



Université de Liège
Faculté de Médecine
Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament
Laboratoire de Chimie Pharmaceutique



Université du Luxembourg
Faculté des Sciences, de la Technologie et de la Communication
Unité de Recherche des Sciences de la Vie



CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE DÉRIVÉS COUMARINIQUES EN TANT QU'AGENTS ANTICANCÉREUX POTENTIELS

Thèse présentée par
Marc HEMMER
pharmacien

En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2010-2011

*Promoteurs: Prof. Bernard Pirotte, Dr. Pascal de Tullio (Université de Liège)
Prof. Eric Tschirhart (Université du Luxembourg)*



Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur Bernard Pirotte pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique et pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder. Son intérêt et sa disponibilité, ainsi que ses conseils précieux ont largement contribué à la réalisation de cette thèse. De même, je voudrais remercier le Docteur Pascal de Tullio pour m'avoir guidé tout au long de mon parcours. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec lui ont été d'une grande utilité pour avancer au mieux dans mes travaux de recherche.

Mes remerciements les plus sincères vont aux Professeurs Eric Tschirhart et Jean-Luc Bueb de l'Université du Luxembourg. Sans hésiter, ils ont accepté le rôle de partenaires luxembourgeois, afin que le projet de recherche puisse satisfaire aux exigences du Fonds National de la Recherche du Luxembourg. Plus que cela, c'est avec beaucoup de dévouement qu'ils m'ont accompagné au cours de mes travaux et ils n'ont pas ménagé leurs efforts et leur temps pour m'aider quand c'était nécessaire. Je tiens à les remercier tout particulièrement pour l'aide inestimable qu'ils m'ont apportée à l'occasion de la rédaction d'un article scientifique. Parmi les membres de leur unité de recherche, je tiens à mentionner les Docteurs Sébastien Plançon et Yohann Bernard, qui m'ont permis d'apprendre et de maîtriser plusieurs techniques de biologie cellulaire, de biologie moléculaire et de biochimie, ainsi que le Docteur Claude Haan qui a eu la gentillesse de tester un de nos composés sur des récepteurs de type tyrosine kinase.

Le Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (LBTD) de l'Université de Liège nous a accueillis pour nous permettre de tester nos molécules sur un modèle d'invasion tumorale. Je remercie donc les Professeurs Jean-Michel Foidart et Agnès Noël, ainsi que les membres de leur laboratoire qui ont contribué à mon travail, en particulier les Docteurs Erik Maquoi, Vincent Lambert et Christel Péqueux. Je remercie également de tout cœur Erika Konradowski et Marie Dehuy sans qui les expériences au LBTD n'auraient pas été possibles.

Un grand merci aux Docteurs Raphaël Frédérick et Lionel Pochet des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur pour la mise à disposition d'un système qui nous a permis de réaliser des tests de solubilité.

Je ne voudrais pas non plus oublier les collègues du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique que j'ai côtoyés quotidiennement pendant de nombreuses années, notamment Basile, Christelle, Christine, Deniz, Eduard, Eric, Gaëlle, Jean-François Liégeois, Jean-François Renard, Julien, Nafila, Pierre Fraikin, Pierre Francotte, Philippe, Sébastien,

Stéphane, Sylvie, Xavier et Yvette. Je les remercie pour leurs innombrables conseils et coups de main, mais aussi pour leur amitié et la bonne ambiance qu'ils ont su créer au sein du laboratoire.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse pour avoir accepté d'en faire partie et pour leurs conseils avisés lors de nos réunions.

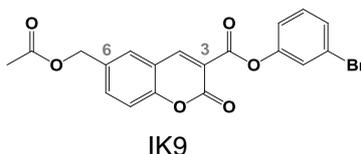
Le présent travail de thèse a été réalisé grâce au soutien financier du Fonds National de la Recherche du Luxembourg (FNR, bourse de Formation Recherche EXT-BFR05-066).

Pour terminer, je souhaiterais rendre hommage à mes parents, ma sœur et mon frère ainsi qu'à tous mes proches pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de mes études et de mes activités de recherche.

Conception, synthèse et évaluation biologique de dérivés coumariniques en tant qu'agents anticancéreux potentiels

Marc Hemmer

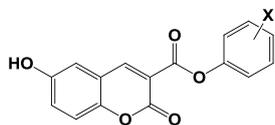
Résumé - Le 6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (IK9) est un dérivé coumarinique décrit comme inhibiteur puissant de l'invasion tumorale et de l'angiogénèse. Il inhibe l'invasion des cellules HT1080 de fibrosarcome humain *in vitro* à travers une membrane poreuse recouverte d'une couche de collagène (test en « chambres de Boyden ») et la croissance tumorale *in vivo* chez des souris athymiques nues. Il est par ailleurs capable de bloquer l'angiogénèse, à la fois dans un modèle *ex vivo* d'anneaux d'aorte de rats et dans un modèle *in vivo* de néovascularisation choroïdale chez la souris. Il présente pour autant une problématique d'hydrosolubilité et de stabilité, dont il faudra tenir compte lors d'investigations futures.



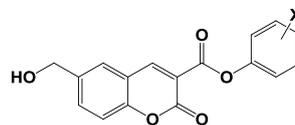
Dans une première partie du projet, nous avons synthétisé des dérivés originaux de l'IK9, modulés en position 3 et 6 du noyau coumarinique, en introduisant des fonctions susceptibles d'augmenter l'hydrosolubilité et la stabilité métabolique des molécules obtenues. Leur pouvoir anti-invasif a été évalué dans le test en « chambres de Boyden », ce qui nous a permis de mettre en évidence différentes relations structure-activité.

Une deuxième partie du projet fut consacrée à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9, qui est non identifié jusqu'à présent. Un effet anti-invasif ou anti-prolifératif envers les cellules endothéliales, actrices principales du processus d'angiogénèse, n'a pu être observé. L'IK9 n'agit vraisemblablement pas en tant qu'inhibiteur de plusieurs récepteurs de type tyrosine kinase (EGFR, PDGFR et VEGFR). Le composé engendre une légère baisse de l'expression de l'ARNm codant pour les métalloprotéases matricielles (MMPs) 2 et 9 mais par contre entraîne une diminution substantielle de la sécrétion des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080 de fibrosarcome humain.

