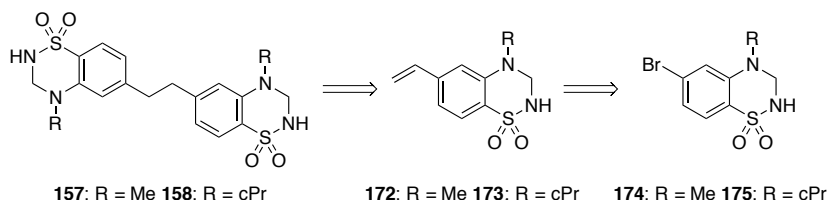


Figure 66. Rétrosynthèse des molécules (**157 - 158**).

La synthèse des deux précurseurs bromés fut réalisée en suivant les conditions généralement employées au LCP-ULiège [Francotte *et al.*, 2010].

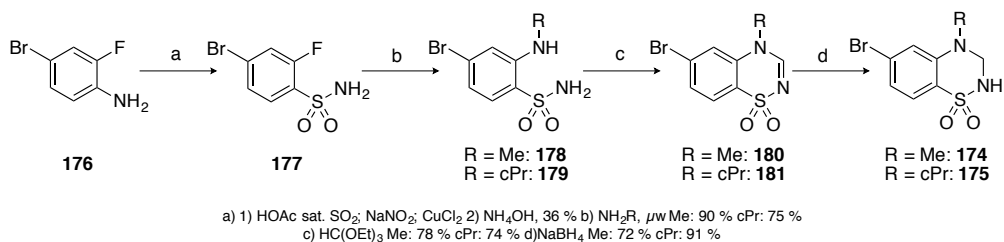


Figure 67. Synthèse des dérivés 6-bromo (174 - 175).

L'étape suivante consiste à fonctionnaliser avec un groupement vinylique par la méthode Suzuki. C'est pour cette réaction catalytique que le Akira Suzuki fut célébré par le prix Nobel de chimie en 2010 aux côtés de Heck et Negishi, pour leurs travaux sur la réaction de couplage catalysée au palladium. La réaction de Suzuki permet le couplage entre un acide ou un ester boronique et un composé halogéné ou pseudohalogéné (groupement triflate, tosylate...), résultant en un lien carbone-carbone entre les deux espèces. Le couplage de Suzuki ressemble fortement au couplage de Stille, en utilisant des dérivés borés au lieu des composés stanneux. La stabilité et l'innocuité des premiers a permis à la méthode Suzuki de se répandre et d'être aujourd'hui couramment utilisée et décrite dans la littérature [Suzuki *et al.*, 1999] [Gujral *et al.*, 2016] [Hussain *et al.*, 2016]. Les conditions expérimentales sont relativement douces : présence de Pd et d'une espèce basique, souvent du carbonate de potassium. Les conditions basiques de réaction permettent d'activer l'espèce boronique en polarisant la liaison, facilitant ainsi la réaction de transmétalement, étape limitante, et donc accélérant grandement le processus.

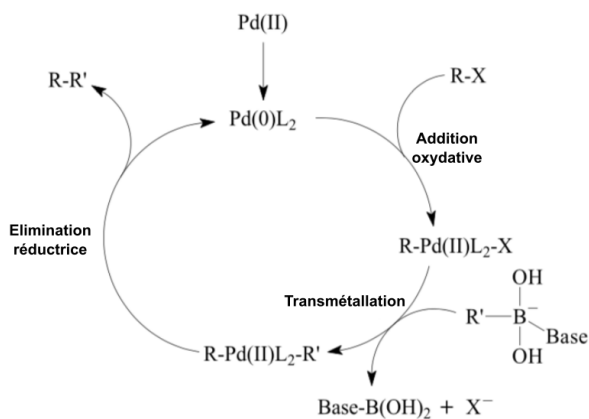


Figure 68. Cycle catalytique (adapté de [Laue and Plagen, 2005]).

Dans un premier temps, la réaction de Suzuki a été réalisée entre les BTD (**174** - **175**) et du 4,4,5-triméthyl-2-vinyl-1,3,2-dioxaborolane en présence d'acétate de palladium et de carbonate de potassium.

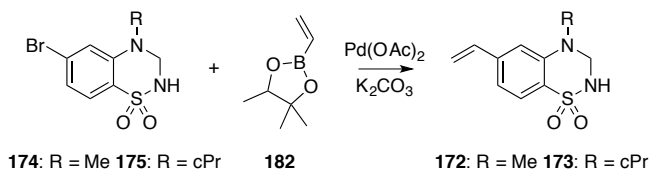


Figure 69. Premier couplage de Suzuki.

Observations :

- La réaction conduit systématiquement à plusieurs produits difficilement séparables sur colonne de silice. Les produits secondaires se forment de manière concomitante avec le produit d'intérêt indépendamment des conditions expérimentales (variations de la température, des quantités de base, de la nature de la base, du solvant...)
- La réaction n'est pas complète malgré l'ajout de réactif boré en excès.

- L'apparition d'un solide noir au cours de la réaction conduit à des pertes de produit lors de son isolement.

Pour pallier ces problèmes, un autre réactif boré fut testé : le vinyltrifluoroborate de potassium. L'utilisation de trifluoroborate pour les réactions de Suzuki est une amélioration de la méthode [Barder *et al.*, 2004] [Molander *et al.*, 2008] [Butters *et al.*, 2010] [Lennox *et al.*, 2012]. La présence d'ions fluorures liés à l'atome de bore permet de polariser la liaison et d'améliorer encore la réactivité. L'utilisation de ce réactif a permis de diminuer de manière drastique la proportion de produits secondaires générés durant la réaction, et surtout de conduire la réaction à son terme.

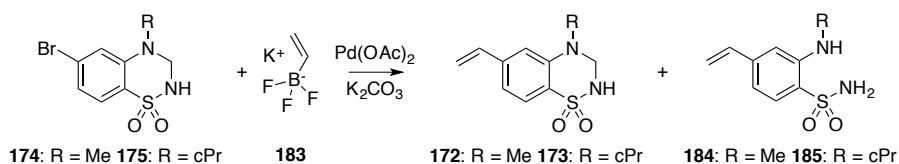


Figure 70. Couplage de Suzuki conduisant à l'ouverture du cycle.

Lors de l'analyse des composés récupérés, il s'est avéré que le produit majoritaire n'était pas la BTM vinylée (**172** ou **173**), mais l'aminobenzènesulfonamide (**184** ou **185**). Ceci s'explique par la nature relativement sensible en milieu basique de ce type de composé qui peut avoir tendance à s'ouvrir et à régénérer le précurseur (aminobenzènesulfonamide) [Mollica *et al.*, 1971].

Ce résultat peut s'expliquer de trois manières : soit la réaction de Suzuki se passe sur le composé cyclisé et l'ouverture se fait ensuite (figure 71, chemin A), soit l'ouverture se fait en premier et c'est l'aminobenzènesulfonamide qui sert de substrat pour la réaction de Suzuki (figure 71, chemin B), soit la réaction de Suzuki se fait sur les

deux substrats et l'ouverture se fait de manière concomitante (figure 71, chemin A et B).

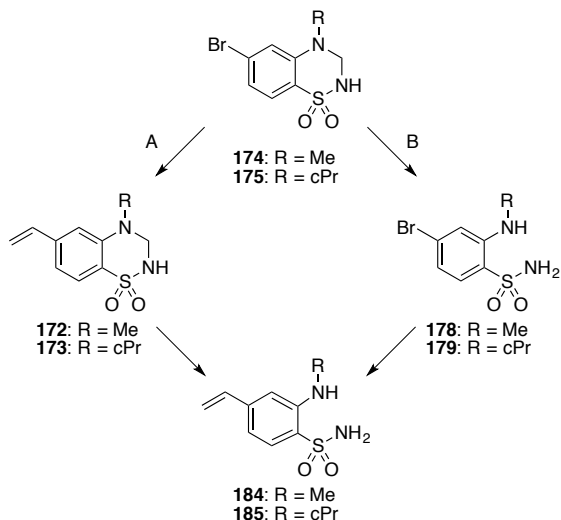


Figure 71. Chemins réactionnels possibles.

Il s'est avéré que si le chemin réactionnel B est possible, il est alors possible de réaliser la réaction de Suzuki sur l'aminobenzènesulfonamide pour obtenir les composés (184) et (185). À partir de ce point, les méthodes de synthèse ainsi que les rendements varient selon la nature du substituant R en position 4.

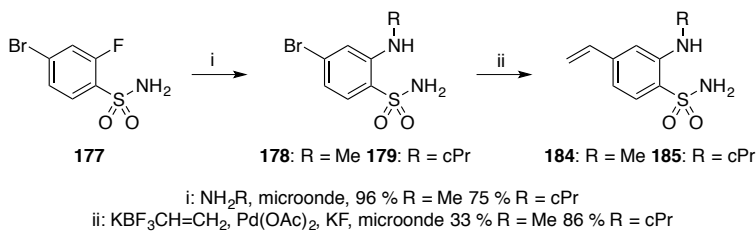


Figure 72. Vinylation des aminobenzènesulfonamides.

3.3.1.1 Synthèse du dimère 157

Comme notifié dans le point précédent, les rendements varient selon le substituant, et pour le cas du groupement méthyle, malgré nos tentatives, la meilleure optimisation que nous avons pu obtenir ne s'élève qu'à 33 % (contre 86 % pour le pendant cyclopropyle discuté au point 3.3.1.2). Nous ne nous expliquons pas cette différence si marquée sur la simple base d'un groupement qui n'est pas directement sur le cycle aromatique et qui ne semble pas provoquer de gêne stérique. La suite du protocole général de synthèse des BTD ne présenta pas de problèmes particuliers et ne demanda pas de modifications des conditions expérimentales, ce qui permit l'obtention de la BTD (**172**).

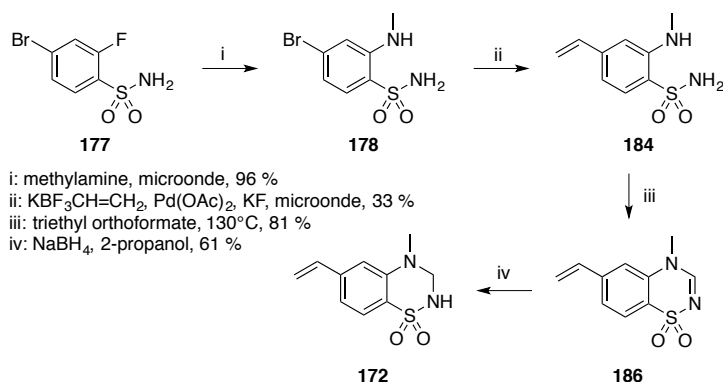


Figure 73. Obtention de la BTD (**172**).

La BTD peut présenter un risque d'empoisonnement du catalyseur de Grubbs et peut empêcher la métathèse. La littérature nous informe qu'il est possible de réaliser des réactions de métathèse avec des fonctions possédant des paires électroniques libres ou des protons libres [Danieli *et al.*, 2004] [Faucher *et al.*, 2004] [Narendra *et al.*, 2004].

Nous avons tout d'abord réalisé un essai sur une BTD disponible dans la chimiothèque du LCP porteuse d'une fonction vinyle (**187**) et la réaction se produit sans difficulté : l'avancement de cette dernière

s'observe facilement avec l'apparition d'un composé insoluble (**188**). L'isolement du produit est d'autant plus simple qu'il suffit de le filtrer, et même si la réaction n'est pas complète, le milieu réactionnel initial étant homogène (réactif et catalyseur solubles dans le dichlorométhane), le produit (**188**) s'isole et se purifie par filtration.

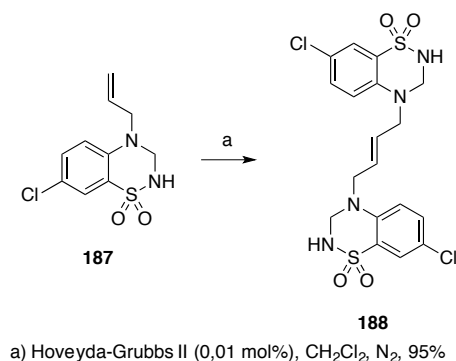


Figure 74. Couplage de Grubbs sur une BTB.

Lorsque la molécule (**172**) réagit avec le catalyseur, les mêmes observations furent réalisées : un milieu homogène avec apparition progressive d'un trouble puis d'un solide aisément récoltable. Ce solide est l'alcène *trans* (**189**) ; cette sélectivité s'explique par la présence d'un seul type de proton vinylique en RMN, traduisant la présence d'un seul des deux isomères. Le *trans* est thermodynamiquement favorisé, car minimisant les gênes stériques ; or, comme nous n'avons mis aucun sélecteur stérique dans le milieu pour favoriser l'apparition du composé *cis*, ça ne peut donc être que le *trans*. La présence de cet isomère spécifique ne nous impacte pas, car l'étape suivante consiste à réduire la double liaison, mais il est intéressant de le souligner.

Enfin, le dimère (**157**) est obtenu par hydrogénation catalytique de (**189**). Cette étape demanda une légère modification du protocole expérimental. Le traitement de cette étape consiste en la filtration du charbon palladié. La solubilité du produit (**189**) étant très faible, il

nécessita l'ajout de DMF comme cosolvant pour le solubiliser et permettre de l'isoler dans le filtrat.

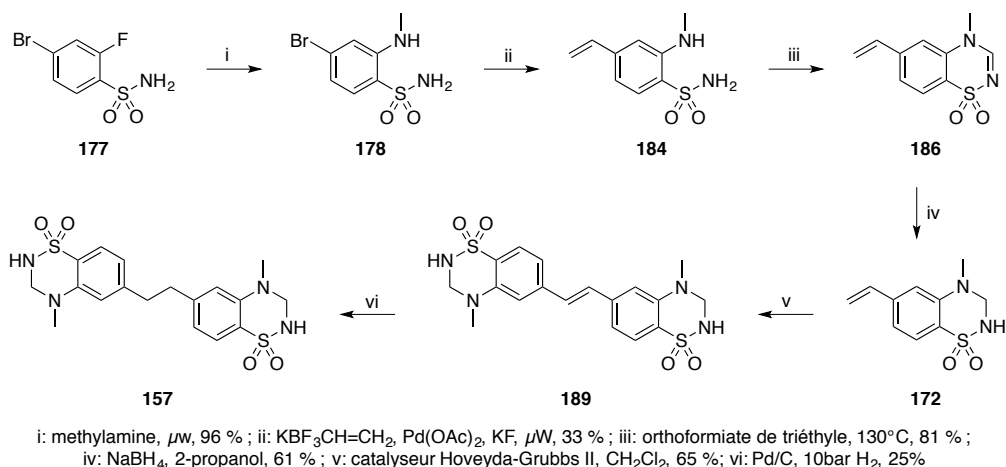


Figure 75. Schéma de synthèse menant au dimère (157).

3.3.1.2 Synthèse du dimère 158

La réaction de Suzuki sur le substrat porteur d'un groupement cyclopropyle en position 4 se passe bien mieux que sur son homologue méthyle, avec un rendement de 86 %. Les conditions expérimentales employées sont pourtant identiques et la pureté des réactifs semble de qualité équivalente. Cependant, nous avons observé une assez grande variation de rendement lors de nos différentes tentatives. Une des explications peut être en lien avec le solide noir qui apparaît suite à l'utilisation du palladium. Ce solide peut se présenter sous différentes formes : soit être relativement fin et ne générer qu'une fine pellicule sur les parois du ballon, soit former un amas bien plus considérable et compact autour de l'agitateur magnétique. Cet amas doit sûrement contenir une partie du produit ; or, comme il est éliminé en début de traitement postréactionnel, son élimination conduit aussi à la perte de produit et réduit ainsi les rendements.

La différence notable entre les protocoles conduisant aux dimères se rencontre à l'étape de cyclisation. Contrairement à son homologue substitué par un méthyle, la préparation du dérivé cyclopropylé exigea une modification de la voie de synthèse expérimentale. Toutes les BTD insaturées en position 2,3 ont pour caractéristique d'être très peu solubles, et donc un solide apparaît dans l'orthoformiate de triéthyle, traduisant l'avancement de la réaction. Cette très faible solubilité permet de purifier la majorité des BTD à cette étape ; c'est une des forces du protocole général. Or, dans ce cas-ci, un produit commence bien à se former, tel qu'en atteste l'apparition d'un solide. Mais lorsque ce solide commence à s'accumuler, son aspect change et le profil CCM montre l'apparition d'une multitude de produits. Et lors de la tentative d'isolement du produit, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un solide, tout au plus un amas visqueux traduisant la présence de multiples produits. Si cette étape ne nécessite pas obligatoirement des réactifs purs, sa cinétique est améliorée et son traitement facilité avec un réactif purifié au préalable. La synthèse a été réalisée plusieurs fois avec des lots différents d'orthoformiate de triéthyle, et avec l'aminobenzènesulfonamide (**185**) purifié sur colonne, mais les mêmes observations furent faites. Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène repose sur la nature du réactif, proche de celle du styrène. Lorsqu'il est chauffé à 130 °C, une polymérisation s'amorcerait sur l'intermédiaire de réaction ou sur le produit qui commence à précipiter. Pour vérifier cette hypothèse, la réaction a été menée dans l'orthoformiate de triméthyle, qui présente une réactivité similaire que l'orthoformiate de triéthyle, mais qui possède un point d'ébullition de 100 °C. De ce fait, la cyclisation devrait se produire, mais pas la polymérisation. Il n'en fut rien et les mêmes observations furent faites dans ces conditions de plus basse température.

Une des autres méthodes de cyclisation consiste à faire réagir à température ambiante, ou en chauffant très légèrement (60 °C), un aminobenzènesulfonamide avec le paraformaldéhyde pour obtenir la BTD désirée [Pirotte *et al.*, 1998]. Les rendements de cette méthode sont fortement dépendants de la nature du substrat, et la séparation du produit du paraformaldéhyde est malaisée. Lors de sa mise en œuvre, aucun produit secondaire n'apparut, mais il n'y eut tout simplement pas de réaction. Lorsque le milieu fut légèrement chauffé, les espèces se dégradèrent, donnant des résultats similaires à ceux obtenus précédemment avec l'orthoformiate de triéthyle (**190**).

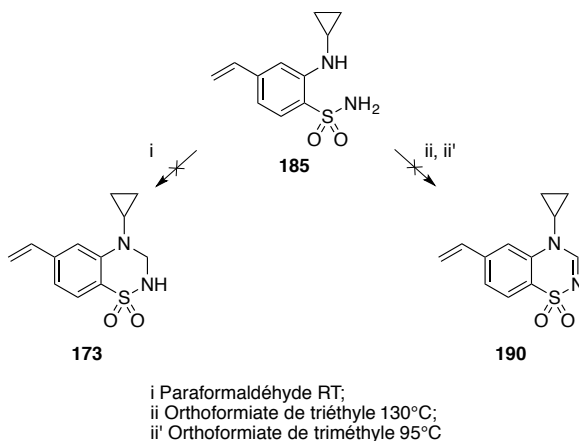


Figure 76. Blocage lors des réactions de cyclisation.

Supposant donc que c'est la double liaison qui pose problème pour cette étape, nous avons réalisé la métathèse de Grubbs sur le composé (**185**) et obtenu le composé dimérique correspondant (**191**). Suite à sa précipitation dans le milieu réactionnel et par simple filtration, ici aussi c'est l'isomère *trans* qui est obtenu comme décrit dans le paragraphe 3.3.1.1. Cet alcène est réduit par hydrogénation catalytique de manière analogue au composé (**189**) pour fournir le composé (**192**).

L'étape suivante de cyclisation était critique, étant donné qu'elle ne fut jamais faite sur un composé dimérique avec succès et qu'il n'était pas possible de cycliser en présence de la double liaison. Un échec à ce stade nous aurait forcé à repenser totalement la méthode de synthèse, mais la cyclisation fut un succès et a permis d'obtenir le composé (**193**). Pour la dernière étape, vu la très faible solubilité du composé (**193**), le DMF fut ajouté dans le milieu réactionnel pour le rendre homogène avant l'ajout de NaBH₄. Cette dernière opération permit d'isoler avec succès le dimère (**158**).

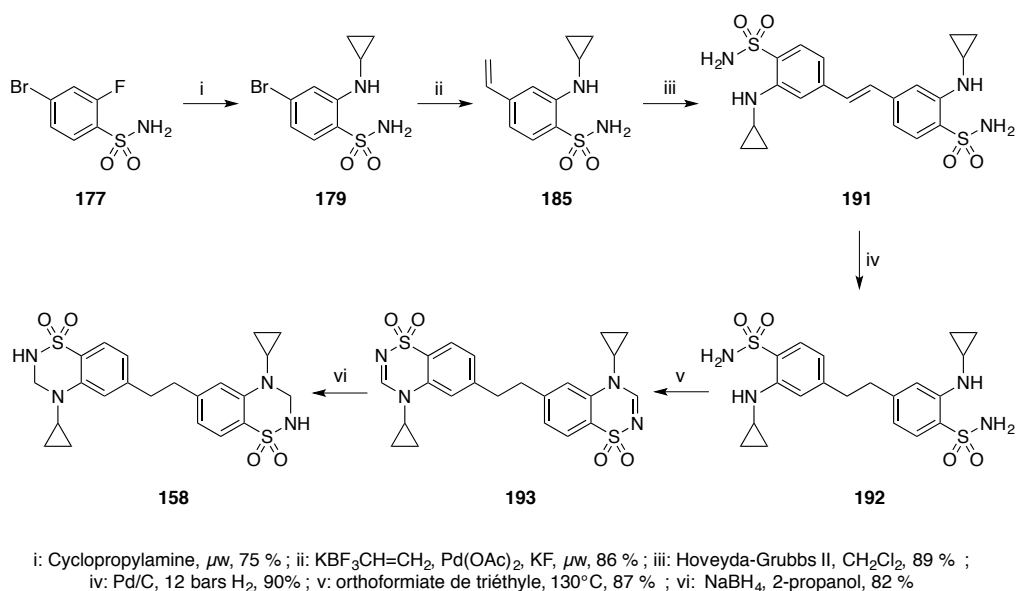


Figure 77. Protocole permettant la synthèse du dimère (**158**).

3.3.1.3 Synthèse des homologues supérieurs

Suite aux résultats obtenus avec les dimères (**157**) et (**158**), il semblait envisageable de réaliser la synthèse d'homologues supérieurs, dont le dimère (**160**). La synthèse du dimère (**160**) serait basée sur les protocoles ayant conduit aux dimères (**157**) et (**158**). Selon les résultats du *docking*, le dimère (**161**) n'était pas une des cibles prioritaires. Cependant,

disposant du synthon et des réactifs nécessaires à sa réalisation, l'opportunité d'obtenir un dimère supplémentaire fut saisie.

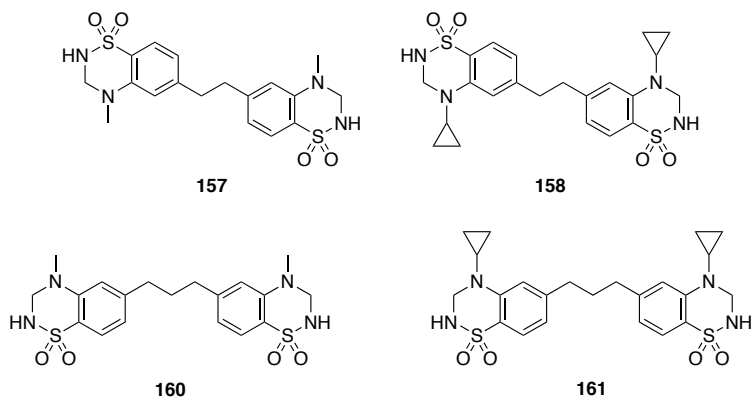
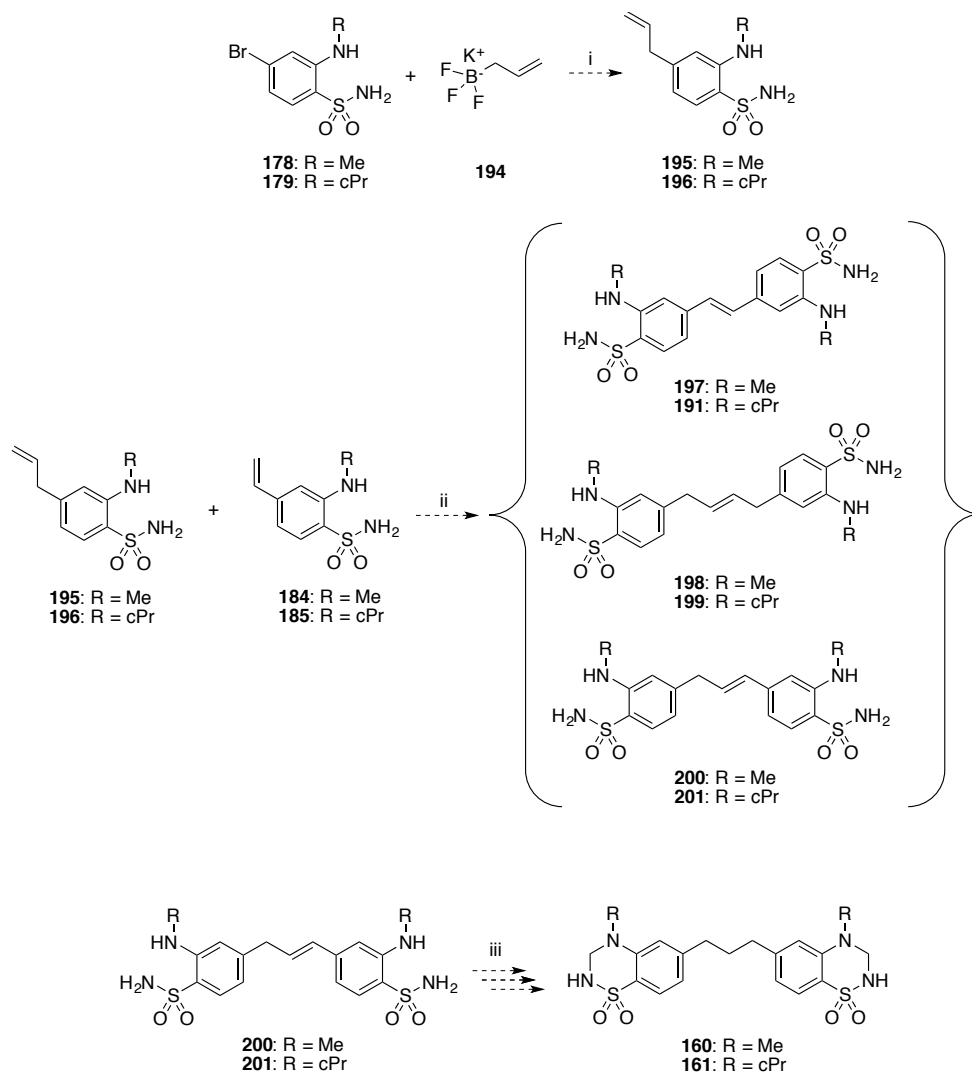


Figure 78. Dimères synthétisés et leurs homologues supérieurs.

L'obtention des réactifs porteurs du groupement allylique (**195** R = Me ; **196** R = cPr) s'est faite au départ des composés (**178**) et (**179**) par couplage de Suzuki en utilisant le réactif (**194**). L'obtention de composés liés par un lien contenant un nombre impair d'atomes, par métathèse des oléfines, ne peut se faire qu'en faisant réagir deux espèces différentes (hétérométathèse). Dans le cas présent, les composés (**195**) et (**196**) réagissent respectivement avec les composés (**184**) et (**185**). Contrairement aux homométathèses, comme celles utilisées pour obtenir les composés (**189**) et (**191**), qui conduisent à un seul produit, les hétérométathèses génèrent au minimum trois produits distincts. Ces produits résultent soit des deux homométathèses (**197** - **191**) et (**198** - **199**), soit de la métathèse croisée (**200** - **201**). Ce dernier peut ensuite suivre le protocole de synthèse conduisant à la BTD (Figure 79).



i. Pd(OAc)₂, KF, μW ii. Hoveyda-Grubbs II, CH₂Cl₂, N₂ iii. Protocole de synthèse des BTDs

Figure 79. Obtention des dimères propylènes.

Le composé (**184**) fut utilisé pour la mise au point des différentes étapes. Il permet la synthèse des homodimères (**197 - 191**) pour permettre l'identification du composé désiré lors de l'hétérométathèse.

Le composé caractérisé par un *linker* éthylène fut obtenu dans des conditions analogues à celles utilisées pour le produit (**192**). L'apparition d'un solide en cours de réaction suggéra son bon avancement. Le solide obtenu (**197**) peut être isolé par filtration.

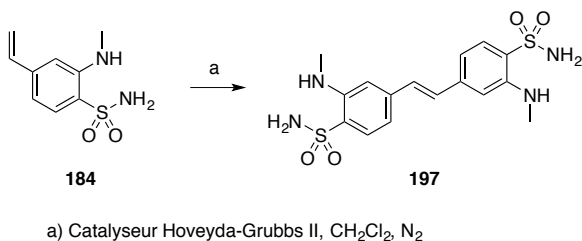


Figure 80. Obtention du premier produit d'homométhathèse.

Pour le composé caractérisé par un *linker* butylène (**191**), il fallut d'abord réaliser le synthon porteur du groupement allylique (**195**). Cette réalisation se fit de manière analogue au protocole mis en place pour le composé porteur du groupement vinylique (**184**). Au cours de la réaction, un solide apparut, semblant indiquer son bon avancement. L'analyse RMN du solide ainsi isolé révéla que celui-ci n'était pas le composé (**198**), mais bien le composé (**197**) précédemment synthétisé.

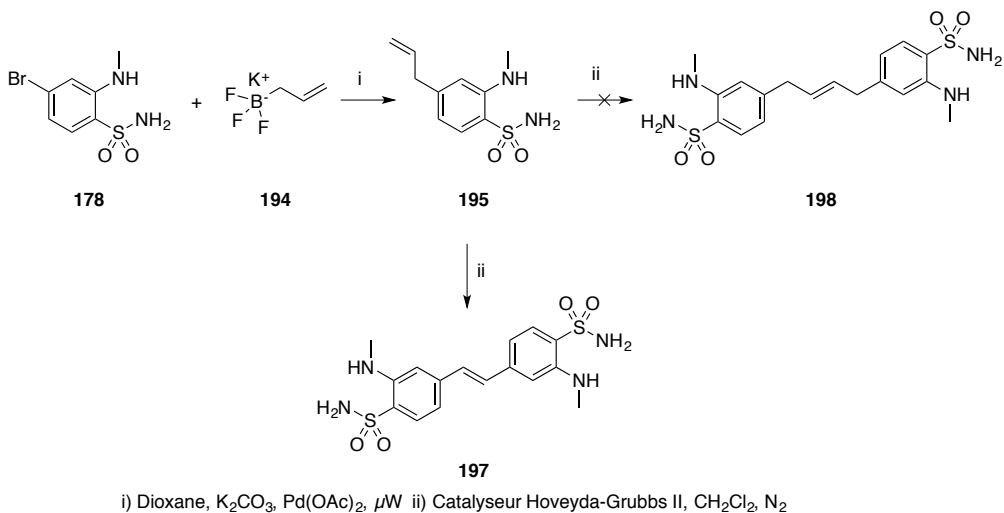


Figure 81. Dimérisation avec un réactif allylique.

Le phénomène observé ici s'explique par une réaction parasite rencontrée lors des métathèses de Grubbs : la migration de l'oléfine. Ces migrations n'apparaissent qu'avec un groupement allylique ou plus long [Hong *et al.*, 2005]. Si dans le cas présent, cette migration est problématique, R. Grubbs rapportait leur existence en 1993 lors de réactions sur des alcools allyliques [McGrath D.V. *et al.* 1993]. Ils rapportent dans cet article que la réaction d'isomérisation permet de régénérer un aldéhyde ou une cétone ; l'éther ou alcool allylique présent comme réactif sert donc de groupe protecteur à cette fonction. Si la réaction existe, est caractérisée et peut avoir des fins appliquées, les mécanismes qui expliquent le chemin de réaction étaient hypothétiques. À l'heure actuelle, ces mécanismes restent flous, des simulations informatiques semblent donner deux modèles cohérents pour expliquer les réactions [Engel *et al.*, 2017]. Le premier implique une coordination de type η^3 entre l'allyle et le ruthénium (figure 82 gauche). Cet état conduit ensuite à l'internalisation de la liaison et donc à l'hybridation. L'autre mécanisme implique l'intervention d'un hydrure. Un des hydrogènes portés par un des groupements méthyles vient se coordonner au noyau de ruthénium. Cet hydrure va ensuite successivement se fixer sur la double liaison et la quitter pour donner l'alcène interne (figure 82 droite). La méthode utilisée pour atteindre ses mécanismes sort du cadre de ce travail, nous n'explicitons pas plus en détail cette dernière.

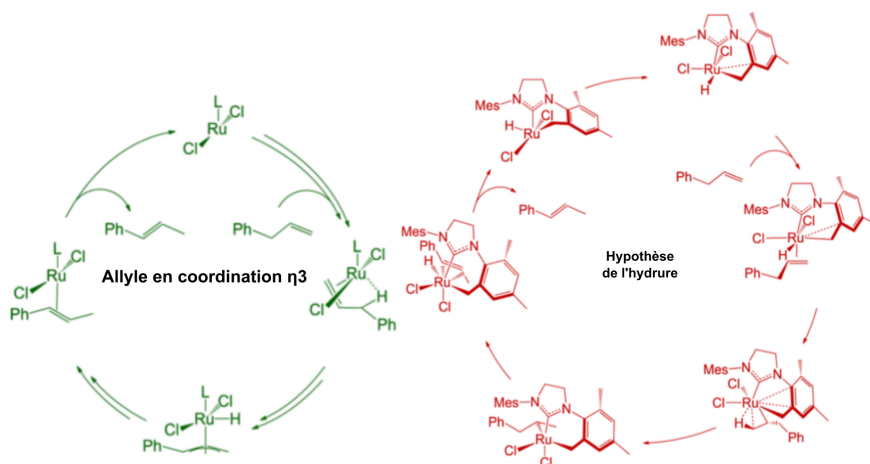


Figure 82. Mécanisme possible expliquant l'isomérisation (gauche : mécanisme η^3 droite : mécanisme hydrure) (adapté de [Engel *et al.*, 2017])

Sur base de données expérimentales, la proportion d'isomérisation est dépendante du catalyseur et du substrat étudié. Il semblerait que dans le cadre de ce travail, l'utilisation du catalyseur Hoveyda-Grubbs II ait tendance à favoriser la formation d'un alcène interne [Liniger *et al.*, 2017] (figure 83). Dès lors, l'obtention des composés dimériques (**160**) et (**161**) ne semble pas être envisageable au moyen de ces réactions.

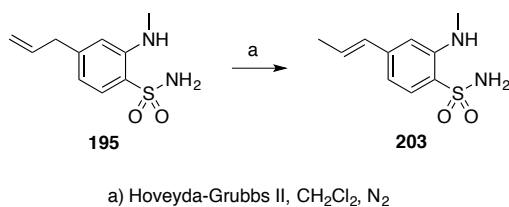


Figure 83. Migration de l'alcène.

3.3.1.4 Synthèse des monomères

Pour comparer l'activité des dimères et évaluer le gain obtenu par dimérisation, il fallait réaliser la synthèse des composés monomères. Ces composés sont soit non substitués sur le noyau aromatique (**204** - **205**) pour représenter le monomère dans son état le plus simple, soit porteurs d'un groupement méthyle en position 6 (**206** - **207**), pour mimer le début de la chaîne reliant les deux sous-unités dans une molécule dimère.

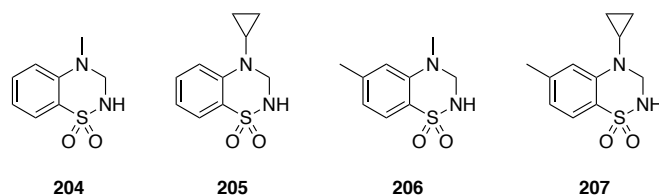
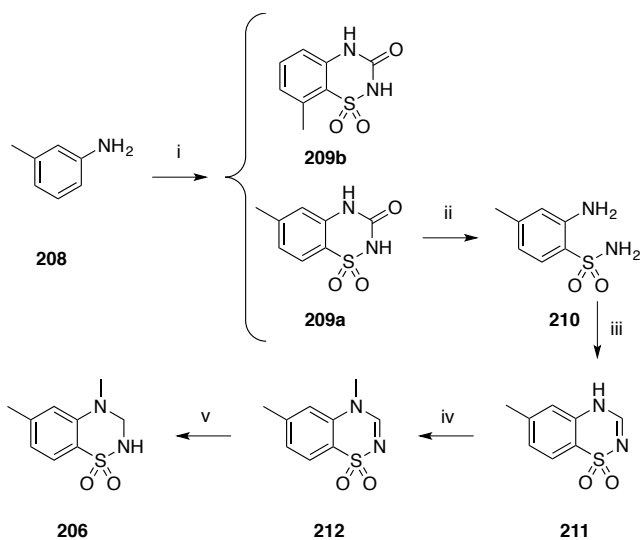


Figure 84. Monomères constitutifs.

Les composés (**204**) et (**205**) ont été resynthétisés suivant des conditions déjà décrites, sans modifications [Francotte *et al.*, 2007] [Nørholm *et al.*, 2013].

Les composés disposant d'un groupement méthyle sur leur noyau aromatique (**206** - **207**) furent synthétisés en suivant la même stratégie de synthèse, mais en aménageant quelque peu les protocoles. La synthèse du composé (**206**) se fit au départ de la *m*-toluidine. La cyclisation fut réalisée selon la méthode de Girard, à l'isocyanate de chlorosulfonyle, menant à deux isomères distincts (**209a** et **209b**). Le mélange de ces isomères est engagé dans la réaction d'hydrolyse acide. Après 6 h de reflux, le composé (**209a**) est presque totalement converti en composé (**210**), soluble dans le milieu acide, alors que le composé (**209b**) est resté intact et insoluble. La séparation des isomères s'opère par filtration ; le composé (**209b**) est recueilli sur le filtre, et le composé (**210**) reste en solution dans le filtrat et est isolé après alcalisation du milieu.

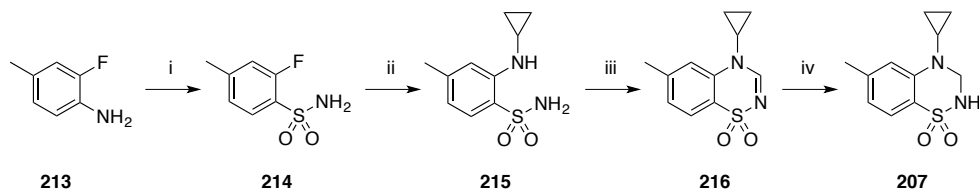
Le composé (**210**) suit ensuite la méthode analogue à l'obtention de (**204**) pour obtenir la BTD (**206**).



i: 1:ClSO₂NCO, CH₃NO₂; 2:AlCl₃; ii H₂SO₄ 50%, reflux, 23 % depuis **208**;
iii orthoformate de triéthyle, 76 %, 130°C; iv: CH₃I, K₂CO₃, CH₃CN, 75 %; v: NaBH₄, 2-propanol, 75 %

Figure 85. Synthèse du composé (**206**).

La synthèse du composé (**207**) se fit au départ de l'aniline (**213**) selon la méthode mise en place au LCP-ULiège.



i: 1) HOAc sat. SO₂, HCl, NaNO₂, CuCl₂ 2) NH₄OH, 37 %; ii Cyclopropylamine, 1,4-dioxane, reflux, 35 %;
iii orthoformate de triéthyle, 130°C, 35 %; iv: NaBH₄, 2-Propanol, 75 %

Figure 86. Synthèse du composé (**207**).

3.4 Pharmacologie

3.4.1 Historique et mise en place

Différentes techniques ont été développées au cours du temps pour l'évaluation des différentes classes de composés pharmacologiques. L'étude des antagonistes se base sur des méthodes d'affinité, telles que le déplacement de ligand radiomarqué [Monaghan *et al.*, 1984], la *single cell RT-PCR* [Bochet *et al.*, 1994] [Jonas *et al.*, 1994] [Geiger *et al.*, 1995], l'hybridation histochimique *in situ* [Keinäinen *et al.*, 1990] [Verdoorn *et al.*, 1991] [Hollmann *et al.*, 1994] ou l'immunocytochimie [Petralia *et al.*, 1992]. L'évaluation des agonistes ou des modulateurs allostériques utilise des approches similaires. Les techniques utilisées sont soit basées sur des techniques d'électrophysiologie, soit sur des phénomènes spectroscopiques.

Les techniques électrophysiologiques furent les premières à être utilisées pour caractériser les récepteurs. L'ovocyte de xénope (*Xenopus laevis*) fut le type cellulaire le plus souvent utilisé. Les ovocytes sont transfectés avec de l'ARN messager poly(A⁺) de cortex de rat, afin d'exprimer les différents types de récepteurs glutamatergiques dont l'étude est envisagée [Pirrotte *et al.*, 1998].

Les premiers rapports de transfection dans ce type de cellule remontent au début des années septante [Gurdon *et al.*, 1971]. Les recherches menées durant les années qui suivirent suggéraient que l'expression de protéines, puis de canaux ioniques [Barnard *et al.*, 1982] par l'ovocyte pourrait servir de modèle *in vitro* pour des expériences d'électrophysiologie. Ainsi, durant les décennies qui suivirent, l'utilisation d'ovocytes permit d'élucider plusieurs questions, telles que

l'impact de mutations dans les sites de coordination sur l'activité d'agonistes, la cinétique d'assemblage post-traductionnel de canaux plurisegmentés, ou l'étude des propriétés de canaux issus de cellules diverses au sein d'un milieu de référence [Methfessel *et al.*, 1986] [Stuhmer *et al.*, 1987] [Snutch *et al.*, 1988] [Krafte *et al.*, 1989] [Stuhmer *et al.*, 1995]. Les mesures faites sur ovocytes sont basées sur le courant qui résulte du flux d'ions au travers de la membrane de la cellule. Ces variations de courant peuvent être mesurées et être corrélées à l'activité d'un agoniste ou d'un modulateur allostérique positif. Trois électrodes sont utilisées dans ces expériences. La première est l'électrode de référence ; elle se trouve dans le milieu extracellulaire et permet de fixer les différents potentiels. Les deux autres électrodes sont en contact avec la cellule ; une sert à injecter du courant dans la cellule pour compenser les variations en lien avec l'ouverture des canaux, l'autre sert à mesurer ces variations (figure 87).

Les différentes techniques employées permettent de corréler un paramètre observable (variation du potentiel membranaire, émission de fluorescence...) avec la concentration du composé étudié. Les courbes obtenues en portant les valeurs de ce paramètre en fonction de la concentration donnent des sigmoïdes. Celles-ci permettent de comparer divers composés selon certains paramètres. Un de ces paramètres couramment utilisés pour ces comparaisons est l' EC_{50} (*half maximal effective concentration*). L' EC_{50} est la concentration à laquelle un composé présente 50 % de son activité maximale. Dans le cadre des modulateurs allostériques positifs, d'autres valeurs d'EC sont aussi couramment référencées, telles que l' EC_{2x} ou l' EC_{5x} , représentant respectivement la concentration à laquelle un modulateur allostérique positif augmente l'activité de l'agoniste d'un facteur deux ou cinq.

Les pentes des sigmoïdes permettent, sur base du coefficient de Hill, de caractériser le nombre de molécules qui interagissent avec le récepteur. Plus la pente est forte, plus il y a de molécules fixées.

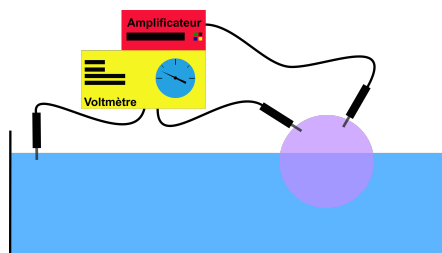


Figure 87. *Patch* sur ovocyte.

Avec l'affinement des techniques de *patch-clamp*, il s'est avéré possible de réaliser des expériences d'électrophysiologie sur des tissus cellulaires *ex vivo*, voire *in vivo*. Cette avancée permit de s'affranchir du modèle utilisant l'ovocyte de xénope. Cependant, la culture de neurones est chronophage et soulève des questions éthiques, car elle implique le sacrifice d'animaux [Rall *et al.*, 1985] [Blanton *et al.*, 1989] [Coleman *et al.*, 1989] [Edwards *et al.*, 1989] [Sakmann *et al.*, 1989] [Gahwiler, *et al.*, 1990] [Sakmann *et al.*, 1995].

Si les méthodes d'électrophysiologie permettent d'avoir un grand nombre d'informations fines, telles que l'action d'un composé sur la désensibilisation ou la désactivation, elles sont peu compatibles pour le *screening* à moyen ou haut rendement. Pour permettre le *screening*, ce sont des méthodes spectroscopiques qui ont été développées. Ces dernières ne permettent généralement pas d'avoir des informations sur la physiologie cellulaire, mais peuvent caractériser dans un temps limité une proportion importante de molécules. Les deux techniques sont finalement complémentaires, les molécules les plus intéressantes issues des criblages

spectroscopiques pouvant être caractérisées en détail par électrophysiologie.

Enfin, d'autres types cellulaires peuvent être utilisés, notamment les cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*). Des travaux ont montré qu'il est possible de faire exprimer de manière stable des récepteurs AMPA (sous-unité GluA3), et de déterminer, grâce à une sonde fluorimétrique sensible à la concentration en ions calciques (Fluo-3), des valeurs d'EC₅₀ pour divers modulateurs allostériques positifs, comme le cyclothiazide (**48**) ou l'IDRA-21 (**47**) [Varney *et al.*, 1998]. L'utilisation d'une lignée stable permet en outre une plus grande reproductibilité entre les tests par rapport à l'utilisation d'ovocytes.

3.4.2 Lignée stable

Le Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire du Dr Hanson dispose de l'expertise dans la mise au point de tests pharmacologiques de *screening* sur GPCR. C'est sous sa supervision qu'une lignée stable et un test de *screening* moyen débit sur les récepteurs AMPA furent développés. Le sous-type de récepteur choisi fut le GluA2_o. Le choix de ce récepteur est justifié par sa prédominance dans le SNC et par son utilisation dans les expériences de cocrystallisation des BTD avec le LBD réalisée par l'équipe du Pr Kastrup. L'utilisation de la même sous-unité pour le *screening* et la cristallographie permet l'obtention de résultats homogènes. Cependant, le récepteur GluA2_o présente une imperméabilité postédiction aux ions Ca²⁺, comme déjà mentionné. Le test est basé sur une augmentation de la concentration intracellulaire de ces derniers ; c'est donc la forme non éditée GluA2_o(Q) perméable au calcium qui a été utilisée. Le plasmide adéquat a été fourni par le laboratoire du Pr Mülle. La lignée fut réalisée sur des cellules HEK293.

Dans l'attente de l'obtention de la lignée stable, le test fluorimétrique fut mis au point grâce à des transfections transitoires. Les conditions expérimentales sont basées sur les travaux du Dr Hanson ; ces conditions furent optimisées pour les GPCR, mais ont pu être adaptées aux récepteurs canaux [Hanson *et al.*, 2007].

3.4.3 Principe du test

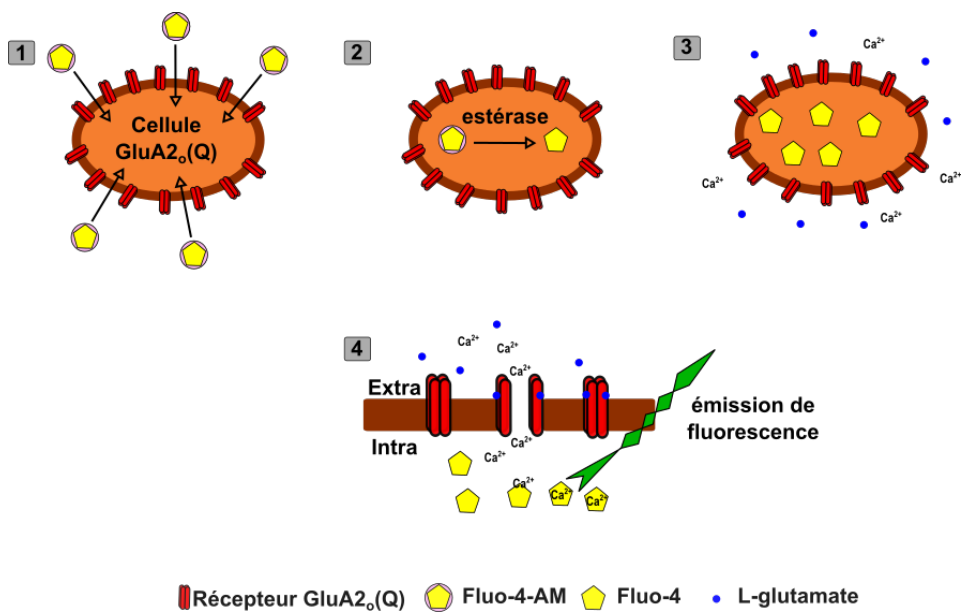


Figure 88. Schéma descriptif fonctionnement au niveau cellulaire du test

Le test est basé sur une émission de fluorescence dont l'intensité peut être corrélée à l'activité des récepteurs. La figure 88 décrit les différentes étapes. Tout d'abord les cellules étudiées, ici les cellules exprimant de manière stable le récepteur GluA2_o(Q), sont incubées en présence de Fluo-4-AM (218). Ce produit est la forme acétoxyméthyle ester de la sonde Fluo-4 (217).

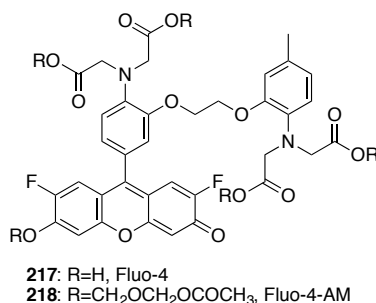


Figure 89. Sonde fluorimétrique.

Sous la forme d'ester, la molécule peut traverser la membrane et pénétrer dans le cytosol (1). Une fois dans le cytosol une estérase non spécifique vient cliver les fonctions esters pour générer la forme active Fluo-4 dans la cellule (2). Le Fluo-4 ainsi régénéré, et porteur de fonctions acides carboxyliques libres, ne peut plus diffuser au travers des membranes. La sonde Fluo-4 s'accumule ainsi dans le milieu intracellulaire. Les cellules sont ensuite stimulées à l'aide de L-glutamate (3). L'action du L-glutamate sur les récepteurs conduit à l'ouverture des canaux et à l'entrée d'ions calciques dans la cellule selon leur gradient de concentration. Les ions calciques sont chélatés par les fonctions carboxyliques de la sonde Fluo-4. Cette complexation va avoir pour effet de rendre la molécule fluorescente. La lumière émise peut alors être mesurée (4). L'intensité de cette fluorescence est proportionnel à la concentration en ion calcique et donc proportionnelle à l'activité des canaux. L'activité de ces derniers étant en lien direct avec les molécules qui les activent (agonistes) ou de molécules qui augmentent l'activité des agonistes (modulateurs allostériques positifs) il est possible de relier l'activité des composés à l'intensité de fluorescence mesurée.

3.4.4 Mise au point du test

Lors des premières stimulations avec du L-glutamate, aucun signal ne fut enregistré. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette absence de signal.

1. L'absence de signal pourrait être expliquée par un problème en lien avec le Fluo-4 (pas d'entrée dans la cellule, lot défectueux, l'ester n'est pas hydrolysé...) (figure 90, droites bleue et verte). Pour vérifier cette hypothèse, les cellules qui ne présentaient pas de signal ont été lysées par l'action d'un surfactant. Une augmentation de fluorescence fut observée, traduisant la présence dans la cellule de Fluo-4 (figure 90, courbes rouges).