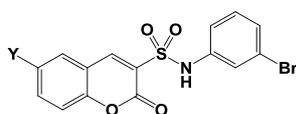
En conclusion, la prise en compte simultanée de l'activité anti-invasive, de l'hydrosolubilité et de la stabilité met en avant plusieurs séries de dérivés, notamment des 6-hydroxycoumarines, des 6-hydroxyméthylcoumarines et des coumarine-3-sulfonamides, dont l'intérêt en tant que successeurs potentiels de l'IK9 est indéniable.



6-hydroxycoumarines



6-hydroxyméthylcoumarines

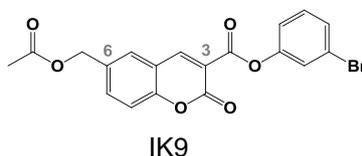


coumarine-3-sulfonamides

Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarinic derivatives as potential anticancer drugs

Marc Hemmer

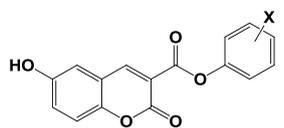
Abstract - 3-bromophenyl 6-acetoxymethyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate (IK9) was recently reported to be a potent inhibitor of cancer cell invasion and angiogenesis. It markedly reduced *in vitro* invasion of human HT1080 fibrosarcoma cells through collagen-coated porous membranes ("Boyden chamber" assay) and *in vivo* tumour growth in athymic nude mice. It was furthermore able to decrease angiogenesis *ex vivo* in a rat aortic ring assay and *in vivo* in a choroidal neovascularisation mice model. It nevertheless presents some water solubility and stability problems, which should be taken into account for further investigations.



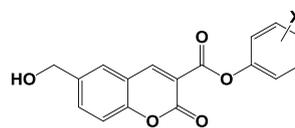
In the first part of the project, we synthesized original IK9 derivatives, modulated at the 3- and 6-positions, by introducing functional groups able to improve water solubility and metabolic stability. Their anti-invasive potency was screened in the "Boyden chamber" assay and the generated results highlighted some structure-activity relationships.

A second part of the project was devoted to the elucidation of the actually unknown mechanism of action of IK9. Anti-invasive or anti-proliferative effects against endothelial cells, main actors of the angiogenic process, were not emphasised. We showed that IK9 acts likely not as an inhibitor of receptor tyrosine kinases (EGFR, PDGFR and VEGFR). The compound generates a weak decrease of mRNA coding for metalloproteinases (MMPs) 2 and 9, and on the other hand a substantial diminution of MMP 2 and 9 secretions by HT1080 fibrosarcoma cells.

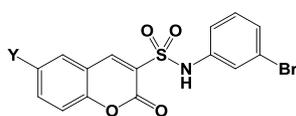
In conclusion, the consideration of anti-invasive properties together with the worked out solubility and stability profiles highlights several series, notably 6-hydroxycoumarins, 6-hydroxymethylcoumarins and coumarin-3-sulfonamides, whose interest as potential successors to IK9 is undeniable.



6-hydroxycoumarins



6-hydroxymethylcoumarins



coumarin-3-sulfonamides

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ang	angiopoïétine
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
COX	Cyclooxygénase
CPT	Camptothécine
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOI	Densité Optique Intégrée
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factors</i>
HLE	<i>Human Leucocyte Elastase</i>
HMTA	Hexaméthylènetétramine
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>HorseRadish Peroxydase</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LOX	Lipoxygénase
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>

MT-MMP	<i>Membrane type-MMP</i>
PA	<i>Plasminogen Activator</i>
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PKA/PKC	<i>Protein Kinase A/C</i>
PS	<i>PhosphatidylSérine</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophage</i>
TEA	<i>Triéthylamine</i>
TGF- β	<i>Tumor Growth Factor β</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of MetalloProteinases</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine</i>
TMS	<i>Tétraméthylsilane</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
tPA	<i>PA de type tissulaire</i>
uPA	<i>Urokinase (PA de type urokinase)</i>
uPAR	<i>urokinase Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
α -CT	<i>α-ChymoTrypsine</i>

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
<i>I.1. Généralités</i>	1
<i>I.2. L'invasion tumorale</i>	6
<i>I.3. L'angiogenèse</i>	9
<i>I.4. Les traitements anti-cancéreux</i>	17
<i>I.5. Les protéases</i>	24
I.5.1. Les protéases à sérine	24
I.5.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)	29
<i>I.6. Coumarines et cancer</i>	33
I.6.1. Généralités sur les coumarines	33
I.6.2. Coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine.....	36
I.6.3. Coumarines en tant qu'inhibiteurs de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse	39
II. PRÉSENTATION DU TRAVAIL	45
III. STRATÉGIES DE SYNTHÈSE	51
<i>III.1. Méthodes de synthèse générales des coumarines</i>	51
<i>III.2. Stratégies de synthèse adoptées pour obtenir les nouveaux dérivés coumariniques</i>	56
III.2.1. Synthèse des 6-acétoxyméthylcoumarines	58
III.2.2. Synthèse des esters phényles de l'acide malonique	60
III.2.3. Synthèse des 6-hydroxyméthylcoumarines, des 6-acétamidométhylcoumarines et des 6-méthylsulfonylaminométhylcoumarines	62
III.2.4. Synthèse des coumarine-3-sulfonamides.....	65
III.2.5. Synthèse des 6-hydroxycoumarines, des 7-hydroxycoumarines et des 6,7-dihydroxycoumarines	68
III.2.6. Synthèse des 6-acyloxycoumarines	71
IV. SOLUBILITÉ ET STABILITÉ	73
<i>IV.1. Solubilité</i>	73
<i>IV.2. Stabilité</i>	76
V. DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTI-INVASIF DES NOUVEAUX DÉRIVÉS COUMARINIQUES SYNTHÉTISÉS	79
VI. CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE L'IK9	95
<i>VI.1. Étude de l'effet de l'IK9 au niveau des cellules endothéliales</i>	96
<i>VI.2. Étude de l'effet de l'IK9 au niveau de l'expression, de la sécrétion et de l'activation des MMPs 2 et 9</i>	103
<i>VI.3. Étude préliminaire de l'effet de l'IK9 au niveau des récepteurs de type tyrosine kinase et des MAPK</i>	112
VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	121

VIII. MATÉRIEL ET MÉTHODES	127
<i>VIII.1. Synthèse organique</i>	127
<i>VIII.2. Solubilité et stabilité.....</i>	178
<i>VIII.3. Évaluation biologique</i>	181
VIII.3.1. Culture cellulaire	181
VIII.3.2. Test de chémoinvasion en « chambres de Boyden » sur cellules HT1080 de fibrosarcome humain	181
VIII.3.3. Étude de l'effet de l'IK 9 sur l'invasion, la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales (HUVEC)	183
VIII.3.4. Étude de l'effet de l'IK9 sur l'expression et la sécrétion des métalloprotéases matricielles 2 et 9	186
VIII.3.5. Récepteurs aux facteurs de croissance de type tyrosine kinase.....	189
<i>VIII.4. Analyse statistique.....</i>	190
IX. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191
X. ANNEXES.....	201
<i>Annexe 1</i>	201
Droites d'étalonnage réalisées dans le cadre des expériences de solubilité ...	201
<i>Annexe 2</i>	204
Exemples de chromatogrammes obtenus lors de l'étude de stabilité	204

I. INTRODUCTION

I.1. Généralités

Le terme « cancer » désigne une maladie lors de laquelle un groupe de cellules se divise de manière incontrôlée au sein d'un tissu de l'organisme. Ces cellules sont en outre capables d'envahir les tissus avoisinants et peuvent donner lieu éventuellement à des métastases. Ce sont ces propriétés qui distinguent les cancers des tumeurs bénignes. Ces dernières ont une prolifération cellulaire anormalement élevée au sein d'un tissu, mais leur pouvoir prolifératif est inférieur à celui d'un cancer. Elles n'envahissent pas les tissus de leur entourage et ne développent par conséquent pas de métastases. Les tumeurs bénignes sont dangereuses dans la mesure où elles peuvent comprimer des organes ou des vaisseaux avoisinants, sans ignorer leur capacité à se transformer en tumeurs malignes.

Dans la plupart des pays occidentaux, le cancer constitue la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Selon l'OMS, entre 7.5 et 8 millions de personnes sont décédées des suites d'un cancer en 2007. Le cancer peut survenir à tous les moments de la vie, même chez le fœtus, mais le risque augmente de manière importante avec l'âge.

Après plusieurs décennies de recherche dans le domaine du cancer, un nombre important de résultats montre que le cancer implique des changements dynamiques au sein du génome. Des agents cancérigènes chimiques, physiques ou viraux provoquent des mutations qui sont responsables de l'expression d'oncogènes et de la répression de gènes suppresseurs de tumeurs, générant ainsi le phénotype des cellules cancéreuses.

Il est bien établi que la survenue d'un cancer constitue le résultat de six altérations essentielles au niveau de la physiologie cellulaire (figure I-1), comme l'ont décrit D. Hanahan et R. A. Weinberg [Hanahan & Weinberg 2000]:

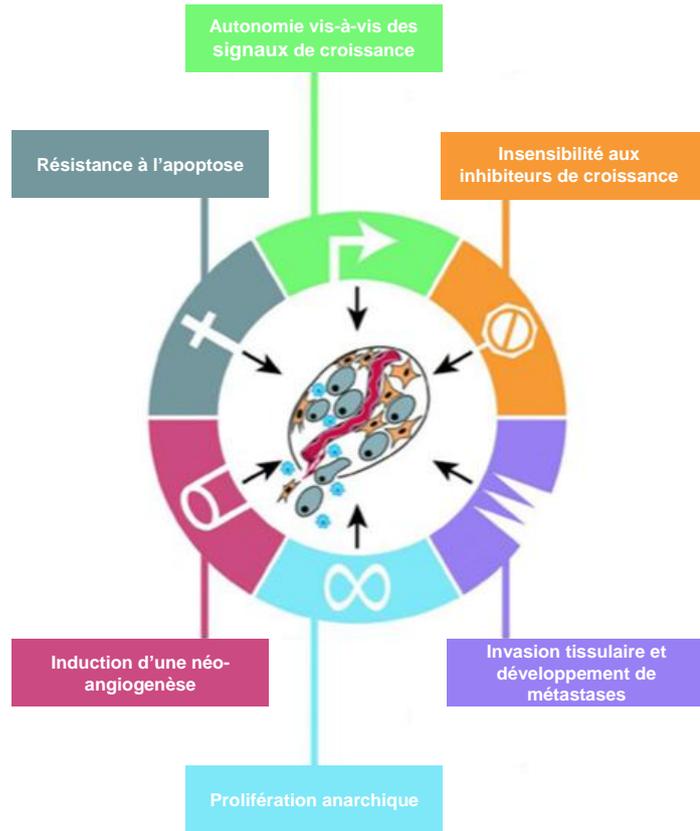


Figure I-1 : Altérations essentielles au niveau de la physiologie des cellules cancéreuses (d'après Hanahan&Weinberg 2000)

- **Autonomie vis-à-vis des signaux de croissance**

Les cellules saines requièrent la présence de signaux de croissance en provenance de leur environnement cellulaire afin d'entrer dans un stade prolifératif. Les cellules tumorales par contre développent différentes stratégies afin d'acquérir une autonomie vis-à-vis de ces signaux. Celles-ci comprennent :

- une production autocrine de facteurs de croissance;
- une surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance;
- l'apparition de récepteurs constitutivement actifs;
- une altération au sein de la transduction intracellulaire.

- **Insensibilité aux inhibiteurs de croissance**

Au sein d'un tissu normal de l'organisme, la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire sont maintenues grâce à la présence d'inhibiteurs physiologiques de croissance. Les cellules sont maintenues soit au stade G0 du cycle cellulaire, soit entrent dans un stade post-mitotique impliquant la perte de leur potentiel prolifératif. Les cellules cancéreuses sont capables de développer une insensibilité à ces inhibiteurs, notamment par :

- une diminution de l'expression ou mutation des récepteurs aux inhibiteurs;
- une interruption de la transduction intracellulaire des signaux inhibiteurs;
- un échappement à la différenciation cellulaire.