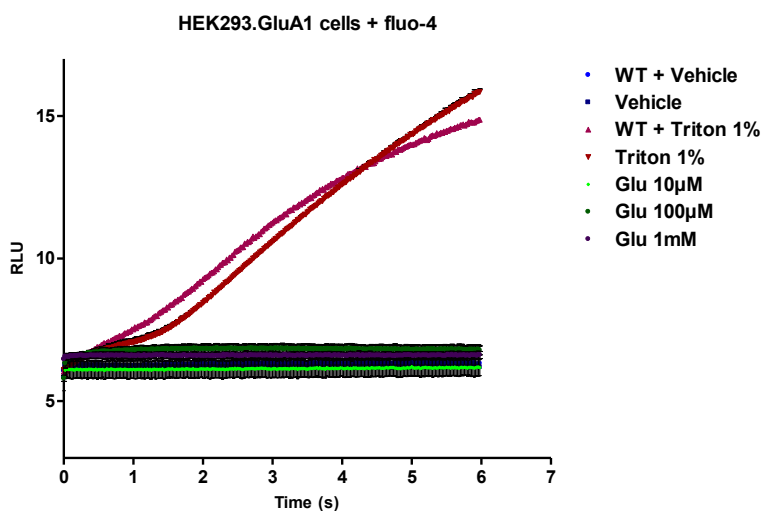


Figure 90. Intensité de fluorescence en fonction du temps sur des cellules HEK transfectées et non transfectées (WT).

2. Une autre hypothèse pourrait être que la transfection des cellules n'internalise pas l'ADN lors de la transfection, ou qu'elles ne produisent pas le récepteur. Pour la vérifier, une expérience de *western blot* fut réalisée. La figure 91 est le résultat de cette expérience. Les signaux présents dans les différents cas traduisent la bonne expression de la protéine par la cellule. Deux types de récepteurs ont été utilisés lors des mises au point, GluA1 et GluA2_o(Q). GluA1 a été utilisé comme contrôle positif pour disposer d'une protéine de masse semblable à celle de GluA2_o(Q). L'intensité des bandes varie selon la méthode de transfection utilisée et selon la nature de l'antigène utilisé. La méthode utilisant du phosphate de calcium est moins intense, car moins efficace que celle utilisant l'*Xtreme gene*. De même, l'intensité entre GluA1 et GluA2_o(Q) varie, car l'antigène utilisé est différent.

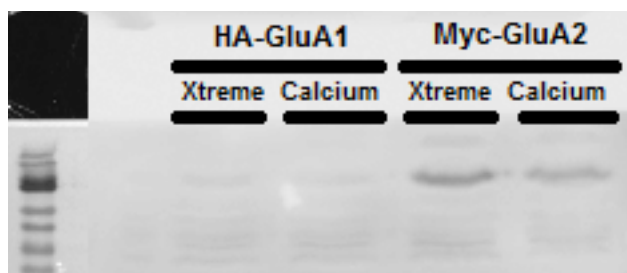


Figure 91. *Western blot* des récepteurs GluA1-2.

3. La protéine était produite par la cellule, comme nous l'avons vérifié par *western blot* ; cependant, il était possible que le récepteur ne soit pas correctement adressé à la membrane. Par immunofluorescence, il fut montré que les récepteurs étaient bien localisés à la membrane (figure 92).

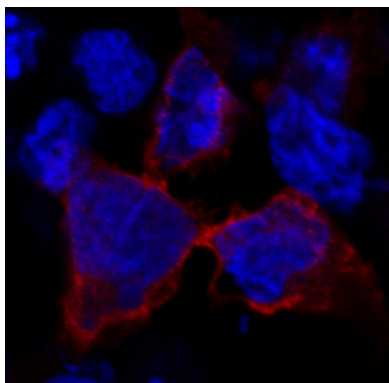


Figure 92. Immunofluorescence de la lignée GluA2. Bleu : DAPI agent intercalant fluorescent ; rouge : HA anticorps récepteur.

Finalement, la prise de mesure d'électrophysiologie dans le laboratoire du professeur V. Seutin permit de montrer la présence de canaux AMPA fonctionnels sur la membrane des cellules HEK (figure 93).

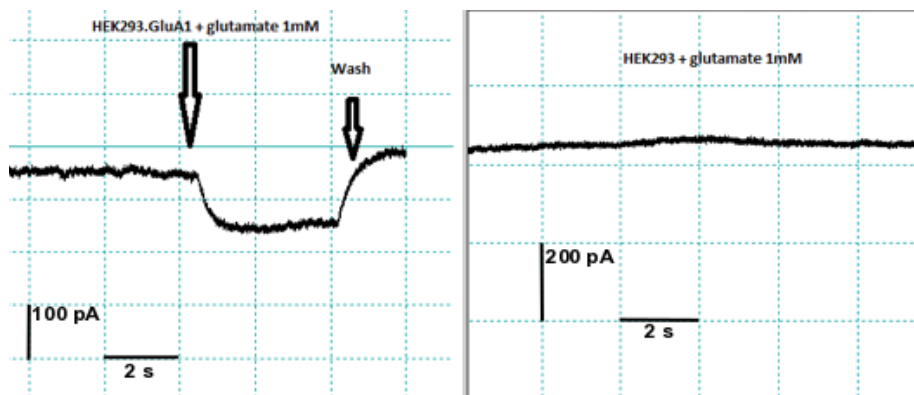


Figure 93. Test *patch-clamp*. Gauche : cellule exprimant GluA1 stimulée au glutamate, réponse de l'ordre de 100 pA. Droite : cellule HEK non transfectée, pas de réponse.

Les courants enregistrés sont de l'ordre de grandeur de ceux rapportés par dans la littérature [Varney *et al.*, 1998]. La figure 94 est issue de l'étude qui sert de modèle pour le développement du test [Varney *et al.*, 1998]. Cette figure montre qu'ils n'observent pas de fluorescence lorsque le L-glutamate est appliqué seul sur les cellules HEK, mais qu'une émission de fluorescence est visible en présence d'un modulateur (CTZ pour cyclothiazide (**51**)).

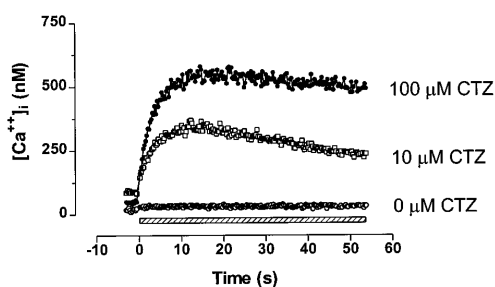


Figure 94. Courbes obtenues par Varney *et al.* lors de l'ajout de glutamate sur leur lignée stable GluA3 en présence de concentrations croissantes de CTZ (adapté de [Varney *et al.*, 1998]).

La molécule (**64**) fut retenue comme modulateur allostérique positif de référence pour la mise au point du test. Ses propriétés physico-chimiques ont déjà été caractérisées, elle n'a montré aucun signe de toxicité, et elle dispose d'une EC_{50} sous le micromolaire [Nørholm *et al.*, 2013]. La lignée GluA2_o(Q) fut stimulée avec du glutamate en présence de diverses concentrations de (**64**) selon le protocole expérimental suivant : les cellules exprimant le récepteur sont décrochées, lavées avec du PBS (*phosphate buffer solution*) resuspendues et incubées dans du PBS durant une heure avec le Fluo-4-AM à 37 °C. Elles sont ensuite rincées par trois fois avec du HBSS (*Hank's balanced salt solution*) qui contient des ions calciques, etensemencée en plaque 96 puits.

Dans les puits, se trouvent soit 1 μL de DMSO, soit les diverses concentrations de (64) dans 1 μL de DMSO.

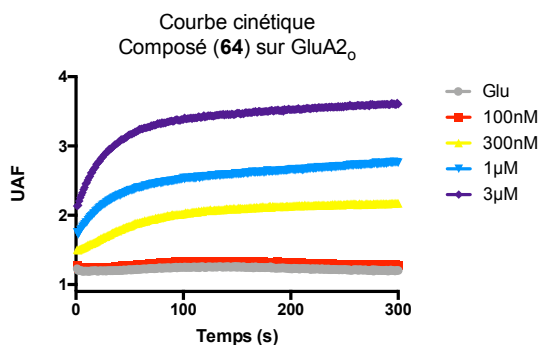


Figure 95. Ajout de glutamate sur des concentrations croissantes de (64).

Comme présenté sur la figure 95, en absence de modulateur ainsi qu'à la concentration la plus faible, il n'y a pas de signal visible, mais dès qu'il y a une plus forte concentration de modulateur, la fluorescence augmente. Cependant, les courbes ne présentaient pas toutes un même niveau de base de fluorescence. Cette variation était due au protocole ; en effet, les cellules étaient incubées avec la sonde dans un milieu sans calcium, puis lavées de l'excès de Fluo-4-AM et mises en contact avec une solution contenant le calcium. Sur le temps de la prise de mesures, le calcium diffusait du milieu extérieur vers le cytosol et un nouvel équilibre s'installait, modifiant la concentration intracellulaire des ions calciques. Les variations des niveaux de base reflétaient la mise en place de ce nouvel équilibre. L'incubation des cellules dans le HBSS contenant les ions calciques permet de pallier ce problème. Avec ce nouveau protocole, la dispersion sur les niveaux de base se fait sur 0,2 UAF (unité arbitraire de fluorescence) au lieu de 1 UAF.

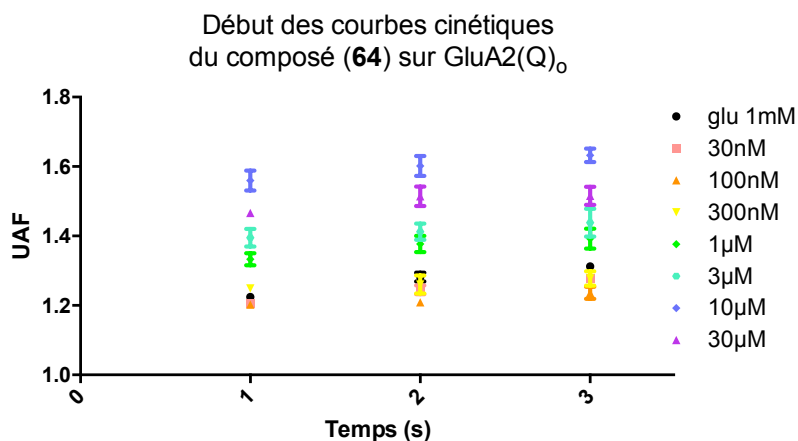


Figure 96. Fluorescence mesurée au début des courbes cinétiques avec le nouveau protocole.

3.4.5 Courbe concentration/réponse du composé de référence

Après avoir mis au point le test, une courbe concentration/réponse fut réalisée pour la molécule (64). Cette courbe donna accès à une valeur d'EC₅₀ de 0,81 µM, qui est très proche de la valeur de 0,9 µM de la littérature [Nørholm *et al.*, 2013].

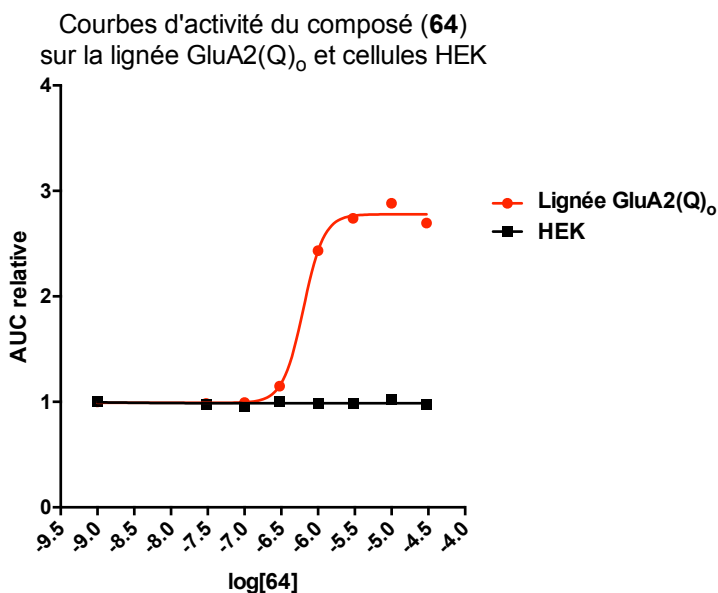


Figure 97. Courbe concentration/réponse du composé (64).

Ce nouveau test a ensuite été validé sur 18 molécules, 3 composés de référence et 15 nouvelles molécules à tester.

[3.4.6 Évaluation de la famille des benzothiadiazines substituées par un groupement phénoxy en position 7](#)

La structure générale des composés de la famille des BTD substitués par un groupement phénoxy en position 7 est représentée sur la figure 98 (molécule **220**). Les molécules **63**, **219**, **64** et **60** sont des molécules du LCP-ULiège dont les propriétés ont déjà été publiées ; elles ont servi de contrôles positifs pour la validation du test sur une gamme « étendue » de valeurs d'EC₅₀.

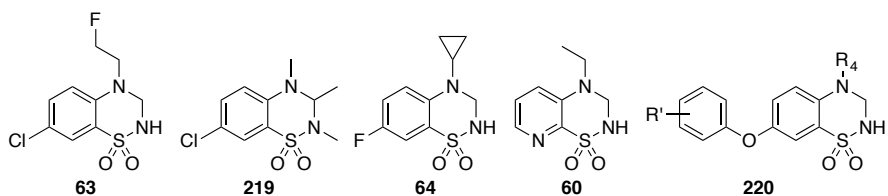


Figure 98. Molécules testées.

Molécule	R ₄	R'	^a pEC ₅₀	^b EC ₅₀ (μM)	^c Coefficient deHill
63	-	-	4,690 ± 0,013 (3)	20,4	3,0 ± 0,2 (3)
219	-	-	4,728 ± 0,012 (3)	18,7	3,0 ± 0,1 (3)
64	-	-	6,090 ± 0,004 (3)	0,81	3,5 ± 0,1 (3)
60	-	-	4,296 ± 0,008 (3)	50,6	3,0 ± 0,1 (3)
220a	CH ₃	H	5,118 ± 0,019 (3)	7,62	1,4 ± 0,1 (3)
220b	CH ₃	<i>o</i> -CH ₃	<5 (3)	>10,0	n. d.
220c	CH ₃	<i>m</i> -CH ₃	6,408 ± 0,015 (3)	0,39	2,3 ± 0,2 (3)
220d	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃	6,020 ± 0,013 (3)	0,95	2,1 ± 0,1 (3)
220e	CH ₃	<i>o</i> -OCH ₃	<5 (3)	>10,0	n. d.
220f	CH ₃	<i>m</i> -OCH ₃	6,431 ± 0,030 (3)	0,37	2,3 ± 0,4 (3)
220g	CH ₃	<i>p</i> -OCH ₃	5,229 ± 0,035 (3)	5,90	1,7 ± 0,2 (3)
220h	CH(CH ₂) ₂	H	6,147 ± 0,033 (3)	0,71	1,3 ± 0,1 (3)
220i	CH(CH ₂) ₂	<i>o</i> -CH ₃	4,807 ± 0,022 (3)	15,6	1,7 ± 0,1 (3)
220j	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -CH ₃	7,336 ± 0,027 (3)	0,05	1,1 ± 0,1 (3)
220k	CH(CH ₂) ₂	<i>p</i> -CH ₃	5,496 ± 0,021 (3)	3,19	1,9 ± 0,2 (3)
220l	CH(CH ₂) ₂	<i>o</i> -OCH ₃	4,807 ± 0,018 (3)	15,60	2,3 ± 0,2 (3)
220m	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -OCH ₃	8,700 ± 0,049 (6)	0,002	1,4 ± 0,2 (6)
220n	CH(CH ₂) ₂	<i>p</i> -OCH ₃	5,740 ± 0,023 (3)	1,82	1,5 ± 0,1 (3)
220o	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -CN	6,343 ± 0,018 (3)	0,45	1,7 ± 0,1 (3)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'évaluation pharmacologique. ^apEC₅₀ = logarithme négatif de la concentration en AMPApam correspondant à 50 % de l'effet maximal (moyenne ± SEM (n)). ^b Concentration moyenne responsable de 50 % de l'effet maximal possible, en μM. ^c Valeur moyenne ± SEM (n).

3.4.6.1 Validation du test

Les molécules (**219**) et (**60**) présentent respectivement des valeurs d'EC₅₀ de 8,3 µM [Larsen *et al.*, 2016] et 96 µM [Pirotte *et al.*, 1998] par la méthode FlipR. Elles ont ici respectivement des valeurs d'EC₅₀ de 18,7 µM et 50,6 µM. La molécule (**63**) n'a pas de valeur d'EC₅₀ dans la littérature, mais une valeur d'EC_{2x} est référencée. Le nouveau test ne permettant pas de mesurer l'activité du glutamate seul, il est impossible de fournir une valeur d'EC_{2x}. Cependant, l'EC_{2x} est une valeur qui est généralement inférieure à l'EC₅₀ ; ainsi, avec une valeur dans la littérature de 18,8 µM pour l'EC_{2x} [Francotte *et al.*, 2010] et une valeur avec le nouveau test de 20,4 µM pour l'EC₅₀, il semble correct de dire que ces valeurs sont dans le même ordre de grandeur. Ces comparaisons entre les valeurs référencées et les nouvelles valeurs semblent permettre de valider le test pharmacologique.

3.4.6.2 Relations structure/activité

La première observation qu'il est possible de faire est que les composés porteurs d'un groupement cyclopropyle s'avèrent plus actifs que ceux porteurs d'un groupement méthyle. Cette observation est en accord avec des résultats précédemment rapportés (comparant **220a** vs **220h**, **220c** vs **220j** or **220f** vs **220m**) [Nørholm *et al.*, 2014].

Deuxièmement, la nature du substituant R', méthyle ou méthoxy, ne semble avoir qu'un impact limité sur l'activité des composés porteurs d'un substituant R₄ méthyle (**220b,c,d** vs **220e,f,g** et **220i,k** vs **220l,n**). En revanche, l'activité des composés porteur d'un substituant R₄ cyclopropyle est améliorée par la présence du groupement R' méthoxy par rapport à un groupement méthyle (**220m** (2 nM) et **220j** (46 nM)).

Troisièmement, la position du groupement R', méthyle ou méthoxy, sur le noyau phénoxy a un impact sur l'activité des composés. Au regard de différentes activités, une tendance semble se construire. Ainsi, les composés présentant un substituant sur la position *méta* ont une meilleure activité, suivis de ceux ne présentant pas de substituant, puis ceux substitués en *para* et enfin ceux en *ortho*. Cette tendance se vérifie pour tous les composés, sauf dans un cas (**220a** vs **220d**) où le composé porteur d'un substituant en *para* (**220d**) possède une meilleure activité que celui qui n'en possède pas (**220a**). Ces tendances se vérifient pour le composé (**220m**), donnant une molécule particulièrement active comme modulateur allostérique positif des récepteurs AMPA, avec une valeur d'EC₅₀ de 2 nM.

Ces résultats semblent indiquer que la présence d'un groupement électrodonneur en position *méta* sur le groupement phénoxy permet l'obtention de composés particulièrement actifs. Dans ces conditions, il a été intéressant d'évaluer l'activité d'un composé possédant un groupement électroattracteur sur cette position. Le composé (**220o**) se montre moins actif que ses analogues (**220m** et **220j**) et présente une activité semblable au composé non substitué (**220h**).

3.4.6.3 Coefficient de Hill

Le coefficient de Hill, qui peut être associé à la pente de la sigmoïde, est le paramètre pharmacologique qui peut permettre le dénombrement des sites d'interaction présents sur une protéine pour une molécule [Weiss *et al.*, 1997]. La partie gauche de la figure 99 montre les courbes obtenues pour les molécules (**220d**) et (**64**). La pente de la courbe relative à la molécule (**64**) est plus abrupte que celle de la molécule (**220d**). Cette comparaison laisse donc à penser que ces molécules

interagissent avec un nombre différent de sites sur la protéine. De plus, les valeurs des coefficients de Hill des composés de la famille portant un groupement 7-phénoxy sont comprises entre 1 et 2, tandis que pour les molécules de référence (**60**, **63**, **64** et **219**), cette valeur est supérieure à 3. La partie droite de la figure 98 montre la distribution moyenne des coefficients de Hill pour les composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy (boîte bleue) et pour les composés de référence (boîte rouge). Il semblerait qu'il y ait des méthodes d'interaction différentes entre les deux familles, et que cette différence soit en lien avec la structure des composés. Les composés de référence interagissent avec une stœchiométrie de quatre molécules par récepteur, comme montré pour (**60**, **63** ou **64**) [Francotte *et al.*, 2014]. Les composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy (**220**) interagiraient avec une stœchiométrie de deux molécules par récepteur. Cette hypothèse a été validée par des techniques complémentaires (SAXS, cristallographie et RMN) [Goffin *et al.*, 2018].

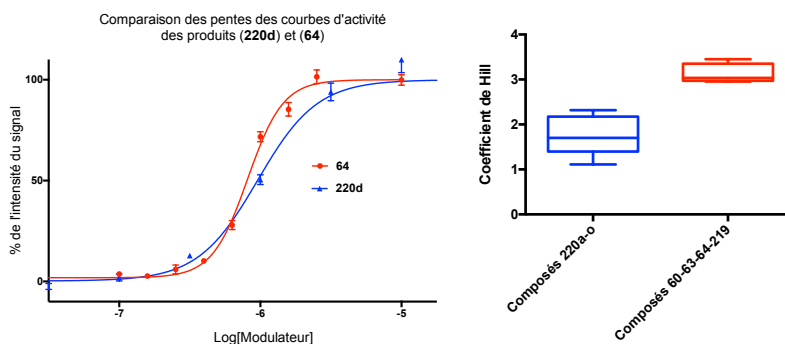


Figure 99. Comparaison des pentes et distribution des coefficients de Hill selon les familles.

3.4.6.4 Cocrystallisation

La cocrystallisation de la molécule (**220m**) avec le LBD d'une unité GluA2 révèle que les molécules possédant un groupement 7-phénoxy occupent deux sous-sites de fixation dans la poche allostérique. Le noyau BTM adopte une configuration semblable à celle prise par la molécule (**64**) (figure 100) et son noyau 7-phénoxy dans la poche C'. Ce mode de fixation ne laisse de la place que pour une seule molécule par poche d'allostérie, et donc à deux molécules par récepteur, comme l'avaient suggéré les observations issues des comparaisons des coefficients de Hill. Les données cristallographiques montrent que deux molécules (**220m**) se superposent. Cette superposition vient de fait qu'il n'est possible d'accueillir qu'une seule molécule à la fois dans la poche, mais qu'elle possède deux manières d'interagir avec la poche selon le site (C ou C') où se fixe son noyau BTM.

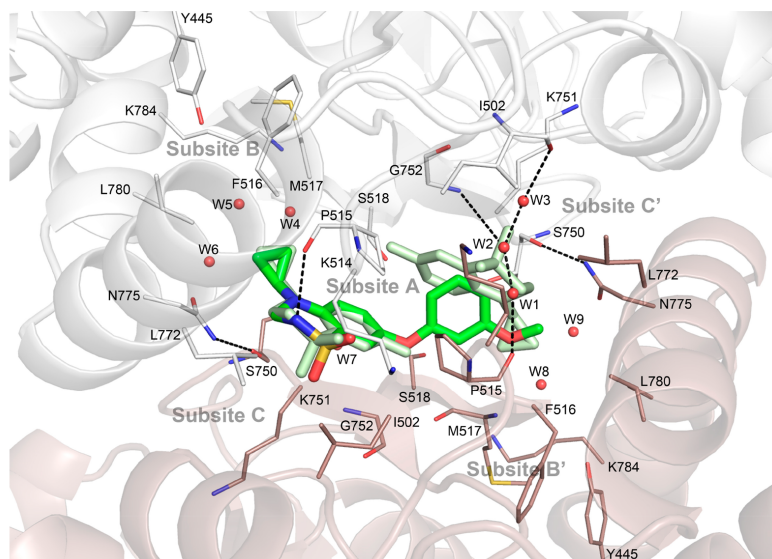


Figure 100. Cocrystallisation de (**220m**).

La représentation issue des données cristallographiques du composé (**220m**) apporte cependant une information capitale. La manière dont cette molécule se comporte ressemble très fortement à l'attitude attendue pour les dimères. En effet, l'occupation concomitante des deux sites C et C' par une molécule en passant par le site A est exactement ce que prédit le *docking* pour les dimères.

3.4.6.5 Patch-clamp

Lorsque ce travail n'était qu'à l'état de projet, il avait été convenu avec l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (U-Bordeaux) qu'un séjour serait effectué au sein de ce laboratoire pour y faire de l'électrophysiologie sur les meilleures molécules et observer leur méthode d'action. L'agenda étant fixe et les contraintes de synthèse n'ayant pas permis la réalisation des dimères, l'évaluation de ces molécules phares ne pourraient s'y faire. Cependant, deux autres problématiques pourraient y être étudiées.

Premièrement, la caractérisation de molécules de la famille des composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy en électrophysiologie. Les résultats fluorimétriques n'étaient que fragmentaires lors du départ pour Bordeaux, mais le (**220m**) faisait partie des molécules qui furent emportées à Bordeaux. Il semblait intéressant de voir si l'occupation des deux sites de manière concomitante par une seule molécule avait des répercussions sur la dynamique du récepteur. Ces observations seraient transposables aux molécules dimères, à défaut d'avoir pu les y tester.

Deuxièmement, les travaux réalisés par le Dr Anja Probst Larsen (Université de Copenhague, laboratoire de recherche biostructurale, Pr Kastrop) avaient permis de mettre en évidence l'activité d'un composé du LCP-ULiège en tant que modulateur allostérique positif des récepteurs

KA [Larsen *et al.*, 2017]. Elle a réalisé l'étude de l'activité du composé (64) sur les différentes sous-unités KA ainsi que GluA1, mais elle n'a pas pu l'évaluer sur les autres sous-unités GluA. Ce séjour serait l'occasion d'avoir une évaluation de son activité sur l'entièreté des récepteurs glutamatergiques non-NMDA.

3.4.6.6 Techniques de patch-clamp

Différentes techniques de *patch-clamp* peuvent être utilisées. Toutes les techniques commencent par un *patch* dit « *cell-attached* » ou « *on cell* ». Ce *patch* s'obtient en approchant une pipette de mesure de la cellule étudiée et en restant à son contact. Cette technique est particulièrement adaptée pour l'étude de canaux ioniques activés de manière intracellulaire [Sauvé, 1987]. Au départ de la configuration *cell-attached*, deux configurations peuvent être rencontrées, soit en soulevant la pipette, soit en appliquant une succion. En soulevant la pipette, c'est la configuration « *inside out* » qui est rencontrée. Lors du retrait de la pipette, une fraction de la membrane reste collée à cette dernière et est arrachée de la cellule. Ce fragment de cellule localisé au niveau de la pointe présente sa surface cytosolique en contact avec le milieu extracellulaire. Cette configuration permet l'étude de l'activation de canaux ionotropiques par des agents intracellulaires. L'autre configuration possible s'obtient en exerçant une succion sur la membrane de manière à la rompre et à lier la pointe à la cellule ; la pointe et la cellule ne sont alors plus qu'une seule entité. Cette configuration s'appelle « *whole cell* ». Ces conditions permettent une étude de phénomènes impliquant toute la cellule, et sont bien adaptées à l'évaluation pharmacologique de composés actifs. C'est cette méthode qui fut utilisée pour la caractérisation du composé (6^o). Enfin, si la pipette est soulevée alors que la configuration est *whole cell*, une partie de la membrane se retrouve sur

le bout de la pipette en présentant la partie externe vers le milieu extérieur. Cette configuration peut être utilisée pour la caractérisation pharmacologique de composés comme le *whole cell*. Elle présente cependant un moins bon rapport signal sur bruit, car moins de canaux sont impliqués.

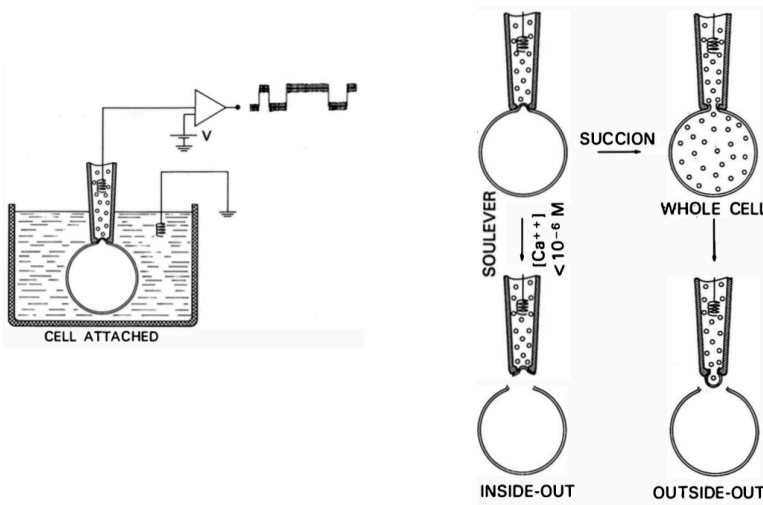


Figure 101. Différentes méthodes de *patch-clamp* (adapté de [Sauvé, 1987]).

Lors de la réalisation d'un *patch* en *whole cell*, une cellule exprimant le récepteur d'intérêt est mise en contact avec une pointe de verre remplie d'une solution conductrice et reliée à l'électrode de mesure, puis une succion est appliquée pour les lier. La cellule, fusionnée à la pipette, est alors détachée de son support et placée devant l'ouverture d'un tube thêta, où d'une extrémité sort la même solution que le milieu extracellulaire, et de l'autre sort la solution à tester. Le tube thêta est relié à un bras piézoélectrique permettant de fait passer la cellule d'un flux à un autre. Grâce à ce bras piézoélectrique, des applications proches des conditions physiologiques, de l'ordre de la milliseconde, peuvent être enregistrées. Lors de l'application courte (1 ms) de L-glutamate, c'est le phénomène de désactivation du récepteur qui est étudié, et lors d'une

application plus longue (800 ms), ce sont les phénomènes de désensibilisation qui sont observés.

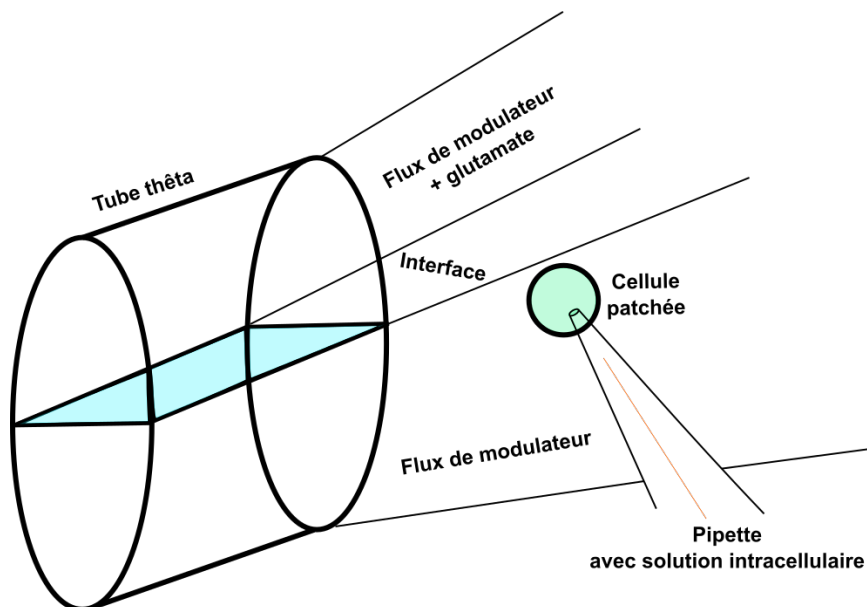


Figure 102. Représentation d'une cellule patchée à l'interface des flux générés par un tube thêta.

3.4.6.7 Évaluation des composés présentant un groupement 7-phénoxy

L'évaluation du composé (**220m**) ne fut pas possible par la méthode de *patch-clamp*. Ce composé présenta une forte affinité pour les sites non spécifiques du plastique des tuyaux du circuit. Il s'adsorbait aux parois des tuyaux et était ensuite relargué dans le milieu. Il était par la suite impossible de revenir à un niveau contrôle par des lavages. Les mesures prises montraient continuellement les traces de ce composé.

3.4.6.8 Évaluation du composé (64) sur les récepteurs AMPA

Comme démontré par le Dr Larsen, le composé (64) est actif sur les récepteurs KA. Cependant, son EC_{50} évaluée sur KA2 est de 79 μM [Larsen *et al.*, 2017]. Il est donc moins actif que sur AMPA, où son EC_{50} est de 0,81 μM sur GluA2_o. Il y a donc un facteur 100 entre les deux familles de récepteurs. La comparaison des EC_{50} sur les différents récepteurs n'a pas pu se faire, car la réalisation de courbes concentration/réponse est extrêmement chronophage ; le Dr Larsen n'a réalisé que la courbe pour le récepteur KA2. Cependant, elle a aussi évalué l'activité de ce composé à une concentration de 100 μM , en théorie dans le plateau d'activité. Cette valeur fut aussi utilisée pour les récepteurs AMPA. Au vu des résultats fluorimétriques, cette valeur se situe dans le plateau d'activité. Les paramètres pharmacologiques évalués sur les différents types de récepteurs pour le composé (64) sont la désactivation et la désensibilisation.

La figure 103 montre l'intensité du pic de courant normalisé pour une application courte (1 ms) ou une application longue (800 ms) de L-glutamate en présence du composé (64). Les résultats obtenus après une stimulation longue ou courte sont sensiblement similaires. Les récepteurs KA2 et KA3 sont plus impactés par la présence du composé (64) que les autres. Le récepteur KA3 est celui dont l'activité est la plus augmentée. Dans les deux cas, les résultats sont statistiquement significatifs entre les trois récepteurs KA comme avancé dans la publication du Dr Larsen. Les résultats sur les différents récepteurs AMPA sont statistiquement significatifs par rapport à KA2 et KA3, mais pas à KA1.

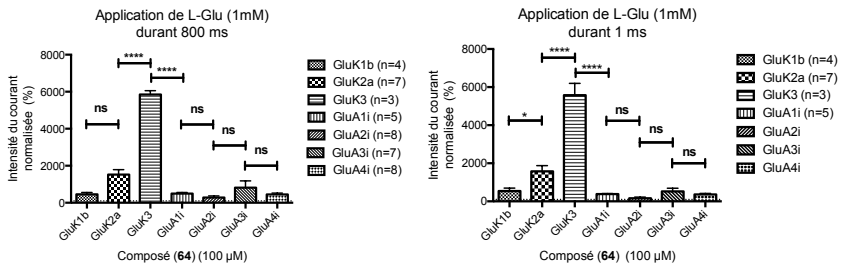


Figure 103. Impact du composé (64) sur les différents récepteurs non-NMDA test ANOVA : **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$.

La figure 104 présente les mêmes données se focalisant sur les résultats obtenus avec les récepteurs AMPA. Ces résultats, tant pour la désactivation que pour la désensibilisation, montrent que les valeurs ne sont pas statistiquement distinctes (ANOVA, ns $p > 0,05$). Ainsi, l'activité du composé (64) avec une concentration de 100 μM est la même sur les sous-types de récepteurs AMPA.

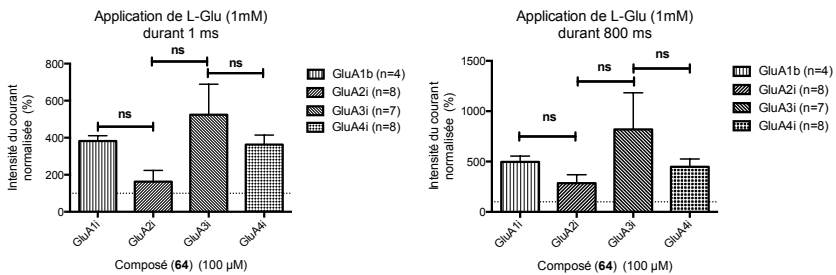


Figure 104. Zoom sur les récepteurs AMPA.

En conclusion, le composé (64) agit tant sur la désactivation que sur la désensibilisation des récepteurs AMPA et KA. Son action est plus marquée sur les récepteurs KA que sur les récepteurs AMPA. L'action sur la désactivation des récepteurs KA2 et KA3 est plus marquée que sur les autres types de récepteurs. L'action sur la désensibilisation est plus marquée sur le récepteur KA3. Pour les récepteurs AMPA, rien ne permet

de conclure que l'action du composé (64) à cette concentration est différente selon le sous-type.

3.4.7 Évaluation des molécules dimères

Les deux composés dimères ont été évalués conjointement avec leurs composés monomères correspondants (figure 105). Leur caractérisation pharmacologique suit le même protocole que celui employé pour les composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy selon la méthode fluorimétrique [Goffin *et al.*, 2018].

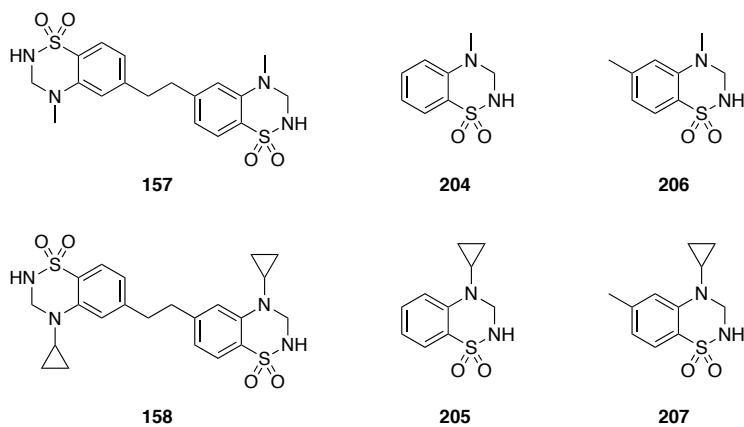


Figure 105. Dimères évalués et leurs monomères constitutifs.

Composés	pEC ₅₀ ^a [moyenne ± s.e.m. (n)]	EC ₅₀ ^b (μM)	Coefficient de Hill ^c [moyenne ± s.e.m. (n)]							
204	3,75 ± 0,02 (3)	176,3	2,8 ± 0,4 (3)							
206	3,39 ± 0,02 (3)	403,3	2,8 ± 0,4 (3)							
157	7,87 ± 0,04 (3)	0,0134	1,2 ± 0,1 (3)							
205	5,04 ± 0,02 (3)	9,06	2,2 ± 0,2 (3)							
207	4,31 ± 0,03 (3)	48,2	2,2 ± 0,3 (3)							
158	8,90 ± 0,05 (3)	0,0014	64	6,090 ± 0,004 (3) ^d	0,81 ^d	3,5 ± 0,1 (3) ^d	220m	8,70 ± 0,05 (6) ^d	0,002 ^d	1,4 ± 0,2 (6) ^d
64	6,090 ± 0,004 (3) ^d	0,81 ^d	3,5 ± 0,1 (3) ^d							
220m	8,70 ± 0,05 (6) ^d	0,002 ^d	1,4 ± 0,2 (6) ^d							

Tableau 3 : Résultats chiffrés de l'évaluation des dimères ((a) Valeur moyenne du $-\log(EC_{50})$ mesuré n fois (b) EC₅₀ : concentration en modulateur responsable de 50% de l'activité maximale (c) Coefficient de Hill donné comme une moyenne (mesuré n fois) (d) Résultats issus de [Goffin *et al.* 2017]) [Drapier *et al.*, 2018].

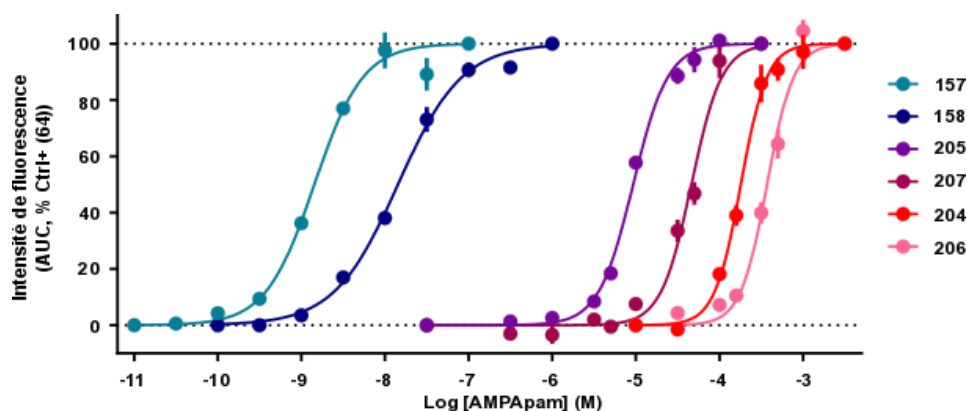


Figure 106. Résultats de l'évaluation des dimères [Drapier *et al.*, 2018].

Les molécules, dimères ou monomères, possédant un groupement cyclopropyle en position 4, présentent une activité supérieure d'un facteur 10 à leur correspondant possédant un substituant méthyle (**204** vs **205**, **206** vs **207** et **157** vs **158**). La présence du groupement méthyle en position 6 a pour effet de diminuer l'activité des composés, et ce

indépendamment de la nature du groupement en position 4 (**204** vs **206** et **205** vs **207**). Enfin, l'observation capitale réside dans le gain obtenu par les composés dimères vis-à-vis de leurs monomères constitutifs allant jusqu'à un gain de 10 000, soit 4 log d'activité (**157** vs **204** et **158** vs **205**). Cet énorme gain permet au composé (**158**) d'être le modulateur allostérique positif disposant de la plus faible valeur d'EC₅₀ de 1,4 nM.

Étant donné que les composés substitués en position 6 (**206** - **207**) présentent une perte d'activité par rapport aux composés non substitués (**204** - **205**), la totalité du gain enregistré pour les composés dimériques provient de l'occupation du *desing* sous forme de dimère. De plus, les résultats obtenus ici sont dans la gamme supérieure de l'estimation théorique donnée par [Murray *et al.*, 2002] qui donnait un écart de valeurs de EC₅₀ de 3 log en moyenne.

Au regard des coefficients de Hill, des conclusions similaires que pour la série 7-phénoxy peuvent aussi être tirées. Les composés dimères (**157** et **158**) présentent des coefficients de Hill de l'ordre de l'unité, traduisant, tout comme les composés substitués par un groupement 7-phénoxy, une méthode de fixation différente des autres BTD précédemment caractérisées. Cependant, cette méthode doit être similaire à celle des molécules de la famille des composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy. Ainsi, l'hypothèse postulant que la forte activité, présentée par les composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy, était due à l'occupation simultanée de deux sous-sites de fixation par une seule molécule semble être corroborée par les observations faites sur les molécules dimères. Ces dernières présentant une très forte activité en occupant les deux sous-sites de fixation simultanément. Ces dernières présentent une très forte activité en occupant les deux sous-sites de fixation simultanément. Le coefficient de Hill des composés (**205**) et

(207) est relativement plus faible que les autres composés monomères déjà évalués. Nous n'avons pas d'explications pour cette observation, nous ne pouvons que supposer que ces composés monomériques présentent un mode d'interaction avec le récepteur qui leur est propre. Cette observation mériterait des investigations futures en électrophysiologie pour étudier en profondeur cette particularité.

Nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion d'évaluer les molécules dimères via une méthode électrophysiologique ; nous n'avons donc aucune preuve sur leur méthode d'action. Étant donné que les autres LTD agissent tant sur la désactivation que sur la désensibilisation, nous pouvons supposer qu'elles agissent de même. Il y aurait peut-être même une sorte « d'effet agrafe » de la molécule sur le canal, la présence du dimère à l'interface des sous-unités conduisant à un blocage du canal dans une position ouverte et où la désensibilisation lui est rendue difficile.

3.4.7.1 Cocrystallisation

Les dimères (157) et (158) furent cocrystallisés comme d'autres LTD avec le LBD d'une sous-unité GluA2. Les résultats obtenus par diffraction des rayons X du cristal montrent clairement que les deux parties LTD se logent dans les sites C et C' et que le pont éthylène les reliant passe au travers du site A (figure 107).

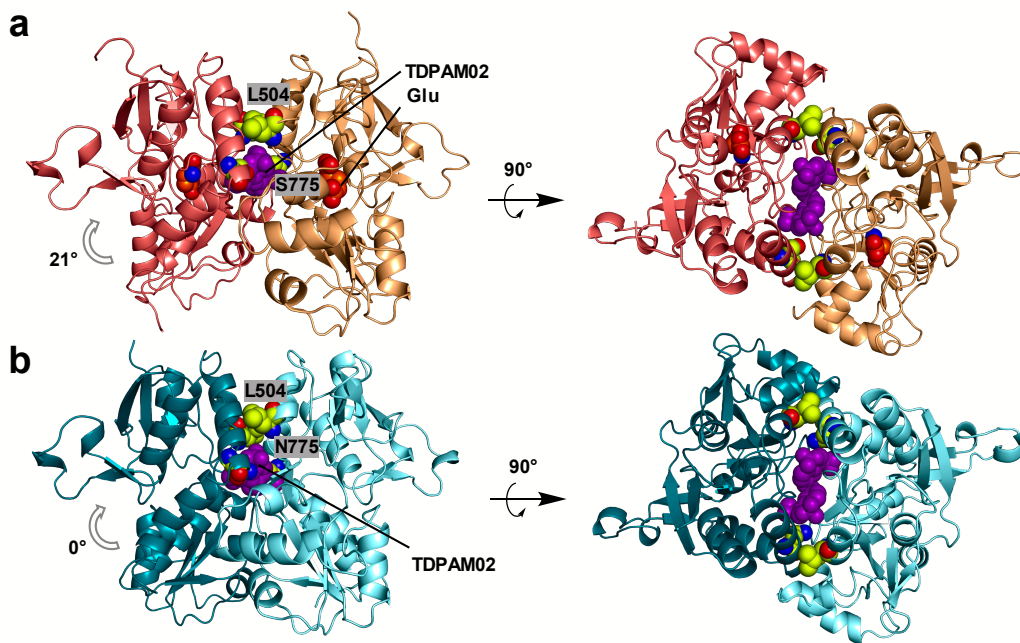


Figure 107. Structure des dimères (157) (b) et (158) (a) au sein du LBD d'une sous-unité GluA2 (adapté de [Laulumaa *et al.*, 2018]).

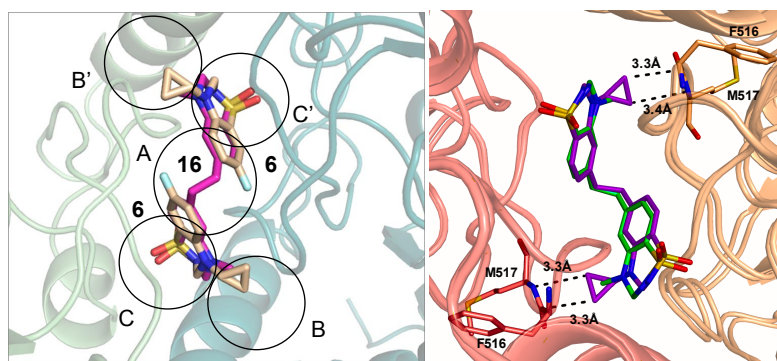


Figure 108. Comparaison des méthodes d'interaction entre le dimère (157) (magenta) et le composé (64) (beige) (gauche) [Drapier *et al.*, 2018] et des dimères (157) (vert) et (158) (mauve) (droite) (adapté de [Laulumaa *et al.*, 2018]).

Ces données cristallographiques montrent que les deux dimères se coordonnent comme prévu par le *design* initial. La figure 108 (gauche) montre la superposition de deux molécules (64) et des deux parties BTD

du dimère (**157**) au sein de la poche. Le dimère s'articulant de manière analogue à deux molécules monomères, ceci valide le *design* et les hypothèses de travail.

En reprenant les prédictions données par l'étude de *docking*, il semble possible de dire que le modèle utilisé est vérifié par les données expérimentales (tableau 1). Cependant, celui-ci avait prédit que les dimères (**157**) et (**158**) auraient sensiblement les mêmes énergies de liaison (tableau 1 : -54,83 et -55,68 kcal/mol), et par conséquent des activités similaires. Il semblerait que le modèle avait sous-estimé l'impact du groupement cyclopropyle en position 4. De fait, la figure 108 (droite) montre une distance plus faible entre les résidus d'une petite poche hydrophobe et le dimère (**158**). Cette distance plus faible semble s'expliquer par des interactions plus importantes entre la protéine et le dimère porteur du groupement cyclopropyle. Ces données devraient permettre d'affiner le modèle mathématique, afin d'obtenir des estimations au plus proche de la réalité expérimentale pour de futures molécules potentielles.

3.4.8 Un détour par le kaïnate

Les récepteurs kaïnate sont structurellement proches des récepteurs AMPA, mais les connaissances sur ces derniers sont moins développées. Plusieurs projets du LCP menés par des mémorants et postdoctorants visent à la réalisation de modulateurs allostériques positifs sélectifs des récepteurs KA. Disposant d'un premier lot de molécules synthétisées dans ce but, il fallait ici aussi la mise en place d'un test pharmacologique permettant d'évaluer leur activité. Ce nouveau test sur les récepteurs kaïnate, couplé au test sur les récepteurs AMPA, permettra de plus de déterminer la sélectivité des molécules vis-à-vis des différents canaux.

Le test sur les récepteurs kaïnate est analogue à celui précédemment mis en place pour les récepteurs AMPA. La première étape fut la réalisation d'une lignée stable de cellule HEK293 exprimant le récepteur KA2. De manière similaire à ce qui fut observé pour le test AMPA, il ne fut pas possible d'enregistrer un signal pour le L-glutamate seul. Mais sachant que le (64) est actif sur KA2 avec une EC_{50} de $79 \mu\text{M}$ [Larsen *et al.*, 2017], il sert ici encore de référence pour la mise au point du test.

La différence notable entre les tests AMPA et KA réside dans les cinétiques observées. D'un côté, le récepteur AMPA présente une augmentation de l'intensité de fluorescence suivie d'un plateau, et ce sur toute la gamme de concentrations. Ce plateau permet de réaliser l'injection de L-glutamate dans tous les puits de la plaque puis de réaliser les lectures de fluorescence puits par puits. L'aire sous la courbe (AUC pour *area under the curve*) qui en résulte reflète l'effet du modulateur.

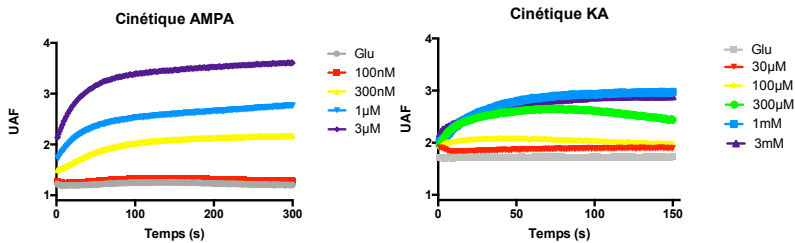


Figure 109. Comparaison des profils cinétiques du modulateur (64) sur les récepteurs AMPA et KA.

De l'autre côté, pour le récepteur KA, le profil cinétique est en cloche pour les premières concentrations auxquelles le modulateur est actif. L'absence d'un plateau pour l'ensemble des concentrations ne permet pas d'appliquer la même méthode d'injection/lecture que pour le récepteur AMPA. En effet, si celle-ci est appliquée, la majeure partie de la fluorescence serait perdue sur le temps de l'injection sur les autres puits. Cette perte d'information donne des courbes non pharmacologiques

et des résultats faussés pour les composés testés, en particulier pour les concentrations où le modulateur commence à être actif. Pour ne pas avoir ce problème, l'injection de L-glutamate est directement suivie de l'enregistrement de fluorescence. Cette méthode est plus longue que celle appliquée au récepteur AMPA, mais reste *screening* compatible.

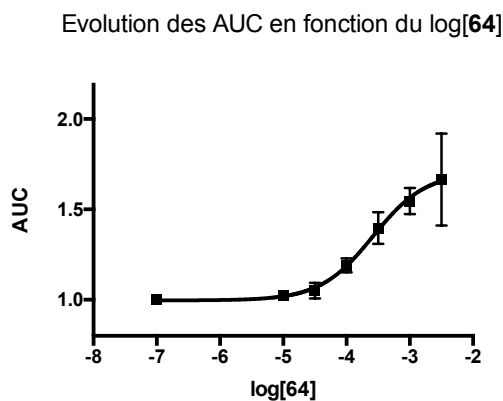


Figure 110. Courbe concentration/réponse pour le composé (64) sur le récepteur KA2.