- **Résistance à l'apoptose**

L'apoptose est définie comme étant la mort cellulaire programmée et ce mécanisme est présent sous forme latente dans toutes les cellules. Elle est déclenchée lorsque des anomalies cellulaires, comme par exemple des dommages au niveau de l'ADN ou l'hypoxie, sont détectées. Les cellules cancéreuses sont capables d'y échapper en stimulant la sécrétion de facteurs de survie cellulaire ou en inactivant des activateurs physiologiques de l'apoptose. Ces deux stratégies sont le plus souvent le résultat d'une surexpression d'oncogènes ou d'une sous-expression de gènes suppresseurs de tumeurs.

- **Prolifération anarchique**

Contrairement aux cellules normales, la plupart des cellules cancéreuses dispose d'un potentiel réplicatif illimité. Les cellules saines effectuent un certain nombre de divisions avant d'arrêter leur prolifération pour être éliminées par sénescence. Ceci est principalement le résultat d'un raccourcissement des télomères à l'extrémité des chromosomes lors de chaque division cellulaire. Lorsque la longueur des télomères tombe en dessous d'un seuil critique, la cellule entre en sénescence. Les cellules

cancéreuses ont développé des stratégies pour maintenir les télomères à une longueur suffisante, notamment en surexprimant la télomérase. D'autres mécanismes permettant de contourner la sénescence sont également décrits [Pacifico & Leonardi 2006; Prevarskaya et al. 2010].

- **Induction d'une néo-angiogenèse**

Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins autour de la masse tumorale est important afin d'assurer un apport suffisant en nutriments et en oxygène, ce qui permet à la tumeur d'atteindre une taille supérieure à 2-3 mm³. Les néo-vaisseaux constituent également la voie de dissémination préférentielle des métastases.

- **Invasion tissulaire et développement de métastases**

La plupart des cancers sont caractérisés par une sortie des cellules tumorales de leur site primaire pour envahir les tissus avoisinants et se disséminer dans l'organisme à travers la circulation sanguine pour développer des métastases.

Les cancers rencontrés en pathologie humaine présentent une grande variabilité en ce qui concerne leur structure et leur aspect morphologique. Néanmoins, quelques caractéristiques communes peuvent être mises en évidence.

La masse tumorale est composée de deux compartiments distincts, à savoir les cellules cancéreuses et le stroma tumoral. Le stroma, dont la taille varie en fonction du type de cancer, se compose de plusieurs types de cellules, d'une matrice extracellulaire et d'un grand nombre de facteurs extracellulaires. Si dans un premier temps, on attribuait au stroma un rôle essentiellement nutritif, des résultats plus récents suggèrent qu'il intervient activement lors de la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, grâce aux interactions permanentes entre les cellules cancéreuses et les éléments du stroma. Les fibroblastes associés aux cancers (CAFs - angl. *Cancer-Associated Fibroblasts*), qui sont la composante cellulaire majoritaire du stroma et qui diffèrent des fibroblastes normaux (les CAFs sont

constamment actifs et ne subissent pas l'apoptose ou la sénescence), sont responsables de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, glycosaminoglycanes,...). Ils stimulent en plus la prolifération et l'invasion en sécrétant des facteurs de croissance, des facteurs chimiotactiques et des facteurs angiogéniques. Il en est de même pour les macrophages associés aux tumeurs (TAMs - angl. *Tumor-Associated Macrophages*), que l'on retrouve, comme les CAFs, au niveau de tous les cancers. Le stroma peut renfermer d'autres cellules immunitaires ou inflammatoires, mais leur occurrence varie en fonction du type de cancer. Le stroma tumoral peut être considéré comme un état inflammatoire permanent qui limite l'exposition des cellules tumorales au système immunitaire et qui serait responsable, du moins partiellement, de l'instabilité génomique des cellules cancéreuses. Les interactions entre le stroma et la tumeur ne sont pas statiques, mais évoluent en fonction des besoins de la tumeur [Dvorak 1986; Li et al. 2007].

Comme la plupart des organes et tissus de l'organisme, les tumeurs sont entourées d'une membrane basale. Celle-ci constitue une barrière physiologique qui maintient les cellules cancéreuses dans leur compartiment d'origine lors des stades précoces (carcinome *in situ*). Lors de la progression de la maladie, elle se dégrade sous l'effet de plusieurs types de protéases, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'envahir les tissus avoisinants et de développer des métastases [Rowe & Weiss 2008].

Les cellules cancéreuses présentent un degré de différenciation inférieur à celui des cellules normales. Lors du processus de cancérogenèse, nous assistons à une dédifférenciation et les cellules qui en résultent redeviennent pluripotentes et présentent des similitudes avec les cellules souches (concept des « *cancer stem cells* »). Le degré de dédifférenciation atteint varie en fonction du type cancer et de l'évolution de la maladie.

Les différents cancers sont classés en fonction du type cellulaire duquel ils dérivent. Les carcinomes, qui représentent environ 80% des tumeurs malignes rencontrées en pathologie humaine, sont d'origine épithéliale. Les sarcomes sont

I. Introduction

d'origine conjonctive et ne représentent qu'environ 1% des cancers chez l'homme. Les lymphomes et les leucémies dérivent des cellules hématopoïétiques.

I.2. L'invasion tumorale

Au fur et à mesure de la progression de la maladie, des clones de cellules tumorales issus de l'instabilité génomique, résistants aux défenses de l'organisme, peuvent acquérir un phénotype invasif et générer des cellules capables de dégrader et de traverser la membrane basale. Les cellules tumorales, localisées jusque là dans un compartiment restreint, envahissent alors les tissus avoisinants et peuvent atteindre la circulation sanguine pour former éventuellement des métastases.

Le processus métastatique peut être schématisé de manière simplifiée (figure I-2) en plusieurs étapes [Zetter 1998; Eccles & Welch 2007; Iizumi et al. 2008]. Les cellules ayant acquis le phénotype invasif commencent à se détacher de la masse tumorale primaire, notamment par perte des jonctions intercellulaires, et vont infiltrer les tissus conjonctifs. Elles stimulent en même temps la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la masse tumorale. Pour pouvoir entrer dans la circulation sanguine (intravasation), les cellules tumorales doivent en outre être capables de dégrader la membrane basale des vaisseaux. Le séjour des cellules cancéreuses dans la circulation, qui représente une étape critique, peut aboutir à l'extravasation dans un organe distant. Lors de celle-ci, les cellules adhèrent d'abord à la paroi des vaisseaux et vont ensuite franchir cette paroi pour finalement s'implanter dans le site secondaire et développer dans un premier temps des micrométastases, qui peuvent évoluer vers des métastases vascularisées majeures. Il existe aussi des tumeurs invasives qui ne sont pas métastatiques, c'est-à-dire qu'elles envahissent les tissus adjacents sans atteindre la circulation sanguine (tumeurs « semi-malignes »).

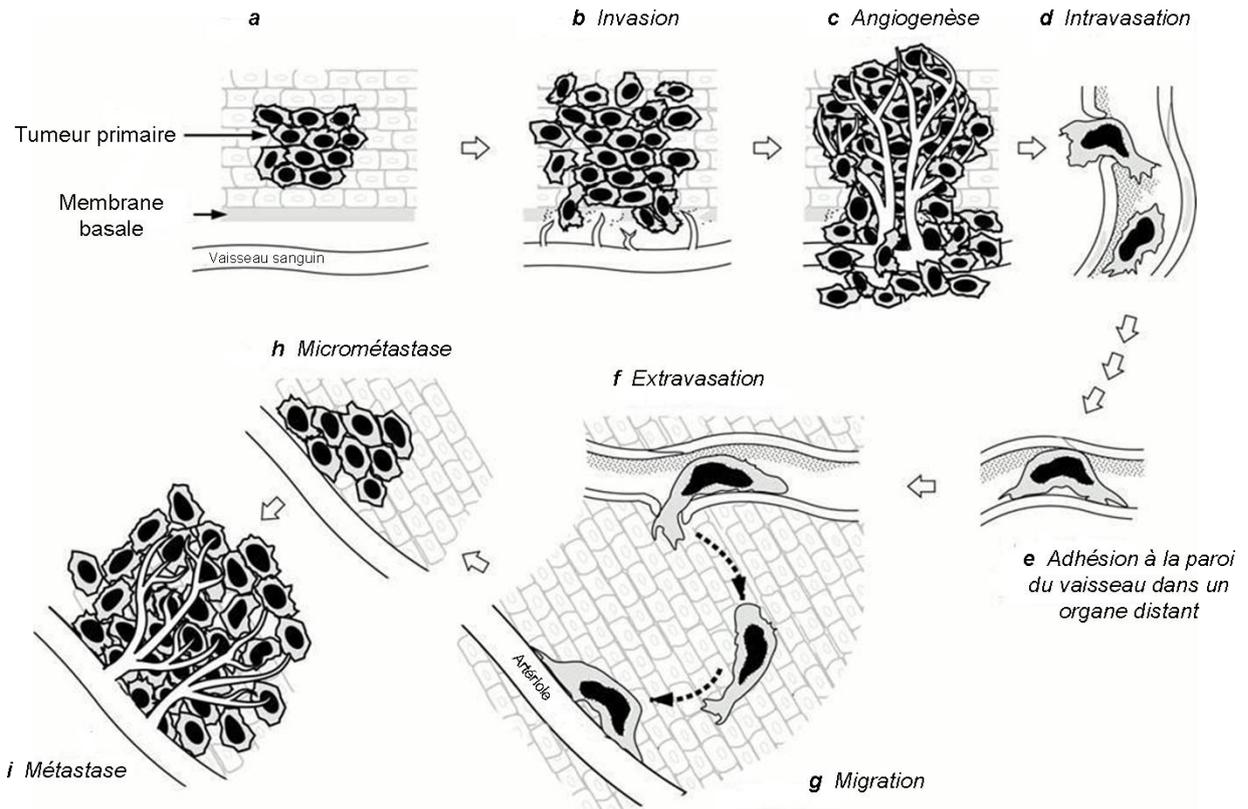


Figure I-2 : Représentation simplifiée du processus métastatique (d'après Zetter 1996)

Un nombre important de cellules qui se trouvent dans la circulation sanguine disparaît, car les vaisseaux sanguins, contrairement au stroma tumoral, ne représentent pas un environnement favorable à la survie des cellules, qui dès lors subissent l'apoptose ou sont éliminées par le système immunitaire. Toutes les micrométastases qui ont atteint un site secondaire ne se développent pas en métastases. La dépendance d'un environnement favorable (stroma) fait que beaucoup de micrométastases ou même des cellules isolées, après l'extravasation, entrent dans un stade de dormance. Alors qu'une fraction significative de ces tumeurs quiescentes ne s'active jamais, certaines micrométastases recommencent à proliférer et à se vasculariser pour devenir des vraies métastases. Celles-ci récupèrent généralement les propriétés invasives de la tumeur primaire et deviennent à leur tour invasives. Cependant, les conditions nécessaires pour le maintien en dormance ou favorables à leur « réveil » sont peu connues [Wikman et al. 2008].

I. Introduction

La localisation des métastases n'est pas aléatoire. Le développement au sein d'un site secondaire s'effectue plutôt en suivant une organotropie (angl. *homing*) qui est fonction du type de cancer impliqué et de la localisation de la tumeur primaire. La sortie des cellules de la circulation peut se produire en principe de manière ubiquitaire, mais elle s'effectue de manière préférentielle en aval du site primaire. Les cellules sont guidées d'une part par des marqueurs spécifiques présents à leur surface et d'autre part par des facteurs attractants produits par les organes cibles. Enfin, le fait que les cellules métastatiques nécessitent un environnement favorable à leur croissance implique que le tissu ciblé doit présenter des caractéristiques communes avec le tissu d'origine. Tout cela se traduit par des localisations secondaires typiques pour de nombreux cancers rencontrés en pathologie humaine.