À la suite de ces mesures, la courbe d'activité pour le composé (64) a pu être établie et donna une valeur d' EC_{50} de 261 μM . Cette valeur, de l'ordre de la centaine de micromolaires, est dans une gamme proche de celle qui a été enregistrée en électrophysiologie (79 μM). Cela suggère que le test peut être utilisé pour du *screening*.

Le premier *screening* porta sur d'anciens produits présentant des activités variées sur AMPA. Ces composés ont été évalués à une concentration maximale de 100 μM ; cette valeur limite fut déterminée pour trouver des composés ayant une meilleure action que le (64) sur le récepteur KA. Les composés présentant une activité à des concentrations supérieures ne seraient pas intéressants, étant donné qu'une référence meilleure avait déjà été caractérisée.

Le profil cinétique attendu est représenté ci-après ; les composés qui présenteraient un tel profil seraient retenus comme ayant une activité égale ou meilleure à celle du composé (64).

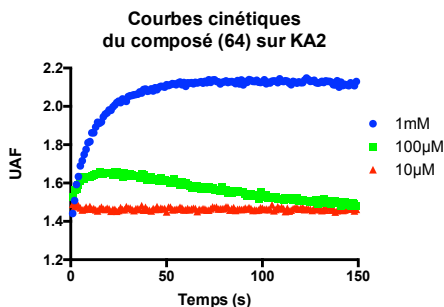


Figure 111. Profil cinétique attendu pour un composé actif.

3.4.9 Screening des composés issus de la chimiothèque potentiellement actifs sur les récepteurs KA

Durant les 20 à 30 dernières années, l'équipe du LCP-ULiège a permis le développement d'une quantité importante de structures chimiques autour des noyaux BTB. Ces composés constituent une chimiothèque informatisée utilisable comme un outil de *drug design*. Un échantillon de cette chimiothèque (figure 112) fut utilisé pour réaliser un premier *screening* sur les récepteurs KA. Il permet d'obtenir des informations reliant la structure des composés à leur activité.

Le composé (64) ayant montré une activité sur les récepteurs KA, il semblait logique d'utiliser des composés structurellement proches pour les premiers essais. Ainsi, divers isomères (221, 222 et 223) du composé (64) et leur équivalent sans atome de fluor (206) furent sélectionnés pour évaluer l'impact de la position de l'atome de fluor sur le cycle aromatique sur l'activité des composés. De ces quatre composés, seul le composé

(223) présenta une légère activité (figure 113). Il semblerait que la présence de l'atome de fluor soit essentielle pour l'activité de ces composés sur les récepteurs KA (**64** vs **206**). Outre ces isomères, un composé parent porteur d'un deuxième atome de fluor sur le cycle aromatique (**229**) fut aussi sélectionné et testé. La présence de ce deuxième atome de fluor est défavorable, étant donné que le composé (**229**) ne présente aucune activité. Le dernier analogue du composé (**64**) évalué porte un groupement difluorméthylène sur le sulfonamide (**230**). La présence de ce groupement se traduit par la perte de l'activité du produit.

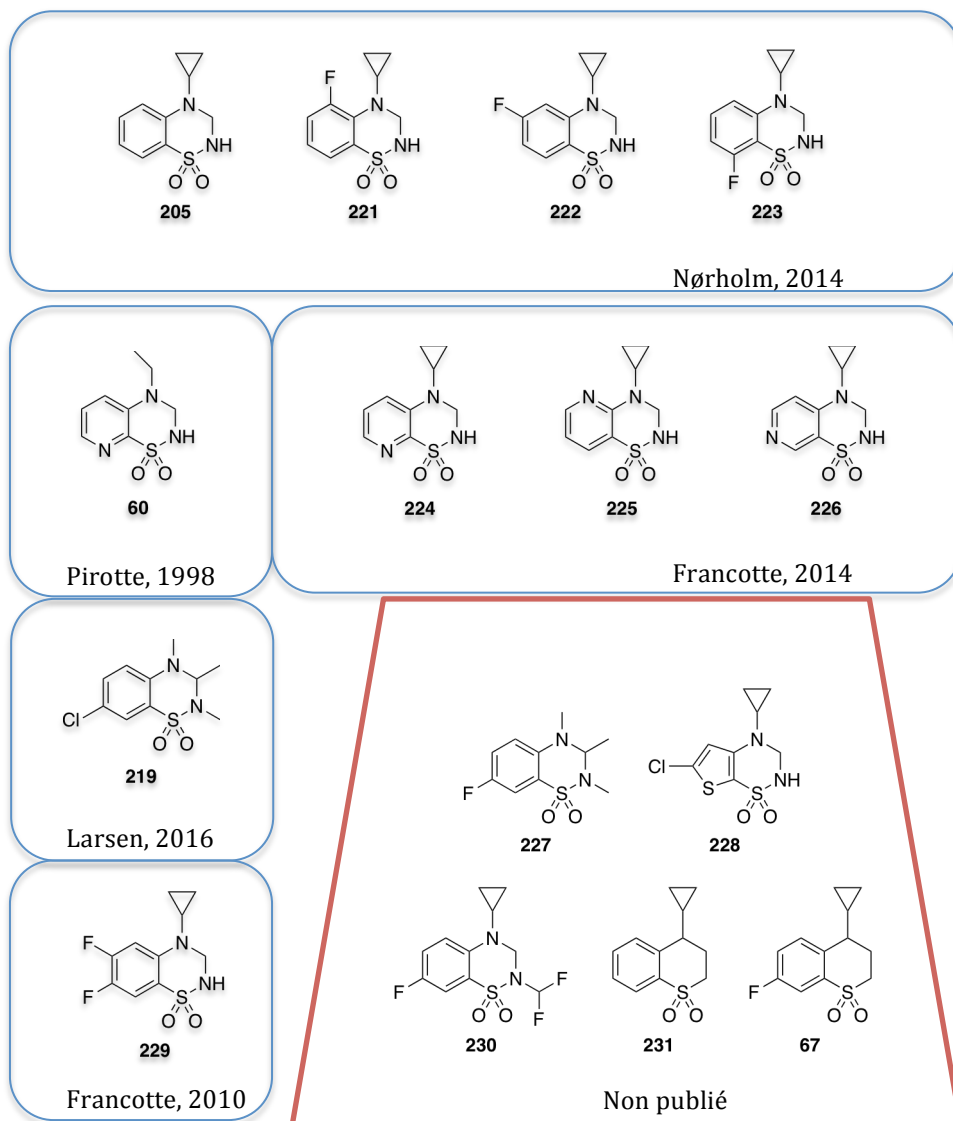


Figure 112. Modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA de la chimiothèque du LCP-ULiège évalués sur les récepteurs KA.

De l'évaluation de ces composés structurellement proches du composé (64), il semblerait que la présence d'un atome de fluor en position 7 (64), et dans une moindre mesure en position 8 (223), soit cruciale pour permettre une action en tant que modulateur allostérique positif des récepteurs KA.

Il sembla intéressant ensuite d'évaluer les composés de la famille des thiochromanes qui sont des isostères des BTB (**67**, **231**). Ces composés, bien qu'actifs en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA (résultats non publiés), n'ont montré aucune activité sur les récepteurs KA. Il semblerait donc que la présence des atomes d'azote soit un élément important dans la modulation des récepteurs KA. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par le Dr Larsen [Larsen *et al.*, 2017]. La résolution cristallographique du composé (**64**) dans le LBD d'une unité KA2 montre la présence de ponts H entre la protéine et le sulfonamide, ainsi qu'avec l'atome de fluor en position 7.

Pour les évaluations suivantes, il sembla intéressant de reprendre des composés dont le noyau aromatique est remplacé par un noyau pyridinique ou thiophène (**224**, **225**, **226** et **228**). Les composés porteurs de ces cycles sont eux aussi des isostères des BTB. Parmi ces composés, seul le composé présentant l'atome d'azote en position 8 a montré une légère activité (**224**) sur le récepteur KA.

Les composés (**223**) et (**224**) présentant tous les deux des groupements hydrophiles en position 8, et ayant présenté une légère activité, il semblerait que cette position du cycle soit intéressante pour des modifications futures.

Vu la légère activité du composé (**224**), un composé plus ancien, porteur d'un groupement éthylène en position 4, a aussi été évalué (**60**). Ce composé s'est montré inactif. Cependant, cette perte d'activité semble indiquer que pour les récepteurs KA, comme pour les récepteurs AMPA, le groupement cyclopropyle en position 4 permet d'obtenir des composés plus actifs.

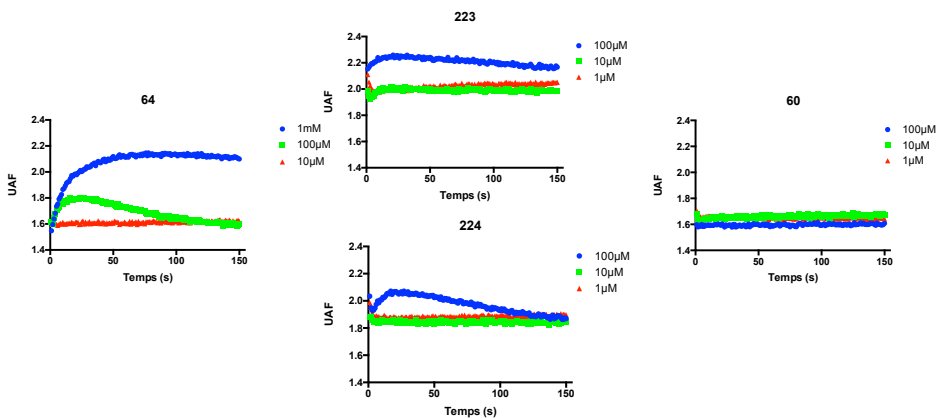


Figure 113. Courbes cinétiques du composé de référence (64), courbes cinétiques de composés légèrement actifs (223) et (224), exemple de courbes d'un composé non actif pour le composé (60).

Ensuite, les composés triméthylés (220) et (227) n'ont présenté aucune activité sur les récepteurs KA. La présence de plusieurs groupements méthyles (220, 227) ne semble pas présenter un avantage dans le cas des récepteurs KA.

Enfin, l'évaluation des deux composés dimères (157) et (158), avec leur activité proche du nanomolaire sur les récepteurs AMPA, fut réalisée. Ils n'ont présenté aucune activité sur les récepteurs KA. Les concentrations auxquelles ils ont été testés se situent largement dans leur plateau d'activité respectif sur les récepteurs AMPA. Cette différence de plus de 5 log d'activité entre les deux types de récepteurs semble faire de ces composés des modulateurs AMPA spécifiques. Ces données sont cohérentes aussi avec les difficultés que rencontre l'équipe du Pr Kastrop à cocristalliser ces dimères avec le LBD d'une sous-unité KA ; il n'y aurait peut-être simplement pas la place pour la grosse molécule dans la poche allostérique des récepteurs KA.

En conclusion, bien que ce *screening* ne soit que très fragmentaire et préliminaire, les quelques résultats développés précédemment

permettent d'identifier de premières tendances dans la recherche d'une corrélation entre structure et activité.

- L'utilisation de molécules dimériques ne semble pas être intéressante dans le cadre des récepteurs KA.
- La présence du groupement cyclopropyle en position 4 semble présenter un avantage dans la modulation de l'activité.
- La présence d'un atome de fluor sur les positions 7 et 8 semble être un atout.
- La présence d'un groupement hydrophile en position 8 semble être bénéfique pour la modulation des récepteurs KA.

Ces quelques conclusions permettent d'avoir de premières informations d'un point de vue structure/activité. Celles-ci devraient par la suite permettre d'orienter les recherches vers des modifications sur les BTB qui permettront d'obtenir des modulateurs sélectifs des récepteurs KA.

Chapitre 4

Conclusions

et

perspectives

4.1 Conclusions

Les données cristallographiques précédemment collectées des interactions entre différentes BTD et le LBD des sous-unités AMPA ont permis de mettre en évidence la possibilité d'appliquer le concept de dimère dans le cadre de *design* rationnel de médicament. La faisabilité du projet fut évaluée *in silico*. Une fois validé, le projet fut affiné *in silico* pour permettre la synthèse des meilleurs candidats pouvant répondre à la configuration singulière qu'un dimère doit rencontrer.

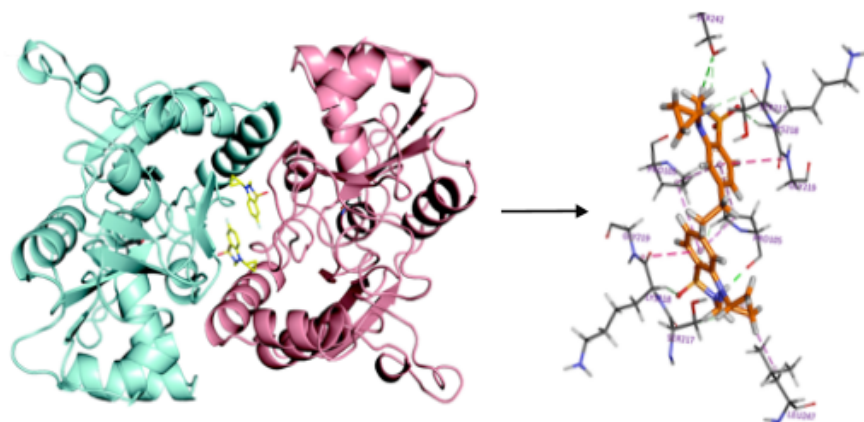


Figure 114. Des données cristallographiques au *docking in silico*.

L'idée première adoptée pour les synthèses reposait sur l'approche « dimère ». Celle-ci impliquait de réaliser des synthons dimériques qui seraient ensuite utilisés dans le protocole mis en place au LCP pour la réalisation des BTD. Ce faisant, les deux motifs BTD de la molécule dimérique auraient été construits en même temps. Les premiers essais ne se sont pas montrés concluants. L'utilisation d'intermédiaires dimériques a posé problème lors des réactions de Sandmeyer ou de substitution nucléophile sur aromatique. C'est ensuite en appliquant une approche convergente qu'il fut possible d'obtenir les dimères référencés comme les

plus intéressants par *docking*. Cette approche consiste en la construction de l'hétérocycle dans un premier temps, puis la réalisation des étapes de dimérisation. Cependant, à cette étape, la nature méthylrique ou cyclopropylique du substituant en position 4 montra une nette différence de réactivité. Celle-ci impliqua une modification du protocole expérimental. Ainsi, deux méthodes de synthèse furent mises en place pour aboutir aux dimères désirés selon la nature du substituant en position 4.

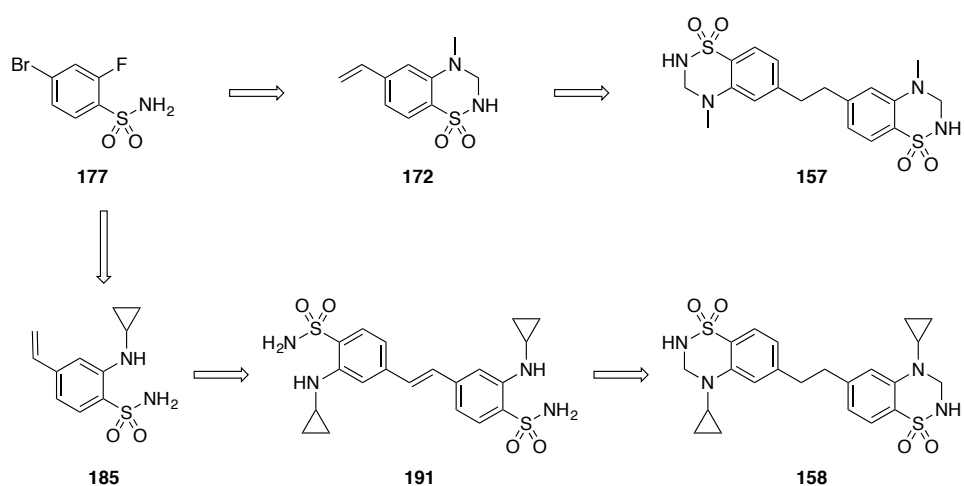


Figure 115. Intermédiaires clés de synthèse.

Outre la synthèse des molécules dimères, il fallait aussi mettre en place une méthode d'évaluation pour ces composés. C'est à cette fin qu'un test pharmacologique basé sur la fluorimétrie a été mis au point. Il permet la caractérisation pharmacologique des différents modulateurs sur cellules HEK exprimant la sous-unité GluA₂(Q). Il fut validé par l'évaluation de plusieurs composés de référence internes au laboratoire.

Ce test permet la caractérisation des composés de la famille 7-phénoxy. Ces derniers ont montré une très forte activité, les meilleurs ayant une EC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. De plus, lors de l'étude des

paramètres pharmacologiques, il apparut que le coefficient de Hill différait entre les composés de référence et ceux de la famille des composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy. En effet, les composés de cette famille présentaient un coefficient de Hill inférieur à 2, alors que les composés de référence montraient des valeurs comprises entre 2 et 4. La cristallographie a montré que ces composés se coordonnent avec une stœchiométrie de deux molécules par récepteur, tandis que les composés de référence se coordonnent à quatre par récepteur. Ces données sont en adéquation avec celles relatives au coefficient de Hill ; dès lors, le test fluorimétrique permet de plus d'obtenir une information structurale sur base de ce même coefficient avant de réaliser une étude cristallographique. La série des composés porteurs d'un groupement 7-phénoxy fut particulièrement intéressante dans le cadre du développement des dimères. En effet, elle permit de montrer qu'il est possible pour des composés présentant un noyau benzothiadiazine d'occuper simultanément deux sous-sites d'interaction.

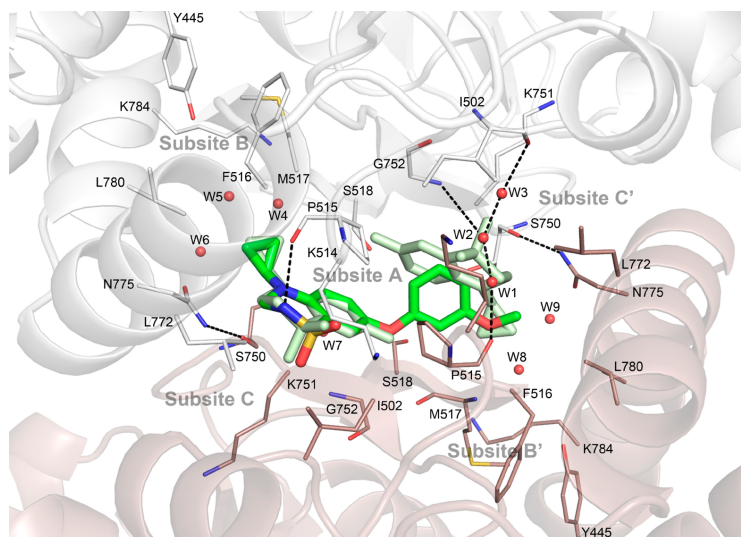


Figure 116. Cocrystallisation du composé (**220m**) porteur d'un groupement 7-phénoxy (vert fluo) et d'un composé de référence (**(64)** vert clair) avec le LBD d'une unité GluA2.

Un second test analogue fut aussi développé pour l'étude des récepteurs KA, proche parent du récepteur AMPA. Il a permis de mettre en avant l'activité de certains des modulateurs de la chimiothèque du LCP-ULiège. Bien que ces composés soient moins actifs que le composé de référence (**64**), ils peuvent servir de point de départ pour des pharmacomodulations futures permettant l'obtention de composés plus actifs.

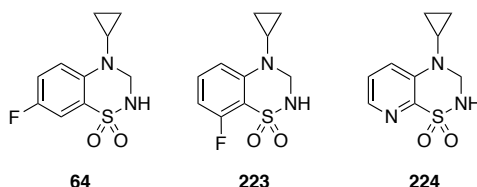


Figure 117. Modulateurs allostériques positifs sur les récepteurs KA.

Enfin, la caractérisation pharmacologique des composés dimériques (**157**) et (**158**) montre des EC_{50} proches du nanomolaire (respectivement 13,4 nM et 1,4 nM), donnant ainsi avec le composé (**220m**) les composés les plus actifs caractérisés, à ce jour, pouvant moduler l'activité des récepteurs AMPA. Les résultats cristallographiques des composés (**157**) et (**158**) ont montré qu'ils occupent les deux sous-sites de la poche d'allostérie comme initialement prévu lors des expériences de *docking*. Les deux parties BTM se coordonnent de manière similaire à deux monomères distincts.

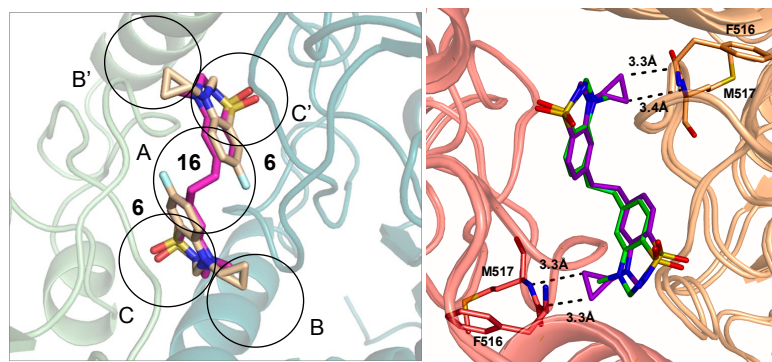


Figure 118. Comparaison des méthodes d'interaction entre le dimère (**157**) (magenta) et le composé (**64**) (beige) (gauche) [Drapier *et al.*, 2018] et des dimères (**157**) (vert) et (**158**) (mauve) (droite) (adapté de [Laulumaa *et al.*, 2018]).

Ensuite, leur évaluation sur le récepteur KA a montré une absence totale d'activité à des concentrations où la solubilité des composés commence à poser des problèmes. Cette absence d'activité est concordante avec les premiers résultats de cocrystallographie où le modulateur ne se fixe pas sur le LBD de GluK1. Ceci traduit certainement une gêne stérique qui empêche le dimère d'interagir.

4.2 Perspectives

D'un point de vue synthèse, il serait intéressant de préparer les autres dimères que le *docking* avait pointés comme potentiellement intéressant (soit présentant un pont propylène (**161**), soit avec une aminométhyle (**171** - **232**)). Ce dernier cas serait particulièrement intéressant. La présence d'un atome d'azote dans le *linker* devrait permettre d'augmenter l'hydrosolubilité du composé par rapport à (**158**). Une meilleure solubilité est toujours intéressante dans le cadre de *drug design*, mais la présence de cet atome d'azote dans le lien reliant les deux sous-unités pourrait se montrer problématique, en impliquant des interactions non souhaitées entre le dimère et le récepteur, conduisant potentiellement à une diminution de l'activité par rapport aux dimères déjà caractérisés.

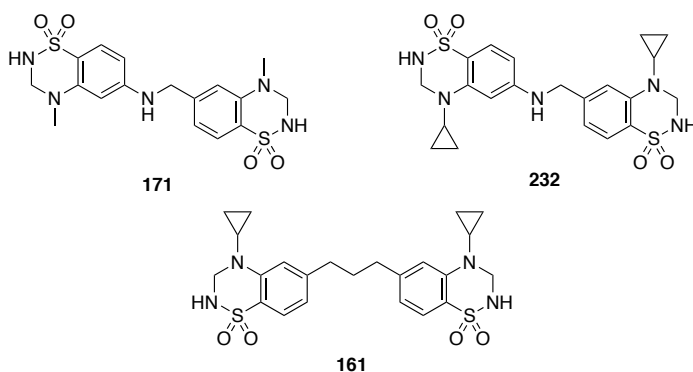


Figure 119. Propositions de structures pour de futurs dimères potentiels.

Ensuite, il serait particulièrement intéressant d'étudier la mécanique physiologique des dimères sur le récepteur. Une étude en électrophysiologie pour étudier la méthode d'action du modulateur sur le récepteur et quantifier son impact tant sur la désactivation que sur la désensibilisation, serait particulièrement intéressante. La structure dimérique pourrait éventuellement présenter une sorte de sélectivité vis-à-

vis des différents sous-types de récepteurs au vu de sa taille ; ainsi cette évaluation pourrait aussi être intéressante.

Enfin, le prochain défi majeur réside dans l'étude du récepteur KA. Le LCP-ULiège dispose désormais d'un test qui permettra la caractérisation des futurs modulateurs de cette famille. Il sera un outil essentiel pour vérifier l'activité des modulateurs KA, qui eux-mêmes pourront aider l'étude de ce récepteur.

Ce travail a permis de démontrer l'application avec succès du concept de dimères appliqués aux BTD en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Ces nouveaux composés extrêmement actifs serviront de base pour la réalisation de nouveaux modulateurs de cette famille. Ceux-ci permettront d'améliorer la compréhension des interactions entre les BTD et la poche d'allostérie des récepteurs glutamatergiques.

Chapitre 5

Matériels et

méthodes

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Chimie

Les réactifs commerciaux ainsi que les solvants employés pour les synthèses ont été fournis par les firmes Aldrich®, Acros® et Apollo®, et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

L'évolution des différentes réactions a été suivie par la technique chromatographique sur couche mince (CCM). Cette méthode a été réalisée sur des plaques en aluminium recouvertes d'un gel de silice (Silicagel 60F254, Merck®). Après élution, ces plaques ont été examinées sous une lampe à ultraviolets, à deux longueurs d'onde : 254 et 366 nm.

Les purifications réalisées par colonne DCVC ont été réalisées sur gel de silice de type Silicagel 60 0,015-0,040 mm (Merck®).

Tous les produits ont été séchés dans un dessiccateur sous vide.

Les points de fusion ont été obtenus par un appareil à tubes capillaires Stuart smp3 et les valeurs sont non corrigées.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker® Avance 500 (500 MHz). Les composés ont été mis en solution dans le DMSO-d₆ ou le CDCl₃ et les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne (0 ppm). Les abréviations employées sur les spectres sont les suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, dd = doublet de doublet, br = *broad signal*.

5.1.2 Synthèse

Bromure de (2,5-difluorobenzyl)triphénylphosphonium (107).

La triphénylphosphine (2,62 g, 10 mmol, 1,05 éq) est dissoute dans 30 mL de toluène, puis additionnée de 2 g de bromure de 2,5-difluorobenzyle (106) (2,0 g, 10 mmol). Le milieu est porté à reflux et agité pendant 1 h 30. Le solide est récupéré sur verre fritté, rincé à l'hexane et séché dans l'étuve ventilée (4,0 g, 90 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,94-7,71 (m, 15H, $\text{PC}_{18}\text{H}_{15}$), 7,25-6,81 (m, 3H, H_{aro}), 5,15 (d, $J = 10\text{Hz}$, 2H, PPh_3CH_2).

1,2-bis(2,5-difluorophényl)éthène (108). Dans un ballon sec de 250 mL à 2 tubulures, le sel de phosphonium (107) (3,5 g, 7,7 mmol, 1,5 éq) est mis en solution dans 75 mL de méthanol pour HPLC. Le terbutanoate de potassium (2,6 g, 23,1 mmol, 3 éq) solubilisé dans 8,5 mL de méthanol pour HPLC sur glace sont ajoutés au milieu durant 5 min. La solution est agitée pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, l'aldéhyde (105) (0,53 mL, 5 mmol) est ajouté au goutte-à-goutte et laissé sous agitation durant 10 min. Le milieu est dilué avec 50 mL d'eau. Le méthanol est éliminé sous dépression. Le précipité est repris et extrait par un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 1/1. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Une fois filtré, le solvant est éliminé sous dépression. Le résidu est purifié sur cartouche de silice (hexane). Le solvant est ensuite évaporé sous dépression et le solide est mis à sécher dans l'étuve ventilée (1,1 g, 90 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,20-7,07 (m, 6H, H_{aro}), 7,12 (s, 2H, CH)

1,2-bis(2,5-difluorophényl)éthane (109). Dans la cuve en téflon de l'hydrogénateur munie d'un agitateur magnétique, de l'alcène (108) (1,1 g, 4,5 mmol) est placé en suspension dans 15 mL de méthanol avec 100 mg de Pd/C 10 %. La suspension est mise sous bonne agitation sous 10 bar de H_2 à 43 °C durant 30 min. Le catalyseur est filtré sur célite. L'élimination du solvant sous dépression donne le produit attendu (1,1 g, 99 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,20-7,07 (m, 6H, H_{aro}), 2,78 (s, 4H, CH_2).

1,2-bis(2,5-difluoro-4-nitrophényl)éthane (110). Le 1,2-bis(2,5-difluorophényl)éthane (109) (1,0 g, 4 mmol) est mis en suspension dans un ballon de 250 mL contenant 85 mL de H_2SO_4 concentré. Le KNO_3 (0,8 g, 8 mmol, 2 éq) est ajouté au milieu par portion. Après 2 h d'agitation à température ambiante, la solution est versée sur 150 g de glace. Le précipité est collecté par filtration sur verre fritté et séché dans l'étuve

ventilée (0,89 g, 65 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,20-7,71 (m, 4H, H_{aro}), 3,08 (s, 4H, CH_2).

4,4'-(éthane-1,2-diyl)bis(2,5-difluoroaniline) (111). Sous agitation, le 1,2-bis(2,5-difluoro-4-nitrophényl)éthane (110) (200 mg, 0,6 mmol) est mis en suspension dans 5 mL d'un mélange éthanol et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (6N) volume/volume : 1/1. Au milieu chauffé à 80 °C, le fer en poudre (750 mg, 13 mmol, 2éq) est ajouté. Après 5 min, la solution est filtrée sur célite, le résidu est rincé à l'eau et à l'éthanol. Le filtrat est acidifié (pH = 1) avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (6N), puis le solvant organique est évaporé sous dépression. Le précipité obtenu est collecté par filtration sur verre fritté séché dans l'étuve ventilée (85 mg, 47 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6,76-6,42 (m, 4H, H_{aro}), 3,67 (s, 4H, NH_2), 2,73 (s, 4H, CH_2).

Bis(4-amino-2,5-difluorophényl)méthane (114). La 2,5-difluoroaniline (5,0 g, 0,039 mol) (113) est mise en solution dans l'acide trifluoroacétique (150 mL) sous agitation, suivi par une solution à 40 % dans l'eau de paraformaldéhyde (1,6 mL, 0,019 mol, 0,5éq). La solution résultante est portée reflux durant 1 h puis versée sur 100 mL d'eau glacée. Le mélange brut est basifié avec une solution aqueuse concentrée de KOH (40 % masse/volume), et laissée sous agitation pour une nuit. Les cristaux jaunes résultants sont filtrés, puis lavés à l'eau et séchés. Ils sont ensuite dissous dans l'éthanol chaud (15 mL par g) et filtrés sur célite. La solution est chauffée puis additionnée d'eau jusqu'à l'apparition d'un trouble, puis refroidie pour permettre l'apparition de cristaux jaune pâle. Le produit est filtré et mis à sécher (4,0 g, 75 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 6,87 (m, 2H, H_{aro}), 6,70 (m, 2H, H_{aro}), 5,32 (s, 4H, NH_2), 3,73 (s, 2H, CH_2)

3-fluoro-N-(4-fluoro-3-nitrophényl)-4-nitrobenzamide (118). L'acide 3-fluoro-4-nitrobenzoïque (117) (5,0 g, 27 mmol) est mis en solution dans 50 mL de chlorure de thionyle et porté à reflux durant 4 h. Le solvant est éliminé par dépression. Le résidu est repris dans 10 mL de toluène sec et la solution est évaporée à sec à deux reprises. Le solide résiduel est repris dans le 1,4-dioxane sec (50 mL) et additionné de 3-nitro-4-fluoroaniline (116) (5,0 g, 32 mmol, 1,2éq) et de pyridine (5 mL). Le milieu est laissé sous agitation durant 1 h. Le solvant est ensuite éliminé par dépression. Le résidu est mis en solution dans le méthanol 15 mL et précipité avec 45 mL d'eau. Le solide est récolté et lavé à l'eau puis séché au dessiccateur (7,5 g, 86 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9,63 (s, 1H, NH), 7,64 (dd, $J = 12,8, 2,0$ Hz, 1H, $5a\text{-H}$), 7,57 (dd, $J =$

8,4, 2,6 Hz, 1H, 6b-H), 7,26 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H, 4a-H), 6,90 (dd, $J = 11,2, 8,8$ Hz, 1H, 3a-H), 6,83 – 6,75 (m, 2H, 3b-5b-H).

4-amino-*N*-(3-amino-4-fluorophényl)-3-fluorobenzamide (119).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (111) au départ du composé (118) (5,0 g, 15 mmol) (1,8 g, 45 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,63 (s, 1H, NH), 7,64 (dd, $J = 12,8, 2,0$ Hz, 1H, 5a-H), 7,57 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H, 6b-H), 7,26 (dd, $J = 8,5, 2,6$ Hz, 1H, 4a-H), 6,90 (dd, $J = 11,2, 8,8$ Hz, 1H, 3a-H), 6,83 – 6,75 (m, 2H, 3b-5b-H), 5,80 (s, 2H, NH_2), 5,13 (s, 2H, NH_2).

3-fluoro-*N*-(4-fluoro-3-sulfamoylphényl)-4-sulfamoylbenzamide (120).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (115) (1,0 g, 4 mmol). (0,47 g, 32 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,73 (s, 1H, NH), 8,30 (dd, $J = 6,4, 2,8$ Hz, 1H, H_{aro}), 8,07 – 7,64 (m, 9H, H_{aro}), 7,46 (t, $J = 9,3$ Hz, 2H, H_{aro}).

4-fluoro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophényl)-3-nitrobenzamide (123).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (118) au départ de l'acide 4-fluoro-3-nitrobenzoïque (122) (5,0 g, 27 mmol) (7,0 g, 80 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,58 (s, 1H, NH), 7,83 (dd, $J = 12,8, 2,0$ Hz, 1H, H_{aro}), 7,20 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H, H_{aro}), 7,01 (dd, $J = 8,4, 2,6$ Hz, 1H, H_{aro}), 6,75 (dd, $J = 11,2, 8,8$ Hz, 1H, H_{aro}), 6,60 – 6,50 (m, 2H, H_{aro}).

3-amino-*N*-(3-amino-4-fluorophényl)-4-fluorobenzamide (124).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (119) au départ du composé (123) (5,0 g, 15 mmol) (2,1 g, 55 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,58 (s, 1H, NH), 7,83 (dd, $J = 12,8, 2,0$ Hz, 1H, H_{aro}), 7,20 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H, H_{aro}), 7,01 (dd, $J = 8,5, 2,6$ Hz, 1H, H_{aro}), 6,75 (dd, $J = 11,2, 8,8$ Hz, 1H, H_{aro}), 6,60 – 6,50 (m, 2H, H_{aro}).

3-fluoro-*N*-(4-fluoro-3-sulfamoylphényl)-4-sulfamoylbenzamide (125).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (124) (1,0 g, 4 mmol). (0,36 g, 25 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,73 (s, 1H, NH), 8,30 (dd, $J = 6,4, 2,8$ Hz, 1H, H_{aro}), 8,07 – 7,64 (m, 9H, H_{aro}), 7,46 (t, $J = 9,3$ Hz, 2H, H_{aro}).

6-amino-4-cyclopropyl-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxyde (127).

Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (128) au départ du composé (136) (1,0 g, 0,004 mmol) (0,91 g, 91 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,98 (s, 2H, NH_2), 7,45 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, 2-H), 6,82 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 4-H), 6,66 (dd, $J = 8,6, 2,0$ Hz, 1H, 5-H), 3,21 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,10 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,02 – 0,87 (m, 2H,

CH(CH₂)₂).

7-amino-4-cyclopropyl-4H-benzo[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxyde (128). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite précédemment dans [Francotte *et al.*, 2009]. m.p. : 283 - 285°C ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7,92 (s, 1H, 6-*H*), 7,54 (d, J = 9 Hz, 1H, 5-*H*), 6,97 (dd, J = 9 Hz, 2,3 Hz, 1H, 8-*H*), 6,95 (d, J = 2,2 Hz, 1H, 3-*H*), 5,72 (s, 2H, NH₂), 3,28 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 1,10 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,95 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

Acide 4-cyclopropyl-4H-benzo[1,2,4]thiadiazine-6-carboxylique 1,1-dioxyde (129). L'ester méthylique (142) (1,93 g, 69 mmol) est mis en suspension dans un mélange de 13 mL d'eau et de 0,5 mL d'acide sulfurique concentré 99 %. Le milieu est chauffé à 80 °C durant 8 h. Une fois revenu à température ambiante, le solide est filtré et rincé à l'eau puis mis à sécher au dessiccateur (1,65 g, 90 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,75 (s, 1H, COOH), 8,31 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 8-*H*), 8,21 (s, 1H, 3-*H*), 8,05 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H, 7-*H*), 8,02 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 5-*H*), 3,48 (tt, J = 7.1, 3.8 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 1,20 – 1,15 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,06 (dd, J = 4.3, 2.4 Hz, 2H, CH(CH₂)₂).

Acide 4-cyclopropyl-4H-benzo[1,2,4]thiadiazine-7-carboxylique 1,1-dioxyde (130). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (186) au départ du composé (147) (3,5 g, 14 mmol) (2,75 g, 72 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 13,42 (s, 1H, COOH), 8,29 (m, 2H, 3-*H*, 5-*H*), 8,22 (s, 1H, 8-*H*), 7,94 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 6-*H*), 3,34 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 1,18 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,05 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

2-fluoro-4-nitrobenzènesulfonamide (132). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (131) (5,0 g, 32 mmol) (3,1 g, 44 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,35 (dd, J = 9,8, 2,2 Hz, 1H, 6-*H*), 8,23 (dd, J = 8,6, 2,1 Hz, 1H, 4-*H*), 8,07 (d, J = 8,6 Hz, 3H, SO₂NH₂ et 3-*H*).

2-chloro-5-nitrobenzènesulfonamide (133). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite précédemment dans [Nørholm *et al.*, 2013]. Rendement : 50–55 %. m.p.: 180–183 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8,67 (d, J = 2,7 Hz, 1H, 6-*H*), 8,43 (dd, J = 8,7 Hz, 2,7 Hz, 1H, 4-*H*), 8,00 (s, 2H, SO₂NH₂), 7,97 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 3-*H*). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 145,9 (C-5), 142,1 (C-1), 137,1 (C-2), 133,3 (C-3), 127,8 (C-4), 123,6 (C-6).

2-(cyclopropylamino)-4-nitrobenzènesulfonamide (134). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (135) au départ du composé (132) (2,0 g, 9 mmol) (2,0 g, 86 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,89 – 7,81 (m, 2H, 3-*H* et 6-*H*), 7,69 (s, 2H, SO₂NH₂), 7,53 (dd, J = 8,7, 2,3 Hz, 1H, 5-*H*), 6,43 (d, J = 1,7 Hz, 1H, NH), 2,61 (m, J = 6,6, 3,2, 1,7 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 0,92 – 0,82 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,63 – 0,55 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

2-(cyclopropylamino)-5-nitrobenzènesulfonamide (135). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite précédemment dans [Nørholm *et al.*, 2013]. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8,48 (d, J = 2,7 Hz, 1H, 6-*H*), 8,28 (dd, J = 9,3 Hz, 2,7 Hz, 1H, 4-*H*), 7,72 (br s, 2H, SO₂NH₂), 7,28 (d, J = 9,3 Hz, 1H, 3-*H*), 6,96 (br s, 1H, NH), 2,67 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,91 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,63 (m, 2H, CH(CH₂)₂). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 150,1 (C-2), 135,5 (C-5), 128,7 (C-4), 125,0 (C-6), 124,5 (C-1), 113,1 (C-3), 25,0 (CH(CH₂)₂), 7,4 (CH(CH₂)₂).

4-cyclopropyl-6-nitro-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxyde (136). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (137) au départ du composé (134) (2,0 g, 8 mmol) (0,77 g, 36 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,52 (d, J = 2,2 Hz, 1H, 2-*H*), 8,31 (dd, J = 8,7, 2,2 Hz, 1H, 4-*H*), 8,28 (s, 1H, 5-*H*), 8,20 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 6-*H*), 3,51 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 1,30 – 1,14 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,14 – 1,06 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

4-cyclopropyl-7-nitro-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxyde (137). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite précédemment dans [Nørholm *et al.*, 2013]. Rendement : 85 %, m.p.: 233–235 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8,60 (dd, J = 9,3 Hz, 2,6 Hz, 1H, 6-*H*), 8,56 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 8-*H*), 8,29 (s, 1H, 3-*H*), 8,07 (d, J = 9,3 Hz, 1H, 5-*H*), 3,46 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 1,20 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,08 (m, 2H, CH(CH₂)₂). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 152,5 (C-3), 144,6 (C-4a), 141,7 (C-7), 127,8 (C-6), 122,0 (C-8a), 120,2 (C-8), 118,9 (C-5), 32,8 (CH(CH₂)₂), 7,5 (CH(CH₂)₂).

Méthyle 3-fluoro-4-nitrobenzoate (138). L'acide 3-fluoro-4-nitrobenzoïque (117) (2,5 g, 13,5 mmol) est mis en solution dans 25 mL de méthanol pour HPLC en présence de 2 mL d'acide sulfurique concentré 99 %. La solution est portée à reflux durant 4 h. Une fois revenue à température ambiante, la solution est refroidie sur glace et additionnée d'eau (50 mL). Le solide est filtré, puis rincé avec une solution 10 % KHCO₃ et enfin à l'eau, puis séché au dessiccateur (2,6 g, 96 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8,29 (dd, J = 8,4, 7,6 Hz, 1H, 5-*H*), 8,04 (dd, J = 7,4, 1,6 Hz, 1H, 6-*H*), 7,97 (dd, 8,1, 1,6 Hz, 1H, 2-*H*), 3,92 (s,

3H, OCH₃).

Méthyle 4-amino-3-fluorobenzoate (139). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (109) (30 min, température ambiante) au départ du composé (138) (2,0 g, 10 mmol) (1,6 g, 95 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7,52 (dd, J = 8,7, 1,8 Hz, 1H, 6-H), 7,48 (dd, J = 12,3, 1,8 Hz, 1H, 5-H), 6,77 (t, J = 8,7 Hz, 1H, 2-H), 6,08 (s, 2H, NH₂), 3,75 (s, 3H, OCH₃).

Méthyle 3-fluoro-4-sulfamoylbenzoate (140). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (139) (2,0 g, 12 mmol) (1,8 g, 64 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7,93 (m, 2H, 5-H, 6-H), 7,87-7,90 (m, 1H, 2-H), 7,86 (s, 2H, NH₂), 3,90 (s, 3H, OCH₃).

Méthyle 3-(cyclopropylamino)-4-sulfamoylbenzoate (141). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (179) au départ du composé (140) (1,5 g, 6 mmol) (0,78 g, 48 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8,23 (m, 1H, 6-H), 7,87-8,01 (m, 1H, 5-H), 7,32-7,65 (m, 1H, 2-H), 7,09-7,24 (m, 1H, 2-H), 6,52 (s, 1H, NH), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 3,61 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,85 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,56 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

Méthyle 4-cyclopropyl-4H-benzo[1,2,4]thiadiazine-6-carboxyloate 1,1-dioxide (142). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (186) au départ du composé (141) (0,78 g, 3 mmol) (0,65 g, 80 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,31 (d, J = 1,2 Hz, 1H, 8-H), 8,22 (s, 1H, 5-H), 8,09 – 8,03 (m, 2H, 3-H, 7-H), 3,94 (s, 3H, OCH₃), 3,48 (m, J = 7,1, 3,9 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 1,18 (m, J = 7,3, 5,3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 1,06 (m, J = 5,4, 3,9 Hz, 2H, CH(CH₂)₂).

2-fluoro-5-méthylbenzènesulfonamide (145). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (144) (5,0 g, 40 mmol) (6,0 g, 80 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7,49-7,66 (m, 3H, 2-H, NH₂), 7,45 (m, 1H, 6-H), 7,30 (dd, J = 10,2, 8,5 Hz, 1H, 5-H), 2,35 (s, 3H, CH₃).

Acide 4-fluoro-3-sulfamoylbenzoïque (146). Une suspension de 2-fluoro-5-méthylbenzènesulfonamide (145) (9,45 g, 5,3 mmol) dans l'eau (50 mL) est chauffée à 70 °C puis additionnée de NaOH 10 % jusqu'à dissolution complète. Le permanganate de potassium (3,0 g, 20 mmol, 4éq) est ajouté par petites portions. Après 4 h sous agitation, la suspension est éliminée par filtration à chaud et le filtrat est amené à pH = 1 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (12N). Le

précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché (8,35 g, 72 %). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 13,49 (br s, 1H, COOH), 8,35 (dd, $J = 7,0$, 1,8 Hz, 1H, 2-*H*), 8,15-8,23 (m, 1H, 6-*H*), 7,85 (s, 2H, NH_2), 7,56 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H, 5-*H*).

Acide 4-(cyclopropylamino)-3-sulfamoylbenzoïque (147). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (179) au départ du composé (146) (4,0 g, 18 mmol) (3,74 g, 80 %). ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 13,24 (s, 1H, COOH), 8,23 (m, 1H, 6-*H*), 7,87-8,01 (m, 1H, 5-*H*), 7,32-7,65 (m, 1H, 2-*H*), 7,09-7,24 (m, 1H, 6-*H*), 6,52 (s, 1H, NH), 3,61 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,85 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,56 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-2-fluorobenzamide (155d).** L'acide 2-fluorobenzoïque (154a) (441 mg, 3,15 mmol, 1,6 éq) est mis en solution, sous atmosphère d'azote dans 6 mL de CHCl_3 sec et d'une goutte de DMF sec. Le milieu est refroidi sur bain d'eau glacée puis additionné de chlorure d'oxalyle (0,3 mL, 3,5 mmol, 1,8 éq). La réaction est laissée dans ces conditions durant 1 h 30. Le solvant est éliminé sous dépression. Le résidu est repris dans du 1,4-dioxane sec (10 mL) et de 5 mL de pyridine. L'aniline (127) (500 mg, 2,1 mmol) est ensuite ajoutée portion par portion sur glace. Le mélange est ensuite laissé revenir à température ambiante et agité durant 1 h 30. 30 mL d'eau sont ajoutés au milieu. Le solide qui apparaît est récupéré par filtration, rincé et séché au dessiccateur (527 mg, 70 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,85 (s, 1H, CONH), 8,41 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 6a-*H*), 8,11 (s, 1H, 3-*H*), 8,01 (m, $J = 9,2$, 2,5 Hz, 1H, 8-*H*), 7,88 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 6-*H*), 7,73 (m, 1H, 4a-*H*), 7,66 – 7,58 (m, 1H, 5a-*H*), 7,43 – 7,32 (m, 2H, 3a-*H*, 3-*H*), 3,37 (tt, $J = 7,1$, 3,8 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,16 (dt, $J = 7,2$, 3,5 Hz, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,05 – 0,98 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-3-fluorobenzamide (155e).** Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (155d) au départ d'acide 3-fluorobenzoïque (154b) (441 mg, 3,15 mmol, 1,6 éq) (316 mg, 42 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,71 (s, 1H, CONH), 8,43 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 6a-*H*), 8,16 (dd, $J = 9,3$, 2,5 Hz, 1H, 2a-*H*), 8,12 (s, 1H, 3-*H*), 7,88 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, 6-*H*), 7,86 (dt, $J = 7,8$, 1,2 Hz, 1H, 8-*H*), 7,82 (dt, $J = 9,3$, 2,2 Hz, 1H, 4a-*H*), 7,63 (m, $J = 8,0$, 5,8 Hz, 1H, 7-*H*), 7,49 (m, 1H, 4-*H*), 3,38 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,23 – 1,13 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,06 – 0,99 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-4-fluorobenzamide (155f).** Ce composé est obtenu selon la procédure

décrite pour le composé **(155d)** au départ d'acide 4-fluorobenzoïque **(151c)** (441 mg, 3,15 mmol, 1,6éq) (203 mg, 27 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,66 (s, 1H, CONH), 8,42 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, 8-*H*), 8,16 (dd, $J = 9,3, 2,3$ Hz, 1H, 6-*H*), 8,13 – 8,04 (m, 2H, 2a-*H*), 7,88 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, 5-*H*), 7,41 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H, 3a-*H*), 3,38 (tt, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,16 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,08 – 0,97 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-2-fluorobenzamide (156d)**. Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé **(172)** au départ du composé **(155d)** (200 mg, 0,7 mmol) (65 mg, 26 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 1H, CONH), 8,09 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, 3-*H*), 7,96 (s, 1H, 8-*H*), 7,72 – 7,65 (m, 1H, 4a-*H*), 7,58 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H, 4a-*H*), 7,41 – 7,24 (m, 2H, 3a-*H*, 5a-*H*), 4,65 (s, 2H, 3-*H*), 0,91 (d, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,65 (d, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-3-fluorobenzamide (156e)**. Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé **(172)** au départ du composé **(155b)** (200 mg, 0,7 mmol) (142 mg, 57 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,33 (s, 1H, CONH), 8,09 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, 6-*H*), 7,94 (s, 1H, 2-*H*), 7,82 (dd, $J = 9,1, 2,8$ Hz, 2H, 4a-*H*), 7,80 – 7,74 (m, 1H, 8-*H*), 7,65 – 7,53 (m, 1H, 4a-*H*), 7,45 (td, $J = 8,5, 2,8$ Hz, 1H, 7-*H*), 7,31 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, 4-*H*), 4,66 (s, 2H, 3-*H*), 0,91 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,66 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-7-yl)-4-fluorobenzamide (156f)**. Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé **(172)** au départ du composé **(155c)** (200 mg, 0,7 mmol) (37 mg, 15 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,28 (s, 1H, CONH), 8,06 (d, $J = 20,0$ Hz, 2H, 8-*H*), 7,98 – 7,74 (m, 2H, 2a-*H*), 7,34 (d, $J = 32,6$ Hz, 2H, 3a-*H*), 4,65 (s, 2H, 3-*H*), 0,91 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,66 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-2-fluorobenzamide (155a)**. Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé **(155d)** au départ du composé **(127)** (500 mg, 2,1 mmol) (241 mg, 32 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,00 (s, 1H, NH), 8,40 (s, 1H, 8-*H*), 8,14 (s, 1H, 5-*H*), 7,86 (m, $J = 8,7$ Hz, 2H, 3-*H*, 6a-*H*), 7,73 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 4a-*H*), 7,63 (q, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5a-*H*), 7,45 – 7,32 (m, 2H, 3-*H*, 3a-*H*), 1,14 (t, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,05 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-3-fluorobenzamide (155b).** Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (155e) au départ du composé (127) (500 mg, 2,1 mmol) (655 mg, 87 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,82 (s, 1H, *NH*), 8,47 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, 8-*H*), 8,15 (s, 1H, 5-*H*), 7,96 – 7,87 (m, 2H, 3-*H*, 6a-*H*), 7,85 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 2a-*H*), 7,82 (m, Hz, 1H, 5a-*H*), 7,64 (m, 1H, 4a-*H*), 7,51 (m, Hz, 1H, 3-*H*), 1,17 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,09 – 1,02 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-4*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-4-fluorobenzamide (155c).** Ce composé est obtenu selon la même procédure décrite pour le composé (155f) au départ du composé (127) (500 mg, 2,1 mmol). (151 mg, 20%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,78 (s, 1H, *NH*), 8,47 (s, 1H, 8-*H*), 8,14 (s, 1H, 5-*H*), 8,08 (dd, *J* = 8,5, 5,4 Hz, 2H, 2a-*H*), 7,95 – 7,84 (m, 2H, 3-*H*, 7-*H*), 7,42 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H, 3a-*H*), 1,17 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,09 – 1,01 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-2-fluorobenzamide (156a).** Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (155a) (200 mg, 0,7 mmol) (138 mg, 56 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,47 (s, 1H, *NH*), 7,90 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, 8-*H*), 7,84 (s, 1H, SO₂*NH*), 7,81 (dt, *J* = 7,8, 1,3 Hz, 1H, 5-*H*), 7,79 – 7,74 (m, 1H, 6a-*H*), 7,61 (td, *J* = 7,8, 5,8 Hz, 1H, 4a-*H*), 7,52 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 7-*H*), 7,50 – 7,44 (m, 1H, 5a-*H*), 7,31 (dd, *J* = 8,6, 2,0 Hz, 1H, 3a-*H*), 4,66 (s, 2H, 3-*H*), 0,92 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,71 – 0,65 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-3-fluorobenzamide (156b).** Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (155b) (200 mg, 0,7 mmol) (118 mg, 48 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,47 (s, 1H, *NH*), 7,90 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, 8-*H*), 7,84 (s, 1H, SO₂*NH*), 7,81 (dt, *J* = 7,8, 1,3 Hz, 1H, 5-*H*), 7,79 – 7,74 (m, 1H, 6a-*H*), 7,61 (td, *J* = 8,0, 5,8 Hz, 1H, 2a-*H*), 7,52 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 5a-*H*), 7,50 – 7,44 (m, 1H, 7-*H*), 7,31 (dd, *J* = 8,6, 2,0 Hz, 1H, 4a-*H*), 4,66 (s, 2H, 3-*H*), 0,92 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,73 – 0,64 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

***N*-(4-cyclopropyl-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazin-6-yl)-4-fluorobenzamide (156c).** Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (155c) (200 mg, 0,7 mmol) (187 mg, 76 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,43 (s, 1H, *NH*), 8,08 – 8,00 (m, 2H, 2-*H*), 7,89 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, 8-*H*), 7,80 (s, 1H, 5-*H*), 7,52 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 7-*H*), 7,42 – 7,35 (m, 2H,

3-*H*), 7,30 (m, 1H, SO₂NH), 4,66 (s, 2H, 3-*H*), 0,96 – 0,88 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,72 – 0,65 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

6,6'-(éthane-1,2-diyl)bis(4-méthyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde) (157). Le (*E*)-6,6'-(éthène-1,2-diyl)bis(4-méthyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (189) (130 mg, 0,31 mmol) est dissous dans le DMF (5 mL) et additionné de 10 % de charbon palladié (13 mg). La suspension qui en résulte est placée sous 12 bars d'H₂ pour une heure. Le charbon est filtré et le solvant du filtrat est éliminé par dépression. Le solide résiduel est recristallisé dans le méthanol et séché (32 mg, 25 %). m.p.: 313 °C (décomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,91 (s, 1H, NH), 7,42 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 8-*H*), 6,71 (s, 1H, 5-*H*), 6,70 (dd, *J* = 7,1 Hz / 1,2 Hz, 1H, 7-*H*), 4,62 (s, 2H, CH₂), 2,91 (s, 3H, NCH₃), 2,86 (s, 2H, CH₂ linker); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146,9 (C-6), 144,0 (C-4a), 124,0 (C-8), 120,6 (C-8a), 116,8 (C-7), 113,4 (C-5), 62,4 (C-3), 36,7 (CH₂ linker), 36,2 (NCH₃); Anal. (C₁₈H₂₂N₄O₄S₂): calculée: N 13,26%, C 51,17%, H 5,25%, S 15,18%; obtenue: N 13,22%, C 51,29%, H 5,29%, S 14,71%.