Les différentes étapes de l'invasion tumorale et du processus métastatique nécessitent la mise en œuvre d'un grand nombre de facteurs différents, dont la description détaillée dépasserait le cadre du présent exposé. Les plus importants d'entre eux méritent néanmoins d'être mentionnés [Bogenrieder & Herlyn 2003]:

- facteurs de survie cellulaire
- molécules intervenant respectivement dans l'adhésion et dans le détachement des cellules tumorales (cadhérines, intégrines, ...)
- facteurs qui stimulent la mobilité des cellules (signalement Met-SF/HGF)
- enzymes protéolytiques nécessaires pour la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire (protéases à sérine, métalloprotéases matricielles, ADAMs, ...)
- inducteurs de l'angiogenèse tumorale
- marqueurs de l'organotropie (chémokines, CD44, ostéopontine)

Il est unanimement reconnu de nos jours que les métastases sont à l'origine d'environ 90% des décès liés au cancer. La présence de métastases est donc le principal indicateur de la malignité d'une tumeur et représente le facteur de pronostic négatif le plus significatif dans la majorité des tumeurs solides. Il est en effet relativement difficile de détecter des micrométastases et leur éradication est par

conséquent compliquée. De plus, les métastases sont fréquemment constituées de cellules résistantes aux chimiothérapies. Malgré ces connaissances, beaucoup de traitements anticancéreux actuels se focalisent sur les tumeurs primaires plus que sur les métastases. C'est pourquoi des substances capables d'inhiber spécifiquement l'invasion tumorale et la formation de métastases sont nécessaires, un nombre important de cibles moléculaires potentielles (protéases, intégrines, cadhérines, laminines, facteurs angiogéniques, cyclo-oxygénases, tyrosine kinases, ...) étant actuellement sous investigation [Germanov et al. 2006; Perret & Crepin 2008].

1.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme étant le bourgeonnement de cellules endothéliales à partir de vaisseaux capillaires préexistants afin de former des nouveaux vaisseaux sanguins. Ce mécanisme est essentiel lors de la croissance et de la réparation de tissus et a lieu au cours de plusieurs processus physiologiques, tels que le développement embryonnaire, le cycle menstruel ou la cicatrisation de plaies. Il est également impliqué dans différents désordres pathologiques comme le cancer ou certaines maladies oculaires comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [Folkman & Shing 1992; Carmeliet 2005]. Une balance finement régulée entre facteurs pro- et antiangiogéniques est requise afin de maintenir l'homéostasie vasculaire, l'angiogenèse pathologique étant généralement le résultat d'une dérégulation de cette balance.

L'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale dépend de la capacité des tumeurs à assurer une vascularisation favorisant l'apport d'éléments nutritifs aux cellules cancéreuses a été proposée par Judah Folkman en 1971 [Folkman 1971]. En l'absence de vaisseaux sanguins, l'apport d'éléments nutritifs et d'oxygène ainsi que l'élimination des déchets métaboliques se fait par diffusion passive et la croissance de la tumeur au-delà de 2-3 mm³ n'est dès lors pas possible. En même temps, dans la plupart des cas, la taille d'une tumeur est directement corrélée à son degré de vascularisation. Les néo-vaisseaux issus de l'angiogenèse tumorale constituent par ailleurs la voie de dissémination principale des métastases.

I. Introduction

L'angiogenèse tumorale se produit à partir de vaisseaux préexistants à proximité de l'implant tumoral, surtout au niveau des capillaires et parfois aussi au niveau des veinules. Elle est subdivisée en quatre évènements distincts, à savoir le bourgeonnement, la migration, l'organisation et le remodelage (figure I-3) [Vandenbunder et al. 1994; Mattot et al. 1998]. Le début est marqué par une dégradation par des protéases de la membrane basale à l'endroit où le bourgeonnement aura lieu, suivi d'une accumulation de cellules endothéliales à la face externe du vaisseau. La prolifération des cellules endothéliales se produit essentiellement à la base du bourgeon. Les cellules qui se trouvent en tête migrent de façon orientée vers le foyer tumoral, source du stimulus angiogénique. Les cellules du bourgeon vont ensuite s'organiser en tubes avec des lumières se terminant en cul-de-sac. Le processus se termine par la formation d'anastomoses et de boucles pour former un réseau vasculaire et la mise en place d'une membrane basale. Ces vaisseaux néo-formés subissent par la suite un remodelage permanent en fonction des besoins de la tumeur. La stabilisation des vaisseaux est assurée par la présence de péricytes, qui sont des cellules murales que l'on retrouve sur la face externe de l'endothélium.

Les capillaires issus de l'angiogenèse tumorale diffèrent morphologiquement et fonctionnellement des vaisseaux normaux. La structure du réseau est irrégulière, notamment à cause de l'absence fréquente de péricytes, et les vaisseaux se terminant en « voie sans issue » sont nombreux, ce qui se traduit par une résistance accrue au flux sanguin et une diminution de la perfusion de la tumeur. Leur membrane basale est souvent interrompue voire absente et les cellules endothéliales sont parfois manquantes, rendant ainsi les vaisseaux hautement perméables [Mattot et al. 1998; Li et al. 2007].

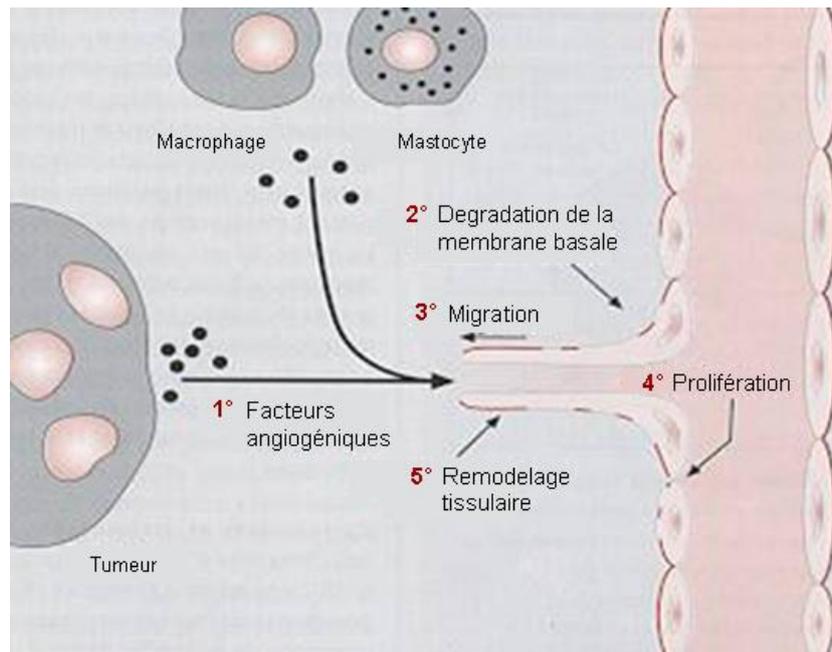


Figure I-3 : Représentation simplifiée du processus angiogénique (d'après E. Hémond, Magazine de l'Université du Québec, 1998)

Le phénomène de l'angiogenèse est absent dans la plupart des tissus adultes et il faut dès lors se demander pourquoi et comment il se réactive dans certaines circonstances pathologiques, en particulier lors du développement d'un cancer. Pour répondre à cette question, il faut savoir que l'angiogenèse est hautement contrôlée par une série de facteurs pro- et anti-angiogéniques présents dans la plupart des tissus sains et malades, et que la présence ou l'absence d'angiogenèse dans une situation donnée est le résultat d'une balance entre ces deux types de facteurs. Au moment où J. Folkman a proposé l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse [Folkman 1971], les facteurs qui la régulent, en même temps que ceux qui déclenchent sa réactivation, n'étaient pas connus et des recherches abondantes à ce sujet ont alors commencé. La liste des facteurs pro- et anti-angiogéniques connus de nos jours est impressionnante et ne cesse de s'allonger, ce qui nous oblige à limiter notre description.

Les premiers facteurs pro-angiogéniques découverts et décrits ont été le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et les FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) de type acide et basique.

I. Introduction

Le terme **VEGF** désigne aujourd'hui une famille de protéines structurellement apparentées regroupant le VEGF proprement dit (ou VEGF-A), les VEGF-B, -C et -D, ainsi que le PlGF (*Placental Growth Factor*). Il existe également deux autres homologues, VEGF-E et VEGF-F, que l'on retrouve respectivement dans les virus et dans le venin de serpents. Le VEGF-A existe sous 5 isoformes différentes (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆) issues de l'épissage alternatif de l'ARNm. Les VEGFs sont produits en réponse à l'hypoxie par un grand nombre de types cellulaires (comme par exemple les cellules tumorales ou les cellules inflammatoires) et agissent sur des récepteurs de type tyrosine kinase situés principalement au niveau des cellules endothéliales. Trois récepteurs différents sont actuellement connus, à savoir le VEGFR-1 (Flt-1) et le VEGFR-2 (Flk-1/KDR) que l'on retrouve au niveau des vaisseaux sanguins, ainsi que le VEGFR-3 (Flt-4) spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGF est un facteur angiogénique essentiel qui stimule la prolifération (à travers VEGFR-2) et la migration (à travers VEGFR-1) des cellules endothéliales. Il augmente la perméabilité vasculaire et intervient aussi lors du remodelage des vaisseaux [Ribatti et al. 2000; Ferrara 2009].

Les **FGFs** acide et basique, mieux connus sous leurs noms actuels FGF-1 et FGF-2, appartiennent à une famille de protéines dont 23 membres sont connus à l'heure actuelle et qui possèdent 4 récepteurs à activité tyrosine kinase identifiés (FGFR-1, -2, -3 et -4). Il s'agit de facteurs à activité pleiotropique agissant sur plusieurs types de cellules, dont les fibroblastes (ce qui est à l'origine de leur nom) mais aussi les cellules endothéliales. Comme le VEGF, les FGFs-1 et -2 augmentent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Ils stimulent en outre la sécrétion de certaines protéases intervenant lors de la dégradation de la matrice extracellulaire et régulent l'expression d'intégrines et de cadhérines [Presta et al. 2005].

Les **angiopoïétines** 1 et 2 (ang-1 et ang-2) représentent une troisième famille de facteurs angiogéniques essentiels qui interagissent avec un récepteur de type tyrosine kinase appelé tie-2 spécifiquement exprimé par l'endothélium vasculaire. Contrairement au VEGF et aux FGFs, ang-1 n'est pas mitogène et ne stimule donc

pas la prolifération des cellules endothéliales. Il intervient dans les phases tardives de l'angiogenèse en induisant le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses par les cellules endothéliales, contrôlant ainsi le remodelage et la maturation du réseau vasculaire. Ang-2 est un antagoniste de ang-1 qui inhibe la phosphorylation de tie-2 induite par ang-1 [Ribatti et al. 2000; Thurston 2003].

Le processus angiogénique fait en outre intervenir le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le TGF- β (*Tumor Growth Factor*), l'interleukine 8 (IL-8), des intégrines et des cadhérines, ainsi que des enzymes protéolytiques (la liste n'est pas exhaustive).

Il est intéressant de remarquer que la plupart des facteurs pro-angiogéniques sont présents dans les tissus au sein desquels l'angiogenèse est quiescente, ce qui signifie que leur effet est réprimé par la présence de facteurs anti-angiogéniques [Folkman 1997].