6,6'-(éthane-1,2-diyl)bis(4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde) (158). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (193) (136 mg, 0,3 mmol) en suspension dans l'isopropanol et en utilisant du DMF ajouté goutte-à-goutte jusqu'à solubiliser le réactif avant l'ajout de NaBH₄ (116 mg, 82 %). m.p.: 290 °C (décomposition) ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,78 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, NH), 7,43 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, 8-*H*), 7,02 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, 5-*H*), 6,75 (dd, *J* = 8,1, 1,5 Hz, 1H, 7-*H*), 4,61 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, 3-*H*), 2,92 (s, 2H, CH₂ linker), 2,41 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,90 - 0,84 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,58 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146,1 (C-6), 143,9 (C-4a), 124,2 (C-8), 121,2 (C-8a), 117,8 (C-7), 114,2 (C-5), 61,0 (C-3), 36,5 (CH₂ linker), 29,6 (NCH), 8,4 (CH(CH₂)₂). Anal. (C₂₂H₂₆N₄O₄S₂): calculées : N 11,80 %, C 55,68 %, H 5,52 %, S 13,51 % ; mesurées : N 11,77 %, C 55,88 %, H 5,67 %, S 13,05 %.

4-méthyl-6-vinyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (172). Le 4-méthyl-6-vinyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (186) (400 mg, 1,83 mmol) est mis en suspension sous agitation vigoureuse dans l'isopropanol (10 mL) à 60 °C. Du NaBH₄ (200 g, 3 eq.) est ajouté au mélange et agité durant 15 min. Le solvant est ensuite éliminé par dépression réduite et le produit brut est repris dans l'eau. La suspension est acidifiée avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (6N). Cette dernière est ensuite extraite au dichlorométhane (3 x 30 mL).

L'ensemble des fractions organiques sont rassemblées, lavées et séchées MgSO₄. Le solvant est éliminé par dépression réduite ; le solide résultant est suspendu dans l'eau, collecté par filtration, rincé à l'eau et séché (234 mg, 61 %). m.p.: > 300 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,03 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, *NH*), 7,49 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 8-*H*), 6,95 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 7-*H*), 6,88 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, 5-*H*), 6,72 (dd, *J* = 17,6, 10,9 Hz, 1H, CH₂CH), 5,95 (dd, *J* = 17,6, 0,8 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5,38 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, E-CH₂CH), 4,65 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CH₂), 2,97 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 144,4 (C-6), 141,6 (C-4a), 136,2 (CH₂CH), 124,4 (C-8), 122,0 (C-8a), 116,5 (CH₂CH), 113,6 (C-7), 111,7 (C-5), 62,2 (C-3), 35,9 (NCH₃)

6-bromo-4-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (174). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (180) (200 mg, 0,7 mmol) (145mg, 72%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,14 (s, 1H, *NH*), 7,46 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 8-*H*), 7,03 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, 5-*H*), 6,94 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H, 7-*H*), 4,68 (s, 2H, CH₂), 2,95 (s, 3H, CH₃).

6-bromo-4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (175) Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (181) (200 mg, 0,7 mmol) (175mg, 91%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,99 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, *NH*), 7,48 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 8-*H*), 7,38 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, 5-*H*), 7,03 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H, 7-*H*), 4,69 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH₂), 2,56 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,97 – 0,90 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,71 – 0,63 (m, 2H, CH(CH₂)₂).

4-bromo-2-(fluoro)benzènesulfonamide (177). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (214) au départ du composé (176) (1g, 1,9mmol) (0,5g, 36%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,84 (dd, *J* = 9,8, 1,9 Hz, 1H, 3-*H*), 7,77 (s, 2H, SO₂NH₂), 7,73 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, 6-*H*), 7,61 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H, 5-*H*).

4-bromo-2-(méthylamino)benzènesulfonamide (178). Le 4-bromo-2-fluorobenzènesulfonamide (177) (4,0 g, 15,7 mmol) est dissous dans une mixture 1:3 de 1,4-dioxane et méthylamine en solution à 40 % dans l'eau (20 mL). Cette solution est ensuite chauffée au micro-ondes à 135 °C durant 25 min. Après refroidissement, le solvant est éliminé par dépression. Le solide rose résultant est suspendu dans l'eau et collecté par filtration et séché au dessiccateur sous vide (3,92 g, 96 %). m.p.: 171-173 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,51 (d, *J*=8,4 Hz, 1H, 6-*H*), 7,38 (s, 2H, SO₂NH₂), 6,87 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, 3-*H*), 6,82 (dd, *J* = 8,4 Hz/1,9

Hz, 1H, 5-*H*), 6,01 (q, $J = 4,5$ Hz, 1H, *NH*), 2,83 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H, NHCH_3) ; ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ 146,7 (*C-1*), 130,0 (*C-6*), 127,2 (*C-4*), 124,1 (*C-2*), 117,0 (*C-5*), 113,3 (*C-3*), 30,0 (NCH_3).

4-bromo-2-(cyclopropylamino)benzènesulfonamide (179). Le 4-bromo-2-fluorobenzènesulfonamide (**177**) (4,0 g, 15,7 mmol) est dissous dans un mélange 1:1 de 1,4-dioxane et cyclopropylamine (20 mL). La solution est chauffée au micro-ondes à 135 °C durant 25 min. Après refroidissement, le solvant est éliminé par dépression. Le solide obtenu est repris dans le méthanol puis additionné d'eau dans un rapport 1:2. Le solide est collecté par filtration, lavé à l'eau et séché au dessiccateur (3,4 g, 75 %). m.p.: 201-204 °C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,52 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 6-*H*), 7,43 (bs, 2H, SO_2NH_2), 7,25 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, 3-*H*), 6,90 (dd, $J = 8,4, 1,9$ Hz, 1H, 5-*H*), 6,21 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, *NH*), 2,50 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,87 - 0,76 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0,56 - 0,49 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ 146,6 (*C-1*), 129,9 (*C-6*), 126,8 (*C-4*), 124,4 (*C-2*), 118,0 (*C-5*), 114,9 (*C-3*), 24,2 ($\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 7,1 ($\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

6-bromo-4-cyclopropyl-4H-1,2,4]-benzo thiadiazine 1,1-dioxide (180) Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (**186**) au départ du composé (**178**) (200 mg, 0,76 mmol) (161 mg, 78 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,09 (s, 1H, 3-*H*), 7,83 (dd, $J = 8,4$ Hz, 1H, 3-*H*), 7,74 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, 5-*H*), 7,73 (dd, $J = 8,4, 1,6$ Hz, 1H, 7-*H*), 3,62 (s, 3H, CH_3).

6-bromo-4-cyclopropyl-4H-1,2,4]-benzo thiadiazine 1,1-dioxide (181) Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (**186**) au départ du composé (**179**) (200 mg, 0,69 mmol) (153 mg, 74 %). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,16 (s, 1H, 3-*H*), 7,98 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, 5-*H*), 7,84 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 8-*H*), 7,76 (dd, $J = 8,4, 1,7$ Hz, 1H, 7-*H*), 3,40 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,22 - 1,12 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 1,06 - 1,00 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).

2-(méthylamino)-4-vinylbenzènesulfonamide (184). Le potassium vinyltrifluoroborate (1,15 g, 8,6 mmol, 1,2 éq) est ajouté à une solution de 4-bromo-2-(méthylamino)benzènesulfonamide (**178**) (1,9 g, 7,17 mmol) dans le 1,4-dioxane (14 mL). Une fois le sel solubilisé, une solution aqueuse de NaOH 10 % (6,3 mL) est ajoutée, par du $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4,3 mg, 0,27 mol%). Cette mixture est portée à reflux durant 24 h. De retour à température ambiante, la mixture brute noire est filtrée. Le filtrat est ensuite extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de Brine (15 mL) et séchées

sur MgSO₄. Le solvant est retiré par dépression. L'huile résiduelle est recristallisée dans un mélange méthanol/eau 1:2. Le solide est collecté par filtration et séché dans un dessiccateur sous vide (0,5 g, 33 %). m.p.: 128-131 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,57 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 6-*H*), 7,26 (s, 2H, SO₂NH₂), 6,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 5-*H*), 6,76 (s, 1H, 3-*H*), 6,72 (dd, *J* = 17,7, 10,9 Hz, 1H, CH₂CH), 5,92 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5,87 (q, *J* = 4,9 Hz, 1H, NHCH₃), 5,35 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H, E-CH₂CH), 2,86 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 145,9 (C-1), 141,8 (C-4), 136,4 (CH), 128,5 (C-6), 124,0 (C-2), 116,4 (CH₂), 111,9 (C-5), 109,0 (C-3), 29,6 (NCH₃).

2-(cyclopropylamino)-4-vinylbenzènesulfonamide (185). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (184) au départ du composé (179) (500 mg, 1,7 mmol) (354 mg, 86 %) m.p.: 155-161 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,61 - 7,51 (m, 1H, 6-*H*), 7,31 (s, 2H, SO₂NH₂), 7,15 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, 3-*H*), 6,87 (dd, *J* = 8,2, 1,6 Hz, 1H, 5-*H*), 6,74 (dd, *J* = 17,6, 10,9 Hz, 1H, CHCH₂), 6,11 (s, 1H, NH), , 5,90 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, Z-CHCH₂), 5,37 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H, E-CHCH₂), 2,50 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,88 - 0,72 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,57 - 0,43 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 146,0 (C-4), 141,0 (C-1), 136,3 (CHCH₂), 128,0 (C-6), 124,0 (C-2), 116,4 (CHCH₂), 113,0 (C-5), 110,7 (C-3), 24,5 (CH(CH₂)₂), 7,2 (CH(CH₂)₂).

4-méthyl-6-vinyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (186). Le 2-(méthylamino)-4-vinylbenzènesulfonamide (184) (1,13 g, 5,3 mmol) est mis à chauffer sous agitation dans le triéthyle orthoformiate (5 mL) à 135 °C durant 4 heures. La suspension qui en résulte est refroidie sur bain de glace ; le solide résultant est collecté par filtration, rincé à l'éther et séché. (892 mg , 81 %). m.p.: > 300 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,08 (s, 1H, 3-*H*), 7,85 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 8-*H*), 7,70 (dd, *J* = 8,3, 1,4 Hz, 1H, 7-*H*), 7,52 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, 5-*H*), 6,88 (dd, *J* = 17,7, 11,0 Hz, 1H CH₂CH), 6,14 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5,53 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H, E-CH₂CH), 3,65 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 151,3 (C-3), 141,7 (C-6), 136,2 (C-4a), 135,1 (CH), 124,4 (C-8), 123,9 (C-7), 121,6 (C-8a) 118,7 (CH₂), 114,3 (C-5), 38,2 (NCH₃).

4-allyl-7-chloro-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxyde (187). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite dans [Larsen *et al.*, 2018] en utilisant le 3-bromoprop-1-ène comme agent alkylant. Rendement : 45 % (2 étapes). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,22 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, 8-*H*), 7,53 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, 6-*H*), 7,41 (dd, *J* = 9,0, 2,7 Hz, 1H, 5-*H*), 6,83 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, SO₂NH), 5,82 (ddt, *J* =

15,7, 9,9, 4,7 Hz, 1H, CH₂CHCH₂), 5,18 (t, *J* = 14,5 Hz, 2H, CH₂), 4,72 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, 3-*H*), 4,03 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H, NCH₂CH).

(E)-4,4'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(7-chloro-3,4-dihydro-2H-benzo-[1,2,4]thiadiazine 1,1-dioxide) (188). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (189) au départ du composé (187) (200 mg, 0,77 mmol) (180 mg, 95 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,18 (m, 1H, 8-*H*), 7,50 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H, SO₂NH), 7,33 (dd, *J* = 9,1, 2,6 Hz, 1H, 6-*H*), 6,82 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, 5-*H*), 5,65 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H, CH₂CH), 4,70 (m, 2H, 3-*H*), 4,05 – 3,92 (s, 2H, NCH₂CH).

(E)-6,6'-(éthène-1,2-diyl)bis(4-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde) (189). Le 4-méthyl-6-vinyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (172) (200 mg, 0,89 mmol) est solubilisé dans le dichlorométhane (3 mL), conditionné sous azote et additionné de catalyseur de Hoveyda-Grubbs II (0,01 mol%). Cette solution est portée à reflux. Toutes les 30 min, le ballon d'azote est vidé et rempli avec un volume frais. Après 4 h, la suspension est refroidie à température ambiante et le solide est collecté par filtration, lavé à l'éther et séché (121,5 mg, 65 %). m.p.: 331 °C (décomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,06 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, NH), 7,54 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 8-*H*), 7,37 (s, 1H, CH), 7,10 (dd, *J* = 8,2, 1,6 Hz, 1H, 7-*H*), 7,05 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, 5-*H*), 4,68 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂), 3,01 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 144,3 (C-6), 141,2 (C-4a), 130,0 (CH linker), 124,5 (C-8), 121,8 (C-8a), 114,3 (C-7), 112,2 (C-5), 62,3 (C-3), 36,2 (NCH₃).

(E)-4,4'-(éthène-1,2-diyl)bis(2-(cyclopropylamino)benzène-sulfonamide) (191). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (189) au départ du composé (185) (200 mg, 0,84 mmol) (167 mg, 89 %); m.p.: 247 °C (décomposition) ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,61 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 6-*H*), 7,37 - 7,28 (m, 3H, SO₂NH₂ et 3-*H*), 7,09 (dd, *J* = 8,4, 1,5 Hz, 1H, 5-*H*), 6,16 - 6,11 (m, 1H, NH), 2,56 (tt, *J* = 6,4, 3,3 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 0,86 (m, *J* = 6,6, 3,3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0,55 (m, *J* = 4,4 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 145,6 (C-4), 141,1 (C-1) 130,0 (C-6), 128,5 (CH linker), 124,1 (C-2), 113,3 (C-5), 111,6 (C-3), 24,6 (NCH), 7,4 (CH(CH₂)₂).

4,4'-(éthane-1,2-diyl)bis(2-(cyclopropylamino)benzènesulfonamide) (192). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (157) au départ du composé (191) (167 mg, 0,37 mmol) (151 mg, 90 %). m.p.: 220-222 °C ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,50 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 6-*H*), 7,23 (s, 2H, SO₂NH₂), 6,94 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, 3-*H*), 6,62 (dd, *J* = 8,1, 1,7 Hz, 1H, 5-*H*), 6,05 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, NH), 2,90

(s, 2H, CH₂), 2,43 - 2,37 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0,76 (dt, *J* = 6,6, 3,3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0,50 - 0,41 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 146,8 (C-4), 145,5 (C-1), 128,0 (C-6) 123,0 (C-2), 115,9 (C-5), 112,6 (C-3), 36,4 (CH₂ linker), 24,5 (NCH), 7,3 (CH(CH₂)₂).

6,6'-(éthane-1,2-diyl)bis(4-cyclopropyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (193). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (186) au départ du composé (192) (150 mg, 0,33 mmol) (136 mg, 87 %). m.p.: 298 °C (décomposition) ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,09 (s, 1H, 3-*H*), 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 8-*H*), 7,53 (s, 1H, 5-*H*), 7,47 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 7-*H*), 3,26 (m, *J* = 7,2, 3,9 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 3,15 (s, 2H, CH₂ linker), 1,09 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H CH(CH₂)₂), 0,93 - 0,84 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 151,4 (C-3), 146,6 (C-6), 136,3 (C-4a), 127,2 (C-8), 124,1 (C-7), 120,3 (C-8a), 116,3 (C-5), 36,3 (CH₂ linker), 32,1 (NCH), 7,3 (CH(CH₂)₂).

4-allyl-2-(méthylamino)benzènesulfonamide (195). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (184) en utilisant l'allyltrifluoroborate de potassium, au départ du composé (178) (200 mg, 0,75 mmol) (150 mg, 86 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,52 (dd, *J* = 8,1, 2,8 Hz, 1H, 5-*H*), 7,20 (dd, 1H, 2,8, 1,6, 3-*H*), 6,49 (dd, *J* = 8,1, 1,6 Hz, 1H, 6-*H*), 5,94 (m, *J* = 17,0, 10,1, 3,7 Hz, 1H, CH₂-CH=CH₂), 5,84 (d, *J* = 4,9, 1H), 5,12 (m, *J* = 17,0, 1,7 Hz, 1H, CH₂-CH=CH₂), 5,08 - 5,02 (m, 10,1, 1,7 Hz 1H, CH₂-CH=CH₂), 3,34 (d, *J* = 3,7 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 2,81 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H, CH₃).

(E)-4,4'-(éthène-1,2-diyl)bis(2-(méthylamino)benzènesulfonamide) (191). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (189) au départ du composé (195) (200 mg, 0,9 mmol) (140 mg, 75 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,73 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, 6-*H*), 7,57 - 7,12 (m, 3H, SO₂NH₂ et 3-*H*), 7,09 (dd, *J* = 8,4, 1,4 Hz, 1H, 5-*H*), 6,45 - 6,49 (m, 1H, NH), 2,86 (s, 3H, CH₃).

4,6-diméthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (206). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (212) (200 mg, 0,9 mmol) (150 mg, 75 %) ; m.p.: 141-142 °C ; ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 7,95 (t, 1H, NH) 7,40 (d, 1H, 8-*H*), 6,66 (s, 1H, 5-*H*), 6,62 (d, 1H, 7-*H*), 4,63 (d, 2H, 3-*H*), 2,92 (s, 3H, NCH₃), 2,29 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 144,0 (C-6), 143,3 (C-4a), 124,0 (C-8), 120,3 (C-8a), 117,3 (C-7), 113,8 (C-5), 62,3 (C-3), 36,1 (NCH₃), 21,6 (6-CH₃). Anal. (C₉H₁₂N₂O₂S): calculées: N 13,20 %, C 50,92 %, H 5,70 %, S 15,10 % ; mesurées: N 13,14 %, C 50,61 %, H 5,50 %, S 15,53 %.

4-cyclopropyl-6-méthyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (207). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (172) au départ du composé (216) (0,6 g, 2,6 mmol) (454 mg, 75 %). m.p.: 157-158 °C ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,81 (s, 1H, NH), 7,45 - 7,38 (d, J = 8,0 Hz, 1H, 8-H), 7,08 (s, 1H, 5-H), 6,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H, 7-H), 4,63 (d, J = 4,9 Hz, 2H, CH₂), 2,32 (d, J = 5,1 Hz, 3H, CH₃), 0,92 (qd, J = 6,5, 4,2 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0,65 (q, J = 4,1, 2,8 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 144,1 (C-6), 142,9 (C-4a), 124,2 (C-8), 120,8 (C-8a), 118,3 (C-7), 114,5 (C-5), 61,1 (C-3), 29,6 (CH₃), 21,7 (NCH), 8,4(CH(CH₂)₂). Anal. (C₁₁H₁₄N₂O₂S) calculées : N 11,76 %, C 55,44 %, H 5,92 %, S 13,45 % ; mesurées: N 12,10 %, C 55,78 %, H 5,99 %, S 13,60 %.

2-amino-4-méthylbenzènesulfonamide (210). La *m*-toluidine (208) (10 g, 93,3 mmol) en solution dans le nitrométhane (40 mL) est additionnée, sur une période de 5 minutes, sur bain de glace et sous agitation, d'une solution de chlorosulfonyl isocyanate (9 mL) dans le nitrométhane (25 mL). Un solide en suspension se forme au cours de l'addition. Le chlorure d'aluminium (14,0 g, 105 mmol) est ajouté à cette suspension ; dès la fin de l'ajout, la suspension devient une solution limpide. Le milieu réactionnel est porté à reflux durant 30 min, refroidi puis versé doucement dans de l'eau glacée. Le solide est collecté par filtration et lavé à l'eau. Il est ensuite mis en suspension dans l'eau puis extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les différentes phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO₄. Le solvant est éliminé par dépression. Le résidu solide est repris dans l'eau (100 mL) et porté à pH = 12 avec une solution aqueuse de NaOH 10 % m/m, traitée au charbon et filtrée. Le filtrat est acidifié par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (12N), le solide résultant est collecté par filtration. Ce solide est un mélange des deux isomères (209a et 209b). Ce mélange est dispersé dans une solution 50 % d'acide sulfurique et porté à reflux durant 6 h. Une fois à température ambiante, le milieu est filtré. Le solide contient principalement le (209b) laissé intact ; le filtrat contient le composé (210). Après neutralisation du filtrat avec une solution 40 % en NaOH, le solvant est éliminé par dépression. Le résidu solide est trituré dans l'éthanol (200 mL) et filtré. Le filtrat est éliminé par dépression ; le solide obtenu est recristallisé dans un mélange méthanol/eau 1 :2 (3,3 g, 19 %) ; m.p.: 121-122 °C (lit. 124-126 °C).

6-méthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (211). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (186) au départ du composé (10) (1,0 g, 5 mmol) (0,8 g, 76 %) ; m.p.: 186-195 °C ; ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 12,17 (s, 1H, NH), 7,94 (s, 1H, 3-H), 7,69 (d, 1H, 8-H), 7,58 (s, 1H, 5-H), 7,25 (d, 1H, 7-H), 2,39 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 147,5 (C-3), 143,5 (C-6), 134,6 (C4a), 127,7 (C-8a), 123,6 (C-8), 120,1 (C-7), 117,0 (C-5), 21,1 (CH₃).

4,6-diméthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (212). Une suspension de 6-méthyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde (211) (1,0 g, 4,62 mmol), carbonate de potassium (2 g), et d'iodométhane (1,7 mL) dans l'acétonitrile (30 mL) est chauffée à 60 °C durant 3 h. Le solvant est éliminé par dépression. Le résidu est mis en suspension dans l'eau (40 mL). Le solide résultant est collecté par filtration, lavé à l'eau et recristallisé dans l'acétate d'éthyle (0,73 g, 75 %). m.p.: 269-272 °C ; ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) 8,04 (s, 1H, 3-H), 7,76 (d, 1H, 8-H), 7,37 (d, 1H, 7-H), 7,32 (s, 1H, 5-H), 3,59 (s, 3H, NCH₃), 2,44 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 151,1 (C-3), 143,8 (C-6), 135,8 (C-4a), 127,7 (C-7), 124,0 (C-8), 120,2 (C-8a), 116,4 (C-5), 38,0 (NCH₃), 21,4 (6-CH₃).

2-fluoro-4-méthylbenzènesulfonamide (214). Une portion d'acide acétique glacial (160 mL) est saturée en SO₂ (g) durant 30 min. Cette solution est ensuite refroidie sur bain d'eau glacée et additionnée d'une solution aqueuse de CuCl₂ (7 g dans 20 mL) (suspension A). Parallèlement, la 2-fluoro-4-méthylaniline (213) (10,0 g, 80 mmol) est dissoute dans un mélange d'acide acétique glacial (160 mL) et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique fumant (40 mL). Cette solution est refroidie sur bain d'eau salée et glacée (-5 °C) puis additionnée au goutte-à-goutte d'une solution aqueuse de NaNO₂ (8 g dans 20 mL, 116 mmol). Après cet ajout, la solution est lentement versée sur la suspension A. Après 15 min d'agitation, la suspension résultante est versée sur glace (400 g). Le précipité qui en résulte est collecté par filtration, lavé à l'eau et immédiatement dissous dans du 1,4-dioxane (150 mL). Cette solution est ajoutée graduellement, sous agitation, à une solution concentrée d'ammoniaque (300 mL) refroidie sur bain de glace. Après l'addition, la solution est agitée durant 30 min, la phase organique et une partie de l'ammoniaque sont retirées sous pression réduite. La solution/suspension aqueuse résultante est neutralisée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (6N). Le précipité ainsi formé est collecté par filtration, lavé à l'eau et séché. (5,6 g, 37 %). m.p.: 136-137 °C ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,66 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, 8-H), 7,59 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H, SO₂NH₂), 7,26 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H, 7-H), 7,17 (t, *J* = 6,4 Hz,

1H, 3-*H*), 2,38 (d, $J = 4,0$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 158,9 - 156,9 (d, $J = 252,3$ Hz, C-2), 145,5 (C-1), 128,8 - 128,7 (d, $J = 14,4$ Hz, C-6), 128,1 (C-4), 124,9 (C-5), 117,3 - 117,1 (d, 20,8 Hz, C-3), 20,8 (CH₃).

2-(cyclopropylamino)-4-méthylbenzènesulfonamide (215). Le 2-fluoro-4-méthylbenzènesulfonamide (**214**) (4,0 g, 21 mmol) est introduit dans la cuve en téflon hermétiquement close d'une bombe contenant un mélange de 1,4-dioxane (70 mL) et de cyclopropylamine (3,5 mL, 50 mmol, 2,4 éq). Elle est fermée puis mise au four à 100 °C durant 240 h. Le solvant et le réactif sont retirés par dépression. Le résidu est repris dans le méthanol (20 mL) ; le solide restant, qui contient le produit désiré, est récupéré par filtration et lavé avec du méthanol et séché. Ce composé fut utilisé pour l'étape suivante sans plus de purification (1,7 g, 35 %) ; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,48 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6-*H*), 7,23 (s, 2H, SO₂NH₂), 6,94 (s, 1H, 3-*H*), 6,58 - 6,49 (m, 1H, 5-*H*), 6,06 (s, 1H, NH), 2,45 (dp, $J = 9,7, 3,7, 3,2$ Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 0,85 - 0,71 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0,50 (p, $J = 4,3$ Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 145,4 (C-4), 143,2 (C-1), 128,1 (C-6), 122,6 (C-2), 116,4 (C-5), 113,0 (C-3), 24,5 (CH(CH₂)₂), 21,5 (CH₃), 7,3 (CH(CH₂)₂).

4-cyclopropyl-6-méthyl-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (216). Ce composé est obtenu selon la procédure décrite pour le composé (**186**) au départ du composé (**215**) (1,7 g, 7,35 mmol) (0,6 g, 35 %). m.p.: 224-226 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,12 (s, 1H, 3-*H*), 7,77 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 8-*H*), 7,64 (s, 1H, 5-*H*), 7,39 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, 7-*H*), 3,34 (bs with water, 1H, NCH), 2,48 (s, 3H, CH₃), 1,30 - 1,08 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1,00 (dt, $J = 6,9, 4,9$ Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 151,4 (C-3), 143,7 (C-6), 136,5 (C-4a), 127,6 (C-7), 124,0 (C-8), 119,8 (C-8a), 116,5 (C-5), 32,1 (CH₃), 21,6 (NCH), 7,3 (CH(CH₂)₂).

5.1.3 Modélisation

La structure cocrystallisée du monomère (**64**) avec GluA2_o-LBD-L504Y-N775S (PDB code 4N07) fut utilisée comme base au *docking*. La protéine cible fut préparée au moyen de Discovery Studio 4.0, la procédure de docking fut quant à elle conduite au moyen du programme GOLD 5.3.0. [Jones G. *et al.* 1997]. Le site de fixation fut défini comme une sphère de 10 Å centrée autour des deux monomères (**64**), ceci permettant l'incorporation de ces derniers ainsi que des acides aminés interagissant avec eux. Les dimères à évaluer furent dessinés au moyen de ChemDraw (PerkinElmer Informatics) et préparés au docking avec le logiciel Discovery Studio 4.0 (Accelrys Inc., San Diego, California, USA). Pour chaque ligand, le nombre d'essais de l'algorithme générique fut fixé à 100. La fonction par défaut ChemPLP fut celle utilisée et son efficacité de recherche paramétrée à 200%. Après ces essais, le programme GOLD fournit les 20 meilleures solutions trouvées pour chaque ligand. Ces solutions sont ensuite regroupées en *clusters* sur base de la pose adoptée par la molécule. Parmi ces *clusters* présentant le plus grand nombre de représentants, le plus représentatif (possédant le plus haut score PLP) fut conservé. Cette pose fut ensuite utilisée pour la minimisation *in situ* et pour calculer l'énergie libre de liaison. La minimisation, le calcul de l'énergie libre de liaison et les interactions permettant la visualisation furent déterminées au moyen de Discovery Studio (DS) 4.0 (Accelrys Inc., San Diego, California, USA). Ces derniers furent calculés selon le même protocole DS. Dans ce protocole l'entropie conformationnelle [Sakkiah S. *et al.* 2013] [Tirado-Rives J. *et al.* 2006] fut aussi prise en compte (les conformères furent générés au moyen de l'algorithme BEST), et le GBMV (generalized Born with molecular volume) utilisé comme solvant implicite au modèle.

5.1.4 Pharmacologie

5.1.4.1 **Western blot**

Les cellules exprimant continuellement le récepteur GluA2_o(Q) ou transitoirement le récepteur GluA1 sont déposées dans une plaque six puits. 24 heures après, les cellules sont déposées sur glace, lysées avec le tampon RIPA glacé (25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % désoxycholate de sodium, 0,1 % SDS ; pH 7,6) contenant un inhibiteur de protéases (Roche, Basel, Switzerland). Le lysat cellulaire est séparé par SDS-PAGE (gel d'acrylamide 10 %) et les protéines sont transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF). Les membranes sont placées durant 1 h à RT dans un tampon de fixation (TBS + 0,1 % Tween-20 (BP337-100, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) + 5 % BSA), puis incubées avec les anticorps primaires durant 12 h à 4 °C. HA-GluA1 a été détecté avec un anticorps monoclonal de lapin anti-HA (1:1000), et Myc-GluA2 avec un *anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody* (1:1000). Après rinçage, les membranes sont incubées 1 h à RT avec le *horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody* (Cell Signaling, 1:2000) correspondant, dilué dans le tampon fixant contenant 5 % de lait en poudre non gras. Les protéines sont révélées en utilisant le PierceTM ECL (32106, Thermo Fischer Scientific/Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA).

5.1.4.2 Immunofluorescence

Les cellules HEK 293 exprimant GluA₂(Q) sont cultivées sur des *coverslips* (VWR, 20x20 mm) traités à la poly-(D-lysine), à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ pour 24 h. Les cellules sont affamées durant 30 min dans un tampon phosphate (*phosphate-buffered saline*, PBS). Elles sont placées sur glace, rincées avec du PBS glacé et figées sur glace durant 30 min avec une solution de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA) à 2 % dans le PBS. L'anticorps monoclonal anti-HA (1:1000) est ensuite ajouté. Après 1 h, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS glacé et fixées dans une solution de formaldéhyde 4 % pendant 15 min à température ambiante. Toutes les étapes suivantes ont été réalisées à température ambiante. L'autofluorescence est éliminée durant 15 min avec du NH₄Cl (50 mM dans du PBS) et les cellules sont incubées avec les *anti-rabbit IgG, F(ab')₂ Fragments* (Alexa Fluor 647 Conjugate ; 1:1000) durant 1 h à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées et les *coverslips* sont montés sur une lame porte-objet (Marienfeld, Germany) avec du *ProLong Gold Artificial* contenant du DAPI (Thermo Fischer Scientific/Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA). L'acquisition des images est réalisée en utilisant un microscope confocal (Nikon A1R).

5.1.4.3 Lignées stables

Des cellules humaines embryonnaires de rein 293 (HEK293) sont transfectées avec le kit X-Tremegne 9 3-1 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Le vecteur d'expression (un mélange de 2,5 µg de pcDNA3,1.Myc-GluA₂(Q) ou de pcDNA3,1.Myc-GluKa2 et 7,5 µL d'X-Tremegne 9 dans un tampon optiMEM) est ajouté sur un *dish* de 50 mm presque confluent de cellules HEK293. Le jour suivant,

l'antibiotique de sélection G418 (700 µg/mL) est ajouté au milieu de culture.

5.1.4.4 Test fluorimétrique AMPA

Les cellules HEK ou de la lignée exprimant le récepteur GluA_{2o}(Q) sont cultivées en routine dans du DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) contenant 10 % de sérum fœtal bovin (FBS). Les mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées sur un lecteur de microplaques fluorescent Fluoroskan Ascent FT équipé de deux injecteurs (Thermo Electron Corporation, Finland). Après passage à la trypsine, les cellules sont lavées avec de la *Hanks balanced salt solution* (HBS, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4) et incubées 1 h avec le colorant fluorescent Fluo-4/AM (5 µg/mL ; Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Belgium) à 37 °C. Ensuite, les cellules sont rincées par deux fois avec du HBS, puis reprises dans du HBS en suspension homogène. Cette suspension est dispersée en échantillons de 100 µL dans chaque puits d'une plaque 96 puits (densité de 150 000 cellules/puits) précédemment chargée avec les composés à évaluer aux diverses concentrations (de 3×10^{-8} M à 10^{-4} M, avec une concentration maximale en DMSO = 1 %). Après agitation de la plaque durant 30 s à 1200 rpm, l'émission de fluorescence est lue à 538 nm après excitation à 485 nm durant 500 ms par mesure, donnant le niveau de base. Ensuite, la fluorescence est lue après une injection d'une solution véhicule (PBS) ou d'une solution de glutamate 10 mM (10 µL). Une dernière mesure est prise après 15 s d'agitation à 1200 rpm. Les résultats (EC₅₀) sont la concentration requise pour atteindre la moitié de l'intensité maximale calculée par régression non linéaire (GraphPad Prism software, v. 5,0c Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California) sur un lot de données prises en triplicata de triplicata. Les points des graphiques

représentent l'émission moyenne de fluorescence exprimée comme moyenne +/- SEM.

5.1.4.5 Test fluorimétrique kainate

Les cellules HEK ou de la lignée exprimant le récepteur GluK2_o(Q) sont cultivées en routine dans du DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) contenant 10 % de sérum fœtal bovin (FBS). Les mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées sur un lecteur de microplaques fluorescent Fluoroskan Ascent FT équipé de deux injecteurs (Thermo Electron Corporation, Finland). Après traitement à la trypsine, les cellules sont lavées avec de la *Hanks balanced salt solution* (HBS, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4) et incubées 1 h avec le colorant fluorescent Fluo-4/AM (5 µg/mL ; Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Belgium) à 37 °C. Ensuite, les cellules sont rincées par deux fois avec du HBS, puis reprises dans le HBS en suspension homogène. Cette suspension est dispersée en échantillons de 100µL dans chaque puits d'une plaque 96 puits (densité de 150 000 cellules/puits) précédemment chargée avec les composés à évaluer à des concentrations diverses (de 10⁻⁶ M à 10⁻⁴ M, avec une concentration maximale en DMSO = 1 %). Après agitation de la plaque durant 30 s à 1200 rpm, l'émission de fluorescence est lue à 538 nm après excitation à 485 nm durant 500 ms, par mesure immédiatement après une injection de solution véhicule (PBS) ou d'une solution de glutamate 10 mM (10 µL, concentration finale 1 mM). Les résultats (EC₅₀) pour le (64) sont obtenus de manière analogue au test AMPA (GraphPad Prism software, v. 5,0c Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California). Pour le *screening*, les différents composés sont évalués à des concentrations de 10⁻⁶ M jusqu'à 10⁻⁴ M. Le résultat est considéré comme positif si un profil cinétique en cloche est observé de manière analogue au

contrôle interne de (64) (évalué entre 10^{-5} et 10^{-3} M). Le *screening* est réalisé en triplet de doublet.

5.1.4.6 Patch-clamp

5.1.4.6.1 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK293 (European Collection of Cell Cultures, Public Health England, Salisbury, UK) furent cotransfectées selon le kit Effectene (QIAGEN, Hilden, Germany) avec la protéine fluorescente verte (GFP) et GluA2_i(Q), GluA3_i, ou GluA4_i dans un rapport de cDNA de 1:5. Les cellules furent utilisées 3 jours après transfection. Après être traitées à la trypsine, elles ont été placées sur des disques traités à la polylysine le matin de l'expérience (6 h avant manipulation au minimum) [Larsen, 2017].

5.1.4.6.2 Électrophysiologie

Les disques porteurs des cellules ont été placés dans la chambre d'expérience perfusée, à température ambiante, avec une solution de HBS (145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, ajusté à 310 mOsm/L et pH 7,4 avec du NaOH). Les pipettes d'enregistrement (résistance 3-6 MΩ) ont été remplies avec un milieu intracellulaire (120 mM CsCH₃SO₃, 2 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, et 4 mM Na₂ATP, ajusté à 300 mOsm/L et pH 7,2 avec du CsOH) réalisé le jour même. Des cellules isolées et fortement fluorescentes ont été choisies pour l'enregistrement. Le potentiel membranaire a été maintenu entre -80 mV et -20 mV pour des enregistrements « cellule entière » (*whole-cells*). Les cellules ainsi attachées ont été placées dans le flux d'un tube thêta monté sur un bras piézoélectrique (P-245,50 and E-470 amplifieur; Polytec PI, France). La

capacitance membranaire et la résistance en série ont été compensées à 80 %. Les mesures de contrôle ont alors été prises en l'absence de modulateur (HBS et glutamate). Le modulateur (**64**) a ensuite été ajouté aux deux flux, et l'enregistrement a été fait après 5 minutes d'équilibrage. La solution de modulateur était préparée le jour même au départ d'une solution mère de 1 M dans le DMSO. Deux types de courant glutamatergique ont été étudiés, les applications courtes (1 ms) et longues (800 ms) de glutamate à une concentration de 1 mM. Les séries d'enregistrement étaient espacées de 30 s, filtrées à 2,9 kHz et échantillonnées avec une fréquence de 20 Hz par un amplificateur EPC9 (HEKA Elektronik Dr Schulze GmbH, Ludwigshafen/Rhein, Germany).

5.1.4.6.3 Analyse de données

IGOR Pro (v. 6,22A, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon) a été utilisé pour l'analyse des traces. La ligne de base était corrigée manuellement pour chaque trace. L'amplitude du courant était mesurée sur la moyenne de cinq traces stables d'une même cellule en utilisant les fonctions internes du programme.

GraphPad Prism (v. 5,0c Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California) a été utilisé pour l'analyse statistique. Le test ANOVA avec le post-test de Bonferroni a été utilisé pour évaluer les différences d'effet du modulateur (**64**) sur les différents sous-types de récepteurs, tant sur la désactivation que sur la désensibilisation, avec comme légende : *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$. Les données sont représentées sous forme de moyenne +/- SEM.

Chapitre 6

Références

- Acher F.C., Metabotropic Glutamate Receptors, *Tocris bioscience scientific review service* **2006**.
- Adler L.A., Kroon R.A., Stein M., Sahid M., Tarazi F.I., Szegedi A., Schipper J. and Cazorla P. A translational approach to evaluate the efficacy and safety of the novel AMPA receptor positive allosteric modulator Org 26576 in adult attention-deficit/ hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* **2012**; 72 : 971-7.
- Alt A., Nisenbaum E.S., Bleakman D. and Witkin J.M. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol* **2006**; 71 : 1273-88.
- Anggono V. and Haganir R.L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol* **2012**; 22 : 461-469.
- Arai A.C. and Lynch G. The waveform of synaptic transmission at hippocampal synapses is not determined by AMPA receptor desensitization, *Brain Res.* **1998** ; 799 : 230-234.
- Arai A.C. and Kessler M. Pharmacology of ampkine modulators: from AMPA receptors to synapses and behavior, *Curr Drug Targets* **2007** ; 583-602.
- Arai A.C., Xia Y.F., Kessler M., Phillips D., Chamberlin R., Granger R., Lynch G. Effects of 5 alkyl-benzothiadiazides on (R,S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor biophysics and synaptic responses, *Mol. Pharmacol.* **2002** ; 62 : 566-577.
- Armstrong N., Sun Y., Chen G.Q. and Gouaux E. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* **1998** ; 395 : 913-917.
- Armstrong N. and Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* **2000** ; 28 : 165-181.
- Ashby M.C., Maier S.R., Nishimune A. and Henley J.M. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J. Neurosci.* **2006** ; 26 : 7046-7055.
- Ayalon, G. and Stern-Bach Y. Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* **2001** ; 31 : 103-113.
- Ayalon G., Segev E., Elgavish S. and Stern-Bach Y. Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J. Biol. Chem.* **2005** ; 280 : 15053-15060.
- Bae S., Mah H., Chaturvedi S., Musafia Jeknic T., Baird W. M., Katz A. K., Carrell H. L., Glusker J. P., Okazaki T., Laali K. K., Zajc B. and Lakshman M. K. Synthetic, Crystallographic, Computational, and Biological Studies of 1,4-Difluorobenzo[c]phenanthrene and Its Metabolites. *J. Org. Chem.* **2007**; 72 : 7625-7633.
- Barco A., Alarcon J.M. and Kandel E.R. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* **2002** ; 108 : 689.

- Barder T. E., and Buchwald S. L. Efficient Catalyst for the Suzuki–Miyaura Coupling of Potassium Aryl Trifluoroborates with Aryl Chlorides. *Organic Letters* **2004** ; 6(16) : 2649-2652.
- Barnard E.A., Miledi R. and Sumikawa K. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors induces functional receptor in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* **1982** ; 215 : 241-246.
- Barria A., Derkach V. and Soderling T. Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* **1997a** ; 272(32): 727-30.
- Barria A., Muller D., Derkach V., Griffith L.C. and Soderling T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* **1997b** ; 276 : 2042-45.
- Barria, A., and Malinow, R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* **2005** ; 48 : 289-301.
- Barry M.F. and Ziff E.B. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002** ; 12 : 279-286.
- Bats C., Groc L. and Choquet D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* **2007** ; 53 : 719–734.
- Beal M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *The FASEB* **1992** ; 3338–361.
- Bear M.F., Connors B.W. and Paradisio M.A. Neuroscience Exploring the Brain. *Lippincott Williams and Wilkins* **2006** ; 3e édition
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate in rat hippocampus during transient cerebral ischaemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **1984** ; 43: 1369– 1374.
- Bergmann K.E., Wooge C.H., Carlson K.E., Katzenellenbogen B.S. and Katzenellenbogen J.A. Bivalent ligands as probes of estrogen receptor action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994** ; 49 : 139-52.
- Bérubé G. Natural and Synthetic Biologically Active Dimeric Molecules: Anticancer Agents, Anti-HIV Agents, Steroid Derivatives and Opioid Antagonists. *Current Medicinal Chemistry* **2005** ; 131-154.
- Bérubé, G., Rabouin, D., Perron, V., N’Zemba, B., Gaudreault, R.-C., Parent, S., and Asselin, É. Synthesis of unique 17β-estradiol homo-dimers, estrogen receptors binding affinity evaluation and cytotoxic activity on breast, intestinal and skin cancer cell lines. *Steroids*, **2006** ; 71(10) : 911-921.
- Birnbaumer L., Campbell K.P., Catterall W.A., Harpold M.M., Hofmann F., Horne W. A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T. and Tsien, R. W. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **1994** ; 13 : 505-506.

- Bjerrum E.J., Kristensen A.S., Pickering D.S., Greenwood J.R., Nielsen B., Liljefors T., Schousboe A., Bräuner-Osborne H. and Madsen U Design, synthesis, and pharmacology of a highly subtype-selective GluR1/2 agonist, (RS)-2-amino-3-(4-chloro-3-hydroxy-5-isoxazolyl)propionic acid (Cl-HIBO). *J. Med. Chem.* **2003** ; 46 : 2246-2249.
- Blanton M.G., Loturco J.J. and Kriegstein A.R. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Methods.* **1989** ; 30 : 203-210.
- Bochet P., Audinat E., Lambolez B., Crepel F., Rossier J., Iino M., Tsuzuki K., Ozawa S. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of glutamate-gated channel. *Neuron* **1994**; 12 : 383-388.
- Borgdorff A.J. and Choquet D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **2002** ; 417 : 649-653.
- Bove G.M. and Moskowitz M.A. Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J. Neurophysiol.* **1997** ; 77 : 299-308
- Bramham C.R. and Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* **2005** ; 76 : 99-126
- Brain S.D. and Cox H.M. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **2006** ; 147 : S202-S211
- Bredt D. S. and Nicoll R. A. AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron* **2003** ; 40 : 361-379.
- Bresink I., Ebert B., Parsons C.G. and Mutschler E. Zinc changes AMPA receptor properties: Results of binding studies and patch clamp recordings. *Neuropharmacology* **1996** ; 35(4) : 503-509.
- Butters M., Harvey J.N., Jover J., Lennox A.J.J., Lloyd-Jones G.C. and Murray, P. M. Aryl Trifluoroborates in Suzuki-Miyaura Coupling: The Roles of Endogenous Aryl Boronic Acid and Fluoride. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010** ; 49(30) : 5156-5160.
- Carroll R.C., Lissin D.V., von Zastrow M., Nicoll R.A. and Malenka, R.C. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat. Neurosci.* **1999** ; 2 : 454-460.
- Carroll R.C., Beattie E.C., von Zastrow M. and Malenka R.C. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001** ; 2 : 315-324.
- Chatterjee A.K., Choi T.-L., Sanders D. P. and Grubbs R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *Journal of the American Chemical Society* **2003** ; 125(37) : 11360-11370.
- Chen L., Chetkovich D.M., Petralia R.S., Sweeney N.T., Kawasaki Y., Wenthold R.J., Bredt D.S., Nicoll R.A. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **2000** ; 408 : 936-943.
- Chen L.W., Yung, K.K.L., and Chan, Y.S. Co-localization of NMDA receptors and AMPA receptors in neurons of the vestibular nuclei of rats. *Brain Research* **2000** ; 884(1) : 87-97.

- Choquet, D. Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience* **2010** ; 32(2) : 250-260.
- Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* **1985**; 58: 293–297.
- Citti, C., Battisti, U. M., Cannazza, G., Jozwiak, K., Stasiak, N., Puja, G., Ravazzini F., Ciccarella G., Daniela Braghiroli D., Parenti C., Troisi L. and Zoli M. 7-Chloro-5-(furan-3-yl)-3-methyl-4H-benzo[e][1,2,4]thiadiazine 1,1-Dioxide as Positive Allosteric Modulator of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor. The End of the Unsaturated-Inactive Paradigm? *ACS Chemical Neuroscience*, **2016** ; 7(2): 149-160.
- Clayden J. Organic chemistry. *Oxford: Oxford University Press.* **2001** ; 276-296.
- Clayton A., Siebold C., Gilbert R.J., Sutton G.C., Harlos K., McIlhinney R.A., Jones E.Y. and Aricescu A.R. Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J. Mol. Biol.* **2009** ; 392 : 1125-1132.
- Coleman P.A. and Miller, R.F., Measurements of passive membrane parameters with wholecell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.* **1989** ; 61 : 218-230.
- Collingridge G.L., Isaac J.T. and Wang, Y.T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004** ; 5 : 952-962.
- Danieli B., Lesma G., Passarella D., Sacchetti A., Silvani A. and Viridis A. Total Enantioselective Synthesis of (–)-Cytisine. *Org. Lett.* **2004** ; 6 (4) : 493-496.
- de Tullio P., Pirotte B., Dupont L., Masereel B., Laeckmann D., Podona T., Diouf O., Lebrun P. and Delarge J. Synthesis and Structural Studies of a New Class of Heterocyclic Compounds: 1,2,4-Pyridothiadiazine 1,1-Dioxydes, Pyridyl Analogues of 1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides. *Tetrahedron* **1995** ; 51(11) : 3221-3234.
- Defelipe J., Lopez-Cruz P.L., Benavides-Piccione R., Bielza C., Larranaga P., Anderson S., Burkhalter A., Cauli B., Fairen A., Feldmeyer D., Fishell G., Fitzpatrick D., Freund T.F., Gonzalez-Burgos G., Hestrin S., Hill S., Hof P.R., Huang J., Jones E.G., Kawaguchi Y., Kisvarday Z., Kubota Y., Lewis D.A., Marin O., Markram H., McBain C.J., Meyer H.S., Monyer H., Nelson S.B., Rockland K., Rossier J., Rubenstein J.L., Rudy B., Scanziani M., Shepherd G.M., Sherwood C.C., Staiger J.F., Tamas G., Thomson A., Wang Y., Yuste R. and Ascoli G.A. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* **2013** ; 14 : 202–216
- Delvigs P., Klopotek D.L. and Hardy-Green D. High Performance Polymers. *High Performance Polymers*, **2001** 13(4) : 301-312.
- Deng W., Neve R.L., Rosenberg P.A., Volpe J.J., and Jensen F.E. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit composition and cAMP-response element-binding protein regulate oligodendrocyte excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2006** ; 281(47): 36004–36011.

- Desos P., Cordi, A. and Lestage, P. Derivatives of benzothiazine and benzothiadiazine, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them as AMPA receptor modulators. *European Patent Application* **2004** EP 1486502 A1.
- Desos P., Cordi, A., Lestage, P. and Danober, L. Derivatives of benzothiazine and benzothiadiazine, process for their preparation, and pharmaceutical compositions containing them as AMPA receptor modulators. *European Patent Application* **2006** EP 1669072 A1.
- Dicou E., Rangon C.M., Guimiot F., Spedding M., Gressens P. Positive allosteric modulators of AMPA receptors are neuroprotective against lesions induced by an NMDA agonist in neonatal mouse brain. *Brain Research* **2003** ; 970 : 221-232.
- Doble A. The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy. *Pharmacol Ther* **1999** ; 81(3): 163–221.
- Drapier T., Geubelle P., Bouckaert C., Nielsen L., Laulumaa S., Goffin E., Dilly S., Francotte P., Hanson J., Pochet L., Kastrup J.S. and Pirotte B. Enhancing action of positive allosteric modulators through the design of dimeric compounds: successful application to ionotropic glutamate receptors *J. Med. Chem.* **2018** Just accepted
- Drapier T. Synthèse de précurseurs de ligands dimères de type benzothiadiazine dioxyde à haute affinité pour le récepteur AMPA Mémoire de Master en Sciences chimique ULg **2013**. <http://hdl.handle.net/2268/228497>
- Dreixler J. C. and Leonard, J. P. Effects of external calcium on zinc modulation of AMPA receptors. *Brain Research*, **1997** ; 752(1) : 170-174.
- Edwards F.A., Konnerth A., Sakmann B., Takahashi T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* **1989** ; 414 : 600-612.
- Ehlers M.D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **2000** ; 28 : 511-25.
- Engel J., Smit W., Foscatto M., Occhipinti G., Törnroos K.W. and Jensen, V.R. Loss and Reformation of Ruthenium Alkylidene: Connecting Olefin Metathesis, Catalyst Deactivation, Regeneration, and Isomerization. *Journal of the American Chemical Society* **2017** ; 139(46) : 16609-16619.
- Everts I., Villmann C. and Hollmann M. N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol.* **1997** ; 52 : 861-873.
- Faucher A.-M., Murray D., Bailey P., Beaulieu L., Brochu C., Duceppe J.-S., Ferland J.-M., Ghirelli E., Gorys V., Halmos T., Kawai S.H., Poirier M., Simoneau B., Tsantrizos Y.S. and Llinas-Brunet M. Synthesis of BILN 2061, an HCV NS3 Protease Inhibitor with Proven Antiviral Effect in Humans. *Org. Lett.* **2004** ; 6(17) : 2901-2904
- Fisher E.L., Rosenkranz R.P., Clark, D.,R., Muchowski, J. M., McClelland, D. L. and Michel, A. N,N-6-bis-[2-(3,4 Dihydroxybenzyl)pyrrolidinyl]hexan, a potent, selective, orally active dopamine analog with hypotensive and diuretic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1995** ; 5 : 2371-2376.

- Folk E.G.Jr. and Long J.P. Serotonine as a neurotransmitter: a review. *Comp. Biochem. Physiol.* **1988** ; 91c (1) 251-257
- Francotte P., de Tullio P., Goffin E., Dintilhac G., Graindorge E., Fraikin P., Lestage P., Danober L., Thomas J-Y., Caignard D.-H. and Pirotte B. Design, Synthesis and Pharmacology of Novel 7-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors. *J. Med. Chem.* **2007** ; 50 : 3153-3157.
- Francotte P., de Tullio P., Podona T., Diouf O., Fraikin P., Lestage P., Danober L., Thomas J-Y., Caignard D.-H. and Pirotte B. Synthesis and pharmacological evaluation of a second generation of pyridothiadiazine 1,1-dioxides acting as AMPA potentiators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008** ; 16(23) : 9948-9956.
- Francotte P., de Tullio P., Pirotte B., Danobert L. et Caignard D.-H. Nouveaux dérivés de benzothiadiazines cycloalkylées, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent. *Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle* **2009**; WO2010/004139 A1.
- Francotte P., Goffin E., Fraikin P., Lestage P., Van Heugen J.-C., Gillotin F., Danober L., Thomas J-Y., Caignard D.-H., Pirotte B. and de Tullio P. New Fluorinated 1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxides: Discovery of an Orally Active Cognitive Enhancer Acting through Potentiation of the 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic Acid Receptors. *J. Med. Chem.* **2010** ; 53(4) : 1700-1711.
- Francotte P., Nørholm A.B., Deva T., Olsen L., Frydenvang K., Goffin E., Fraikin P., de Tullio P., Challal, S., Thomas J. Y., Iop F., Louis C.; Botez-Pop I., Lestage P., Danober L., Kastrop J. S. and Pirotte, B. Positive allosteric modulators of 2-amino-3-(3-hydroxy-5- methylisoxazol-4-yl)propionic acid receptors belonging to 4-cyclo- propyl-3,4-dihydro-2h-1,2,4-pyridothiadiazine dioxides and diversely chloro-substituted 4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2014** ; 57 : 9539-9553.
- Freeman J.H. and Wagner E.C. 1,2,4-benzothiadiazike dooxides and 3,4-dihydro-1,2,4 benzothiadiazine dioxides *J. Org. Chem.* **1951** ; 16: 815-837 .
- Frischknecht R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D. & Gundelfinger, E.D. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **2009** ; 12 : 897-904.
- Gahwiler B.H., Organotypic cultures of neural tissue. *Trends Neurosci.* **1988** ; 11 : 484-489.
- Garner C.C., Nash, J. and Haganir R.L. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* **2000** ; 10 : 274-280.
- Gates M., Ogden, A. and Bleakman, D. Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology* **2001** ; 40 : 984-996.
- Geiger J.R.P., Melcher T., Koh D.-S., Sakmann B., Seeborg P.H., Jonas P. and Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **1995**; 15 : 193-204.

- Gerges N.Z., Backos D.S. and Esteban J.A. Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family. *J Biol Chem* **2004** ; 279 : 43870-43878.
- Gill A., Birdsey-Benson A., Jones B.L., Henderson L.P. and Madden D.R. Correlating AMPA receptor activation and cleft closure across subunits: crystal structures of the GluR4 ligand-binding domain in complex with full and partial agonists. *Biochemistry* **2008** ; 47 : 13831-13841.
- Gill M.B., Vivithanaporn P. and Swanson G.T. Glutamate binding and conformational flexibility of ligand-binding domains are critical early determinants of efficient kainate receptor biogenesis. *J. Biol. Chem.* **2009** ; 284 : 14503-14512.
- Girard Y., Atkinson J.G. and Rokach J. A new synthesis of 1,2,4- benzothiadiazines and a selective preparation of o- aminobenzenesulfonamides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1979** ; 4 : 1043.
- Glaxo Group Limited, Bradley D.M., Thewlis K.M. and Ward S.E. Compounds which potentiate glutamate receptor and uses thereof in medicine. *PCT International Application* **2006**; WO015828
- Glaxo Group Limited, Cooper D.G., Forbes I.T., Garzya V., Walker G. and Wyman P.A. 1-(Piperidin-4- Yl)Benzimidazol-2-Ones As Muscarinic M1 Receptor Agonists, Their Preparation, Pharmaceutical Compositions, And Use In Therapy *PCT International Application* **2008**; WO 2008-EP53600.
- Goff D.C., Leahy L. and Berman I. A placebo-controlled pilot study of the ampakine CX516 added to clozapine in schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2001**; 21 : 484-487.
- Goffin E., Drapier, T., Larsen A.P., Geubelle P., Ptak C. P., Laulumaa S., Rovinskaja K., Gilissen J., de Tullio P., Olsen L., Frydenvang K., Pirote B., Hanson J., Oswald R.E., Kastrup J. S. and Francotte P. 7-Phenoxy-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors with Nanomolar Potency. *J. Med. Chem.* **2018** ; 61(1) : 251-264.
- Gong L.W. and De Camilli P. Regulation of postsynaptic AMPA responses by synaptojanin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008** ; 105 : 17561-17566.
- Gouliaev A.H., Larsen M., Varming T., Mathiesen C., Johansen T.H., Nielsen K.S., Hartz B., Scheel-Krueger J. Preparation of benzothiazine derivatives as modulators of AMPA sensitive glutamate receptors for treatment of CNS disorders. *PCT International Application*, **2003** WO 2003031422 A1.
- Gouliaev A.H., Larsen M., Varming, T., Mathiesen C., Johansen T.H., Scheel-Krueger J., Olsen G.M., Nielsen E.O. Preparation of benzothiadiazines, quinazolines, and other aryl-fused heterocycles as positive AMPA-receptor modulators for treatment of memory and learning disorders. *PCT International Application*, **1999** ; WO 9942456 A2.
- Graindorge E., Francotte P. et Boverie S. Les Laboratoires Servier. Novel thiadiazine derivatives useful as AMPA receptor modulators, preparation method, and pharmaceutical compositions containing them. FR2854634; **2004**

- Greer A., Wauchope O.R., Farina N.S., Haberfield P., and Liebman J.F. Paradigms and paradoxes: Mechanisms for possible enhanced biological activity of bilaterally symmetrical chemicals. *Structural Chemistry*, **2006** ; 17(4) : 347-350.
- Greger I.H., Khatri L., Kong X., and Ziff E.B. AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* **2003** ; 40 : 763-774
- Greger I.H., Ziff E.B. and Penn A.C. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in Neurosciences* **2007** ; 30(8) : 407-416.
- Greger, I.H. and Esteban, J.A. AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Op. Neurobiology*, **2007** ; 17(3) : 289-297.
- Gujral S.S., Khatri S., Riyal P., and Gahlot V. Suzuki Cross Coupling Reaction- A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Chemistry* **2016** ; 351-367.
- Gundelfinger E.D., Frischknecht, R., Choquet D. and Heine M. Converting juvenile into adult plasticity - a role for the brain's extracellular matrix. *Eur. J. Neurosci.* **2010** ; 31 : 2156-2165.
- Gundersen V., Chaudry F.A., Bjaalie J.G., Fonnum F., Ottersen O.-P. and Storm-Mathisen J. Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **1998** ; 18: 6059-6070.
- Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R., Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **1971** ; 233 : 177-182.
- Halazy, S. G-protein coupled receptors bivalent ligands and drug design. *Expert Opin. Thera. Patents*, **1999**, 9(4) : 431-446.
- Halgren, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17 : 490-519.
- Halt A.R., Dallapiazza R.F., Zhou Y., Stein I.S., Qian H., Juntti S., Wojcik S., Brose N., Silva A.J., and Hell J.W. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J.* **2012** ; 31 : 1203-1216.
- Hamberger A. C., Chiang G. H., Nysten E. S., Sche S. W. and Cotman, C. W. Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* **1979** ; 168 : 513-530.
- Hanson J., Dogné J.-M., Ghiotto J., Moray A.-L., Kinsella B. T. and Pirotte, B. Design, Synthesis, and SAR Study of a Series of N-Alkyl- N'-[2-(aryloxy)-5-nitrobenzenesulfonyl]ureas and -cyanoguanidine as Selective Antagonists of the TP α and TP β Isoforms of the Human Thromboxane A₂ Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007** ; 50(16) : 3928-3936.
- Hargittai, I. and Hargittai, M. Symmetry through the eyes of a chemist, VCH Publishers, **1987**.
- Harms J. E., Benveniste M., Maclean J.K.F., Partin, K.M. and Jamieson C. Functional analysis of a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors derived from a structure-based drug design strategy. *Neuropharmacology* **2013** ; 64(C) : 45-52.

- Harpsoe K., Liljefors T., Balle T. Prediction of the binding mode of biarylpropylsulfonamide allosteric AMPA receptor modulators based on docking, GRID molecular interaction fields and 3D-QSAR analysis. *Journal of molecular graphics & modelling* **2008**, 26 : 874.
- Harpsoe K., Varming, T., Gouliaev A.H., Peters D., Liljefors T. Identification of a putative binding site for 5-alkyl-benzothiadiazides in the AMPA receptor dimer interface. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, **2007** ; 26 : 213.
- Hayashi, T. *The Keio Journal of Medicine*. **1954** ; 3: 183
- Hayashi T., Rumbaugh G. and Huganir, R.L. Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* **2005** ; 47 : 709-723.
- Hayashi Y., Shi S.H., Esteban J.A., Piccini A., Poncer J.C. and Malinow R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **2000** ; 287 : 2262-2267
- Heindel N., Ko H., Birrer R., Merkel J. Antibacterial activity of o-amino-N-hydroxybenzenesulfonamides. *J. Med. Chem.* **1971** ; 15 : 118.
- Hestrin S., Nicoll R.A., Perkel D.J. and Sah P. Analysis of excitatory synaptic action in the rat hippocampus using whole cell recording from thin slices. *J. Physiol.* **1990** ; 422 : 203-225.
- Heynen A.J., Quinlan E.M., Bae D.C. and Bear M.F. Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* **2000** ; 28 : 527-536.
- Hollmann M., and Heinemann S. Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience* **1994**, 17(1) : 31-108.
- Hong S.H., Sanders D.P., Lee C.W. and Grubbs, R.H. Prevention of Undesirable Isomerization during Olefin Metathesis. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127(49) : 17160-17161.
- Huganir R. L. and Nicoll, R.A. AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron* **2013** ; 80(3) : 704-717.
- Hussain I., Capricho J. and Yawer M. A. Synthesis of Biaryls via Ligand-Free Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions: A Review of Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Developments. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2016** ; 358(21) : 3320-3349.
- Jaskolski F. and Henley J.M. Synaptic receptor trafficking: the lateral point of view. *Neuroscience* **2009** ; 158 : 19-24.
- Jaskolski F., Mayo-Martin B., Jane D. and Henley J.M. Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines. *J. Biol. Chem.* **2009** ; 284 : 12491-12503.
- Jencks W.P. On the attribution and additivity of binding energies. *PNAS* **1981**, 78(7) : 4046-4050.
- Jin R., Horning M., Mayer, M.L. and Gouaux E. Mechanism of activation and selectivity in a ligand-gated ion channel: structural and functional studies of GluR2 and quisqualate. *Biochem* **2002** ; 41 : 15635-15643.

- Jin R., Banke T.G., Mayer M.L., Traynelis S.F. and Gouaux E. Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature Neuroscience*, **2003** ; 803–810.
- Jin R., Singh S.K., Gu S., Furukawa H., Sobolevsky A.I., Zhou J., Jin Y., and Gouaux E. Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *EMBO J* **2009** ; 28 : 1812-1823.
- Jin R.S., Clark S., Weeks A.M., Dudman J.T., Gouaux E., Partin K.M. Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors, *Journal of Neuroscience* **2005** ; 25 : 9027.
- Joffre M., *Electrophysilogie moléculaire Tome 1. « La technique du patch clamp »* **2001** Hermann.
- Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* **1994** ; 12 : 1281-1289.
- Jones G., Willett, P., Glen R.C., Leach A.R. and Taylor R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997** ; 267 : 727-748.
- Kao J.P.Y., Harootunian A.T. and Tsien R.Y. Photochemically Generated Cytosolic CalciumPulses and Their Detection by Fluo-3* *Journal of Biological Chemistry* **1989** ; 264 : (14), 8179-8184.
- Kaae B.H., Harpsøe K., Kastrup J.S., Sanz A.C., Pickering D.S., Metzler B., Clausen R.P., Gajhede M., Sauerberg P., Liljefors T. and Madsen U. Structural Proof of a Dimeric Positive Modulator Bridging Two Identical AMPA Receptor-Binding Sites. *Chemistry & Biology* **2007** ; 14(11) : 1294-1303.
- Kameyama K., Lee H.K., Bear M.F. and Huganir R.L. Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* **1998** ; 21 : 1163-1175.
- Kataoka, Y, Morii, H., Watanabe, Y. and Ohmori H. A postsynaptic excitatory amino acid transporter with chloride conductance functionally regulated by neuronal activity in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* **1997** ; 17: 7017- 7024.
- Keinänen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P.H. A family of AMPA selective glutamate receptors. *Science* **1990** ; 249 : 556-590.
- Kennedy, M. B. Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: Long-term potentiation. *Cell* **1989** ; 59(5) : 777-787.
- Kessels H.W., and Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **2009** ; 61 : 340-350.
- Kessler M., Arai A., Quan A. and Lynch G. Effect of cyclothiazide on binding properties of AMPA-type glutamate receptors: lack of competition between cyclothiazide and GYKI 52466, *Mol. Pharmacol.* **1996** ; 49 : 123-131.
- Kew J.N.C. and Kemp J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **2005** ; 179(1) : 4-29.

- Korb O., Stützle T. and Exner T.E Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009** ; 49: 84–96
- Krafte D. and Lester H.A. Expression of functional sodium channels in stage II-III *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci. Meth.* **1989** ; 26 : 211-215.
- Kramar E.A., Lin B., Lin C.-Y., Arai A.C., Gall C.M. and Lynch G. A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* **2004** ; 24, 5151-5161.
- Krintel, C., Frydenvang K., Olsen L., Kristensen M. T., de Barrios O., Naur P., Francotte P., Pirotte B., Gajhede, M., Kastrup J.S. Thermodynamics and Structural Analysis of Positive Allosteric Modulation of the Ionotropic Glutamate Receptor GluA2. *Biochem. J.* **2012** ; 441 : 173-178.
- Krintel C., Francotte P., Pickering D.S., Juknaitė L., Pøhlsgaard J., Olsen L., Frydenvang K., Goffin E., Pirotte B. and Kastrup J.S.). Enthalpy-Entropy Compensation in the Binding of Modulators at Ionotropic Glutamate Receptor GluA2. *Biophysical Journal* **2016** ; 110(11) : 2397-2406.
- Kristensen W.B., Noraberg J. and Zimmer J. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research* **2001** ; 21–44.
- Krogsgaard-Larsen, P., Honore, T., Hansen, J. J., Curtis, D.R. et Lodge, D. New class of glutamateagonist structurally related to ibotenic acid. *Nature* **1980** ; 284: 64.
- Kumar J., Schuck P., Jin R. and Mayer M.L. The N-terminal domain of GluR6- subtype glutamate receptor ion channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009** ; 16 : 631-638.
- Kuusinen A., Abele R., Madden D.R., and Keinanen K. Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *J. Biol. Chem.* **1999** ; 274 : 28937-28943.
- Larsen A.P., Fievre S., Frydenvang K., Francotte P., Pirotte B., Karstrup J.S., and Mülle C. Identification and structure-function study of positive allosteric modulators of kainate receptors. *Molecular Pharmacology mol.* **2017** ; 116 : 107599.
- Larsen A.P., Francotte P., Frydenvang K., Tapken D., Goffin E., Fraikin P., Caignard D.-H., Lestage P., Danober L., Pirotte B. and Kastrup J.S. Synthesis and Pharmacology of Mono-, Di-, and Trialkyl-Substituted 7-Chloro-3,4-dihydro-2 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides Combined with X-ray Structure Analysis to Understand the Unexpected Structure-Activity Relationship at AMPA Receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, **2016** ; 7(3) : 378-390.
- Laue T. and Plagens A. Named Organic Chemistry *John Wiley & Sons, Ltd* **2005** ; 2e édition
- Laulumaa S., Voigt Hansen K., Masternak M., Drapier T., Francotte P., Pirotte B., Frydenvang K. and Kastrup J.S. Crystal structures of potent dimeric positive allosteric modulators at the ligand-binding domain of the GluA2 receptor. *ACS J. Med. Chem. Letters*, **2018** ; Just submitted

- Lebrun C., Pilliere E. and Lestage P. Effects of S 18986-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats. *European Journal of Pharmacology* **2000** ; 401: 205.
- Lee H.K., Kameyama K., Huganir R.L. and Bear, M.F. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* **1998** ; 21, 1151-1162.
- Lee H.K., Barbarosie M., Kameyama K., Bear M.F. and Huganir, R.L. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **2000** ; 405 : 955-959.
- Lee S.H., Liu L., Wang Y. T. and Sheng, M. Clathrin Adaptor AP2 and NSF Interact with Overlapping Sites of GluR2 and Play Distinct Roles in AMPA Receptor Trafficking and Hippocampal LTD. *Neuron* **2002** ; 36(4) : 661-674.
- Lee S.J., Escobedo-Lozoya Y., Szatmari E.M. and Yasuda, R. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **2009** ; 458 : 299-304.
- Lehre K.P. and Danbolt N.C., “ The number of glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain,” *Journal of Neuroscience* **1998** ; 18(21) : 8751-8757.
- Lennox A.J.J. and Lloyd-Jones G.C. Organotrifluoroborate Hydrolysis: Boronic Acid Release Mechanism and an Acid-Base Paradox in Cross-Coupling. *Journal of the American Chemical Society* **2012** ; 134(17) : 7431-7441.
- Leuschner W.D. and Hoch, W. Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their N-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **1999** ; 274 : 16907-16916.
- Levy L. M., Warr O. and Attwell, D. Transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* **1998** ; 19 : 9620-9628.
- Lin D.T. and Huganir R.L. PICK1 and phosphorylation of the glutamate receptor 2 (GluR2) AMPA receptor subunit regulates GluR2 recycling after NMDA receptor-induced internalization. *J. Neurosci.* **2007** ; 27 : 13903-13908.
- Liniger M., Liu Y. and Stoltz, B. M. Sequential Ruthenium Catalysis for Olefin Isomerization and Oxidation: Application to the Synthesis of Unusual Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*, **2017**; 139(39) : 13944-13949.
- Lipowski A. W. Cooperative reinforcement of opioid pharmacophores *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1987**; 39 : 585-596.
- Lisman J., Yasuda R. and Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012** ; 13 : 169-182.
- Liu Y., Wong T. P., Aarts M., Rooyackers A., Liu L. and Lai T. W. NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *Journal of Neuroscience*, **2007** ; 27(11) : 2846-2857.

- Lockhart B., Iop F., Closier M. and Lestage P. (S)-2,3-dihydro- [3,4]cyclopentano-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide: (S18986-1) a positive modulator of AMPA receptors enhances (S)-AMPA-mediated [3H]noradrenaline release from rat hippocampal and frontal cortex slices. *European Journal of Pharmacology*, **2000** ; 401 : 145.
- Lonze B.E. and Ginty D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system, *Neuron* **2002** ; 35: 605.
- Lu B. Pang P.T. and Woo N.H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005** ; 6 : 603-614.
- Luebke J.I., Changa Y.-M., Moore T. and D. Rosene Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* **2004** ; 125 : 277-288.
- Lüscher C., Xia H., Beattie E.C., Carroll R.C., von Zastrow M., Malenka R.C. and Nicoll R.A. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* **1999** ; 24 : 649-658.
- Lüscher, C., and Malenka, R.C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012** ; 4 : 4.
- Luthi A., Chittajallu R., Duprat F., Palmer M.J., Benke T.A., Kidd F.L., Henley, J.M., Isaac J.T. & Collingridge G.L. Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction. *Neuron* **1999**, 24, 389-399.
- Lynch G. Memory enhancement: the search for mechanism- based drugs. *Nat. Neurosci.* **2002** ; 5 : 1035-1038.
- Lynch G. AMPA receptor modulators as cognitive enhancers. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**; 4 : 4-11.
- Lynch G. and Gall, C. M. Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. *Trends in Neurosciences* **2006** ; 29(10) : 554-562.
- Mah S.J., Cornell E., Mitchell N.A., and Fleck M.W. Glutamate receptor trafficking: endoplasmic reticulum quality control involves ligand binding and receptor function. *J. Neurosci.* **2005** ; 25 : 2215-2225.
- Makino, H. & Malinow, R. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* **2009** ; 64 : 381- 390.
- Malenka, R.C. and Nicoll R.A *Science* **1999** ; 285 : 1870-1874.
- Maletic-Savatic M., Koothan T., Malinow R. Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci.* **1998** ; 18 : 6814-21.
- Malinow R. and Malenka R. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **2002** ; 25 : 103-126.
- Mammen A.L., Kameyama K., Roche K.W., Haganir R.L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-pro- pionic acid receptor GluR1 subunit by cal- cium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.* **1997** ; 272(32) : 528-33.

- Mansour M., Nagarajan N., Nehring R.B., Clements J.D. and Rosenmund C. Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* **2001** ; 32 : 841-853.
- Martinez-Lozada Z., and Ortega A. Review Article Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural Plasticity* **2015** ; 1-11.
- Matsuda S., Kamiya Y. and Yuzaki M. Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* **2005** ; 280, 20021-20029.
- Mayer M. L. and Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **2004** ; 66, 161–181.
- McGrath D.V. and R. Grubbs The Mechanism of Aqueous Ruthenium(II)-Catalyzed Olefin Isomerization. *Organometallics* **1994** ; 13: 224-235.
- Meier J., Vannier C., Serge A., Triller A. and Choquet D. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat. Neurosci.* **2001** ; 4 : 253-260.
- Meldrum, B. S. The glutamate synapse as a therapeutic target: perspectives for the future. *Progress in Brain Research* **1998** ; 116 : 413- 430.
- Messer W.S. Jr. Bivalent Ligands for G Protein-Coupled Receptors. *Current Pharmaceutical Design* **2004** ; 2015-2020.
- Methfessel C., Witzemann V., Takahashi, T., Mishina M., Numa S., Sakmann B. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch.* **1986** ; 407 : 577-588.
- Miu P., Jarvie K.R., Radhakrishnan V., Gates M.R., Ogden A., Ornstein P.L., Zarrinmayeh H., Ho K., Peters D., Grabell J., Gupta A., Zimmerman D.M. and Bleakman D. Novel AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187: effects on recombinant human AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology* **2001** ; 40: 976.
- Molander, G. A., & Sandrock, D. L. Orthogonal Reactivity in Boryl-Substituted Organotrifluoroborates. *Journal of the American Chemical Society* **2008** ; 130(47) : 15792-15793.
- Mollica J.A., Rehm C.R., Smith J.B. and Govan H.K. Hydrolysis of Benzothiadiazines. *Journal of pharmaceutical sciences* **1971**; 60(9): 1380-1384
- Monaghan D.T., Yao D. and Cotman C.W. Distribution of [³H] AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res.* **1984** ; 324 : 160-164.
- Mueller R., Rachwal S., Tedder M.E., Li Y.-X., Zhong S., Hampson A., Ulas J., Varney M., Nielsson L. and Rogers G. Substituted benzoxazinones as potent positive allosteric AMPA receptor modulators: part II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011** ; 21 : 3927-30.
- Murray C.W. and Verdonk M. L. The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2002** ; 16(10), 741-753.
- Nicoll R.A. and Malenka R. C. Leaky Synapses. *Neuron* **1999** ; 23(2) : 197-198.

- Nishimune A., Isaac J.T., Molnar E., Noel J., Nash S.R., Tagaya M., Collingridge G.L., Nakanishi S. and Henley J.M. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* **1998** ; 21 : 87-97.
- Niswender C. M. and Conn P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010** ; 50 : 295 - 322.
- Nørholm A.-B., Francotte P., Olsen L., Krintel C., Frydenvang K., Goffin E., Challal S., Danober L., Botez-Pop I., Lestage P., Pirotte B. and Kastrup J.S. Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization, and Thermodynamic Aspects of GluA2-Positive Allosteric Modulators with a 3,4-Dihydro-2 H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Scaffold. *J. Med. Chem.* **2013** ; 56(21) : 8736-8745.
- Nørholm A.B., Francotte P., Goffin E., Botez I., Danober L., Lestage P., Pirotte B., Kastrup J. S., Olsen L. and Oostenbrink C. Thermodynamic characterization of new positive allosteric modulators binding to the glutamate receptor A2 ligand-binding domain: combining experimental and computational methods unravels differences in driving forces. *J. Chem. Inf. Model.* **2014** ; 54 : 3404–3416.
- O'Brien R. J., Xu D., Petralia R. S., Steward O., Huganir R. L. and Worley, P. Synaptic Clustering of AMPA Receptors by the Extracellular Immediate-Early Gene Product *Narp*. *Neuron* **1999** ; 23(2) : 309-323.
- O'Neill MJ, Bleakman D, Zimmerman DM and Nisenbaum ES. AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2004** ; 3 : 181-194.
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G. et Nicotera, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**; 10: 281–284.
- Otto N., Ferenc D. and Opatz T. A Modular Access to (±)-Tubocurine and (±)-Curine - Formal Total Synthesis of Tubocurarine *The Journal of Organic Chemistry* **2017** 82 (2), 1205-1217
- Page M.I. and Jencks W. P. Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the chelate effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971** ; 68(8) : 1678-1683.
- Park M., Penick E.C., Edwards J.G., Kauer J.A. and Ehlers M.D. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* **2004** ; 305 : 1972-1975.
- Partin K.M., Fleck M.W. and Mayer M. L. AMPA Receptor Flip/Flop Mutants Affecting Deactivation, Desensitization, and Modulation by Cyclothiazide, Aniracetam, and Thiocyanate. *The Journal of Neuroscience* **1996** ; 6634–6647.
- Passafaro M., Piech V. and Sheng M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **2001** ; 4 : 917-926.
- Pasternack A., Coleman S.K., Jouppila A., Mottershead D.G., Lindfors M., Pasternack M. and Keinänen K. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **2002** ; 277 : 49662-49667.

- Pei W., Huang Z., Wang C., Han Y., Park J.S. and Niu L. Flip and flop: a molecular determinant for AMPA receptor channel opening. *Biochemistry* **2009** ; 48 : 3767-3777.
- Pentikäinen O.T., Settimo L., Keinänen K., and Johnson M.S. Selective agonist binding of (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid (AMPA) and 2S-(2 α ,3 β ,4 β)-2-carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidineacetic acid (kainate) receptors: a molecular modeling study. *Biochem Pharmacol* **2003** ; 66 : 2413-2425.
- Petralia R.S. and Wenthold R.J. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **1992** ; 318 : 329-354.
- Petrini, E.M., Lu J., Cognet L., Lounis B., Ehlers M.D. and Choquet, D. Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron* **2009** ; 63 : 92-105.
- Phillips D., Sonnenberg J., Arai A.C., Vaswani R., Krutzik P.O., Kleisli T., Kessler M., Granger R., Lynch G., Chamberlin A.R. 5'-Alkyl- benzothiadiazides: A New Subgroup of AMPA Receptor Modulators with Improved Affinity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002** ; 10 : 1229.
- Pirotte B., de Tullio P., Boverie S., Kempen I., Lestage P. Novel benzothiadiazine dioxide derivatives useful as AMPA receptor modulators, preparation method, and pharmaceutical compositions containing them. *PCT International Application*, **2001** WO 2001040210 A1.
- Pirotte B., Fontaine J. and Lebrun P. Recent advances in the chemistry of potassium channel openers. *Curr. Med. Chem.* **1995**; 2 : 573-582.
- Pirotte B., Podona T., Diouf O., de Tullio P., Lebrun P., Dupont L., Somers F., Delarge J., Morain P., Lestage P., Lepagnol J., and Spedding M. 4H-1,2,4-Pyridothiadiazine 1,1-Dioxides and 2,3-Dihydro-4H-1,2,4-pyridothiadiazine 1,1-Dioxides Chemically Related to Diazoxide and Cyclothiazide as Powerful Positive Allosteric Modulators of (R/S)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic Acid Receptors: Design, Synthesis, Pharmacology, and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1998** ; 41 (16) : 2946-2959.
- Pirotte B., Francotte P., Goffin E. and de Tullio P. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2013** ; 23(5) : 615-628.
- Pirrung M.C., "The Synthetic Organic Chemist's Companion" *John Wiley & Sons, Inc.* **2007**.
- Portoghese P.S., Larson D.L., Ronsisvalle G., Schiller P.W., Nguyen T.M., Lemieux C. and Takemori, A.E. Hybrid bivalent ligands with opiate and enkephalin pharmacophores. *Journal of Medicinal Chemistry* **1987** ; 30(11) : 1991-1994.
- Portoghese P.S., Sultana M. and Takemori A.E. The message-address concept in the design of highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonists. *Recent Advances in Receptor Chemistry* **1988** ; 307-317.
- Portoghese, P.S The role of concepts in structure-activity relationship studies of opioid ligands *J. Med. Chem.*, **1992** ; 35 (11) : 1927-1937.

- Ptak C.P., Ahmed A.H. and Oswald R.E. Probing the Allosteric Modulator Binding Site of GluR2 with Thiazide Derivatives *Biochemistry* **2009** ; 48 : 8594-8602.
- Ptak C.P., Hsieh C.-L., Weiland G.A., and Oswald R.E. Role of Stoichiometry in the Dimer-Stabilizing Effect of AMPA Receptor Allosteric Modulators *ACS Chem. Biol.* **2014** ; 9 : 128–133.
- Qiu S., Zhang X.M., Cao J.Y., Yang W., Yan Y.G., Shan L., Zheng J., and Luo J.H. An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **2009**; 284 : 20285-20298.
- Rall W. and Segev I. Space clamp problems when voltage clamping branched neurons with intracellular microelectrodes. T.G.J. Smith, H. Lecar, S.J. Redman, P.W. Gage (Eds.), *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes. Bethesda: American Physiological Society* **1985** ; 191-215.
- Randle J.C., Biton C. and Lepagnol J.M. Allosteric potentiation by diazoxide of AMPA receptor currents and synaptic potentials. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**; 247 : 257-65.
- Rassendren F.A., Lory P., Pin J.P., and Nargeot J. Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* **1990** ; 4(5), 733-740.
- Roche K.W., O'Brien R.J., Mammen A.L., Bernhardt J. and Huganir R.L. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* **1996** ; 16 : 1179-88.
- Rosi S., Grazia G.M, Lestage P.J., Munoz C., Della Corte L. and Pepeu G. S18986, a positive modulator of AMPA receptors with cognition- enhancing properties, increases ACh release in the hippocampus of young and aged rat. *Neuroscience Letters* **2004** ; 361 : 120.
- Rossi A., Barraco A. and Donda P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine *Annals of General Hospital Psychiatry* **2004** ; 3 : 1-8
- Sanacora G., Zarate C.A., Krystal J.H. and Manji H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**; 7 : 426-37.
- Sakkiah S., Arooj M., Kumar M. R., Eom S. H. and Lee, K. W. Identification of Inhibitor Binding Site in Human Sirtuin 2 Using Molecular Docking and Dynamics Simulations. *PLoS One* **2013**; 8, e51429.
- Sakmann B., Edwards F., Konnerth A., Takahashi T., Patch clamp techniques used for studying synaptic transmission in slices of mammalian brain. *Q. J. Exp. Physiol.* **1989** ; 74 : 1107-18.
- Sakmann B. and Stuart, G., Patch-pipette Recordings from the Soma, Dendrites, and Axon of Neurons in Brain Slices *Single-Channel Recording*, **1995** ; 2 : 199-211.
- Sauvé R. Le patch clamp: une nouvelle façon de voir les canaux ioniques. *Médecine/Sciences*, **1987**; 3, 538-545
- Scannevin R.H. and Huganir, R.L. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **2000**; 1, 133-141.

- Schnell E., Sizemore M., Karimzadegan S., Chen L., Brecht D.S. and Nicoll R.A. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002** ; 99:13902–13907.
- Serge A., Fourgeaud L., Hemar A. and Choquet, D. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.* **2002** ; 22, 3910- 3920.
- Shahid M., Tripathi T., Sobia F., Moin S., Siddiqui M. and Khan R.A. Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review . *The Open Immunology Journal* **2009** ; 2 : 9-41
- Shi S., Hayashi Y., Esteban J.A. and Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* **2001**, 105 : 331-343.
- Sia G.M., Beique J.C., Rumbaugh G., Cho R., Worley P.F. et Huganir R.L. Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron* **2007** ; 55 : 87-102.
- Silva A.J., Kogan J.H., Frankland P.W. et Kida S. CREB and memory. *Annual Review of Neuroscience* **1998** ; 21 : 127.
- Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. et Meldrum, B. S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischaemic brain damage in the brain. *Science* **1984** ; 226: 850– 852.
- Simeone A.T., Sanchez R.M. and Rho J.M. Molecular Biology and Ontogeny of Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *Journal of Child Neurology* **2004**; 19(5): 343-360.
- Snutch T.P. The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trend Neurosci.* **1988** ; 11 : 250-256.
- Sobolevsky A.I., Koshelev S.G. and Khodorov B.I. Probing of NMDA channels with fast blockers. *J. Neurosci.* **1999** ; 19 : 10611-10626.
- Sobolevsky A.I., Rosconi M.P., and Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **2009** ; 462 : 745– 756.
- Song I., Kamboj S., Xia J., Dong H., Liao D. and Huganir R.L. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* **1998** ; 21 : 393-400.
- Song I. and Huganir R.L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **2002** ; 25 : 578-588.
- Stern-Bach Y., Bettler B., Hartley M., Sheppard P.O., O’Hara P.J., and Heinemann S.F. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* **1994** ; 13 : 1345-1357.
- Stuhmer W., Methfessel C., Sakmann, B., Noda M.Y., Numa S. Patch clamp characterization of sodium channels expressed from rat brain cDNA. *Eur. Biophys. J.* **1987** ; 14 : 131-138.

- Stuhmer W., and Parekh A.B., Electrophysiological Recordings from *Xenopus* Oocytes. *Single-Channel Recording*, **1995** ; 2 : 341-355.
- Sun Y., Olson R., Horning M., Armstrong N., Mayer M., and Gouaux E. Mechanism of glutamate receptor desensitization, *Nature* **2002** ; 417 : 245.
- Suzuki A. Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995-1998. *Journal of Organometallic Chemistry* **1999** ; 576 : 147-168.
- Tamiz A.P., Zhang J., Zhang M., Wang C.Z., Johnson K.M., Kozikowski A.P. Application of the bivalent ligand approach to the design of novel dimeric serotonin reuptake inhibitors *J. Am. Chem. Soc.* **2000** ;122 : 5393.
- Tirado-Rives J. and Jorgensen, W. L. Contribution of Conformer Focusing to the Uncertainty in Predicting Free Energies for Protein- ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2006**; 49: 5880–5884.
- Tiwari P., Dwivedi S., Singh M.P., Mishra R. and Chandy A. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review *Asian Pac J Trop Dis* **2013**; 3(5): 413-420
- Thorsen T.S., Madsen K.L., Rebola N., Rathje M., Anggono V., Bach A., Moreira I.S., Stuhr-Hansen N., Dyhring T., Peters D., Beuming T., Haganir R., Weinstein H., Mülle C., Stromgaard K., Ronn L.C. and Gether U. Identification of a small-molecule inhibitor of the PICK1 PDZ domain that inhibits hippocampal LTP and LTD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010** ; 107 : 413-418.
- Tomita S., Adesnik H., Sekiguchi M., Zhang W., Wada K., Howe J.R., Nicoll R.A. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* **2005** ; 435(7045) : 1052-1058.
- Tripathy N.K. and Georg G.I. RCM approach for the total synthesis of cryptophycin-24 (Arenastatin A) *Tetrahedron Letters* (**2004**) ; 45 : 5309-5311.
- Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J. et Dingledine R. (). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* **2010**; 62(3), 405–496.
- Vandergriff J., Huff K., Bond A. and Lodge D. Potentiation of responses to AMPA on central neurons by LY392098 and LY404187 in vivo. *Neuropharmacology*, **2001** ; 40 : 1003.
- Varney M.A., Rao S.P., Jachec C., Deal C., Hess S.D., Daggett L.P., Li F.-F., Johnson E.C. and Eleb G.V. Pharmacological Characterization of the Human Ionotropic Glutamate Receptor Subtype GluR3 Stably Expressed in Mammalian Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1998** ; 285(1) : 358-370.
- Verdoorn T.A., Burnashev N., Monyer H., Seeborg P.H. and Sakmann B. Structural determinant of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **1991** ; 252 : 1715-1718.
- Vinade L. and Dosemeci A. Regulation of the phosphorylation state of the AMPA receptor GluR1 subunit in the postsynaptic density. *Cell Mol Neurobiol.* **2000**; 20 : 451-463.

- Voloshchuk T., Farina N.S., Wauchope O.R., Kiprowska M., Haberfield P. and Greer A. Molecular Bilateral Symmetry of Natural Products: Prediction of Selectivity of Dimeric Molecules by Density Functional Theory and Semiempirical Calculations. *J. Nat. Prod.* **2004** ; 67 : 1141.
- Ward S.E., Harries M., Aldegheri L., Andreotti D., Ballantine S., Bax B.D., Harris A.J., Harker A.J., Lund J., Melarange R., Mingardi A., Mookherjee C., Mosley J., Neve M., Oliosi B., Profeta R., Smith K.J., Smith P.W., Spada S., Thewlis K.M. and Yusaf SP. Discovery of N-[(2S)-5-(6-fluoro-3- pyridinyl)-2,3-dihydro-1H-inden-2-yl]-2-propanesulfonamide, a novel clinical AMPA receptor positive modulator. *J Med Chem* **2010** ; 53 : 5801-12.
- Watkins J.C. L-Glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochemical Society Transactions* **2000** ; 28 : 297.
- Watkins J.C. and Jane D.E. *The glutamate story. British Journal of Pharmacology* **2006** ; 147: S100.
- Waxham M.N. Neuroscience Online (<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/toc.htm>) chap.13 **1997**
- Weiss J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **1997** ; 11 : 835–841.
- Wu J.-Y. and Howard P. Role of taurine in the central nervous system *Journal of Biomedical Science* **2010** ; 17 : S1
- Wyllie D.J., Traynelis, S.F. and Cull-Candy, S.G. Evidence for more than one type of non-NMDA receptor in outside-out patches from cerebellar granule cells of the rat. *J. Physiol.* **1993** ; 463 : 193-226.
- Wollmuth L.P. and Sobolevsky, A.I. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* **2004** ; 27 : 321-328.
- Yamada K.A. and Rothman SM. Diazoxide blocks glutamate desensitization and prolongs excitatory postsynaptic currents in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **1992** ; 458 : 409-23.
- Yamada K.A. and Tang C.M. Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents. *J. Neurosci.* **1993** ; 13 : 3904-15.
- Yoshimura Y., Aoi C. and Yamauchi, T. Investigation of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin - dependent protein kinase II translocated to the postsynaptic density. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2000** ; 81 : 118-128.
- Yoshimura Y., Shinkawa T., Taoka M., Kobayashi K., Isobe T. and Yamau-chi, T. Identification of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin - dependent protein kinase II in the postsynaptic density by protein sequencing and mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002** ; 290 : 948-954.
- Zhang A., Liu Z., and Kan, Y. Receptor Dimerization - Rationale for the Design of Bivalent Ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2007** ; 343-345.
- Zhou Y., Takahashi E., Li W., Halt A., Wiltgen B., Ehninger D., Li G.D., Hell J.W., Kennedy M.B. and Silva A.J. Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J. Neurosci.* **2007** ; 27 : 13843-13853.

Chapitre 7

Publications

7-Phenoxy-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors with Nanomolar Potency

Eric Goffin,^{†,‡} Thomas Drapier,^{†,‡} Anja Probst Larsen,[‡] Pierre Geubelle,^{†,§} Christopher P. Ptak,^{||,¶} Saara Laulumaa,[‡] Karoline Rovinskaja,[‡] Julie Gilissen,^{†,§} Pascal de Tullio,[†] Lars Olsen,^{‡,¶} Karla Frydenvang,[‡] Bernard Pirotte,[†] Julien Hanson,^{*,†,§} Robert E. Oswald,^{*,||} Jette Sandholm Kastrup,^{*,‡,¶} and Pierre Francotte^{*,†,¶}

[†]Laboratory of Medicinal Chemistry, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liège, Quartier Hôpital B36 Av. Hippocrate 15 B-4000 Liège, Belgium

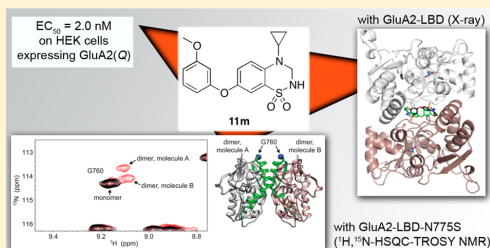
[‡]Biostructural Research, Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark

[§]Laboratory of Molecular Pharmacology, GIGA-Molecular Biology of Diseases, University of Liège, Liège, Belgium

^{||}Department of Molecular Medicine, Cornell University, Ithaca, New York 14850, United States

Supporting Information

ABSTRACT: We report here the synthesis of 7-phenoxy-substituted 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and their evaluation as AMPA receptor positive allosteric modulators (AMPApams). The impact of substitution on the phenoxy ring and on the nitrogen atom at the 4-position was examined. At GluA2(Q) expressed in HEK293 cells (calcium flux experiment), the most potent compound was **11m** (4-cyclopropyl-7-(3-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide, EC₅₀ = 2.0 nM). The Hill coefficient in the screening and the shape of the dimerization curve in small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments using isolated GluA2 ligand-binding domain (GluA2-LBD) are consistent with binding of one molecule of **11m** per dimer interface, contrary to most benzothiadiazine dioxides developed to date. This observation was confirmed by the X-ray structure of **11m** bound to GluA2-LBD and by NMR. This is the first benzothiadiazine dioxide AMPApam to reach the nanomolar range.



INTRODUCTION

L-Glutamate is well-known as the key excitatory neurotransmitter in the central nervous system, acting through activation of metabotropic receptors (mGluRs, coupled to G-protein) and ionotropic receptors (iGluRs, cation channels).^{1,2} iGluRs are recognized to play a crucial role in the fast excitatory synaptic transmission. They have been classified into three subtypes named after their affinity for nonendogenous ligands: *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), and kainic acid (KA). Among these three subtypes, AMPA receptors (AMPA-Rs) have attracted attention, assuming that upregulation of these receptors could lead to cognition enhancement. This idea has been reinforced, taking into account their critical involvement in synaptic plasticity³ and their involvement in the mechanism of action of nootropic drugs.⁴ AMPARs are thus considered as an attractive and appropriate target for the

discovery of cognitive enhancers and a potential therapeutic tool in the management of Alzheimer's disease.⁵ This strategy was even found more promising considering their ability to induce the release of neurotrophic factors in vivo, like BDNF.^{6,7}

While AMPAR agonists are expected to exert excitotoxic effects, AMPAR positive allosteric modulators (so-called "AMPApams" or AMPAR potentiators) seem more promising, as they are able to fine-tune AMPAR signals through their binding at allosteric sites of the receptors and need the presence of endogenous glutamate to be active.

AMPA-Rs are homo/heterotetrameric complexes assembled with GluA1–4 subunits.⁸ Each subunit contains an amino-terminal domain involved in subunit assembly (ATD), a clamshell-shaped domain providing the binding pocket for

Received: September 7, 2017

glutamate (LBD), a transmembrane domain forming the permeation channel for cations (TMD) and a cytoplasmic terminal domain (CTD) associated with processes such as receptor trafficking or regulation.⁹ By their ability to form bridging interactions between LBD dimers, positive allosteric modulators stabilize the receptor in its open state and thus slow deactivation and/or desensitization processes.^{5,10} This may be achieved either with one or two potentiator molecules per dimer, thus with two or four potentiator molecules per AMPAR,¹¹ depending on the occupancy of the A/B/B'/C and C' subsites, which constitute the binding cavity, as previously defined.¹²

Among the different AMPAR potentiators,¹³ 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides constitute probably the most investigated chemical class, as exemplified by recent publications (Figure 1).^{14–17}

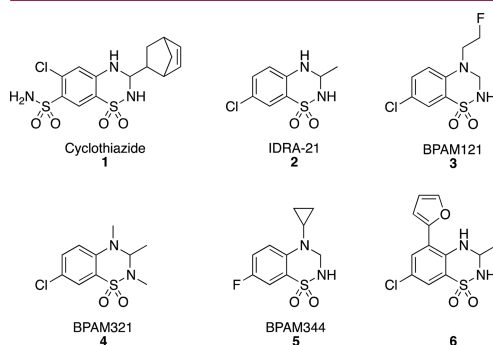


Figure 1. Structures of selected AMPAR potentiators belonging to 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides.

Taking advantage of the observation by Cordi et al. that an aryloxy or a heteroaryloxy group at the 7-position of benzothiadiazine dioxides could favorably impact the potentiator activity on AMPARs,¹⁸ the present work focused on the 7-phenoxy-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides, exploring the influence of monosubstitution of the phenoxy group introduced at the 7-position. Particular attention was paid to the study of the binding mode of the new compounds

through characterization with SAXS, NMR, and crystallography.

RESULTS AND DISCUSSION

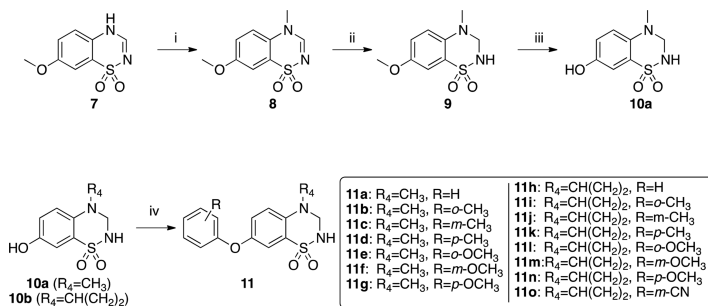
Synthesis. The synthetic pathway used to prepare the 7-phenoxy-substituted 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides reported here is illustrated in Scheme 1.

The 7-phenoxy-substituted 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides **11** series were prepared from the corresponding intermediates **10** series through a Chan–Lam coupling reaction with the appropriate phenylboronic acid in the presence of copper(II) acetate in dichloromethane. While the intermediate **10b** was obtained as previously described,¹⁶ its 4-methylated analogue **10a** was prepared via an alternate pathway, starting from 7-methoxy-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **7**.¹⁹ After alkylation on the 4-nitrogen atom using methyl iodide in the presence of potassium carbonate in acetonitrile and saturation of the double bond in the 2,3-positions by means of sodium borohydride, conversion of the methoxy at the 7-position into a hydroxyl group was achieved with boron tribromide in dichloromethane giving access to **10a**.

Substituents inserted on the nitrogen atom at the 4-position were selected according to the previously reported structure–activity relationships.^{19,20} While the introduction of the cyclopropyl group in this position was clearly the optimal choice and could thus not be neglected, we decided to also investigate the impact of the insertion of the smallest alkyl radical, namely the methyl group.

Measurement of GluA2-Induced Calcium Flux in HEK293 Cells. The new set of compounds was evaluated in vitro as AMPAR potentiators using a fluorescence-based calcium assay performed on HEK293 cells stably expressing the AMPAR GluA2(Q) in order to evaluate the effect of the compounds on the glutamate-evoked channel opening. For each compound, the pEC₅₀ (negative logarithm of the modulator concentration responsible for 50% of the glutamate maximal effect at 1 mM) value was determined. Results obtained with this newly developed pharmacological assay were in good agreement with results obtained with previously used methods: for example, the mean EC₅₀ values obtained with a previous fluorescence-based calcium measurement assay induced by 300 μM AMPA on primary cultures of neurons from a rat embryonic cortex²¹ for **5**, **11h**, and **11o** were 0.9, 1.0,

Scheme 1. Synthetic Pathway of 7-Phenoxy-Substituted 3,4-Dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides⁴



^aConditions: (i) CH₃I, K₂CO₃, CH₃CN, 60°C, 3 h (81%); (ii) NaBH₄, 2-propanol, rt, 45 min (78%); (iii) BBr₃, CH₂Cl₂, rt, 6 h (76%); (iv) adequately substituted phenylboronic acid, Cu(OAc)₂, molecular sieves, CH₂Cl₂, 40°C, 5 h (13–74%).

Table 1. Potentiating Effects of 7-Phenoxy-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides on the Calcium Flux Induced by 1 mM Glutamate on HEK293 Cells Stably Expressing the GluA2(Q) Subunit and Hill Coefficient

compound	R ₁	R	pEC ₅₀ ^a	corresponding EC ₅₀ ^b	Hill coefficient ^c
3			4.690 ± 0.013 (3)	20.4	3.0 ± 0.2 (3)
4			4.728 ± 0.012 (3)	18.7	3.0 ± 0.1 (3)
5			6.090 ± 0.004 (3)	0.81	3.5 ± 0.1 (3)
12			4.296 ± 0.008 (3)	50.6	3.0 ± 0.1 (3)
11a	CH ₃	H	5.118 ± 0.019 (3)	7.62	1.4 ± 0.1 (3)
11b	CH ₃	<i>o</i> -CH ₃	<5 (3)	10.0	nd
11c	CH ₃	<i>m</i> -CH ₃	6.408 ± 0.015 (3)	0.39	2.3 ± 0.2 (3)
11d	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃	6.020 ± 0.013 (3)	0.95	2.1 ± 0.1 (3)
11e	CH ₃	<i>o</i> -OCH ₃	<5 (3)	>10.0	nd
11f	CH ₃	<i>m</i> -OCH ₃	6.431 ± 0.030 (3)	0.37	2.3 ± 0.4 (3)
11g	CH ₃	<i>p</i> -OCH ₃	5.229 ± 0.035 (3)	5.90	1.7 ± 0.2 (3)
11h	CH(CH ₂) ₂	H	6.147 ± 0.033 (3)	0.71	1.3 ± 0.1 (3)
11i	CH(CH ₂) ₂	<i>o</i> -CH ₃	4.807 ± 0.022 (3)	15.6	1.7 ± 0.1 (3)
11j	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -CH ₃	7.336 ± 0.027 (3)	0.05	1.1 ± 0.1 (3)
11k	CH(CH ₂) ₂	<i>p</i> -CH ₃	5.496 ± 0.021 (3)	3.19	1.9 ± 0.2 (3)
11l	CH(CH ₂) ₂	<i>o</i> -OCH ₃	4.807 ± 0.018 (3)	15.60	2.3 ± 0.2 (3)
11m	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -OCH ₃	8.700 ± 0.049 (6)	0.002	1.4 ± 0.2 (6)
11n	CH(CH ₂) ₂	<i>p</i> -OCH ₃	5.740 ± 0.023 (3)	1.82	1.5 ± 0.1 (3)
11o	CH(CH ₂) ₂	<i>m</i> -CN	6.343 ± 0.018 (3)	0.45	1.7 ± 0.1 (3)

^apEC₅₀ = negative logarithm of AMPAR potentiator concentration responsible for 50% of the maximal effect (mean ± SEM (n)). ^bMean concentration responsible for 50% of the maximal effect, in μM. ^cMean value ± SEM (n).

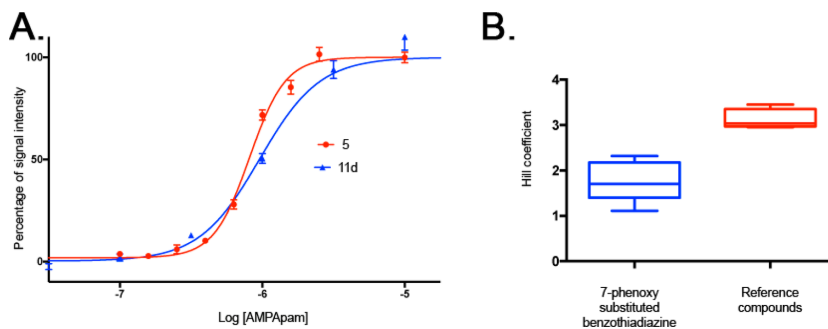


Figure 2. Measurement of GluA2-induced calcium flux in HEK293 cells. (A) Comparison of two activity curves obtained with **11d** and **5**. (B) Comparison of the mean Hill coefficient obtained with the two sets of compounds. The boxes represent the distribution of the values corresponding to the Hill coefficient collected for the two sets; they include a medium line depicting the corresponding mean value for each set and the error bars corresponding the standard error to the mean.

and 0.4 μM, respectively ($n = 3$). These values are close to those obtained here in heterologously transfected HEK293 cells (EC₅₀ values of 0.81, 0.71, and 0.45 μM, respectively; Table 1).

As previously noticed in other series,²⁰ the introduction of a cyclopropyl group on the nitrogen atom at the 4-position is in most cases more favorable for the activity than introduction of a methyl group (compare **11a** vs **11h**, **11c** vs **11j** or **11f** vs **11m**).

Exploration of the nature of the substitution of the phenoxy moiety was limited but showed that a methyl group seemed to have the same impact on activity as a methoxy group (see **11b**/**11c**/**11d** vs **11e**/**11f**/**11g** and **11i**/**11k** vs **11l**/**11n**). However,

in the 4-cyclopropyl series, the methoxy group surprisingly exerts a drastic change of the activity profile when positioned in the *meta* position of the phenoxy moiety (see **11m**, EC₅₀ = 2.0 nM vs **11j**, EC₅₀ = 46.1 nM). This leads to the most powerful AMPAR potentiator ever designed in our series, namely compound **11m**.

The position of the substitution was found critical for the activity: the rank order of potency was observed following the sequence *meta* > *para* > *ortho*. While the *meta* position for the phenoxy substitution was found to be the best option, the absence of a substitution was found to have a neutral to rather

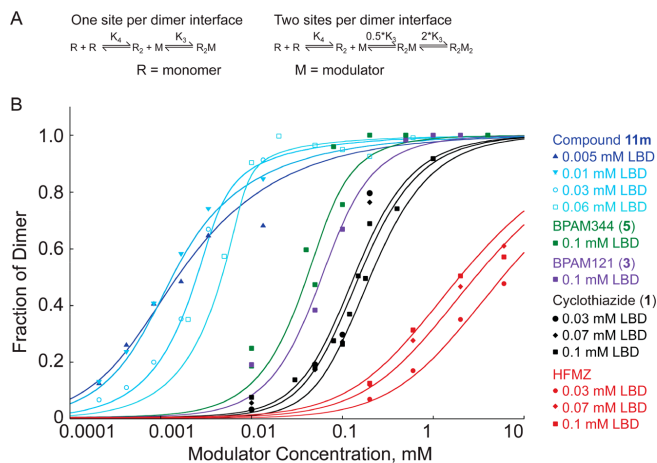


Figure 3. GluA2-LBD-N775S dimerization using SAXS. (A) Dimerization models assuming one site per dimer interface and two sites per dimer interface. K_4 is the dimerization constant and K_3 is the intrinsic binding constant. R is the GluA2-LBD-N775S monomer and M is the free modulator concentration. The model is written to exclude cooperativity of binding. (B) The fraction of dimer observed in the SAXS experiment as a function of the total modulator concentration using various allosteric modulators and different concentrations of GluA2-LBD-N775S. For compound 11m, the curves are shown in different shades of blue, with the lightest corresponding to the highest concentration of protein. The change in shape of the curve is due to the fact that the protein concentration is in the same range as the modulator concentration, so that it is particularly limiting in the lower ranges of modulator concentration. The lowest protein concentration in this series has a shallow slope similar to that of HFMZ, suggesting one binding site per dimer interface. The steeper slope of the 11m curve at increasing protein concentrations is caused by the modulator/protein ratio depleting the free modulator. At higher protein concentrations, the dimer fraction becomes particularly limited by the lower range of modulator concentrations.

positive effect comparing to *ortho* or *para* substitution (see 11a vs 11b/11e/11g or 11h vs 11i/11k/11l/11n). This trend was only contradicted with the methyl group in the *para* substitution (11a vs 11d) in the series bearing a methyl group on the nitrogen atom at the 4-position.

Based on the fact that the *meta* position of the phenoxy group was critical, the preparation of a 7-phenoxy compound substituted with a cyano moiety at the *meta* position was envisaged in order to evaluate the influence of a strong electron-withdrawing group. This compound (11o) was found less active than the methyl or methoxy analogues (11j and 11m) and nearly as potent as the unsubstituted phenoxy compound (11h). This observation could be explained by the steric interactions of the corresponding group in the *meta* position.

Looking at the slope of the concentration–response sigmoidal curves generated in our new functional assay (see Figure 2A for two representative profiles obtained with 11d and reference compound 5, respectively) and keeping in mind the observations previously made with SAXS data,¹¹ the Hill coefficient²² was examined for each curve. This feature of the curve reflects the existence of multiple binding sites in the receptor and enables determination of the binding stoichiometry. This permitted to compare the new compounds 11 and the references 3, 4, 5, and 12 (see Table 1 and Figure 2B). The collected data suggest a distinct stoichiometry for 7-phenoxy compounds 11 compared to reference compounds 3, 4, 5, and 12; whereas reference compounds bind in two copies on the interface (as previously demonstrated for 5²³), the compounds 11 bind in one copy. This trend observed here might be explained by a difference in the binding mode within the dimer interface. The figures suggest that the new set of compounds

constitutes a unique subclass in our series of benzothiadiazine dioxides designed to date (Figure 2B). Further investigations (SAXS, crystallography, and NMR) presented hereafter corroborate this observation.

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS). The isolated GluA2-LBD-N775S shows only a weak propensity for dimerization, but the ability of allosteric modulators to stabilize dimer formation can be used to assess both affinity and stoichiometry.¹¹ SAXS provides a measure of GluA2-LBD-N775S dimerization because the scattering profile of the GluA2-LBD-N775S changes markedly upon dimerization allowing the contributions of monomer and dimer curves to be determined by standard fitting routines (OLIGOMER).²⁴ The fraction of dimer at each modulator condition is then modeled using the schemes shown in Figure 3A. All curves were fit simultaneously, with a common K_4 value (dimerization constant) and K_3 values (intrinsic equilibrium dissociation constants) specific to the individual modulator. The choice of model (one or two sites per dimer interface) was based on the slope of the curve and the fit of the model to the data. As shown in Figure 3B, the dependence of dimerization on the concentration of allosteric modulator can have quite different slopes depending upon which modulator is used. As shown previously,¹¹ those modulators that bind to one site per dimer interface exhibit a relatively shallow slope (HFMZ in Figure 3B),¹² while those that bind to two sites show a much steeper slope (cyclothiazide 1).²⁵ This is not due to cooperativity of modulator binding but rather a consequence of the fact that the two-site model assumes that dimerization is stabilized further with each successive occupancy. Two of the compounds in Figure 1 (5 and 3) show a steeper slope consistent with binding to two sites per dimer interface (consistent with the crystal

structures of **5**²³ and **3**, see below in this paper). Reference compound **5** (K_3 of 9×10^{-7} M) is somewhat more potent than reference compound **3** (K_3 of 2×10^{-6} M). This is in contrast to the calcium flux experiments that show a considerably larger difference between the two compounds. The SAXS experiments are not directly comparable to measurements of the intact receptor because the mechanism involves the dimerization of two identical soluble proteins with an extremely weak dimerization constant (approximately 32 mM), leading to an EC_{50} considerably higher than that measured in the intact receptor. K_3 is the intrinsic binding constant for the interaction of the modulator with the GluA2-LBD-N775S dimer. This, in principle, should be the same in the intact receptor. The difference is that in the intact receptor, the two monomers within the dimer are held in close proximity by the structure, and the formation of the dimer interface can be seen as a favorable conformation transition rather than a weak protein–protein interaction involving the diffusion of two independent proteins. For this reason, the EC_{50} measured in the intact receptor is generally lower than that observed in the SAXS measurements. (See the supplement to Ptak et al.¹¹ for a further discussion of this point.) The calcium flux measurements suggest that compound **11m** is several orders more potent than the reference compounds **3** and **5**. This raised a difficulty in the SAXS measurements because typical protein concentrations are higher than the affinity for this compound, suggesting that modulator rather than protein would be limiting. This was approached by using several low concentrations of GluA2-LBD-N775S and signal averaging three independent data sets. The shapes of the dimerization curves indicated that at some of the concentrations tested, the modulator was indeed limiting. This is reflected in the shape of the dimerization curves, which become increasingly steep as the protein concentration increases (Figure 3B). By using a numerical fitting routine described in the Experimental Section that takes into account the limiting modulator concentration, the affinity of compound **11m** could be determined for a model assuming one binding site per dimer interface. At the lowest protein concentration, the dimerization slope was similar to that of HFMZ, further supporting a model with one site per dimer interface, consistent with the crystal structure described below. The four curves for compound **11m** shown in Figure 3B were generated with a K_4 of 32 mM and K_3 of 5×10^{-11} M. The change in the shape of the curve with increasing concentration does not reflect an increase in stoichiometry but is solely a predictable consequence of a limiting modulator concentration. In fact, this change in shape provided a significant constraint on the value of K_3 . Overall, the SAXS measurements show that compound **3** and **5** both bind in two copies per dimer interface and are of considerably lower affinity than compound **11m**, which occupies only one site per dimer interface.

Structure Determination. To investigate the binding mode of the highly potent compound **11m**, and especially how the larger substituent in the 7-position is located in the binding site, the GluA2-LBD was crystallized in complex with **11m**. In addition, the GluA2-LBD-L504Y–N775S was crystallized with the reference compound **3**. This compound differs from previously crystallized BTDs as it contains a fluoro-ethyl group at *N*-4 and chlorine at the *C*-7 position. The structures were determined at 2.00 and 1.78 Å, respectively (Table 2).

GluA2-LBD with 11m. The GluA2-LBD in complex with **11m** crystallized with three molecules in the asymmetric unit,

forming two biological dimers (molA/molB (Figure 4A) and molC/symmetry-related molC). Glutamate is present in the orthosteric-binding site of all three protein molecules, leading to D1-D2 domain closures of 19–21°.

Unambiguous electron density was identified at the interface of both dimers corresponding to **11m** (Figure 4B). As suggested by the Hill coefficient in the calcium flux assays and the shape of the dimerization curve in the SAXS data, only one molecule of **11m** can occupy the modulator-binding sites at a time, leading to two alternative binding modes with the BTD-scaffold positioned in one of the two binding sites seen in the structure of GluA2-LBD with compound **5**.²³ Due to the symmetrical dimer, the binding mode of the two molecules of **11m** is rotated 180° relative to each other. The occupancy of the modulator and corresponding water molecules was refined to 0.55/0.45 for molA/molB and 0.46 for molC. The 7-substituent occupies the second binding site together with three water molecules (W1–W3), occupying the same space in the binding site as the sulfonamide of **11m** in the alternate binding mode. Compound **11m** belongs to the shifted thiazide class of modulators, with the BTD scaffold primarily located in subsite C but the 7-(3'-methoxyphenoxy) substituent spanning subsite A with the 3'-methoxy moiety oriented toward subsite B' (Figure 4C). Previous studies of thiazide modulators (class *i* and *ii*) have shown that most of these compounds do not reach into subsite A and thus can bind two molecules in the dimer interface.^{12,26}

One hydrogen bond is formed from the sulfonamide N atom of **11m** to the backbone O atom of ProS15. The three water molecules (W1–W3) found to occupy the second BTD binding site together with the 7-(3'-methoxyphenoxy) substituent do not form polar contacts with the 7-(3'-methoxyphenoxy) substituent, but instead establish a network of polar contacts from the backbone O atom of ProS15 on one side of the dimer to the backbone N atom of Gly752 and O atom Ile502 on the other side (Figure 4C). Multiple nonpolar interactions are possible from **11m** to surrounding residues within 4 Å. The BTD scaffold forms contact to Lys514, ProS15, Phe516, Met517, Ser518, Asn775, and Leu780 from one protein chain and Ile502, ProS15, Ser518, Ser750, Lys751, and Gly752 from the opposite protein chain in the dimer comprising molA and molB. Almost identical interactions are seen in the symmetry-generated dimer (molC/sym-molC); however, in molC, the contact to Ser518 is replaced by a contact to Leu772 in the same chain. Although no polar contacts are established from the 7-(3'-methoxyphenoxy) substituent to surrounding residues, the substituent engages in nonpolar interactions with nine of the 12 same residues as the BTD scaffold: Ser750 and Lys751 from one protein chain, and ProS15, Phe516, Met517, Ser518, Gly752, Asn775, and Leu780 from the opposite chain. Thus, binding of one molecule of **11m** to a large extent recreates the interactions seen when two molecules of **5** bind in the dimer interface. In addition, the benzene ring of the 7-phenoxy substituent is positioned to form pi-stacking interactions with the backbone amide bonds between Lys751–Gly752 in one subunit and Met517–Ser518 in the other subunit. These observations, combined with smaller entropy loss upon binding of one instead of two molecules, may explain the 40-fold better potency of **11m** ($EC_{50} = 2.0$ nM) compared to **5** ($EC_{50} = 813$ nM).

The activity for the newly synthesized series of compounds was found to correlate with the position of the substituent on the 7-phenoxy moiety in the following order: *meta* > *para* >

Table 2. Crystal Data, Data Collection, and Refinement Statistics for the GluA2-LBD-L504Y–N775S in Complex with **3** and GluA2-LBD in Complex with **11m**

	complex	
	3	11m
Crystal Data		
PDB entry	5O9A	5OEW
space group	$P2_1$	$P2_12_12_1$
unit cell: a, b, c (Å)	47.31, 98.41, 121.79	114.70, 164.37, 47.33
units cell: β (°)	90.53	90
molecules in a.u. ^a	4	3
Data Collection		
wavelength (Å)	0.979	1.000
resolution ^b (Å)	49.20–1.78 (1.88–1.78)	29.27–2.00 (2.11–2.00)
no. of unique reflections	106 755 (15 582)	61 361 (8 859)
average redundancy	3.7 (3.6)	4.1 (4.1)
completeness (%)	100 (100)	99.8 (99.8)
R_{merge}^c	0.063 (0.377)	0.087 (0.313)
$I/\sigma I$	10.4 (2.0)	6.5 (2.0)
Wilson B (Å ²)	13.6	17.5
Refinement		
amino acid residues	263/264/263/260	261/259/261
glutamate/modulator	4/4	3/2
acetate/sulfate/Zn/Cl	–/16/–/7	4/–/18/–
glycerol/PEG/ethylene glycol/citrate/water	3/1/1/1/1186	–/–/–/–/522
$R_{\text{work}}^d/R_{\text{free}}^e$	0.15/0.18	0.17/0.19
average B values (Å ²) for amino acid residues	18/25/17/24	27/28/23
average B values (Å ²) for glutamate/modulator	12/15	18/15
average B values (Å ²) for acetate/sulfate/Zn/Cl	–/60/–/53	46/–/64/–
average B values (Å ²) for glycerol/PEG/ethylene glycol/citrate/water	49/47/46/30/29	–/–/–/–/34
RMSDs: bond lengths (Å)	0.01	0.03
RMSDs: angles (°)	0.79	0.61
Ramachandran plot (%): outliers	0	0
Ramachandran plot (%): favored	99.2	99.4
rotamer outliers ^f	1.0	1.0
$C\beta$ outliers ^f (%)	0	0
clash score ^f	0.74	0.56

^aa.u.: asymmetric unit of the crystal. ^bValues in parentheses correspond to the outermost resolution shell. ^c R_{merge} is calculated as follows: $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl , and $I(hkl)$ is the intensity from multiple observations. $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - I(hkl)| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$. ^d $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$ where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively, for reflection hkl . ^e R_{free} is equivalent to R_{work} but is calculated with 5% of reflections omitted from the refinement process. ^fMolProbity statistics.⁴⁵

ortho. From the structure of **11m** bound to GluA2-LBD, this ranking might be explained. Introduction of substituents in the *ortho* position, even a methyl group, would require changes in the conformation or binding mode of the modulator or protein rearrangements to avoid steric clash with Met517-Ser518. Likewise, large substituents in the *para* position will lead to clash with protein residues and interference with the intermolecular hydrogen bond between the side-chain ND2 atom of Asn775 and the backbone O atom of Ser750, whereas the *meta* position of the 7-phenoxy moiety holds the most space for introduction of substituents. The *m*-OCH₃ in **11m** has several van der Waals contacts to both protein molecules, which would be less with an *m*-CH₃ group (**11j**). This might explain the better potency of **11m** compared to **11j**. However, an *m*-CN as in **11o** would lead to steric clash with the protein and would require changes in the conformation or binding mode of the modulator or protein rearrangements.

GluA2-LBD-L504Y–N775S with 3. Compound **3** was crystallized in complex with GluA2-LBD-L504Y–N775S in the presence of glutamate. This mutant has previously been used in

several studies addressing modulator binding (see Krintel et al.¹⁶): the complex crystallized with four molecules in the asymmetric unit, forming two biological dimers (molA/molB (Figure 5A) and molC/molD). Glutamate binds in all four protein molecules, leading to D1–D2 domain closures of 20–22°.

Unambiguous electron density was identified at the interface of both dimers corresponding to **3** (Figure 5B). Two molecules of **3** bind at the dimer interface in subsite C, as seen with other BTD containing compounds like **5**²³ and **12**.²¹ One hydrogen bond is formed from the sulfonamide N atom of **3** to the backbone O atom of Pro515 (Figure 5B) as also seen in the GluA2-LBD structure with **11m**. Ser518 adopts two different side-chain conformations in all four protein molecules, one pointing away from the modulator and one pointing toward it. When the side chain of Ser518 points toward the modulator, it allows for the formation of a hydrogen bond at the 7-chlorine atom (distances of 3.1–3.2 Å). However, the occupancy of the side chain in this conformation is only 30%, consistent with the fact that the chlorine atom is expected to be a poor proton

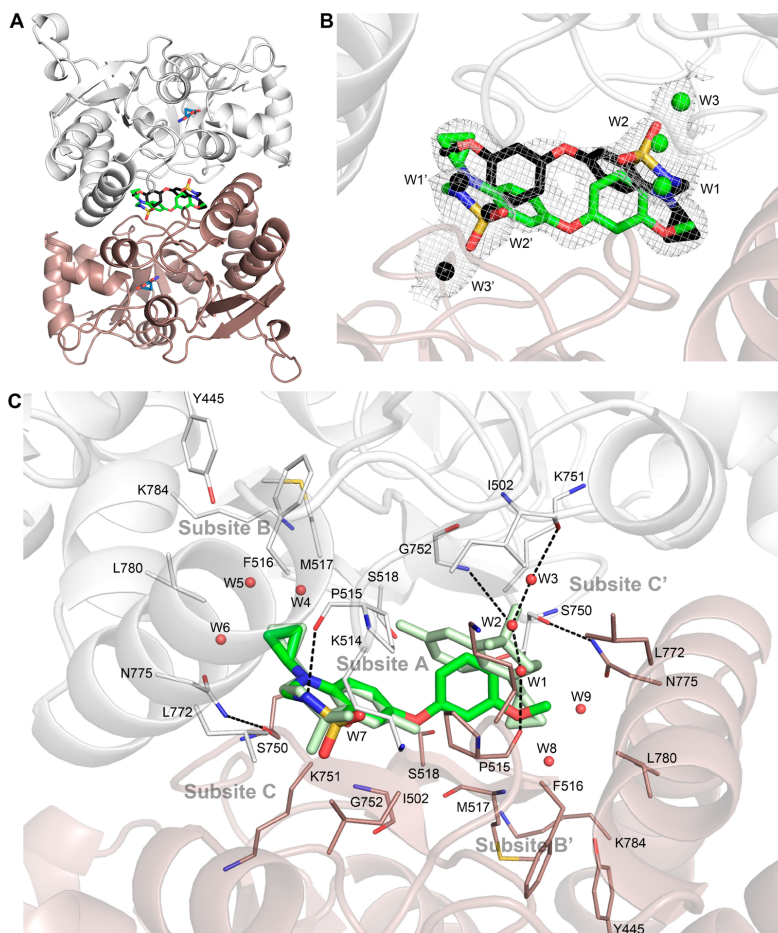


Figure 4. Structure of GluA2-LBD in complex with glutamate and the AMPAR potentiator **11m**. (A) Cartoon representation of the GluA2-LBD dimer (molA in white and molB in dark salmon) with glutamate shown in blue sticks representation and the two binding orientations of **11m** in green and black, respectively. Nitrogen atoms are blue, oxygen atoms red, and sulfur atoms yellow. (B) Compound **11m** binds to one site in the dimer interface. However, because of the symmetry of the dimer interface, two overlapping copies of the compound are observed in the crystal structure, only one of which is present in any given dimer. A $2F_o - F_c$ OMIT map (gray mesh, contoured at 0.5σ and carved around the modulator at 2.0 \AA) is shown with the two orientations of **11m**. Six water molecules are shown as spheres: green water molecules are present together with **11m** in green orientation and black water molecules with **11m** in black orientation. (C) Compound **11m** primarily occupies subsites A and C in the allosteric binding site. GluA2 residues are shown in line representation, green orientation of **11m** in sticks representation. Hydrogen bonds are shown as dashed black lines and water molecules within 4 \AA of **11m** as red spheres. The binding mode of two molecules of **5** (light green sticks) is shown for comparison.

acceptor.²⁷ Introduction of larger substituents at the 7-position is likely to cause steric clash with Met517 and Ser518, in agreement with previous observations that the potency decreases with iodine and methyl substituents.¹⁹ However, the introduction of a smaller substituent in the 7-position, such as the fluorine analogue of **3** ($EC_{2x} = 11.3\text{ }\mu\text{M}$), leads to an increase in potency compared to **3** with chlorine in the 7-position ($EC_{2x} = 18.8\text{ }\mu\text{M}$).²⁸

The alkyl chain of **3** is bent to a U-shaped conformation, where the fluorine atom points toward the chlorine atom of the

neighboring modulator molecule with a C—Cl...F bond angle of 165° (Figure 5B). The Cl—F distances between the two neighboring molecules of **3** are $4.1\text{--}4.4\text{ \AA}$. Chlorine, due to the charge distribution of a soft halogen, has an electropositive tip, called sigma-hole (Figure 5C).^{29,30} This leads to a favorable interaction between the chlorine and the electronegative fluorine. The aromatic ring system in **3** shows van der Waals contacts to the 7-chlorine atom of the neighboring molecule of **3** with a shortest distance of 3.4 \AA .

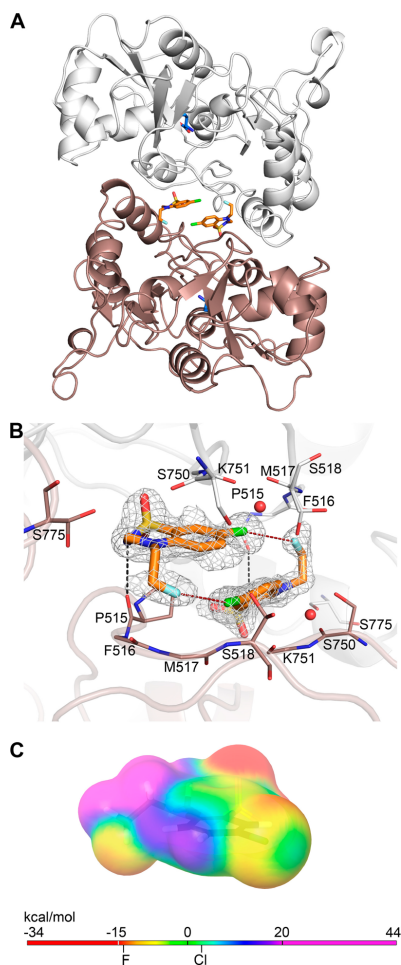


Figure 5. Structure of GluA2-LBD-L504Y-N775S in complex with glutamate and the AMPAR potentiator **3**. (A) Cartoon representation of the GluA2-LBD-L504Y-N775S dimer (molA in white and molB in dark salmon) with glutamate shown in a blue stick representation and two molecules of **3** in orange. Nitrogen atoms are blue, oxygen atoms red, and sulfur atoms yellow. (B) The two molecules of compound **3** primarily occupies subsites C in the allosteric binding site. GluA2 residues are shown in line representation, **3** in stick representation, and water molecules within 3.5 Å of modulator as red spheres. Hydrogen bonds up to 3.2 Å are shown as dashed black lines. F–Cl distances (4.1–4.4 Å) are indicated as red dashed lines. A $2F_o - F_c$ OMIT map is shown as a gray mesh, contoured at 1 σ and carved around the modulator at 1.8 Å. (C) The electrostatic potential map on the electron density map of **3** is represented in rainbow colors. Potentials below -15 kcal/mol are shown with red and above $+20$ in magenta. The electropositive tip (3 kcal/mol) of chlorine can make a halogen bond to the electronegative (-14 kcal/mol) fluorine. The electrostatic potential of **3** was calculated using Jaguar in MAESTRO (v.10.1; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015) with the cc-PVDZ basis set and B3LYP hybrid potential.

NMR Spectroscopy. The GluA2-LBD-N775S was uniformly labeled with ^{15}N and, on an 800 MHz spectrometer, ^1H , ^{15}N -HSQC-TROSY spectra were collected in the presence and absence of $90\ \mu\text{M}$ compound **11m**. A significant fraction of the protein was dimerized as indicated by line broadening and the presence of new broadened peaks. Peaks in the dimer interface formed by the binding of **11m** were significantly shifted and not readily assigned in this spectrum. However, on the periphery of the dimer interface, the change in chemical environment was less pronounced such that the peak shifts were smaller. An example is Gly760 (Figure 6), which clearly

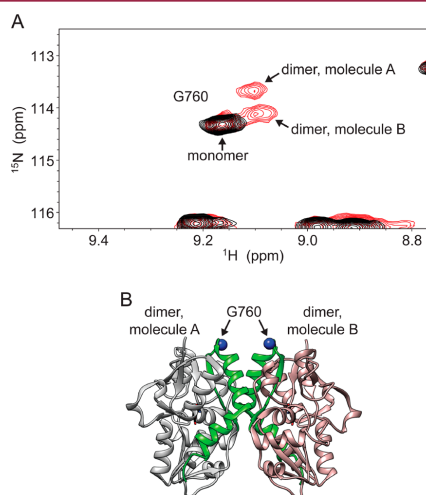


Figure 6. GluA2-LBD-N775S dimerization using NMR spectroscopy. (A) Portion of the ^1H , ^{15}N -HSQC-TROSY spectra at 800 MHz showing monomeric GluA2-LBD-N775S in black and the partially dimerized spectrum bound to compound **11m** in red. (B) Structure of the dimer of GluA2-LBD-N775S (PDB entry 3DP6) with G760 shown as a blue sphere.

shows two new peaks formed by the binding of compound **11m** and dimerization. Simple dimerization would not produce two new peaks because the dimer interface is symmetrical. Consistent with the crystal structure and SAXS results, the binding of one molecule of compound **11m** to the dimer interface breaks that symmetry, producing two peaks.

CONCLUSION

With the aim of exploring the influence of monosubstitution of the phenoxy ring introduced at the 7-position of the benzothiadiazine dioxide scaffold, we developed a synthetic pathway giving access to the preparation of 15 compounds. We also developed a new medium-throughput fluorimetric assay in order to screen this series.

The first part of the work led to highlight the high potency of **11m**, with an $\text{EC}_{50} = 2.0\ \text{nM}$ (calcium flux experiment); this in vitro activity was found to be the highest in comparison with our previous lead structures. Interestingly, the activity curves obtained for the new compounds shared a much lower Hill coefficient than the curves obtained with reference compounds from our library. Considering this interesting activity profile,

attention was thus focused on the characterization of the binding mode of the most active compound **11m** in the series via complementary SAXS, NMR, and crystallography.

SAXS data first corroborated the high affinity of **11m** and confirmed that this compound occupies only one site per dimer interface, contrary to most benzothiadiazine dioxides developed as AMPAR potentiators. Structure determination of GluA2-LBD in complex with glutamate and **11m** confirmed that only one molecule of **11m** binds at the dimer interface and revealed the detailed binding mode. Compound **11m** primarily occupies subsites A and C. Results obtained with NMR spectroscopy were found to be consistent with the X-ray and SAXS data.

From these observations, compound **11m** behaves as two molecules of the reference compound **5**, since **11m** is able to recreate the interaction observed after two molecules of compound **5** binds into the allosteric pocket. Altogether, the data collected in this second part confirmed that compound **11m** belongs to a singular subclass of the benzothiadiazine dioxides developed so far.

The binding mode of compound **3** was characterized using SAXS and crystallography. Compound **3** binds in two copies per dimer interface and occupies subsites C within the allosteric pocket. A chlorine–fluorine interaction between the two neighboring molecules was found.

This study suggests that 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is (still) a very interesting scaffold to develop new powerful AMPAR potentiators. Keeping this idea in mind, efforts should now be focused toward the design of new BTDS in order to further map the GluA2-LBD and develop powerful pharmacological tools useful to refine knowledge of the AMPAR biology.

EXPERIMENTAL SECTION

General Procedures. Melting points were determined on a Büchi Tottoli capillary apparatus and were uncorrected. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz) instrument using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6) as the solvent with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard; chemical shifts were reported in δ values (ppm) relative to that of internal TMS. The abbreviations s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, and bs = broad singlet were used throughout. Elemental analyses (C, H, N, S) were realized on a Thermo Scientific Flash EA 1112 elemental analyzer and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values for carbon, hydrogen, and nitrogen; a higher tolerance ($\pm 0.75\%$) was admitted for sulfur, considering its corresponding peak shape. This analytical method certified a purity of $\geq 95\%$ for each tested compound. All reactions were routinely checked by TLC on silica gel (Merck 60 F254).

7-Methoxy-4-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (8). The mixture of 7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**7**)¹⁹ (10.0 g, 47.2 mmol), potassium carbonate (20 g), and methyl iodide (15 mL) in acetonitrile (300 mL) was heated at 60 °C for 3 h. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (400 mL). The resulting insoluble material was collected by filtration, washed with water, dried, and recrystallized in ethyl acetate (8.6 g, 81% yield): mp 204–206 °C (lit.¹⁸ 205–209 °C); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 3.61 (s, 3H, NCH₃), 3.87 (s, 3H, 7-OCH₃), 7.31 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.38 (dd, J = 9.3, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.49 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 5-H), 8.01 (s, 1H, 3-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 38.0 (NCH₃), 56.0 (O–CH₃), 106.1 (C-8), 118.6 (C-5), 120.9 (C6), 123.6 (C-4a), 129.6 (C-8a), 150.3 (C-3), 157.4 (C-7).

7-Methoxy-4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (9). The solution of 4-methyl-7-methoxy-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**8**) (6.0 g, 27 mmol) in 2-propanol (300 mL) was supplemented under stirring with sodium borohydride

(3.0 g, 80 mmol). After 45 min of stirring the mixture at room temperature, the solvent was removed by distillation under reduced pressure and the residue was suspended in water (250 mL). The alkaline suspension was adjusted to pH 7 with 0.1 N HCl and extracted 3-fold with chloroform (3 \times 250 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue of the title compound was recrystallized in methanol/water 1:2 (4.7 g, 78% yield): mp 127–129 °C (lit.¹⁸ 126–128 °C); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 2.89 (s, 3H, NCH₃), 3.73 (s, 3H, 7-OCH₃), 4.57 (s, 2H, 3-CH₂), 6.87 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.04 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 8-H), 7.09 (dd, J = 9.2, 3.0 Hz, 1H, 6-H), 8.05 (s, 1H, 3-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 36.7 (NCH₃), 55.6 (O–CH₃), 62.4 (C-3), 107.4 (C-8), 116.2 (C-5), 121.0 (C-6), 123.3 (C-4a), 138.8 (C-8a), 150.5 (C-7).

7-Hydroxy-4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (10a). The solution of 7-methoxy-4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (**9**) (5.0 g, 21.9 mmol) in dichloromethane (200 mL) was cooled at –30 °C and then supplemented with boron tribromide (16 mL). After 6 h of stirring the mixture at room temperature, water (200 mL) was carefully poured in the reaction mixture and the organic solvent was removed by distillation under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 \times 200 mL). The collected organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The filtrate was evaporated to dryness, and the residue was crystallized in dichloromethane and dried (76% yield): mp 165–166 °C (lit.¹⁸ 168–172 °C); ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.85 (s, 3H, NCH₃), 4.52 (s, 2H, 3-CH₂), 6.78 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 6.91 (m, 2H, 6-H/7-H), 7.99 (bs, 1H, 2-H), 9.31 (bs, 1H, 7-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 36.9 (NCH₃), 62.5 (C-3), 109.2 (C-8), 116.5 (C-5), 121.4 (C-6), 123.8 (C-4a), 137.6 (C-8a), 148.6 (C-7).

General Synthetic Pathway to Obtain 7-Phenoxy-Substituted 4-Alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides 11. A solution of the appropriate 4-alkyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide **10** (1.7 mmol) in dichloromethane (60 mL) and pyridine (10 drops), molecular sieves (5 g), the adequately substituted phenyl boronic acid (2.5 mmol), and copper(II) acetate (2.5 mmol) was stirred at 40 °C. After 5 h, dichloromethane was added to the medium and the solid was removed by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure before the addition of acidic water (50 mL). The resulting suspension was extracted with ethyl acetate (3 \times 50 mL). The organic phases were collected and dried over anhydrous MgSO₄. The removal of the solvent followed by flash column chromatography on silica gel (dichloromethane) and subsequent recrystallization (dichloromethane/petroleum ether 5:15) afforded the pure **11** compounds (yields 13–74%).

4-Methyl-7-phenoxy-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11a): 74% yield, mp 143.5–145.5 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.94 (s, 3H, NCH₃), 4.65 (s, 2H, 3-CH₂), 6.94 (m, 3H, 5-H/2'-H/6'-H), 7.12 (m, 2H, 4'-H/8-H), 7.22 (dd, J = 9.1, 2.8 Hz, 1H, 6-H), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 3'-H/5'-H), 8.11 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 36.4 (NCH₃), 62.3 (C-3), 114.3 (C-8), 116.0 (C-5), 117.5 (C-2'/C-6'), 123.0 (C-8a), 123.1 (C-4'), 125.2 (C-6), 130.0 (C-3'/C-5'), 140.9 (C-4a), 146.2 (C-7), 157.5 (C-1'). Anal. (C₁₄H₁₄N₂O₂S) Calcd: C, 57.91; H, 4.86; N, 9.65; S, 11.04. Found: C, 57.96; H, 4.93; N, 10.04; S, 10.80.

4-Methyl-7-(2-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11b): 25% yield, mp 166–168 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.93 (s, 3H, NCH₃), 4.63 (s, 2H, 3-CH₂), 6.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, 6'-H), 6.93 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 6.96 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.08 (td, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H, 4'-H), 7.15 (dd, J = 9.2, 3.0 Hz, 1H, 6-H), 7.20 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.32 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 3'-H), 8.11 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 15.8 (CH₃), 36.5 (NCH₃), 62.3 (C-3), 112.3 (C-8), 116.2 (C-5), 118.2 (C-6'), 123.1 (C-8a), 123.8 (C-4'), 124.1 (C-6), 127.4 (C-5'), 128.5 (C-2'), 131.5 (C-3'), 140.3 (C-4a), 147.3 (C-7), 154.6 (C-1'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₂S) Calcd: C, 59.19; H, 5.30; N, 9.20; S, 10.53. Found: C, 58.90; H, 5.24; N, 8.87; S, 10.21.

4-Methyl-7-(3-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11c): 35% yield, mp 173.5–175.5 °C; ^1H NMR

(DMSO- d_6) δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.94 (s, 3H, NCH₃), 4.65 (d, J = 8.1 Hz, 2H, 3-CH₂), 6.73 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1H, 6'-H), 6.76 (s, 1H, 2'-H), 6.93 (d, J = 9.1 Hz, 2H, 5-H/6'-H), 7.11 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.20 (dd, J = 9.1, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.25 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 5'-H), 8.13 (t, J = 8.1 Hz, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 20.9 (CH₃), 36.4 (NCH₃), 62.3 (C-3), 114.3 (C-8), 114.6 (C-4'), 116.0 (C-5), 118.0 (C-2'), 123.0 (C-8a), 123.8 (C-6'), 125.5 (C-6), 129.7 (C-5'), 139.7 (C-4a), 140.8 (C-3'), 146.3 (C-7), 157.5 (C-1'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₃S) Calcd: C, 59.19; H, 5.30; N, 9.20; S, 10.53. Found: C, 59.18; H, 5.37; N, 9.18; S, 9.88.

4-Methyl-7-(4-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11d): 25% yield, mp 137–139 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.93 (s, 3H, NCH₃), 4.63 (s, 2H, 3-CH₂), 6.86 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2'-H/6'-H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.06 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.19 (m, 3H, 6-H/3'-H/5'-H), 8.11 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 20.2 (CH₃), 36.5 (NCH₃), 62.3 (C-3), 113.5 (C-8), 116.1 (C-5), 117.9 (C-2'/C-6'), 123.0 (C-8a), 125.0 (C-6), 130.4 (C-3'/C-5'), 132.3 (C-4'), 140.6 (C-4a), 147.0 (C-7), 155.0 (C-1'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₃S) Calcd: C, 59.19; H, 5.30; N, 9.20; S, 10.53. Found: C, 59.02; H, 5.37; N, 9.11; S, 9.92.

4-Methyl-7-(2-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11e): 19% yield, mp 150–151.5 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 2.96 (s, 3H, NCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.60 (s, 2H, 3-CH₂), 6.87 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 6.89 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 6.98 (m, 2H, 5'-H/6'-H), 7.09 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.19 (m, 2H, 3'-H/4'-H), 8.08 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 36.5 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 62.3 (C-3), 110.8 (C-8), 113.5 (C-3'), 116.0 (C-5), 121.0–121.1 (C-5'/C-6'), 122.8 (C-6), 122.9 (C-8a), 125.5 (C-4'), 139.9 (C-4a), 144.0 (C-1'), 148.3 (C-7), 151.1 (C-2'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₄S) Calcd: C, 56.24; H, 5.03; N, 8.74; S, 10.01. Found: C, 56.12; H, 5.06; N, 8.78; S, 9.95.

4-Methyl-7-(3-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11f): 3% yield, mp 143.5–145.5 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 2.95 (s, 3H, NCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.65 (s, 2H, 3-CH₂), 6.46 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1H, 6'-H), 6.53 (t, J = 2.2 Hz, 1H, 2'-H), 6.69 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H, 4'-H), 6.93 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.15 (d, J = 2.8 Hz, 1H, 8-H), 7.22 (dd, J = 9.1, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.26 (t, J = 8.2 Hz, 1H, 5'-H), 8.11 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 36.4 (NCH₃), 55.2 (OCH₃), 62.3 (C-3), 103.7 (C-2'), 108.6 (C-4'), 109.4 (C-6'), 114.4 (C-8), 116.0 (C-5), 123.0 (C-8a), 125.6 (C-6), 130.5 (C-5'), 140.9 (C-4a), 146.0 (C-7), 158.7 (C-1'), 160.7 (C-3'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₄S) Calcd: C, 56.24; H, 5.03; N, 8.74; S, 10.01. Found: C, 56.10; H, 4.99; N, 8.51; S, 9.65.

4-Methyl-7-(4-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11g): 27% yield, mp 104–106 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 2.92 (s, 3H, NCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.62 (s, 2H, 3-CH₂), 6.91 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 6.95 (s, 4H, 2'-H/3'-H/5'-H/6'-H), 7.00 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.16 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 8.10 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 36.5 (NCH₃), 55.4 (OCH₃), 62.3 (C-3), 112.6 (C-8), 115.1 (C-3'/C-5'), 116.1 (C-5), 119.8 (C-2'/C-6'), 123.0 (C-8a), 124.3 (C-6), 140.3 (C-4a), 148.1 (C-7), 150.2 (C-1'), 155.4 (C-4'). Anal. (C₁₅H₁₆N₂O₄S) Calcd: C, 56.24; H, 5.03; N, 8.74; S, 10.01. Found: C, 56.29; H, 4.97; N, 8.50; S, 9.44.

4-Cyclopropyl-7-phenoxy-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11h): 57% yield, mp 198–200 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.66 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.90 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.51 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 4.66 (s, 2H, 3-CH₂), 6.96 (d, J = 7.8 Hz, 2H, 2'-H/6'-H), 7.13 (m, 2H, 4'-H/8-H), 7.25 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.34 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.38 (m, 2H, 3'-H/5'-H), 7.95 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 29.8 (CH(CH₂)₂), 61.1 (C-3), 114.2 (C-8), 116.7 (C-5), 117.7 (C-2'/C-6'), 123.2 (C-4'), 123.4 (C-8a), 125.1 (C-6), 130.0 (C-3'/C-5'), 140.8 (C-4a), 147.1 (C-7), 157.4 (C-1'). Anal. (C₁₆H₁₆N₂O₃S) Calcd: C, 60.74; H, 5.10; N, 8.85; S, 10.13. Found: C, 60.49; H, 5.24; N, 9.07; S, 9.58.

4-Cyclopropyl-7-(2-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11i): 44% yield, mp 244–247 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.65 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.89 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.47 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 4.64 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 3-CH₂), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 3'-H), 6.95 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.09 (t, J = 7.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.19 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.22

(t, J = 7.5 Hz, 1H, 4'-H), 7.32 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 6'-H), 7.33 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.94 (t, J = 8.0 Hz, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 15.8 (CH₃), 29.8 (CH(CH₂)₂), 61.1 (C-3), 112.1 (C-8), 116.7 (C-5), 118.4 (C-3'), 123.4 (C-8a), 123.7 (C-6), 123.9 (C-5'), 127.5 (C-4'), 128.6 (C-2'), 131.6 (C-6'), 140.2 (C-4a), 148.1 (C-7), 154.4 (C-1'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₃S) Calcd: C, 61.80; H, 5.49; N, 8.48; S, 9.70. Found: C, 62.09; H, 5.62; N, 8.43; S, 9.50.

4-Cyclopropyl-7-(3-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11j): 52% yield, mp 196–197.5 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.66 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.90 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.49 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 4.66 (d, J = 3.7 Hz, 2H, 3-CH₂), 6.74 (dd, J = 8.1, 2.3 Hz, 1H, 4'-H), 6.78 (s, 1H, 2'-H), 6.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 6'-H), 7.11 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.24 (m, 2H, 6-H/5'-H), 7.34 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.96 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 20.9 (CH₃), 29.8 (CH(CH₂)₂), 61.0 (C-3), 114.2 (C-8), 114.7 (C-4'), 116.6 (C-5), 118.2 (C-2'), 123.4 (C-8a), 123.9 (C-6'), 124.1 (C-6), 129.7 (C-5'), 139.7 (C-4a), 140.7 (C-3'), 147.1 (C-7), 157.4 (C-1'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₃S) Calcd: C, 61.80; H, 5.49; N, 8.48; S, 9.70. Found: C, 62.13; H, 5.56; N, 8.53; S, 9.70.

4-Cyclopropyl-7-(4-methylphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11k): 35% yield, mp 188–190 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.65 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.89 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.49 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 4.64 (s, 2H, 3-CH₂), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2'-H/6'-H), 7.05 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.19 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 3'-H/5'-H), 7.22 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.33 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.95 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 20.2 (CH₃), 29.8 (CH(CH₂)₂), 61.1 (C-3), 113.4 (C-8), 116.6 (C-5), 118.0 (C-2'/C-6'), 123.4 (C-8a), 124.6 (C-6), 130.4 (C-3'/C-5'), 132.4 (C-4'), 140.5 (C-4a), 147.8 (C-7), 154.9 (C-1'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₃S) Calcd: C, 61.80; H, 5.49; N, 8.48; S, 9.70. Found: C, 61.86; H, 5.63; N, 8.79; S, 9.29.

4-Cyclopropyl-7-(2-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11l): 17% yield, mp 209–212 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.63 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.88 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.46 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.61 (s, 2H, 3-CH₂), 6.86 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 6.99 (m, 2H, 5'-H/6'-H), 7.13 (dd, J = 9.2, 3.0 Hz, 2H, 6-H), 7.19 (m, 2H, 3'-H/4'-H), 7.29 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.92 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.3 (CH(CH₂)₂), 29.8 (CH(CH₂)₂), 55.6 (OCH₃), 61.1 (C-3), 110.6 (C-8), 113.5 (C-3'), 116.5 (C-5), 121.1 (C-5'/C-6'), 122.5 (C-6), 123.2 (C-8a), 125.6 (C-4'), 139.8 (C-4a), 143.8 (C-1'), 149.1 (C-7), 151.1 (C-2'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₄S) Calcd: C, 58.94; H, 5.24; N, 8.09; S, 9.25. Found: C, 59.03; H, 5.43; N, 8.46; S, 8.67.

4-Cyclopropyl-7-(3-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11m): 31% yield, mp 150–152 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.66 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.90 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.51 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.66 (s, 2H, 3-CH₂), 6.47 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H, 6'-H), 6.54 (t, J = 2 Hz, 1H, 2'-H), 6.70 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.14 (d, J = 2.7 Hz, 1H, 8-H), 7.25 (d, J = 9 Hz, 1H, 6-H), 7.27 (t, J = 8.3 Hz, 1H, 5'-H), 7.34 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.97 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 29.8 (CH(CH₂)₂), 55.3 (OCH₃), 61.1 (C-3), 103.9 (C-2'), 108.7 (C-4'), 109.5 (C-6'), 114.4 (C-8), 116.6 (C-5), 123.4 (C-8a), 125.2 (C-6), 130.5 (C-5'), 140.9 (C-4a), 146.8 (C-7), 158.6 (C-1'), 160.7 (C-3'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₄S) Calcd: C, 58.94; H, 5.24; N, 8.09; S, 9.25. Found: C, 58.60; H, 5.24; N, 8.44; S, 9.20.

4-Cyclopropyl-7-(4-methoxyphenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (11n): 47% yield, mp 161–162.5 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6) δ 0.64 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.89 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.47 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.63 (s, 2H, 3-CH₂), 6.96 (s, 4H, 2'-H/3'-H/5'-H/6'-H), 6.99 (d, J = 2.9 Hz, 1H, 8-H), 7.20 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H, 6-H), 7.32 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.94 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 8.3 (CH(CH₂)₂), 29.8 (CH(CH₂)₂), 55.4 (OCH₃), 61.1 (C-3), 112.4 (C-8), 115.1 (C-3'/C-5'), 116.6 (C-5), 119.9 (C-2'/C-6'), 123.4 (C-8a), 123.9 (C-6), 140.2 (C-4a), 148.9 (C-7), 150.0 (C-4'), 154.5 (C-1'). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₄S) Calcd: C, 58.94; H, 5.24; N, 8.09; S, 9.25. Found: C, 59.27; H, 5.29; N, 8.20; S, 9.25.

4-Cyclopropyl-7-(3-cyanophenoxy)-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (**11o**): 13% yield, mp 198–200 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.68 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.91 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 2.52 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 4.68 (s, 2H, 3-CH₂), 7.27 (m, 2H, 8-H/6'-H), 7.31 (dd, *J* = 9.1, 2.8 Hz, 1H, 6-H), 7.36 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, 5-H), 7.41 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 2'-H), 7.57 (m, 2H, 4'-H/5'-H), 7.98 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.4 (CH(CH₂)₂), 29.8 (CH(CH₂)₂), 61.0 (C-3), 112.6 (C-3'), 115.3 (C-8), 116.8 (C-5), 118.2 (CN), 120.5 (C-2'), 122.2 (C-6'), 123.5 (C-8a), 125.6 (C-6), 126.8 (C-4'), 131.5 (C-5'), 141.5 (C-4a), 145.6 (C-7), 158.0 (C-1'). Anal. (C₁₇H₁₅N₃O₃S) Calcd: C, 59.81; H, 4.43; N, 12.31; S, 9.39. Found: C, 59.82; H, 4.71; N, 11.96; S, 8.66.

Stable Transfection of GluA2_o(Q) in HEK293 Cells. Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were transfected using the x-tremegene 9 3–1 kit (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Briefly, an expression vector (a mixture of 2.5 μg of pcDNA3.1.Myc-GluA2_o(Q) and 7.5 μL of x-tremegene 9 in a buffer of optiMEM) was added on nearly confluent HEK293 cells in a 50 mm dish. A day later, the antibiotic G418 (700 μg/mL) was added to make the selection.

Fluorescence-Based Calcium Assay on GluA2(Q) Cells. HEK293 cells stably expressing AMPA tetrameric channel form A2 (Q) flop isoform (GluA2_o(Q)) were prepared. HEK293 cells or their stable cell line equivalents were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). The measurement of the fluorescence intensity was carried out using fluorescent microplate reader Fluoroskan Ascent FT equipped with two dispensers (Thermo Electron Corporation, Finland). After trypsinization, the cells were washed twice using Hanks balanced salt solution (HBS, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) and incubated for 1 h with fluorescent dye Fluo-4/AM (5 μg/mL; Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke Belgium). The cells were rinsed twice with HBS, and 100 μL of the resulting cell suspension in HBS buffer was introduced into each well of a 96-well plate (density of 150 000 cells/well). The evaluated compounds were applied at various concentrations (from 3 × 10⁻⁸ M to 10⁻⁴ M, with maximal DMSO concentration = 1%). After shaking the plate 30 s at 1200 rpm, the emission was read at 538 nm after an excitation at 485 nm during 500 ms per measure. Measurement of a vehicle control was followed by injection of a 10 mM glutamate solution (10 μL), a fluorescence measurement, 15 s of shaking at 1200 rpm and a final fluorescence measurement. The results (EC₅₀) are the concentration required to reach half of the maximal intensity, calculated by nonlinear regression analysis (GraphPad Prism software) from at least three independent concentration–response curves made in triplicate.

Expression and Purification. Rat GluA2-LBD, comprising segment S1 residues 413–527, a GT-linker, and segment S2 residues 653–807 (UNP P19491; numbering with signal peptide) as well as GluA2-LBD-L504Y–N775S were expressed and purified following the previously described procedure.³¹ For the SAXS experiments, the construct was identical except that the L504Y mutation was not present (GluA2-LBD-N775S).

Small-Angle X-ray Scattering. SAXS experiments were conducted as previously described.¹¹ Briefly, GluA2-LBD-N775S was concentrated to 3 mg/mL (0.1 mM) in SAXS buffer (10 mM glutamate, 25 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7) and subsequently diluted to the appropriate concentration (0.005–0.1 mM) with SAXS buffer. Loaded samples consisted of 1 μL of appropriately diluted modulator stock solubilized (in DMSO) and 29 μL of diluted protein. All SAXS experiments were collected at the Cornell High-Energy Synchrotron Source (CHESS)'s G1 beamline using a dual Pilatus 100 K–S SAXS/WAXS detector.^{32,33} Capillary cells were robotically loaded with the 30 μL precentrifuged samples, maintained at 4 °C, and thoroughly washed between samples.³⁴ For 0.005, 0.01, and 0.03 mM concentrations of **11m**, each sample condition and SAXS buffer was loaded and measured as three 30 μL replicates. The three scattering curves were averaged together for analysis. Background subtraction with matching buffer and data analysis were performed with RAW software.³⁵ The fraction of dimer was determined from

experimental SAXS data using the OLIGOMER program from the ATAS suite.²⁴ Theoretical CRY SOL-derived²⁴ form factors were based on monomeric and dimeric glutamate-bound GluA2-LBD-N775S structures.

Data were analyzed based on the equilibrium models in Figure 3A.¹¹ For the model with one site per dimer interface the degree of dimerization is given by

$$\bar{R} = \frac{-1 + \sqrt{1 + \left(\frac{8R_t}{K_4} \left(1 + \frac{M}{K_3}\right)\right)}}{1 + \sqrt{1 + \left(\frac{8R_t}{K_4} \left(1 + \frac{M}{K_3}\right)\right)}}$$

where *R*_t is the total GluA2-LBD-N775S concentration and *M* is the free modulator concentration. *K*₄ and *K*₃ are defined in Figure 3A. The degree of dimerization for two sites per dimer interface is given by

$$\bar{R} = \frac{-1 + \sqrt{1 + \left(\frac{8R_t}{K_4} \left(1 + \frac{2M}{K_3} + \frac{M^2}{K_3^2}\right)\right)}}{1 + \sqrt{1 + \left(\frac{8R_t}{K_4} \left(1 + \frac{2M}{K_3} + \frac{M^2}{K_3^2}\right)\right)}}$$

Since only the degree of dimerization is measured, there is no direct measure of the free modulator. In order to appropriately fit the data, the fitting routine generates a curve for values of *K*₃ and *K*₄ as a function of *M* and then calculates the total modulator at each point, generating a new curve for dimerization vs total modulator. In this way, the predicted results can be compared to the data. This is particularly important in cases in which the concentration of GluA2-LBD-N775S approaches that of the modulator (see **11m** in Figure 3B).

The value of *K*₄ was fit simultaneously to all of the SAXS data, as this parameter was common to all modulators and all protein concentrations. As part of that global fit, the *K*₃ was fit simultaneously to all data (i.e., data from all protein concentrations) for a given modulator. In that way, the *K*₄ value was constrained by all of the data across all modulators and protein concentrations, and *K*₃ was constrained by all of the data for a given modulator. This approach was used previously,¹¹ but in this case, the minimum for the *K*₄ value was much better defined because of the additional data used in the fit.

Crystallization of GluA2-LBD-L504Y–N775S with **3.** To GluA2-LBD-L504Y–N775S (4.5 mg/mL in 10 mM HEPES pH 7.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) were added glutamate to a final concentration of 1 mM and **3** as solid compound. The solution was equilibrated at 6 °C overnight prior to use. The protein–ligand complex was crystallized by the hanging-drop vapor-diffusion method at 6 °C. The reservoir volume was 500 μL and consisted of 18% PEG4000, 0.23 M lithium sulfate, and 0.1 M phosphate citrate, pH 4.5. Drops consisted of 1 μL of a protein solution mixed with 1 μL of the reservoir solution. Crystals were briefly submerged into the reservoir solution containing 20% glycerol as a cryo-protectant and flash cooled in liquid nitrogen before storage.

Crystallization of GluA2-LBD with **11m.** To GluA2-LBD (5 mg/mL in 10 mM HEPES pH 7.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) were added glutamate to a final concentration of 5 mM and **11m** as solid compound due to the low solubility of the compound. The solution was equilibrated at 6 °C for 24 h prior to use. The protein–ligand complex was crystallized by the hanging-drop vapor-diffusion method at 6 °C. The reservoir volume was 500 μL and consisted of 15.2% PEG4000, 0.3 M zinc acetate, and 0.1 M sodium acetate, pH 5.5. Drops consisted of 1 μL of a protein solution mixed with 1 μL of the reservoir solution. Crystals were briefly submerged into reservoir solution containing 20% glycerol as a cryo-protectant and flash cooled in liquid nitrogen before storage.

Structure Determination. X-ray diffraction data were collected at beamline I911–3 at MAX-lab, Lund, Sweden³⁶ at a cryogenic temperature (100 K). The data were processed using XDS³⁷ and SCALA³⁸ in the CCP4 suite of programs.³⁹ The two structures were solved by molecular replacement in PHASER⁴⁰ using only the protein

atoms of the search model (PDB entry 3TKD (moA) for structure with **3** and PDB entry 3TDJ (moA) for structure with **11m**). Initial model building was performed using AUTOBUILD⁴¹ in PHENIX⁴² and water molecules were introduced into the structures at this step. During iterative rounds of model building and editing in COOT⁴³ and refinement in PHENIX, ligand molecules, other additives, and additional water molecules were gradually built into the structures. Coordinate files for **3** and **11m** were generated in MAESTRO (v.9.4; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013) and parameter files in eLBOW keeping the geometry.⁴⁴ The structures were refined using individual isotropic B values, TLS, NCS, and riding H atoms. The structures were validated by build-in tools in COOT, MolProbity,⁴⁵ in PHENIX, and the wwPDB Validation Service. Domain closure of GluA2-LBD relative to the apo structure of GluA2-LBD (PDB entry 1FTO, moA) was calculated using the DynDom server.⁴⁶ Figures were prepared in PyMOL (v.1.7; The PyMOL Molecular Graphics System, V.S., LLC).

NMR Spectroscopy. GluA2-LBD-N775S was uniformly labeled with ¹⁵N and prepared for NMR spectroscopy as described previously.⁴⁷ Spectra were collected on a Bruker AVANCE III HD 800 MHz NMR spectrometer at the SUNY ESF NMR facility. A total of 1024 complex points were collected in the proton dimension (spectral width of 14423 Hz), and 128 complex increments were collected in the nitrogen dimension (spectral width of 3080 Hz). Data were analyzed with NMRPipe⁴⁸ and NMRFAM-SPARKY.⁴⁹ Figure 6B was prepared with Chimera.⁵⁰

■ ASSOCIATED CONTENT

§ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01323.

Experimental SAXS data (PDF)

Molecular formula strings of the target compounds (CSV)

■ Accession Codes

The structure coordinates and corresponding structure factor file of GluA2-LBD-L483Y-N754S with glutamate and **3** have been deposited in the Protein Data Bank under the accession code 5O9A and the structure of GluA2-LBD with glutamate and **11m** with accession code SOEW.

■ AUTHOR INFORMATION

■ Corresponding Authors

*E-mail: j.hanson@uliege.be (for pharmacological assays).

*E-mail: reol@cornell.edu (for SAXS and protein NMR).

*E-mail: jsk@sund.ku.dk (for structure determination).

*E-mail: pierre.francotte@uliege.be (for synthetic and medicinal chemistry).

■ ORCID

Christopher P. Ptak: 0000-0003-2752-0367

Lars Olsen: 0000-0002-7607-7130

Jette Sandholm Kastrup: 0000-0003-2654-1510

Pierre Francotte: 0000-0001-9252-7798

■ Author Contributions

[†]E.G. and T.D. contributed equally.

■ Funding

J.H. and T.D. are a F.R.S.-FNRS research associate and Ph.D. fellow, respectively. P.G. is a Télévie Ph.D. fellow. This work was supported by the Fonds pour la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS) Incentive Grant for Scientific Research [F.4510.14], Fonds Léon Frédéricq (Drapier, Gilissen), University of Liège [Fonds Spéciaux], Lundbeck Foundation (Larsen, Frydenvang, Kastrup), Danish Council for Independ-

ent Research (Laulumaa, Kastrup), Novo Nordisk Foundation (Kastrup), GluTarget (Larsen, Frydenvang, Kastrup), Danscatt (Larsen, Frydenvang, Rovinskaja, Kastrup), CoNeXT (Larsen, Kastrup), BioStruct-X (Frydenvang, Rovinskaja, Kastrup), and NIH (NS085239 and GM068935, Oswald). CHESS is supported by the NSF and NIH/NIGMS via the NSF award DMR-1332208, and the MacChess resource is supported by the NIGMS award GM-103485.

■ Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Heidi Peterson is thanked for the help with expression and purification of the ligand-binding domain of GluA2. MAX-Lab, Lund, Sweden is thanked for providing beamtime.

■ ABBREVIATIONS USED

AMPA, AMPA receptor; ATD, amino-terminal domain; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BTB, benzothiadiazine 1,1-dioxide; CTD, cytoplasmic terminal domain; GluA2-LBD, ligand-binding domain of GluA2; HFMZ, hydroflumethiazide; HSQC-TROSY, heteronuclear single quantum coherence transverse relaxation optimized spectroscopy; KA, kainic acid; SAXS, small-angle X-ray scattering; TMD, transmembrane domain

■ REFERENCES

- (1) Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 7–61.
- (2) Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingledine, R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 405–496.
- (3) Haganir, R. L.; Nicoll, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* **2013**, *80*, 704–717.
- (4) Lynch, G.; Palmer, L. C.; Gall, C. M. The likelihood of cognitive enhancement. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2011**, *99*, 116–129.
- (5) Partin, K. M. AMPA receptor potentiators: from drug design to cognitive enhancement. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *20*, 46–53.
- (6) Jourdi, J.; Hsu, Y.-T.; Zhou, M.; Qin, Q.; Bi, X.; Baudry, M. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA. *Transl. J. Neurosci.* **2009**, *29*, 8688–8697.
- (7) Clarkson, A. N.; Overman, J. J.; Zhong, S.; Mueller, R.; Lynch, G.; Carmichael, S. T. AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 3766–3775.
- (8) Gan, Q.; Salussolia, C. L.; Wollmuth, L. P. Assembly of AMPA receptors: mechanisms and regulation. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 39–48.
- (9) Sager, C.; Terhag, J.; Kott, S.; Hollmann, M. C-terminal domains of transmembrane α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptor regulatory proteins not only facilitate trafficking but are major modulators of AMPA receptor Function. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 32413–32424.
- (10) Arai, A. C.; Kessler, M.; Rodgers, G.; Lynch, G. Effects of the Potent Ampakine CX614 on hippocampal and recombinant AMPA receptors: interactions with cyclothiazide and GYKI 52466. *Mol. Pharm.* **2000**, *58*, 802–813.
- (11) Ptak, C. P.; Hsieh, C. L.; Weiland, G. A.; Oswald, R. E. Role of stoichiometry in the dimer-stabilizing effect of ampa receptor allosteric modulators. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 128–133.
- (12) Ptak, C. P.; Ahmed, A. H.; Oswald, R. E. Probing the allosteric modulator binding site of GluR2 with thiazide derivatives. *Biochemistry* **2009**, *36*, 8594–8602.

- (13) Pirotte, B.; Francotte, P.; Goffin, E.; de Tullio, P. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 615–628.
- (14) Citti, C.; Battisti, U. M.; Cannazza, G.; Jozwiak, K.; Stasiak, N.; Puja, G.; Ravazzini, F.; Ciccarella, G.; Braghiroli, D.; Parenti, C.; Troisi, L.; Zoli, M. 7-Chloro-5-(furan-3-yl)-3-methyl-4H-benzo[e][1,2,4]-thiadiazine 1,1-dioxide as positive allosteric modulator of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor. The end of the unsaturated-inactive paradigm? *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 149–160.
- (15) Battisti, U. M.; Citti, C.; Rastelli, G.; Pinzi, L.; Puja, G.; Ravazzini, F.; Ciccarella, G.; Braghiroli, D.; Cannazza, G. An unexpected reversal in the pharmacological stereoselectivity of benzothiadiazine AMPA positive allosteric modulators. *MedChemComm* **2016**, *7*, 2410–2417.
- (16) Krintel, C.; Francotte, P.; Pickering, D. S.; Juknaite, L.; Pohlsgaard, J.; Olsen, L.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Enthalpy-entropy compensation in the binding of modulators at ionotropic glutamate receptor GluA2. *Biophys. J.* **2016**, *110*, 2397–2406.
- (17) Larsen, A. P.; Francotte, P.; Frydenvang, K.; Tapken, D.; Goffin, E.; Fraikin, P.; Caignard, D. H.; Lestage, P.; Danober, L.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Synthesis and pharmacology of mono-, di-, and trialkyl-substituted 7-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides combined with x-ray structure analysis to understand the unexpected structure-activity relationship at AMPA receptors. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 378–390.
- (18) Cordi, A.; Desos, P.; Lestage, P. N. *Benzothia(dia)zine derivatives and their use as ampa modulators*. U.S. Patent WO03053947 (A1), 2003.
- (19) Francotte, P.; de Tullio, P.; Goffin, E.; Dintilhac, G.; Graindorge, E.; Fraikin, P.; Lestage, P.; Danober, L.; Thomas, J.-Y.; Caignard, D.-H.; Pirotte, B. Design, synthesis, and pharmacology of novel 7-substituted 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides as positive allosteric modulators of AMPA receptors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3153–3157.
- (20) Nørholm, A. B.; Francotte, P.; Goffin, E.; Botez, I.; Danober, L.; Lestage, P.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S.; Olsen, L.; Oostenbrink, C. Thermodynamic characterization of new positive allosteric modulators binding to the glutamate receptor A2 ligand-binding domain: combining experimental and computational methods unravels differences in driving forces. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 3404–3416.
- (21) Francotte, P.; Nørholm, A. B.; Deva, T.; Olsen, L.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Fraikin, P.; de Tullio, P.; Challal, S.; Thomas, J. Y.; Iop, F.; Louis, C.; Botez-Pop, I.; Lestage, P.; Danober, L.; Kastrup, J. S.; Pirotte, B. positive allosteric modulators of 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic acid receptors belonging to 4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-pyridothiadiazine dioxides and diversely chloro-substituted 4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9539–9553.
- (22) Weiss, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **1997**, *11*, 835–841.
- (23) Nørholm, A. B.; Francotte, P.; Olsen, L.; Krintel, C.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Challal, S.; Danober, L.; Botez-Pop, I.; Lestage, P.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Synthesis, pharmacological and structural characterization, and thermodynamic aspects of GluA2-positive allosteric modulators with a 3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide scaffold. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8736–8745.
- (24) Petoukhov, M. V.; Franke, D.; Shkumatov, A. V.; Tria, G.; Kikhney, A. G.; Gajda, M.; Gorba, C.; Mertens, H. D.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 342–350.
- (25) Sun, Y.; Olson, R.; Horning, M.; Armstrong, N.; Mayer, M.; Gouaux, E. Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **2002**, *417*, 245–253.
- (26) Ahmed, A. H.; Ptak, C. P.; Oswald, R. E. Molecular mechanism of flop selectivity and subsite recognition for an AMPA receptor allosteric modulator: structures of GluA2 and GluA3 in complexes with PEPA. *Biochemistry* **2010**, *49*, 2843–2850.
- (27) Dunitz, J. D.; Taylor, R. Organic Fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds. *Chem. - Eur. J.* **1997**, *3*, 89–98.
- (28) Francotte, P.; Goffin, E.; Fraikin, P.; Lestage, P.; Van Heugen, J.-C.; Gillotin, F.; Danober, L.; Thomas, J.-Y.; Chiap, P.; Caignard, D.-H.; Pirotte, B.; De Tullio, P. New fluorinated 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides: discovery of an orally active cognitive enhancer acting through potentiation of the 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic acid receptors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1700–1711.
- (29) Clark, T.; Hennemann, M.; Murray, J. S.; Politzer, P. Halogen bonding: the σ -hole. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 291–296.
- (30) Politzer, P.; Murray, J. S.; Clark, T. Halogen bonding: an electrostatically-driven highly directional noncovalent interaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7748–7757.
- (31) Krintel, C.; Frydenvang, K.; Olsen, L.; Kristensen, M. T.; de Barrios, O.; Naur, P.; Francotte, P.; Pirotte, B.; Gajhede, M.; Kastrup, J. S. Thermodynamics and structural analysis of positive allosteric modulation of the ionotropic glutamate receptor GluA2. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 173–178.
- (32) Skou, S.; Gillilan, R. E.; Ando, N. Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1727–1739.
- (33) Acerbo, A. S.; Cook, M. J.; Gillilan, R. E. Upgrade of MacCHESS facility for X-ray scattering of biological macromolecules in solution. *J. Synchrotron Radiat.* **2015**, *22*, 180–186.
- (34) Nielsen, S. S.; Moller, M.; Gillilan, R. E. High-throughput biological small-angle X-ray scattering with a robotically loaded capillary cell. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 213–223.
- (35) Hopkins, J. B.; Gillilan, R. E.; Skou, S. BioXTAS RAW: improvements to a free open-source program for small-angle X-ray scattering data reduction and analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **2017**, *50*, 1545–1553.
- (36) Ursby, T.; Unge, J.; Appio, R.; Logan, D. T.; Fredslund, F.; Svensson, C.; Larsson, K.; Labrador, A.; Thunnissen, M. M. G. M. The macromolecular crystallography beamline 1911–3 at the MAX IV laboratory. *J. Synchrotron Radiat.* **2013**, *20*, 648–653.
- (37) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.
- (38) Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 72–82.
- (39) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235–242.
- (40) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- (41) Terwilliger, T. C.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Afonine, P. V.; Moriarty, N. W.; Zwart, P. H.; Hung, L. W.; Read, R. J.; Adams, P. D. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2008**, *64*, 61–69.
- (42) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.
- (43) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- (44) Moriarty, N. W.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 1074–1080.

(45) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.

(46) Hayward, S.; Berendsen, H. J. C. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change; new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1998**, *30*, 144–154.

(47) Ptak, C. P.; Ahmed, A. H.; Oswald, R. E. NMR approaches to functional dynamics of genetically separated iGluR domains. *Neuro-methods* **2016**, *106*, 101–118.

(48) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277–293.

(49) Lee, W.; Tonelli, M.; Markley, J. L. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1325–1327.

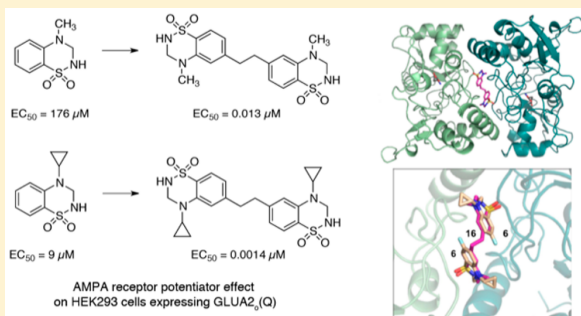
(50) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.

Enhancing Action of Positive Allosteric Modulators through the Design of Dimeric Compounds

Thomas Drapier,[†] Pierre Geubelle,^{†,‡} Charlotte Bouckaert,[§] Lise Nielsen,^{||} Saara Laulumaa,^{||} Eric Goffin,[†] Sébastien Dilly,[†] Pierre Francotte,^{†,||} Julien Hanson,^{*,†,‡} Lionel Pochet,^{*,§} Jette Sandholm Kastrup,^{*,||,||} and Bernard Pirotte^{*,†,||}[†]Laboratory of Medicinal Chemistry, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), ULiège, Quartier Hôpital, Avenue Hippocrate, 15, B36, B-4000 Liège, Belgium[‡]Laboratory of Molecular Pharmacology, GIGA-Molecular Biology of Diseases, ULiège, B34, Quartier Hôpital, Avenue de l'hôpital, 11, B-4000 Liège, Belgium[§]Namur Medicine & Drug Innovation Center (NAMEDIC), NARILIS, UNamur, rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium^{||}Biostructural Research, Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen, Denmark

Supporting Information

ABSTRACT: The present study describes the identification of highly potent dimeric 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BTD)-type positive allosteric modulators of the AMPA receptors (AMPAms) obtained by linking two monomeric BTD scaffolds through their respective 6-positions. Using previous X-ray data from monomeric BTDs cocrystallized with the GluA2 ligand-binding domain (LBD), a molecular modeling approach was performed to predict the preferred dimeric combinations. Two 6,6-ethylene-linked dimeric BTD compounds (**16** and **22**) were prepared and evaluated as AMPAms on HEK293 cells expressing GluA₂(Q) (calcium flux experiment). These compounds were found to be about 10,000 times more potent than their respective monomers, the most active dimeric compound being the bis-4-cyclopropyl-substituted compound **22** [6,6'-(ethane-1,2-diyl)bis(4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide)], with an EC₅₀ value of 1.4 nM. As a proof of concept, the bis-4-methyl-substituted dimeric compound **16** (EC₅₀ = 13 nM) was successfully cocrystallized with the GluA₂-LBD and was found to occupy the two BTD binding sites at the LBD dimer interface.



INTRODUCTION

It is well established that L-glutamate is the key excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS).¹ L-Glutamate exerts its biological effect on the CNS through the activation of either metabotropic (mGluRs, G protein-coupled) or ionotropic (iGluRs, ligand-gated ion channel) receptors.^{1,2} iGluRs can be classified into three subcategories depending on their affinity toward nonendogenous ligands: *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, and kainic acid (KA) receptors.^{1,2} Due to rapid response to L-glutamate in the synapses, iGluRs play a sustainable role in the fast transmission of excitatory potentials from one neuron to another.^{3–5} Several studies have shown the impact of a decrease of the AMPA signaling in brain disorders such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), Alzheimer's disease, mild depression, or schizophrenia.^{6–8} Based on this, the AMPA receptors (AMPAms) seem to be an interesting pharmacological target

for the development of either probing tools or cognitive enhancers.

It is conceivable that agonists could be used as cognitive enhancers, but their development is questioned due to the possible occurrence of unwanted and adverse phenomena related to excitotoxicity.⁹ Therefore, AMPA positive allosteric modulators (so-called “AMPAms”) have been postulated to be a more promising option. Because they do not bind into the orthosteric-binding site but into an allosteric binding site, they are expected to be devoid of an intrinsic activity on the AMPARs and to show an effect only when glutamate is released in the synapse. This mode of action is assumed to give better fine-tuning of the AMPA receptor signaling and to avoid the excitotoxicity problems resulting from overdose of a direct agonist.

Received: February 14, 2018

Published: May 18, 2018

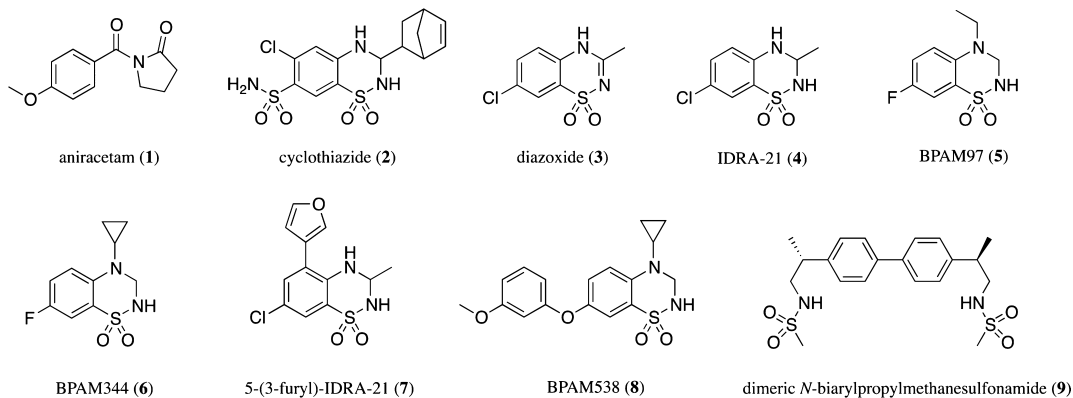


Figure 1. Known AMPA receptor modulators from different families. Benzamides, (1) aniracetam; 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides, (2) cyclothiazide, (3) diazoxide, (4) IDRA-21, (5) BPAM97, (6) BPAM344, (7) 5-(3-furyl)-IDRA-21,⁵⁸ (8) BPAM538; *N*-biarylpropylmethanesulfonamides, dimeric compound (9).

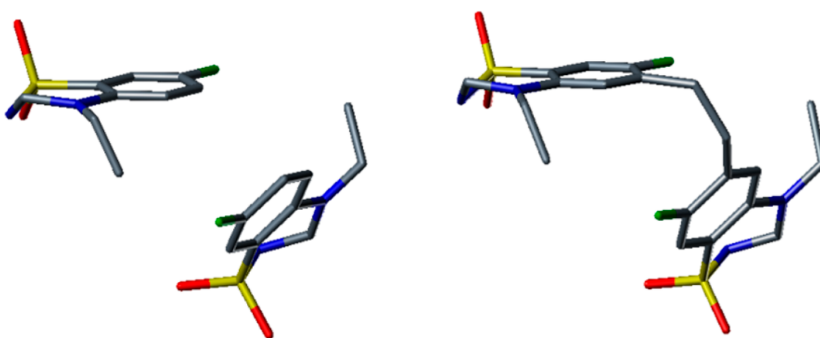
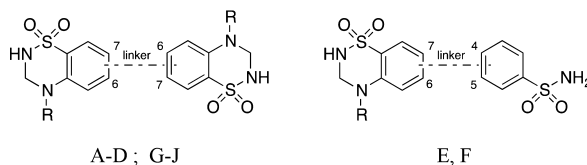


Figure 2. Spatial arrangement of two molecules of **5** at the interface of two GluA2 LBDs (left) according to the cocrystallization data.²⁸ Spatial arrangement of modeled dimeric compound **5** linked with an ethylene bridge at the 6-position of each benzothiadiazine dioxide scaffold [modeled under the SYBYL 8.0 software (Tripos Inc.: St. Louis, MO, 2008)] by using a library of standard fragments; the geometry was then optimized using the MMFF94 force field.⁵⁹ It was expected that the dimeric compound can adopt a conformation that fits the two binding sites of the two constitutive monomers.

AMPA receptors consist of various combinations of four different subunits (GluA1–4) that can bind to each other in several ways, either on a homo- or a heteromeric scaffold with heteromeric constructions preferred in wild type neurons.¹⁰ They first assemble in dimers and then in functional dimers of dimers (homodimers or heterodimers).¹¹ Each subunit constituting the receptors can be divided into four semi-autonomous domains.^{12–14} Two of them are extracellular: the amino-terminal domain (ATD) and the ligand-binding domain (LBD). One is inside the membrane, which constitutes the channel itself, the transmembrane domain (TMD). The last one is intracellular, the carboxy-terminal domain (CTD).^{12–14} Interactions with ligands occur at the level of the LBD, either with *L*-glutamate or with different allosteric modulators, respectively, in the orthosteric (agonist) binding site and in the allosteric binding site, which lies at the interface of two subunits.² The interactions of AMPApams with the AMPAR can lead to two main outcomes: they can act on slowing down the receptor deactivation process by enhancing the affinity of *L*-glutamate for its orthosteric binding site or they can increase the affinity between subunits, thereby inhibiting the receptor desensitization process, where conformational changes lead to the closure of the channel even if *L*-glutamate is still bound.^{15–17}

The well-known allosteric binding site has a U shape and comprises LBDs of both subunits. It is divided in three smaller subsites called A, B/B', and C/C'.^{18,19} Allosteric modulators interact with the different subsites depending on their chemical structure. For example, the benzamide-type family of AMPApams was shown to interact mostly with the A subsite.¹⁸ Among those compounds, aniracetam (**1**, Figure 1) is referred to as the oldest molecule acting as an AMPApam.²⁰ The second major chemical class of AMPApams is the ring-fused thiadiazine family of compounds among which the benzothiadiazine dioxide (BTD) members are the most prominent representatives.²⁰ They were studied following the discovery of the *in vitro* AMPAR potentiation by cyclothiazide (**2**, Figure 1), a compound used in clinical practice for its diuretic action.²¹ However, this drug did not show marked *in vivo* activity on the CNS resulting from AMPAR potentiation, probably because of its inability to cross the blood–brain barrier (BBB).^{18,20} Cyclothiazide interacts with the B and C subsites of this allosteric binding site in a symmetrical way resulting in an interaction of one molecule per subunit, thus two molecules at the dimer interface.¹⁸ Unlike cyclothiazide, IDRA 21 (**4**, Figure 1), a saturated analog of the potassium channel opener diazoxide (**3**, Figure 1), was found to be active *in vitro* as an AMPApam²² and was further identified *in vivo* as a cognitive enhancer in animal models of cognitive impairments.^{23,24}

Table 1. Proposed Dimeric Structures for the Docking Studies with Their Occurrence, ChemPLP Score, and Calculated Binding Energy (BE)

A-D ; G-J

E, F

numbering	linker	R	occurrence ^a	ChemPLP score	BE (kcal/mol)
A or 16	6-(CH ₂) ₂ -6	methyl	20/20	84.0	-55.7
B or 22	6-(CH ₂) ₂ -6	cyclopropyl	11/20	90.2	-54.8
C	6-(CH ₂) ₃ -6	methyl	13/20	87.8	-45.4
D	6-(CH ₂) ₃ -6	cyclopropyl	10/20	90.1	-53.2
E	6-(CH ₂) ₂ -4	cyclopropyl	18/20	78.1	-26.9
F	6-(CH ₂) ₂ -4	cyclopropyl	9/20	81.0	-34.6
G	7-(CH ₂) ₂ -7	methyl	20/20	85.1	-25.0
H	7-(CH ₂) ₂ -6	methyl	11/20	78.1	-37.3
I	6-NH-CO-6	methyl	13/20	61.4	-2.74
J	6-NH-CH ₂ -6	methyl	15/20	81.1	-50.3

^aThe selected docking pose is the best representative (based on the ChemPLP score) of the cluster having the highest occurrence. In this study, the selected docking poses are, in addition, the best docking poses among the 20 solutions given by Gold except for dimeric compounds C and F.

Accordingly, many examples of ring-fused thiadiazine dioxides based on this structure were developed as AMPApams (see, for example, compounds 5–8; Figure 1).^{20,25} These molecules interact in different ways with the binding site compared to cyclothiazide: being smaller, they rotate in the cavity and only interact with the hydrophobic C/C' subsites (still with a ratio of one molecule per subunit, thus two molecules per dimer interface).¹⁸ Recently, the large-sized BTD modulator 8 (BPAM538) was found to bind the "BTB" allosteric site with a high affinity and with only one molecule per dimer interface.²⁶ Other families of AMPApams that have their own way to interact with the allosteric binding site have been reported,²⁰ among which are *N*-biaryl(cyclo)alkyl-2-propane-sulfonamides, phenyliminothiazoles, and 3-trifluoromethylpyrazoles.

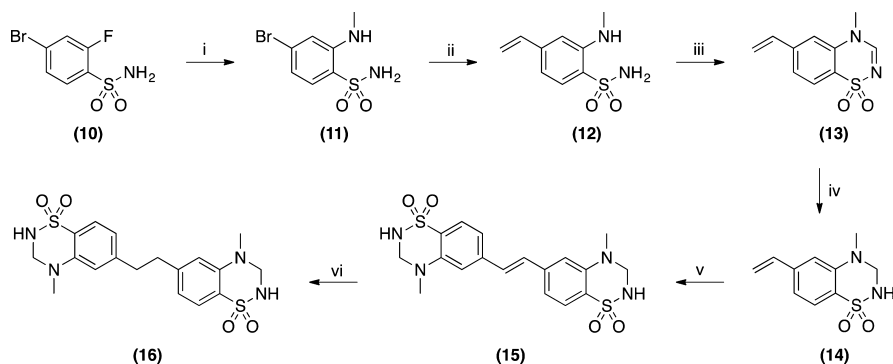
Among the reported AMPApams, *N*-biarylpropylmethane-sulfonamides such as 9 synthesized by Kaae et al.²⁷ should be highlighted as the first examples of dimeric molecules modulating the activity of AMPARs. The authors showed that some dimeric compounds acted as AMPApams with a drastic 1000-fold elevation of the potency compared to the constitutive monomers.²⁷ This gain of potency was tentatively explained by the presence of the 2-fold pattern fitting in the two subsites, C and C', on both sides of the AMPAR dimer interface.

Based on X-ray data obtained from some examples of BTB-type AMPApams synthesized by our team and cocrystallized with the GluA2-LBD,^{28–33} we clearly observed a close proximity of two modulators in two binding sites at the dimer interface. Thus, we hypothesized that it should be possible to design dimeric compounds linked together via the 6-position of the respective BTB monomers (Figure 2), providing new ligands with a significant enhancement of potency on AMPARs. This assumption was reinforced by our recent work on 7-phenoxy-substituted BTBs.²⁶ Indeed, we demonstrated that these compounds occupied the C subsite with their BTB moiety, spanning the A subsite and pointing the methoxy substituent toward the B' subsite where water-mediated interactions took place between receptor subunits.²⁶ Therefore, we reasoned that it could be possible to design

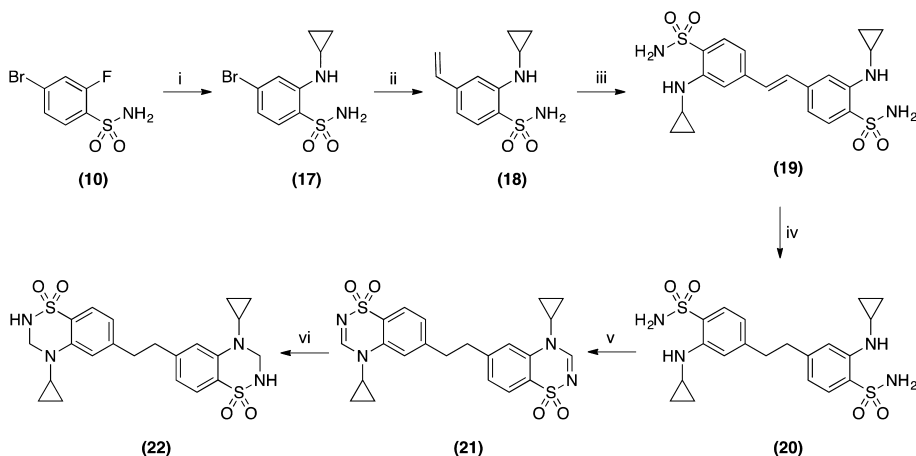
rather large molecules that would interact on both sites of the GluA2-LBD dimer interface. Starting from such hypothesis, we elaborated our work with an initial molecular modeling approach (docking studies) to predict what would be the most potent dimeric modulator candidates. These molecules were synthesized, pharmacologically evaluated, and then compared to their respective monomers in order to demonstrate a gain of activity on the AMPAR by the design of dimeric compounds, and finally cocrystallized with the GluA2_o-LBD as an ultimate proof of concept.

RESULTS AND DISCUSSION

Dimeric Compounds Design Based on Docking Studies. In order to prioritize the synthesis of novel compounds, we decided to dock potential dimeric combinations and to compare the obtained results with the position of the two isolated monomers (compound 6) in the crystal structure (PDB code 4N07).²⁹ According to the distance between the two monomers in the crystal structure, we estimated that an ethylene or a propylene spacer would be appropriate to generate dimeric structures. The anchoring points for the linker were set to the 6,6-, 7,7-, or 6,7-position. We also considered amide or methylamine linkers instead of the alkyl-linking group. The alkyl substituent at the 4-position was chosen in accordance with previously established structure–activity relationships (SAR) (a methyl radical as the smallest alkyl group and a cyclopropyl radical known to confer the highest potency in the BTB series of AMPApams). Finally, we evaluated the possibility to simplify the structure by replacing one of the BTB monomers by a simpler benzenesulfonamide group. On this ground, a total of 10 potential dimeric compounds were designed and docked using the automated GOLD 5.3.0 program, while the binding energy and interactions were obtained using Discovery Studio 4.0. The docking solutions were ranked and analyzed according to the occurrence of compounds in each cluster, the ChemPLP score, the calculated binding energy, and the superimposition with compound 6 in the crystal structure (see Supporting Information for details on the interactions between the docking pose and the target).

Scheme 1. Synthetic Pathway Leading to the 4-Methyl-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Dimeric Compound 16^a

^ai: methylamine, μw , yield: 96%; ii: $\text{KBF}_3\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, KF , μw , yield: 33%; iii: triethyl orthoformate, 130°C , yield: 81%; iv: NaBH_4 , 2-propanol, yield: 61%; v: Hoveyda-Grubbs II catalysts, CH_2Cl_2 , yield: 65%; vi: Pd/C 10%, H_2 , 12 bars, yield: 25%.

Scheme 2. Synthetic Pathway Leading to the 4-Cyclopropyl-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Dimeric Compound 22^a

^ai: cyclopropylamine, 1,4-dioxane, μw , yield: 75%; ii: $\text{KBF}_3\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, KF , μw , yield: 86%; iii: Hoveyda-Grubbs II catalysts, CH_2Cl_2 , yield: 89%; iv: Pd/C 10%, H_2 , 12 bars, yield: 90%; v: triethyl orthoformate, 130°C ; yield: 87% vi: NaBH_4 , 2-propanol, yield: 82%.

From the results of this docking study, it seems that an ethylene linker would be more favorable compared to a propylene, an amide or a methylamine linker, and that the anchoring point should preferably be the 6,6-position (Table 1). While a propylene linker associated with a *N*-methyl moiety gives a promising calculated binding energy, its superimposition with the monomer in the crystal structure was found to be less satisfactory (see dimeric compounds C and D in the Supporting Information). The simplification of the dimeric structure through the replacement of one BTM monomer with a benzenesulfonamide group led to a marked decrease of estimated binding energy. Taken together, the results of this analysis highlighted the potential interest of the dimeric compounds A (16) and B (22) with an ethylene bridge between the two 6-positions of the respective BTM scaffolds for potent AMPAR positive allosteric modulation.

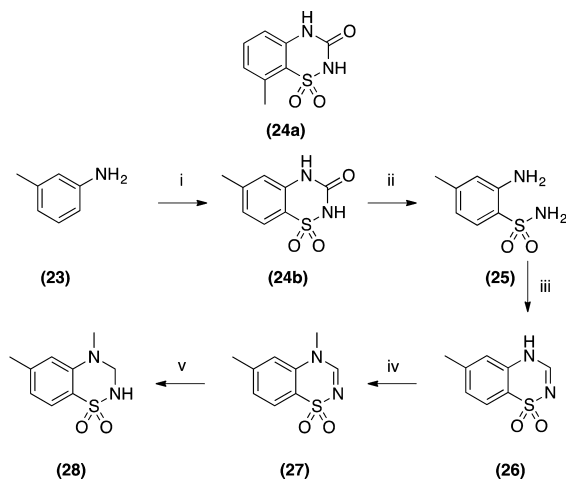
Synthesis of the Target Compounds. The synthetic pathways giving access to the two desired dimeric molecules 16 and 22 are shown in Schemes 1 and 2. It should be noted that the change of the nature of the substituent on the nitrogen atom at the 4-position led to a complete change in the synthetic

pathway. For the 4-methyl-substituted dimeric compound 16, a classical convergent method was used, and we first realized the synthesis of the monomeric BTM intermediate 14 according to previously described protocols²⁹ except the use of a Suzuki's coupling reaction for vinylation at the 6-position. Finally, the 6-vinyl-substituted monomer 14 was coupled through a Grubbs' metathesis for dimerization to obtain the dimeric intermediate 15, which gave access to the final compound 16 after hydrogenation (Scheme 1). For the 4-cyclopropyl-substituted dimeric molecule 22, the same synthetic pathway was investigated, but the classical ring formation with triethyl orthoformate on intermediate 18 led to uncharacterized byproducts. A second pathway was developed in which the dimerization took place before the ring closure reaction, and then the benzothiadiazine dioxide cycle was obtained on both sides of the dimeric molecule according to classical protocols (Scheme 2).

Concerning the monomeric compounds selected for comparison purposes in this work, the BTMs 34 and 35 devoid of a substituent at the 6-position were synthesized as previously described.^{29,34} The corresponding 6-methyl-sub-

stituted BTDs **28** and **33** were obtained using a slightly modified pathway compared to their corresponding unsubstituted analogs at the 6-position (Schemes 3 and 4).

Scheme 3. Synthetic Pathway Leading to the 4,6-Dimethyl-Substituted BTD Monomer **28**^a

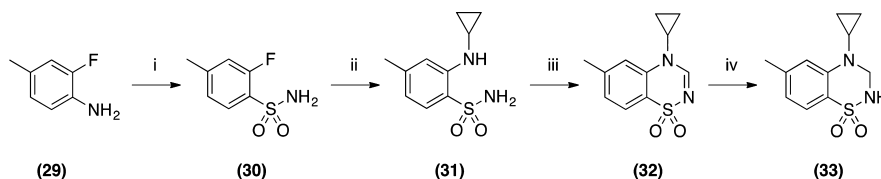


^ai: 1: ClSO₂NCO, CH₃NO₂; 2: AlCl₃; ii: H₂SO₄ 50%, Δ, yield from **23**: 19%; iii: triethyl orthoformate, 130°C, yield: 76%; iv: CH₃I, K₂CO₃, CH₃CN, yield: 75%; v: NaBH₄, 2-propanol, yield: 75%.

Starting from *m*-toluidine (**23**), the ring closure reaction was performed with chlorosulfonyl isocyanate in the classical experimental conditions described by Girard et al.³⁵ The reaction provided a mixture of two geometric isomers (**24a** and **24b**) (Scheme 3). The mixture was engaged in the next step of hydrolysis by means of concentrated sulfuric acid in water (50% w/v). After 6 h at refluxing temperature, compound **24b** was predominantly converted into the corresponding ring-opened aminobenzenesulfonamide **25**, while compound **24a** remained largely insoluble and unaffected in the acidic medium. After filtration, compound **25** was recovered in the filtrate, and then engaged in the next usual steps³⁴ up to the target compound **28** (Scheme 3).

For the synthesis of **33**, starting compound 2-fluoro-4-methylaniline (**29**) was converted into the corresponding 2-fluoro-4-methylbenzenesulfonamide **30** after diazotization according to the Meerwein conditions.³⁶ The *o*-fluorobenzenesulfonamide **30** was then converted to the target compound **33** according to a multistep sequence previously described for 4-cyclopropyl-substituted 3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (Scheme 4).²⁹

Scheme 4. Synthetic Pathway Leading to the 4-Cyclopropyl-6-methyl-Substituted BTD Monomer **33**^a



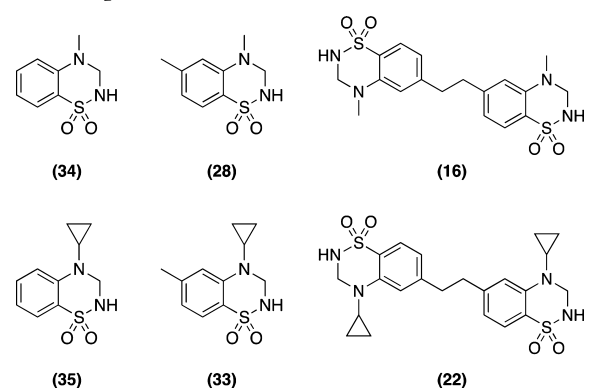
^ai: 1: HNO₂, -5°C; 2: SO₂, Cu₂Cl₂, HOAc; 3: NH₃, yield: 37%; ii: cyclopropylamine, 1,4-dioxane, Δ, yield: 35%; iii: triethyl orthoformate, 130°C, yield: 35%; iv: NaBH₄, 2-propanol, yield: 75%.

Dramatic Increase of the Potency of AMPApams by the Dimeric Design. The evaluation of the two dimeric molecules **16** and **22** and their constitutive monomers **28**, **33**, **34**, and **35** as AMPApams was achieved with a fluorescence-based calcium assay as previously described.²⁶ HEK293 cells stably expressing GluA2_o(Q) were loaded with the calcium-sensitive fluorescent probe Fluo-4-AM. The cells were incubated with the modulators at different concentrations and stimulated with L-glutamate (1 mM).³⁷ The intensity of fluorescence emission is positively correlated to the cytoplasmic concentration of calcium ions and hence can be used as a surrogate measure to estimate the calcium influx from extracellular medium through the open AMPAR channel. Therefore, this assay is suitable to determine the potentiating activity of the compounds on the L-glutamate-induced AMPAR opening. From the data obtained, the pEC₅₀ values (negative logarithm of the modulator concentration responsible for 50% of the maximum effect) were calculated for the six selected molecules and compared with the pEC₅₀ values obtained in the same conditions for the reference compounds **6** and **8** (Table 2; Figure 3).

As expected from previous SAR studies on BTD-type AMPApams,^{20,25} the cyclopropyl substituent at the 4-position was always found to be the optimal (cyclo)alkyl chain with a gain of potency compared to the corresponding 4-methyl-substituted compounds of at least one log unit (compare **35** versus **34**; **33** versus **28**; **22** versus **16**). Introduction of a methyl group at the 6-position in both series giving compounds **28** and **33** was responsible for a marked decrease of potency on AMPARs compared to the unsubstituted compounds **34** and **35** (compare **28** versus **34** and **33** versus **35**) supporting the view that the absence of a substituent at this position should be preferred. On the contrary, with the dimeric compounds bearing an alkyl link at this key position, a substantial improvement of activity on AMPARs, up to more than 10,000 times (4 log units) compared to their corresponding monomers, was observed (compare **16** versus **34**; **22** versus **35**). This major enhancement led to the identification of one of the most potent AMPApams (compound **22**) ever described with an EC₅₀ value of 1.4 nM (pEC₅₀ value of -8.90).

We recently demonstrated that the Hill coefficient (HC), which is sometimes improperly referred to as the "slope" of the sigmoidal curve,³⁸ of the concentration-response curves obtained in our functional assay was a good surrogate to estimate the binding stoichiometry of AMPApams.²⁶ Therefore, calculation of the HC has been included in Table 2. It was noticed that compounds **16** and **22** were characterized by a HC closer to unity, a profile that we previously observed for compound **8**.²⁶ Such observations strongly suggest that the dimeric compounds have a different binding stoichiometry compared to their monomeric counterparts **28** and **33**. These

Table 2. Potentiating Effects of the 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Dimeric Molecules 16 and 22 Compared to the Corresponding Monomers 28, 33, 34, and 35 on the Calcium Flux Induced by 1 mM L-Glutamate on HEK293 Cells Stably Expressing the GluA_{2o}(Q) Subunit and Their Respective Hill Coefficients



compounds	pEC ₅₀ ^a [mean ± SEM (n)]	corresponding EC ₅₀ ^b (μM)	Hill coefficient ^c [mean ± SEM (n)]
34	3.75 ± 0.02 (3)	176.3	2.8 ± 0.4 (3)
28	3.39 ± 0.02 (3)	403.3	2.8 ± 0.4 (3)
16	7.87 ± 0.04 (3)	0.0134	1.2 ± 0.1 (3)
35	5.04 ± 0.02 (3)	9.06	2.2 ± 0.2 (3)
33	4.31 ± 0.03 (3)	48.2	2.2 ± 0.3 (3)
22	8.90 ± 0.05 (3)	0.0014	1.7 ± 0.2 (3)
6	6.090 ± 0.004 (3) ^d	0.81 ^d	3.5 ± 0.1 (3) ^d
8	8.70 ± 0.05 (6) ^d	0.002 ^d	1.4 ± 0.2 (6) ^d

^apEC₅₀: negative logarithm of the AMPApam concentration responsible for 50% of the maximal effect (mean ± SEM (n)).

^bEC₅₀: mean concentration responsible for 50% of the maximal effect, in μM. ^cThe Hill coefficient is given as the mean value ± SEM (n).

^dResults from Goffin et al.²⁶

data are consistent with the nature of these dimeric compounds establishing a bridge between two AMPAR subunits, forming a single binding pocket at this interface.

The observation that the interaction of 7-phenoxy-substituted BTDs with two distant AMPAR subunits led to a drastic enhancement of the activity²⁶ seems to be confirmed here with the dimeric compounds. To our knowledge, the BTD-type AMPApam family shows an effect either on the deactivation or the desensitization process.² With the dimeric

modulators we observe a “staple effect”, or at least a bridge effect, in which the dimeric compound acts by “sticking” the two LBD subunits together, leading to a locked position of the 2-fold symmetric GluA2 dimer and thus most probably inhibiting completely the desensitization phenomenon. This hypothesis is strengthened by studies on iGluRs involving rigid bridging through cysteine–cysteine interaction where the linking of the two different parts of the LBD with a similar bridge significantly affected desensitization.^{39–41}

Cocrystallization of Dimeric Compound 16 with GluA_{2o}-LBD Shows 1:2 Stoichiometry. To establish the binding mode of 16 at AMPARs, we crystallized 16 in complex with GluA_{2o}-LBD and L-glutamate. Diffraction data were collected to a high resolution of 1.4 Å (Table 3). The complex crystallized with two GluA_{2o}-LBD molecules in the crystal asymmetric unit, forming a dimer (Figure 4A). Unambiguous electron density was observed for L-glutamate in both orthosteric binding sites and for one molecule of 16 at the dimer interface (Figure 4B). In the presence of 16, L-glutamate induces a domain closure of 20.7° (chain A) and 21.7° (chain B) relative to the apo structure of GluA_{2o}-LBD (PDB code 1FTO, chain A). These domain closures are similar to those observed with L-glutamate with no modulator bound.⁴²

Compound 16 binds at GluA2 in a low energy conformation (2.8 kJ/mol above the global energy minimum). Therefore, introducing an ethylene bridge in 16 only gives rise to a minor conformational penalty. For the dimeric modulator 16, the potency at GluA2 was increased ~30 000 and ~13 000 times, respectively, compared to its monomeric parent compound 28 (6-methyl) and the monomeric compound containing a 6-hydrogen (34) (Table 1). Similarly, compound 22 was superior to its monomeric parent compounds 33 (~34 000) and 35 containing 6-hydrogen (~6 000). The increase in potencies corresponds to a more favorable energy of 22–26 kJ/mol. It has previously been shown that the potency of a bivalent modulator was greater than the sum of its fragments.²⁷ This could be due to a decreased loss of rotational and translational entropy (from freezing of the overall molecular motion) in the dimeric compound resulting from joining the fragments compared to the binding of two individual components of the monomer. However, other aspects related to enthalpy might also be involved such as decreased rate of dissociation of the dimer. The 6-hydrogen containing compounds 34 and 35 have a greater potency than 6-methyl compounds 28 and 33 (~2 and 5 times, respectively). This is in agreement with that

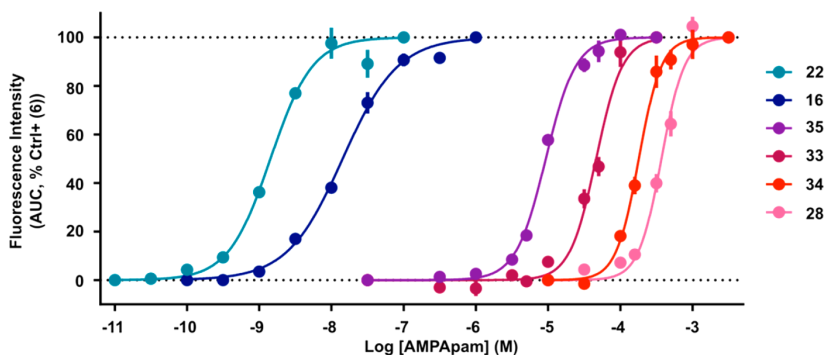


Figure 3. Concentration–response curves obtained in a fluorescence-based calcium assay in GluA_{2o}(Q)-transfected HEK293 cells. Compounds 16 and 22 show a marked increase in potency compared to their corresponding monomers (28 and 34 for 16; 33 and 35 for 22).

Table 3. Crystal Data, Data Collection, and Refinement Statistics of GluA2_o-LBD in Complex with L-Glutamate and 16

Crystal Data	
PDB-code	6FAZ
beamline	BioMAX, MAX-IV
space group	<i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₁
unit cell dimensions (Å)	97.21, 121.46, 47.16
molecules in a.u. ^a	2
Data Collection and Processing	
resolution (Å)	47.16–1.40 (1.47–1.40) ^b
unique reflections	110,730 (15,969)
average multiplicity	13.3 (13.4)
completeness (%)	100 (100)
wilson <i>B</i> -factor (Å ²)	16.6
<i>R</i> _{merge} (%) ^c	5.5 (64.3)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	7.2 (1.2)
Refinement	
numbers of	
amino-acid residues (chain A/chain B)	263/260
compound 16	1
L-glutamate/sulfate/PEG/glycerol/chloride/acetate/ethylene glycol/water	2/5/2/5/5/3/2/677
<i>R</i> _{work} ^d (%)/ <i>R</i> _{free} ^e (%)	13.6/16.8
average <i>B</i> -values (Å ²) for	
amino acid residues (chain A/chain B)	22.6/26.4
compound 16	26.5
L-glutamate/sulfate/PEG/glycerol/chloride/acetate/ethylene glycol/water	15.6/40.1/43.9/49.2/55.7/38.2/37.8/33.3
RMS deviation bonds length (Å)/angles (deg)	0.007/0.98
Ramachandran outliers/favored (%) ^f	0/99.1
rotamer outliers (%) / C β outliers (%) / clash score	0.8/0/2.54

^aa.u.: asymmetric unit of the crystal. ^bValues in parentheses correspond to the outermost resolution shell. ^c $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{i,\text{hkl}} - I_{\text{hkl}}| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{i,\text{hkl}}$, $I_{i,\text{hkl}}$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices *hkl* and I_{hkl} is the intensity from multiple observations. ^d $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{o,hkl}}| - |F_{\text{c,hkl}}|) / |F_{\text{o,hkl}}|$, where $|F_{\text{o,hkl}}|$ and $|F_{\text{c,hkl}}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. ^e R_{free} is equivalent to R_{work} but calculated with 5% of the reflections omitted from the refinement process. ^fThe Ramachandran plot was calculated according to MolProbity.⁵⁶

34 and **35** can bind in a similar manner in GluA2 as **16**, whereas a different binding mode is required for **28** and **33** to avoid clash between the two methyl groups.

Compound **16** binds to the allosteric binding site in the same region as other BTM modulators. The binding mode of the dimeric modulator **16** is similar to that of the monomeric modulator **6** (Figure 4C). However, a slight displacement of the BTM ring systems of ~0.5 Å was observed. Previously, it was shown that introduction of a cyclopropyl group at the 4-*N* nitrogen in the monomeric modulator (**6**) led to 10 times improved binding affinity compared to an ethyl group (**5**).²⁹ This is in agreement with what we observed in the present study, namely, a 10 times greater potency of **22** (with cyclopropyl) compared to **16** (with methyl) (Table 2). Compound **16** binds symmetrically in both the B/B' and C/C' subsites (Figure 4C).

Similarly to **16** and **22**, compound **8** can be considered a dimeric modulator, but it is asymmetric. However, the 3-methoxyphenoxy substituent of **8** occupies a different space than the benzothiadiazine dioxide of **16**, with the benzene ring

positioned perpendicular to the backbone of Met517 and Ser518.²⁶

The following residues are within 4 Å of **16**: Lys514, Pro515, Phe516, Met517, Ser518, Ser750, Lys751, Gly752, Leu772, and Asn775 of both subunits comprising the GluA2_o-LBD dimer (numbering with signal peptide). Of these residues, Lys514, Pro515, Ser518, Ser750, Leu772, and Asn775 are protruding into the modulator binding site (Figure 4B). Notably, Ser518 and Ser750 are present in two side-chain conformations in both subunits of which one conformation of Ser518 in both subunits are lining the ethylene bridge of **16**. Both conformations of Ser518 form water-mediated contacts to both conformations of Ser750 (Figure 4B). Compound **16** only forms two hydrogen bonds to the receptor subunits: a hydrogen bond is seen from both sulfonamide nitrogen atoms of **16** to the backbone oxygen atom of Pro515 in each subunit (Figure 4B). In addition, a water-mediated hydrogen bond is formed from an oxygen atom of each sulfonamide in **16** to the side chain of Asn775. Thus, the monomeric parts of **16** make polar contacts to the receptor subunits in a symmetrical manner.

CONCLUSIONS

The aim of the present study was to develop dimeric compounds able to fit the allosteric binding sites located on both sides of the AMPAR dimer interface. The design of such molecules was motivated by the putative gain of activity resulting from a double occupancy of the binding site. Previous X-ray data obtained with “monomeric” BTM-type AMPAPams clearly highlighted the close proximity of two molecules of such modulator on two close receptor subunits and that it could be possible to design dimeric molecules interacting with both sides of the LBD dimer interface.

Molecular modeling was used to perform the virtual docking of a series of large dimeric molecules in the double-sided allosteric pocket. The best fits were obtained with dimeric compounds linked together by an ethylene bridge between their respective 6-positions. It should be noticed that there was a little difference in the predicted binding affinities between compounds differing by the nature of the substituent (methyl or cyclopropyl) introduced at the 4-position of the two BTM scaffolds.

According to these data, two dimeric molecules, compounds **16** and **22**, were selected for chemical synthesis. This was done following two different synthetic pathways. For the 4-methyl-substituted compound **16**, a convergent pathway was developed in which the 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide ring was first built and for which the cross-linkage took place in the last steps. For the 4-cyclopropyl-substituted compound **22**, the cross-linking step was performed much earlier in the synthesis route, and the ring closure of the heterocycle was built in the final steps.

The pharmacological evaluation of the target compounds and their corresponding constitutive monomers was performed on HEK293 cells expressing the GluA2_o(Q) receptor, and the variations of cytoplasmic calcium content were followed with a fluorescent probe. The AMPAPam activity of dimeric compound **22** was found to be approximately 10 times higher than dimeric compound **16**, an observation that differs only slightly from the docking results. For the whole series of tested compounds, the cyclopropyl group was always found to be the best choice of alkyl substituent at the 4-position of the BTM ring. Interestingly, both dimeric molecules **16** and **22** showed about 10 000 times lower EC₅₀ values than their corresponding

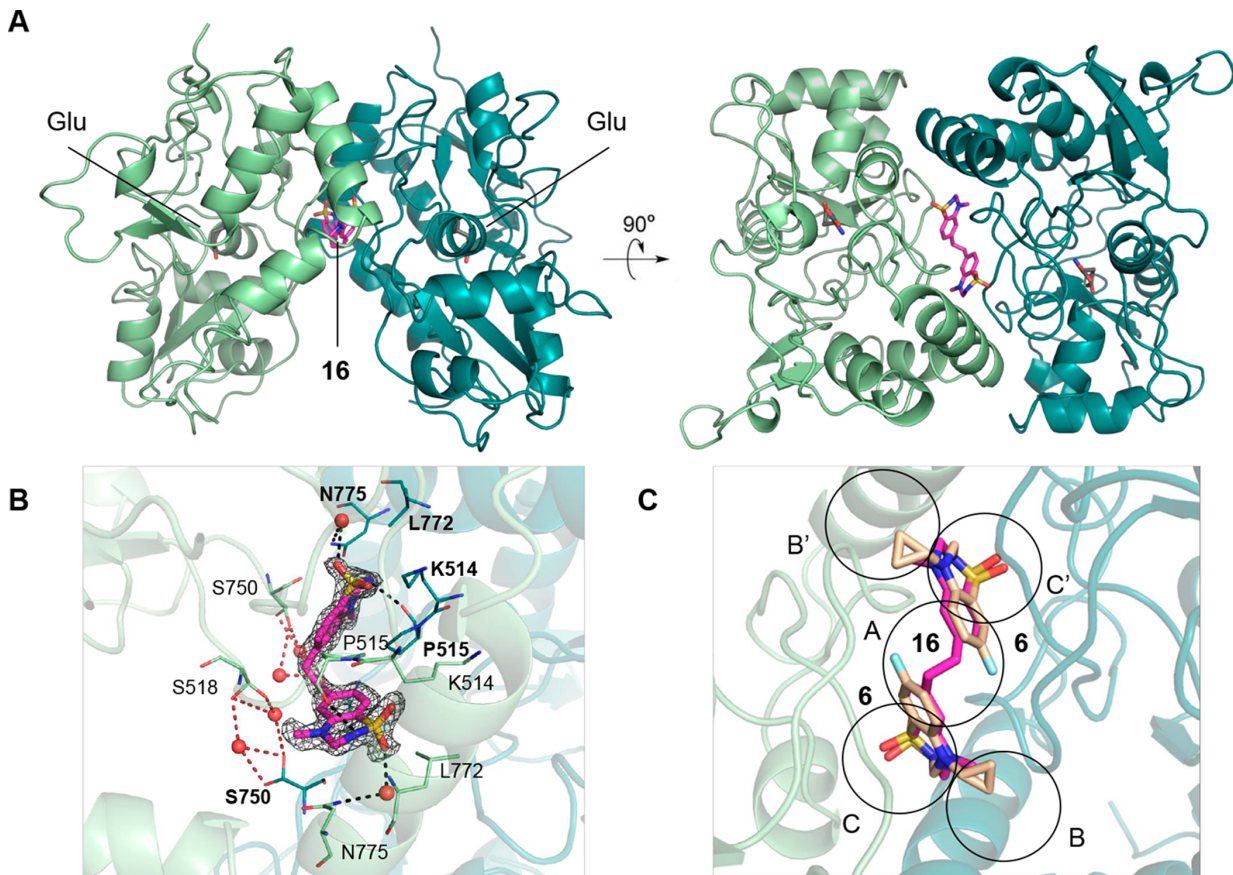


Figure 4. Structure of GluA2_o-LBD in complex with L-glutamate (Glu) and 16. (A) Left: side-view of the GluA2_o-LBD dimer (light green and dark green cartoon representation), showing that 16 (magenta sticks) binds in the lower part of the dimer interface. L-Glutamate is shown as gray sticks. Right: a 90° horizontally rotated view. (B) Zoom in on the modulator binding site, showing the 2F_o-F_c omit electron density map contoured at 1σ and carved at 1.2 Å around the modulator. Residues within 4 Å of 16 and protruding into the binding site are shown as lines. Polar interactions (up to 3.5 Å) of 16 with GluA2_o-LBD residues and water molecules (red spheres) are shown as stippled, black lines. In addition, water-mediated contacts between Ser518 and Ser750 are shown as red stippled lines. (C) Comparison of the binding mode of 16 and 6 (pdb code 4N07), showing that 16 and 6 (in beige sticks) occupy the same binding sites at the GluA2_o-LBD dimer interface. The circles indicate the different subsites. GluA2_o chains belonging to the structure with 16 are shown as cartoon representation.

unsubstituted BTM monomers (compounds 34 and 35). To the best of our knowledge, compound 22, with an EC₅₀ value of 1.4 nM, may be considered as one of the most potent AMPA-pams ever described in the literature, expressing a potency in the same order of magnitude as the recently described compound 8.²⁶ Ultimately, the cocrystallization of dimeric compound 16 with GluA2_o-LBD clearly demonstrated that the two allosteric binding sites located at the LBD dimer interface were able to host the dimeric compound occupying the position of two separated monomers.

EXPERIMENTAL SECTION

General Procedures. Melting points were determined on a Büchi Tottoli capillary apparatus and are uncorrected. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance (500 MHz for ¹H; 125 MHz for ¹³C) instrument using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) as the solvent with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard; chemical shifts are reported in δ values (ppm) relative to that of internal TMS. The abbreviations s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, qd = quadruplet of doublet, dt = doublet of triplet, tt = triplet of triplet, and bs = broad singlet are used throughout. Elemental

analyses (C, H, N, S) were realized on a Thermo Scientific Flash EA 1112 elemental analyzer and were within ±0.4% of the theoretical values for carbon, hydrogen, and nitrogen. This analytical method certified a purity of ≥95% for each tested compound. All reactions were routinely checked by TLC on silica gel Merck 60 F254.

4-Bromo-2-(methylamino)benzenesulfonamide (11). 4-Bromo-2-fluorobenzenesulfonamide (10) (4 g, 15.7 mmol) was dissolved in a 1:3 mixture of 1,4-dioxane and methylamine solution 40% in water (20 mL). The solution was heated in a microwave oven at 135 °C for 25 min. After cooling, the solvent was removed by distillation under reduced pressure. The pink solid was suspended in water, collected by filtration, and dried in a vacuum desiccator (yield: 96%). m.p., 171–173 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 6-*H*), 7.38 (s, 2H, SO₂NH₂), 6.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, 3-*H*), 6.82 (dd, *J* = 8.4 Hz/1.9 Hz, 1H, 5-*H*), 6.01 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H, NH), 2.83 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, NHCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.7 (C-1), 130.0 (C-6), 127.2 (C-4), 124.1 (C-2), 117.0 (C-5), 113.3 (C-3), 30.0 (NCH₃).

2-(Methylamino)-4-vinylbenzenesulfonamide (12). To a solution of 4-bromo-2-(methylamino)benzenesulfonamide (11) (1.9 g, 7.17 mmol) in 1,4-dioxane (14 mL), potassium vinyltrifluoroborate (1.15 g, 8.6 mmol, 1.2 equiv) was added. Once the salt was completely solubilized, an aqueous solution of NaOH 10% (6.3 mL) was added, followed by Pd(OAc)₂ (4.3 mg, 0.27 mol %). This mixture was heated

to reflux for 24 h. Once returned to room temperature, the crude black suspension was filtered. The aqueous filtrate was then extracted with ethyl acetate (3 × 25 mL). The organic layers were combined, washed with brine (15 mL), and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the oily residue was recrystallized in a mixture of methanol/water 1:2 (yield: 33%). m.p., 128–131 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 6-*H*), 7.26 (s, 2H, SO₂NH₂), 6.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 5-*H*), 6.76 (s, 1H, 3-*H*), 6.72 (dd, *J* = 17.7, 10.9 Hz, 1H, CH₂CH), 5.92 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5.87 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, NHCH₃), 5.35 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, E-CH₂CH), 2.86 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145.9 (C-1), 141.8 (C-4), 136.4 (CH), 128.5 (C-6), 124.0 (C-2), 116.4 (CH₂), 111.9 (C-5), 109.0 (C-3), 29.6 (NCH₃).

4-Methyl-6-vinyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (13). 2-(Methylamino)-4-vinylbenzenesulfonamide (12) (1.13 g, 5.3 mmol) was heated under stirring in triethyl orthoformate (5 mL) at 135 °C for 4 h. The resulting suspension was cooled on an ice bath, and the solid product was collected by filtration, washed with ether, and dried (yield: 81%). m.p., >300 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (s, 1H, 3-*H*), 7.85 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 8-*H*), 7.70 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, 7-*H*), 7.52 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, 5-*H*), 6.88 (dd, *J* = 17.7, 11.0 Hz, 1H, CH₂CH), 6.14 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5.53 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, E-CH₂CH), 3.65 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.3 (C-3), 141.7 (C-6), 136.2 (C-4a), 135.1 (CH), 124.4 (C-8), 123.9 (C-7), 121.6 (C-8a), 118.7 (CH₂), 114.3 (C-5), 38.2 (NCH₃).

4-Methyl-6-vinyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (14). 4-Methyl-6-vinyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (13) (0.4 g, 1.83 mmol) was stirred in suspension in isopropanol (10 mL) at 60 °C. NaBH₄ (0.2 g, 3 equiv) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, the crude product was taken in water, and the suspension was adjusted to acidic pH by means of 6 N HCl. The aqueous suspension was then extracted with methylene chloride (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with brine and dried over MgSO₄. The filtrate was evaporated to dryness, and the resulting solid residue was suspended in water, collected by filtration, washed with water, and dried (yield: 61%). m.p., >300 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.03 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 8-*H*), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 7-*H*), 6.88 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, 5-*H*), 6.72 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1H, CH₂CH), 5.95 (dd, *J* = 17.6, 0.8 Hz, 1H, Z-CH₂CH), 5.38 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, E-CH₂CH), 4.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH₂), 2.97 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.4 (C-6), 141.6 (C-4a), 136.2 (CH₂CH), 124.4 (C-8), 122.0 (C-8a), 116.5 (CH₂CH), 113.6 (C-7), 111.7 (C-5), 62.2 (C-3), 35.9 (NCH₃).

(E)-6,6'-(Ethene-1,2-diyl)bis(4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (15). 4-Methyl-6-vinyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (14) (0.2 g, 0.89 mmol) was solubilized in methylene chloride (3 mL) and supplemented with Hoveyda-Grubbs II catalyst (0.01 mol %) under nitrogen, and the mixture was heated to reflux. Every 30 min, the nitrogen was fluxed and replaced with fresh volume. After 4 h, the reaction mixture was cooled to room temperature, and the solid was collected by filtration, washed with ether, and dried (yield: 65%). m.p., 331 °C (decomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.06 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 8-*H*), 7.37 (s, 1H, CH), 7.10 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, 7-*H*), 7.05 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 5-*H*), 4.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 3.01 (s, 3H, NCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.3 (C-6), 141.2 (C-4a), 130.0 (CH linker), 124.5 (C-8), 121.8 (C-8a), 114.3 (C-7), 112.2 (C-5), 62.3 (C-3), 36.2 (NCH₃).

6,6'-(Ethane-1,2-diyl)bis(4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (16). (E)-6,6'-(Ethene-1,2-diyl)bis(4-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (15) (0.13 g, 0.31 mmol) was dissolved in DMF (5 mL) and was supplemented with 10% palladium on charcoal (13 mg). The resulting suspension was placed under 12 bar of H₂ for 1 h. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was recrystallized in methanol, collected by filtration, and dried (yield: 25%). m.p., 313 °C (decomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (s, 1H,

NH), 7.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 8-*H*), 6.71 (s, 1H, 5-*H*), 6.70 (dd, *J* = 7.1 Hz/1.2 Hz, 1H, 7-*H*), 4.62 (s, 2H, CH₂), 2.91 (s, 3H, NCH₃), 2.86 (s, 2H, CH₂ linker); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.9 (C-6), 144.0 (C-4a), 124.0 (C-8), 120.6 (C-8a), 116.8 (C-7), 113.4 (C-5), 62.4 (C-3), 36.7 (CH₂ linker), 36.2 (NCH₃). Anal. (C₁₈H₂₂N₄O₄S₂) calcd: N 13.26%, C 51.17%, H 5.25%, S 15.18%. Found: N 13.22%, C 51.29%, H 5.29%, S 14.71%.

4-Bromo-2-(cyclopropylamino)benzenesulfonamide (17). 4-Bromo-2-fluorobenzenesulfonamide (10) (4.0 g, 15.7 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of 1,4-dioxane and cyclopropylamine (20 mL). The solution was heated in a microwave oven to 135 °C for 25 min. After cooling, the solvent was removed by distillation under reduced pressure. The solid residue was recrystallized from methanol/water 1:2, collected by filtration, washed with water, and dried in a vacuum desiccator (yield: 75%). m.p., 201–204 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 6-*H*), 7.43 (bs, 2H, SO₂NH₂), 7.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 3-*H*), 6.90 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H, 5-*H*), 6.21 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, NH), 2.50 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0.87–0.76 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.56–0.49 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.6 (C-1), 129.9 (C-6), 126.8 (C-4), 124.4 (C-2), 118.0 (C-5), 114.9 (C-3), 24.2 (NCH₃), 7.1 (CH(CH₂)₂).

2-(Cyclopropylamino)-4-vinylbenzenesulfonamide (18). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 12 starting from compound 17 (yield: 86%). m.p., 155–161 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.61–7.51 (m, 1H, 6-*H*), 7.31 (s, 2H, SO₂NH₂), 7.15 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 3-*H*), 6.87 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, 5-*H*), 6.74 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1H, CHCH₂), 6.11 (s, 1H, NH), 5.90 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Z-CHCH₂), 5.37 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, E-CHCH₂), 2.50 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0.88–0.72 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.57–0.43 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.0 (C-4), 141.0 (C-1), 136.3 (CHCH₂), 128.0 (C-6), 124.0 (C-2), 116.4 (CH₂), 113.0 (C-5), 110.7 (C-3), 24.5 (CH(CH₂)₂), 7.2 (CH(CH₂)₂).

(E)-4,4'-(Ethene-1,2-diyl)bis(2-(cyclopropylamino)benzenesulfonamide) (19). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 15 starting from compound 18 (yield: 89%). m.p., 247 °C (decomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 6-*H*), 7.37–7.28 (m, 3H, SO₂NH₂ and 3-*H*), 7.09 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, 5-*H*), 6.16–6.11 (m, 1H, NH), 2.56 (tt, *J* = 6.4, 3.3 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 0.86 (m, *J* = 6.6, 3.3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0.55 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145.6 (C-4), 141.1 (C-1), 130.0 (C-6), 128.5 (CH linker), 124.1 (C-2), 113.3 (C-5), 111.6 (C-3), 24.6 (NCH), 7.4 (CH(CH₂)₂).

4,4'-(Ethane-1,2-diyl)bis(2-(cyclopropylamino)benzenesulfonamide) (20). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 16 starting from compound 19 (yield: 90%). m.p., 220–222 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 6-*H*), 7.23 (s, 2H, SO₂NH₂), 6.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 3-*H*), 6.62 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, 5-*H*), 6.05 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, NH), 2.90 (s, 2H, CH₂), 2.43–2.37 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0.76 (dt, *J* = 6.6, 3.3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0.50–0.41 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.8 (C-4), 145.5 (C-1), 128.0 (C-6), 123.0 (C-2), 115.9 (C-5), 112.6 (C-3), 36.4 (CH₂ linker), 24.5 (NCH), 7.3 (CH(CH₂)₂).

6,6'-(Ethane-1,2-diyl)bis(4-cyclopropyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (21). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 13 starting from compound 20 (yield: 87%). m.p., 298 °C (decomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (s, 1H, 3-*H*), 7.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 8-*H*), 7.53 (s, 1H, 5-*H*), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 7-*H*), 3.26 (m, *J* = 7.2, 3.9 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 3.15 (s, 2H, CH₂ linker), 1.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0.93–0.84 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.4 (C-3), 146.6 (C-6), 136.3 (C-4a), 127.2 (C-8), 124.1 (C-7), 120.3 (C-8a), 116.3 (C-5), 36.3 (CH₂ linker), 32.1 (NCH), 7.3 (CH(CH₂)₂).

6,6'-(Ethane-1,2-diyl)bis(4-cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide) (22). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 14 starting from compound 21 suspended in isopropanol and adding DMF dropwise

until the reactant was solubilized before the addition of NaBH₄ (yield: 82%). m.p., 290 °C (decomposition); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.78 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 8-*H*), 7.02 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 5-*H*), 6.75 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, 7-*H*), 4.61 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, 3-*H*), 2.92 (s, 2H, CH₂ linker), 2.41 (m, 1H, CH(CH₂)₂), 0.90–0.84 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.58 (m, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.1 (C-6), 143.9 (C-4a), 124.2 (C-8), 121.2 (C-8a), 117.8 (C-7), 114.2 (C-5), 61.0 (C-3), 36.5 (CH₂ linker), 29.6 (NCH), 8.4 (CH(CH₂)₂). Anal. (C₂₂H₂₆N₄O₄S₂) calcd: N 11.80% C 55.68% H 5.52% S 13.51%. Found: N 11.77% C 55.88% H 5.67% S 13.05%.

2-Amino-4-methylbenzenesulfonamide (25). A solution of *m*-toluidine (23) (10 g, 93.3 mmol) in nitromethane (40 mL) was added to a stirred, ice-cooled solution of chlorosulfonyl isocyanate (9 mL) in nitromethane (25 mL) during 5 min. This addition resulted in a suspension. Aluminum chloride (14.0 g, 105 mmol) was added at once, resulting in a clear solution. The reaction mixture was then refluxed for 30 min, cooled, and poured into ice–water. The precipitated solid was collected by filtration and washed with water. The precipitate was suspended in water and then extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was taken in water (100 mL), and the mixture was adjusted to pH 12 with NaOH 10% w/w in water, treated with charcoal, and filtered. The filtrate was then acidified by the addition of 12 N HCl, and the solid that precipitated was collected by filtration. This solid consisted in the mixture of the two isomers (24a and 24b). This solid was dispersed in 50% w/w sulfuric acid in water and refluxed during 6 h. After being cooled, the mixture was filtered and afforded a solid (mainly unchanged 24a) and a filtrate containing compound 25. After neutralizing the filtrate with NaOH 40% w/w in water, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was suspended in hot ethanol (200 mL) and filtered. The resulting filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue of the title compound was recrystallized in methanol/water 1:2 (yield: 19%) / m.p., 121–122 °C (lit. 124–126 °C⁴³).

6-Methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (26). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 13 starting from compound 25 (yield: 76%). m.p., 186–195 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 12.17 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, 3-*H*), 7.69 (d, 1H, 8-*H*), 7.58 (s, 1H, 5-*H*), 7.25 (d, 1H, 7-*H*), 2.39 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 147.5 (C-3), 143.5 (C-6), 134.6 (C-4a), 127.7 (C-8a), 123.6 (C-8), 120.1 (C-7), 117.0 (C-5), 21.1 (CH₃).

4,6-Dimethyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (27). The mixture of 6-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (26) (1 g, 4.62 mmol), potassium carbonate (2 g), and methyl iodide (1.7 mL) in acetonitrile (30 mL) was heated at 60 °C for 3 h. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was suspended in water (40 mL). The resulting insoluble material was collected by filtration, washed with water, dried and recrystallized in ethyl acetate (yield: 75%). m.p., 269–272 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) 8.04 (s, 1H, 3-*H*), 7.76 (d, 1H, 8-*H*), 7.37 (d, 1H, 7-*H*), 7.32 (s, 1H, 5-*H*), 3.59 (s, 3H, NCH₃), 2.44 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.1 (C-3), 143.8 (C-6), 135.8 (C-4a), 127.7 (C-7), 124.0 (C-8), 120.2 (C-8a), 116.4 (C-5), 38.0 (NCH₃), 21.4 (6-CH₃).

4,6-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (28). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 14 starting from compound 27 (yield: 75%). m.p., 141–142 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 7.95 (t, 1H, NH), 7.40 (d, 1H, 8-*H*), 6.66 (s, 1H, 5-*H*), 6.62 (d, 1H, 7-*H*), 4.63 (d, 2H, 3-*H*), 2.92 (s, 3H, NCH₃), 2.29 (s, 3H, 6-CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.0 (C-6), 143.3 (C-4a), 124.0 (C-8), 120.3 (C-8a), 117.3 (C-7), 113.8 (C-5), 62.3 (C-3), 36.1 (NCH₃), 21.6 (6-CH₃). Anal. (C₉H₁₂N₂O₂S) calcd: N 13.20%, C 50.92%, H 5.70% S 15.10%. Found: N 13.14%, C 50.61%, H 5.50% S 15.53%.

2-Fluoro-4-methylbenzenesulfonamide (30). A portion of glacial acetic acid (160 mL) was saturated for 30 min with gaseous sulfur dioxide. To the resulting solution, cooled on an ice bath, was added

under stirring an aqueous solution of CuCl₂ (7 g in 20 mL) (suspension A). 2-Fluoro-4-methylaniline (29) (15 g, 87 mmol) was dissolved in a mixture of glacial acetic acid (160 mL) and 16 N HCl (40 mL). To the resulting solution, cooled in an ice–salt bath (–5 °C), was added dropwise under stirring an aqueous solution of NaNO₂ (8 g in 20 mL, 116 mmol). At the end of the addition, the resulting solution was slowly mixed with suspension A. After being stirred for 15 min, the suspension was poured onto ice (400 g). The resulting precipitate was collected by filtration, washed with water, and immediately dissolved in 1,4-dioxane (150 mL). The solution obtained was added gradually, under stirring, to a concentrated ammonium hydroxide solution (300 mL) previously cooled on an ice bath. After the resulting solution was stirred for 30 min, the organic solvent and part of the ammonia were removed by evaporation under reduced pressure. The aqueous solution/suspension obtained was adjusted to neutral pH by adding 6 N HCl. The precipitate formed was collected by filtration, washed with water, and dried (yield: 37%). m.p., 136–137 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.66 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, 8-*H*), 7.59 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, SO₂NH₂), 7.26 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, 7-*H*), 7.17 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, 3-*H*), 2.38 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.9–156.9 (d, *J* = 252.3 Hz, C-2), 145.5 (C-1), 128.8–128.7 (d, *J* = 14.4 Hz, C-6), 128.1 (C-4), 124.9 (C-5), 117.3–117.1 (d, 20.8 Hz, C-3), 20.8 (CH₃).

2-(Cyclopropylamino)-4-methylbenzenesulfonamide (31). 2-Fluoro-4-methylbenzenesulfonamide (30) (5 g, 21 mmol) was introduced into a hermetically closed vessel containing a mixture of 1,4-dioxane (70 mL) and cyclopropylamine (3.5 mL, 50 mmol). The closed vessel was placed in an oven at 100 °C for 240 h. After this time period, the solvent and the reagent were removed by distillation under reduced pressure. The residue was taken up in methanol (20 mL), and the insoluble material, which contained the title product, was collected by filtration, washed with methanol, and dried. This compound was used in the next step without further purification (yield: 35%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 6-*H*), 7.23 (s, 2H, SO₂NH₂), 6.94 (s, 1H, 3-*H*), 6.58–6.49 (m, 1H, 5-*H*), 6.06 (s, 1H, NH), 2.45 (dp, *J* = 9.7, 3.7, 3.2 Hz, 1H, CH(CH₂)₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 0.85–0.71 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 0.50 (p, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145.4 (C-4), 143.2 (C-1), 128.1 (C-6), 122.6 (C-2), 116.4 (C-5), 113.0 (C-3), 24.5 (CH(CH₂)₂), 21.5 (CH₃), 7.3 (CH(CH₂)₂).

4-Cyclopropyl-6-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (32). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 13 starting from compound 31 (yield: 35%). m.p., 224–226 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (s, 1H, 3-*H*), 7.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 8-*H*), 7.64 (s, 1H, 5-*H*), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 7-*H*), 3.34 (bs with water, 1H, NCH), 2.48 (s, 3H, CH₃), 1.30–1.08 (m, 2H, CH(CH₂)₂), 1.00 (dt, *J* = 6.9, 4.9 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.4 (C-3), 143.7 (C-6), 136.5 (C-4a), 127.6 (C-7), 124.0 (C-8), 119.8 (C-8a), 116.5 (C-5), 32.1 (CH₃), 21.6 (NCH), 7.3 (CH(CH₂)₂).

4-Cyclopropyl-6-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide (33). The title compound was obtained according to the procedure described for compound 14 starting from compound 32 (yield: 75%). m.p., 157–158 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.81 (s, 1H, NH), 7.45–7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 8-*H*), 7.08 (s, 1H, 5-*H*), 6.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 7-*H*), 4.63 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂), 2.32 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H, CH₃), 0.92 (qd, *J* = 6.5, 4.2 Hz, 2H, CH(CH₂)₂), 0.65 (q, *J* = 4.1, 2.8 Hz, 2H, CH(CH₂)₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.1 (C-6), 142.9 (C-4a), 124.2 (C-8), 120.8 (C-8a), 118.3 (C-7), 114.5 (C-5), 61.1 (C-3), 29.6 (CH₃), 21.7 (NCH), 8.4 (CH(CH₂)₂). Anal. (C₁₁H₁₄N₂O₂S) calcd: N 11.76%, C 55.44%, H 5.92%, S 13.45%. Found: N 12.10%, C 55.78%, H 5.99%, S 13.60%.

Fluorescent-Based Calcium Assay on GluA2₆(Q) Cells. The pharmacological evaluation of the target molecules was performed as described previously.²⁶ Briefly, HEK293 cells stably expressing AMPA channel GluA2₆(Q) were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin and streptomycin (5000 U/mL), 1% L-glutamine (200 mM), and Geneticin (G418–600 mg/mL). The measurement of the fluorescence intensity was carried out using fluorescent microplate

reader Fluoroskan Ascent FT equipped with two dispensers (Thermo Electron Corporation, Finland). After trypsinization, the cells were washed twice using Hank's balanced salt solution (HBS, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) and incubated for 1 h with fluorescent dye Fluo-4/AM (5 μg/mL; Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke Belgium). The cells were rinsed twice with HBS, and 100 μL of the resulting cell suspension in HBS buffer was introduced into each well of a 96-well plate (density of 150 000 cells/well). The evaluated compounds were applied at various concentrations (from 10⁻¹¹ M to 3 × 10⁻³ M, with maximal DMSO concentration = 1%). After shaking the plate for 30 s at 1200 rpm, the emission was read at 538 nm after an excitation at 485 nm during 500 ms per measure. Measurement of a vehicle control was followed by injection of a 10 mM L-glutamate solution (10 μL), a fluorescence measurement (2 min), 15 s of shaking at 1200 rpm, and a final fluorescence measurement (5 min). The results are expressed as the EC₅₀ value, which is the concentration required to reach half of the maximal intensity, and are calculated by nonlinear regression analysis (GraphPad Prism software) from at least three independent concentration–response curves made in triplicate.

Molecular Modeling. The cocrystal structure of monomer **6** with GluA2_o-LBD-L504Y-N775S (PDB code 4N07) was used in the docking study. The target protein was prepared with Discovery Studio 4.0, while the docking procedure was carried out with the automated GOLD 5.3.0 program.⁴⁴ The binding site was defined as a 10 Å sphere starting from the two monomers **6** in the crystal structure, allowing the incorporation of both monomers as well as the amino acids interacting with them. Potential dimeric compounds were sketched with ChemDraw (PerkinElmer Informatics) and prepared for docking with Discovery Studio 4.0 (Accelrys Inc., San Diego, California, USA). For each ligand, the number of genetic algorithm (GA) runs was set at 100. The default ChemPLP score function was used, and the search efficiency was fixed at 200%. For the output, we asked GOLD to keep the 20 best solutions for each ligand. From these solutions, clusters based on the orientation adopted by the docking poses were identified. From the cluster having the highest occurrence, we kept the best representative (higher PLP fitness score). This representative was then used for the minimization *in situ* and free binding energy calculation. The *in situ* minimization, free binding energy calculations, and interactions visualization were performed with Discovery Studio (DS) 4.0 (Accelrys Inc., San Diego, California, USA). The *in situ* minimization and free binding energy calculation were launched in the same DS protocol. In this protocol, the ligand conformational entropy^{45,46} was also considered (conformers generated with the BEST algorithm), and generalized Born with molecular volume (GBMV) was used as implicit solvent model.

Crystallography. GluA2_o-LBD was expressed and purified as previously described.⁴⁷ A suspension of **16** in buffer with glutamate and 10% DMSO (5 mM L-glutamate, 20 mM **16**, 10 mM HEPES (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% DMSO) was mixed using shaking in the cold room overnight. Then, to the GluA2_o-LBD solution (in 10 mM HEPES (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) was added **16** suspension to a resulting concentration of 5 mg/mL protein and 7 mM **16** suspension. The protein–ligand suspension was left at 6 °C for 4 days with periodic shaking. The hanging drop vapor diffusion method was used for crystallization of the complex at 6 °C. The drops consisted of 1 μL of protein–ligand solution and 1 μL of reservoir solution. The reservoir volume was 0.5 mL. The crystal used for data collection was obtained using a reservoir solution consisting of 15% PEG4000, 0.3 M ammonium sulfate, 0.1 M phosphate-citrate buffer pH 4.5. The crystal was cryo-protected using reservoir solution containing 20% glycerol before flash-cooling in liquid nitrogen.

X-ray diffraction data were collected at BioMAX, MAX IV, Lund, Sweden to a resolution of 1.4 Å. The data were processed with XDS⁴⁸ and scaled using SCALA⁴⁹ in CCP4.⁵⁰ The structure was solved with molecular replacement using PHASER⁵¹ in CCP4, with the structure of GluA2_o-L504Y-N775S-LBD in complex with glutamate and **6** as search model (PDB code 4N07, chain A). The structure was built with AUTOBUILD⁵² in PHENIX.⁵³ The program MAESTRO [version 10.1.013, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015] was used to

generate coordinate file for compound **16**. The energy minimization and conformational search were calculated in water. The parameter file of **16** was obtained using eLBOW,⁵⁴ keeping the geometry obtained from MAESTRO. The structure was manually adjusted in COOT⁵⁵ and refined in PHENIX with individual isotropic B-factors in the initial refinements and anisotropic B-factors at the final refinements, as well as riding H atoms. The structure validation was done using tools in COOT, MolProbity⁵⁶ in PHENIX, and the wwPDB Validation Service. The LBD domain closure induced by **16** was calculated using the DynDom server⁵⁷ relative to the apo structure of GluA2_o-LBD (PDB code 1FTO, chain A). Figure 4 was made in PyMOL [version 2.0.3, The PyMOL Molecular Graphics Systems, V.S., LLC].

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00250.

Docking studies: proposed structures for docking studies, docking data and modulator-receptor interactions for selected compounds with the dimeric GluA2_o-LBD-L483Y-N754S, interactions figures for selected compounds with the dimeric GluA2_o-LBD-L483Y-N754S (PDF)

PDB code 6FAZ (PDB)

Molecular formula strings (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: b.pirotte@uliege.be. Phone: +32 4 366 43 65. Fax: +32 4 366 43 62.

*E-mail: lionel.pochet@unamur.be (molecular modeling).

*E-mail: j.hanson@uliege.be (pharmacological evaluation).

*E-mail: jsk@sund.ku.dk (structure determination).

ORCID

Pierre Francotte: 0000-0001-9252-7798

Jette Sandholm Kastrop: 0000-0003-2654-1510

Bernard Pirotte: 0000-0001-8251-8257

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fonds L. Fredericq from the University of Liege and by the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.), from which T.D. is a Research Fellow, P.G. is a Télévie Ph.D. Fellow, and J.H. is a Research Associate. We also acknowledge funding from The Danish Council for Independent Research/Natural Sciences (to S.L., J.S.K.), Danscatt (to L.N., S.L., J.S.K.), and CoNeXT (to L.N., S.L., J.S.K.). The technical assistance of S. Counerotte (elemental analyses) and H. Peterson (expression, purification and crystallization of GluA2_o-LBD) is gratefully acknowledged. We would also like to thank beamline scientists at BioMAX, MAX IV, Lund, Sweden for excellent help during data collection.

■ ABBREVIATIONS

ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AMPA-pam, positive allosteric modulator of the AMPA receptor; AMPAR, AMPA receptor; ATD, amino-terminal domain; BBB, blood–brain barrier; BTD, 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide;

CNS, central nervous system; CTD, carboxy-terminal domain; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; FBS, fetal bovine serum; GA, generic algorithm; GBMV, generalized Born with molecular volume; HC, Hill coefficient; HBS, Hank's balanced salt; HEK cells, human embryonic kidney cells; iGluRs, ionotropic glutamate receptors; KA, kainic acid; LBD, ligand-binding domain; mGluRs, metabotropic glutamate receptors; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; NMR, nuclear magnetic resonance; SAR, structure-activity relationships; TMD, transmembrane domain; TMS, tetramethylsilane

REFERENCES

- (1) Kew, J. N. C.; Kemp, J. A. Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Structure and Pharmacology. *Psychopharmacol.* **2005**, *179*, 4–29.
- (2) Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingledine, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 405–496.
- (3) Bassani, S.; Valnegri, P.; Beretta, F.; Passafaro, M. The GLUR2 Subunit of AMPA Receptors: Synaptic Role. *Neuroscience* **2009**, *158*, 55–61.
- (4) Bettler, B.; Mülle, C. Review: Neurotransmitter Receptors II. AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology* **1995**, *34*, 123–139.
- (5) Kumar, J.; Mayer, M. L. Functional Insights from Glutamate Receptor Ion Channel Structures. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 313–337.
- (6) Carlson, G. C. Glutamate Receptor Dysfunction and Drug Targets Across Models of Autism Spectrum Disorders. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2012**, *100*, 850–854.
- (7) Chang, P. K. Y.; Verbich, D.; McKinney, R. A. AMPA Receptors as Drug Targets in Neurological Disease - Advantages, Caveats, and Future Outlook. *Eur. J. Neurosci* **2012**, *35*, 1908–1916.
- (8) Henley, J. M.; Wilkinson, K. A. Synaptic AMPA Receptor Composition in Development, Plasticity and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2016**, *17*, 337–350.
- (9) Kristensen, B. W.; Norberg, J.; Zimmer, J. Comparison of Excitotoxic Profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Brain Res.* **2001**, *917*, 21–44.
- (10) Sobolevsky, A. I. Structure and Gating of Tetrameric Glutamate Receptors. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 29–38.
- (11) Greger, I. H.; Esteban, J. A. AMPA Receptor Biogenesis and Trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 289–297.
- (12) Herguedas, B.; García-Nafria, J.; Cais, O.; Fernández-Leiro, R.; Krieger, J.; Ho, H.; Greger, I. H. Structure and Organization of Heteromeric AMPA-type Glutamate Receptors. *Science* **2016**, *352*, 549–559.
- (13) Greger, I. H.; Watson, J. F.; Cull-Candy, S. G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* **2017**, *94*, 713–730.
- (14) Sobolevsky, A. I.; Rosconi, M. P.; Gouaux, E. X-ray Structure, Symmetry and Mechanism of an AMPA-subtype Glutamate Receptor. *Nature* **2009**, *462*, 745–756.
- (15) Weeks, A. M.; Harms, J. E.; Partin, K. M.; Benveniste, M. Functional Insight into Development of Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors. *Neuropharmacology* **2014**, *85*, 57–66.
- (16) Jin, R.; Clark, S.; Weeks, A. M.; Dudman, J. T.; Gouaux, E.; Partin, K. M. Mechanism of Positive Allosteric Modulators Acting on AMPA Receptors. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 9027–9036.
- (17) Meyerson, J. R.; Kumar, J.; Chittori, S.; Rao, P.; Pierson, J.; Bartesaghi, A.; Mayer, M. L.; Subramaniam, S. Structural Mechanism of Glutamate Receptor Activation and Desensitization. *Nature* **2014**, *514*, 328–334.
- (18) Ptak, C. P.; Ahmed, A. H.; Oswald, R. E. Probing the Allosteric Modulator Binding Site of GluR2 with Thiazide Derivatives. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8594–8602.
- (19) Ptak, C. P.; Hsieh, C.-L.; Weiland, G. A.; Oswald, R. E. Role of Stoichiometry in the Dimer-stabilizing Effect of AMPA Receptor Allosteric Modulators. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 128–133.
- (20) Pirotte, B.; Francotte, P.; Goffin, E.; de Tullio, P. AMPA Receptor Positive Allosteric Modulators: a Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *2*, 615–628.
- (21) Schwartz, N.; Torosdag, S.; Fertig, H.; Fletcher, L., Jr.; Quan, R. B.; Schwartz, M. S.; Bryant, J. M. Cyclothiazide, a New Diuretic-antihypertensive Drug. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **1962**, *4*, 437–440.
- (22) Bertolino, M.; Baraldi, M.; Parenti, C.; Braghioroli, D.; DiBella, M.; Vicini, S.; Costa, E. Modulation of AMPA/kainate Receptors by Analogues of Diazoxide and Cyclothiazide in Thin Slices of Rat Hippocampus. *Receptors Channels* **1993**, *1*, 267–278.
- (23) Zivkovic, I.; Thompson, D. M.; Bertolino, M.; Uzunov, D.; DiBella, M.; Costa, E.; Guidotti, A. 7-Chloro-3-methyl-3-(4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine S,S-dioxide (IDRA 21): a Benzothiadiazine Derivative that Enhances Cognition by Attenuating DL-alpha-amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolepropanoic acid (AMPA) Receptor Desensitization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *272*, 300–309.
- (24) Thompson, D. M.; Guidotti, A.; DiBella, M.; Costa, E. 7-Chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine S,S-dioxide (IDRA 21), a Congener of Aniracetam, Potently Abates Pharmacologically Induced Cognitive Impairments in Patas Monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7667–7671.
- (25) Pirotte, B.; Francotte, P.; Goffin, E.; Fraikin, P.; Danober, L.; Lesur, B.; Botez, I.; Caignard, D. H.; Lestage, P.; de Tullio, P. Ring-fused Thiadiazines as Core Structures for the Development of Potent AMPA Receptor Potentiators. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3575–3582.
- (26) Goffin, E.; Drapier, T.; Probst Larsen, A.; Geubelle, P.; Ptak, C. P.; Laulumaa, S.; Rovinskaja, K.; Gilissen, J.; de Tullio, P.; Olsen, L.; Frydenvang, K.; Pirotte, B.; Hanson, J.; Oswald, R. E.; Kastrup, S. J.; Francotte, P. 7-Phenoxy-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors with Nanomolar Potency. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 251–264.
- (27) Kaae, B. H.; Harpsøe, K.; Kastrup, J. S.; Sanz, A. C.; Pickering, D. S.; Metzler, B.; Clausen, R. P.; Gajhede, M.; Sauerberg, P.; Liljefors, T.; madsen, U. Structural Proof of a Dimeric Positive Modulator Bridging Two Identical AMPA Receptor-Binding Sites. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1294–1303.
- (28) Krintel, C.; Frydenvang, K.; Olsen, L.; Kristensen, M. T.; de Barrios, O.; Naur, P.; Francotte, P.; Pirotte, B.; Gajhede, M.; Kastrup, J. S. Thermodynamics and Structural Analysis of Positive Allosteric Modulation of the Ionotropic Glutamate Receptor GluA2. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 173–178.
- (29) Nørholm, A. B.; Francotte, P.; Olsen, L.; Krintel, C.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Challal, S.; Danober, L.; Botez-Pop, I.; Lestage, P.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Synthesis, Pharmacological and Structural Characterization, and Thermodynamic Aspects of GluA2-Positive Allosteric Modulators with a 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxide Scaffold. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8736–8745.
- (30) Francotte, P.; Nørholm, A. B.; Deva, T.; Olsen, L.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Fraikin, P.; de Tullio, P.; Challal, S.; Thomas, J.-Y.; Iop, F.; Louis, C.; Botez-Pop, I.; Lestage, P.; Danober, L.; Kastrup, J. S.; Pirotte, B. Positive Allosteric Modulators of 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionic Acid Receptors Belonging to 4-Cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-pyridothiadiazine Dioxides and Diversely Chloro-substituted 4-Cyclopropyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9539–9553.
- (31) Nørholm, A. B.; Francotte, P.; Goffin, E.; Botez, I.; Danober, L.; Lestage, P.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S.; Olsen, L.; Oostenbrink, C. Thermodynamic Characterization of New Positive Allosteric Modulators Binding to the Glutamate Receptor A2 Ligand-binding Domain: Combining Experimental and Computational Methods Unravels Differences in Driving Forces. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 3404–3416.
- (32) Larsen, A. P.; Francotte, P.; Frydenvang, K.; Tapken, D.; Goffin, E.; Fraikin, P.; Caignard, D. H.; Lestage, P.; Danober, L.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Synthesis and Pharmacology of Mono-, Di-, and Trialkyl-

Substituted 7-Chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides Combined with X-ray Structure Analysis to Understand the Unexpected Structure-Activity Relationship at AMPA Receptors. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 378–390.

(33) Krintel, C.; Francotte, P.; Pickering, D. S.; Juknaite, L.; Pohlsgaard, J.; Olsen, L.; Frydenvang, K.; Goffin, E.; Pirotte, B.; Kastrup, J. S. Enthalpy-Entropy Compensation in the Binding of Modulators at Ionotropic Glutamate Receptor GluA2. *Biophys. J.* **2016**, *110*, 2397–2406.

(34) Francotte, P.; de Tullio, P.; Goffin, E.; Dintilhac, G.; Graindorge, E.; Fraikin, P.; Lestage, P.; Danober, L.; Thomas, J.-Y.; Caignard, D.-H.; Pirotte, B. Design, Synthesis, and Pharmacology of Novel 7-Substituted 3,4-Dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as Positive Allosteric Modulators of AMPA Receptors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3153–3157.

(35) Girard, Y.; Atkinson, J. G.; Rokach, J. A New Synthesis of 1,2,4-Benzothiadiazines and a Selective Preparation of *o*-Aminobenzenesulphonamides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, *1*, 1043–1047.

(36) Meerwein, H.; Dittmar, G.; Göllner, R.; Hafner, K.; Mensch, F.; Steinfort, O. Untersuchungen über aromatische Diazoverbindungen, II. Verfahren zur Herstellung Aromatischer Sulfonsäurechloride, Eine Neue Modifikation der Sandmeyerschen Reaktion. *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 841–852.

(37) Varney, M. A.; Rao, S. P.; Jachec, C.; Deal, C.; Hess, S. D.; Daggett, L. P.; Lin, F.-F.; Johnson, E. C.; Veliçelebi, G. Pharmacological Characterization of the Human Ionotropic Glutamate Receptor Subtype GluR3 Stably Expressed in Mammalian Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 358–370.

(38) Weiss, J. N. The Hill Equation Revisited: Uses and Misuses. *FASEB J.* **1997**, *11*, 835–841.

(39) Priel, A.; Selak, S.; Lerma, J.; Stern-Bach, Y. Block of Kainate Receptor Desensitization Uncovers a Key Trafficking Checkpoint. *Neuron* **2006**, *52*, 1037–1046.

(40) Weston, M. C.; Schuck, P.; Ghosal, A.; Rosenmund, C.; Mayer, M. L. Conformational Restriction Blocks Glutamate Receptor Desensitization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 1120–1127.

(41) Armstrong, N.; Jasti, J.; Beich-Frandsen, M.; Gouaux, E. Measurement of Conformational Changes accompanying Desensitization in an Ionotropic Glutamate Receptor. *Cell* **2006**, *127*, 85–97.

(42) Pohlsgaard, J.; Frydenvang, K.; Madsen, U.; Kastrup, J. S. Lessons from more than 80 Structures of the GluA2 Ligand-Binding Domain in Complex with Agonists, Antagonists and Allosteric Modulators. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 135–150.

(43) Topliss, J. G.; Sherlock, M. H.; Leroy, H. R.; Konzelman, L. M.; Shapiro, E. P.; Pettersen, B. W.; Schneider, H.; Sperber, N. Antihypertensive agents. I. Nonduretic 2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 122–127.

(44) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.

(45) Sakkiah, S.; Arooj, M.; Kumar, M. R.; Eom, S. H.; Lee, K. W. Identification of Inhibitor Binding Site in Human Sirtuin 2 Using Molecular Docking and Dynamics Simulations. *PLoS One* **2013**, *8*, e51429.

(46) Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Contribution of Conformer Focusing to the Uncertainty in Predicting Free Energies for Protein-ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5880–5884.

(47) Krintel, C.; Frydenvang, K.; Ceravalls de Rabassa, A.; Kaern, A. M.; Gajhede, M.; Pickering, D. S.; Kastrup, J. S. L-Asp is a Useful Tool in the Purification of the Ionotropic Glutamate Receptor A2 Ligand-Binding Domain. *FEBS J.* **2014**, *281*, 2422–2430.

(48) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.

(49) Evans, P. R. An Introduction to Data Reduction: Space-Group Determination, Scaling and Intensity Statistics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 282–292.

(50) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.

Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235–242.

(51) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.

(52) Terwilliger, T. C.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Afonine, P. V.; Moriarty, N. W.; Zwart, P. H.; Hung, L.-W.; Read, R. J.; Adams, P. D. Iterative Model Building, Structure Refinement and Density Modification with the PHENIX AutoBuild Wizard. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2008**, *D64*, 61–69.

(53) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.

(54) Moriarty, N. W.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. Electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a Tool for Ligand Coordinate and Restraint Generation. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 1074–1080.

(55) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.

(56) Davis, I. W.; Leaver-Fay, A.; Chen, V. B.; Block, J. N.; Kapral, G. J.; Wang, X.; Murray, L. W.; Arendall, W. B.; Snoeyink, J.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: All-Atom Contacts and Structure Validation for Proteins and Nucleic Acids. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W375–W383.

(57) Hayward, S.; Berendsen, H. J. C. Systematic Analysis of Domain Motions in Proteins from Conformational Change; New Results on Citrate Synthase and T4 Lysozyme. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1998**, *30*, 144–154.

(58) Battisti, U. M.; Jozwiak, K.; Cannazza, G.; Puia, G.; Stocca, G.; Braghieri, D.; Parenti, C.; Brasili, L.; Carrozzo, M. M.; Citti, C.; Troisi, L. 5-Arylbenzothiadiazine Type Compounds as Positive Allosteric Modulators of AMPA/Kainate Receptors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 25–29.

(59) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.