La **thrombospondine-1** est l'un des premiers facteurs anti-angiogéniques endogènes qui a été identifié et décrit dans la littérature. Il s'agit d'une protéine sécrétée dont les caractéristiques sont intermédiaires entre celles des facteurs de croissance et des cytokines et celles des protéines de la matrice extracellulaire. L'**angiostatine** et l'**endostatine** sont deux protéines anti-angiogéniques issues du clivage protéolytique de composantes de la matrice extracellulaire, l'angiostatine étant un fragment du plasminogène et l'endostatine un fragment du collagène XVIII. La protéolyse générant ces deux facteurs est régulée par les cellules tumorales qui sécrètent les protéases nécessaires. Les trois facteurs diminuent la prolifération et la mobilité des cellules endothéliales et stimulent leur apoptose. Leurs effets ne peuvent cependant pas être attribués à des interactions précises avec des récepteurs bien définis, comme c'est le cas pour les facteurs pro-angiogéniques décrits ci-dessus, mais seraient plutôt le résultat de multiples interactions avec un ensemble de récepteurs et cibles peu spécifiques appartenant à différentes familles de protéines (thrombospondine-1 : interactions avec le CD36 et des intégrines, inactivation du FGF-2, ... ; angiostatine : interactions avec une ATP synthase à la surface des cellules endothéliales et avec le mécanisme d'activation du

I. Introduction

plasminogène, inhibition de la signalisation intracellulaire ERK1/2 induite par le VEGF et le FGF-2, ...) [Zetter 1998; Sim et al. 2000; Armstrong & Bornstein 2003].

Le passage au sein des tumeurs d'une vasculature quiescente vers la néo-vascularisation est appelé « **switch** » **angiogénique** et provient d'un changement au sein de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. De manière schématique, le switch vers le phénotype angiogénique, qui survient dans les phases précoces ou intermédiaires du processus cancéreux, est le résultat soit d'une augmentation des facteurs induisant l'angiogenèse, soit d'une répression des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse. Plusieurs causes potentielles du switch angiogénique ont été proposées par le passé. L'instabilité génomique des cellules tumorales en fait certainement partie. L'expression de la thrombospondine-1 est en effet positivement régulée par le gène suppresseur de tumeurs p53. Par conséquent, la perte de la fonction p53 dans la plupart des tumeurs fait diminuer les taux de thrombospondine-1, contribuant ainsi au déclenchement de l'angiogenèse. De même, l'activation de l'oncogène *ras* ou la perte du gène suppresseur de tumeurs VHL provoque une augmentation de l'expression du VEGF. Le développement de l'angiogenèse est souvent une réponse au manque de nutriments et d'oxygène. Il a été montré par exemple que l'hypoxie au sein de la masse tumorale active la transcription de gènes HIF (*Hypoxia Inducible Factors*) dont les produits activent à leur tour l'expression du VEGF. Enfin, les protéases - capables de libérer des facteurs de la matrice extracellulaire – sécrétées par les cellules tumorales et les facteurs angiogéniques – sécrétées par les cellules immunitaires du stroma (macrophages, mastocytes, ...) – participent également au déclenchement de l'angiogenèse [Folkman & Shing 1992; Hanahan & Weinberg 2000; Ribatti et al. 2007].

L'hypothèse de J. Folkman ne s'arrête pas à la constatation que la croissance tumorale dépend de la présence d'une vascularisation suffisante et que l'absence de vaisseaux sanguins maintient les tumeurs dans un stade dormant sans dépasser un volume de quelques mm³. Il introduit en même temps le concept d'« anti-angiogenèse » selon lequel il est envisageable de combattre les cancers en empêchant la formation d'une vascularisation tumorale. Idéalement, la tumeur

primaire et les métastases seraient privées de nutriments et d'oxygène et finiraient par régresser ou du moins par rester dans un état de dormance prolongé. L'absence de vaisseaux pourrait accessoirement rendre impossible la dissémination de cellules tumorales à travers l'organisme et donc empêcher le développement de nouvelles métastases [Folkman 1997]. Le concept de l'anti-angiogenèse a été assez rapidement accepté comme étant une stratégie anti-cancéreuse prometteuse et a été largement exploité par la suite.

Plusieurs arguments en faveur des thérapies anti-angiogéniques ont été formulés [Feron 2004; Fayette et al. 2005] :

- le traitement serait sélectif envers les cellules endothéliales associées aux tumeurs, car l'angiogenèse au sein d'un organisme adulte se limite à quelques situations particulières, telles que l'embryogenèse ou l'ovulation, alors que la grande majorité des cellules endothéliales se trouvent dans un stade quiescent ;
- les cellules endothéliales seraient peu susceptibles de développer des résistances, car elles sont génétiquement stables (contrairement aux cellules tumorales) ;
- les cellules endothéliales sont facilement accessibles aux substances anti-angiogéniques.

L'élucidation détaillée des mécanismes et des facteurs impliqués dans le processus angiogénique a permis le développement d'un nombre considérable de substances anti-angiogéniques. Plusieurs de ces substances sont entrées en phase clinique et le premier agent anti-angiogénique a été commercialisé en 2004. Il s'agit du bévacizumab (Avastin[®]), qui est un anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF et qui est utilisé en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle, entre autres contre les carcinomes colorectaux et les carcinomes mammaires [Presta et al. 1997; Hurwitz et al. 2004; Willett et al. 2004].

I. Introduction

Le succès des substances anti-angiogéniques n'était malheureusement pas aussi fulgurant que prévu, car plusieurs limitations sont apparues au cours des recherches [Feron 2004] :

- la réponse des vaisseaux aux traitements anti-angiogéniques dépend de leur degré de maturation (donc du nombre de péricytes recrutés par l'endothélium);
- les cellules endothéliales peuvent développer des résistances sous l'influence du microenvironnement tumoral;
- l'inhibition d'un facteur angiogénique peut déclencher l'activation de voies alternatives afin de pallier l'absence du facteur en question;
- l'anti-angiogenèse peut être à l'origine de la sélection de clones tumoraux résistants à l'hypoxie;
- la régression des vaisseaux tumoraux complique l'accès des agents cytostatiques au foyer tumoral;
- il ne faut pas non plus perdre de vue que l'angiogenèse joue un rôle essentiel durant l'embryogenèse et que chaque substance anti-angiogénique est potentiellement tératogène.

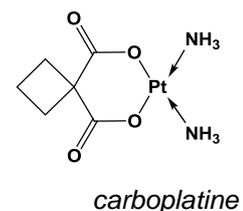
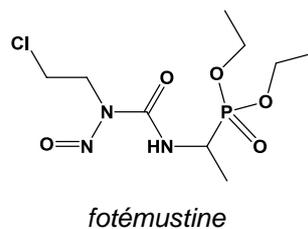
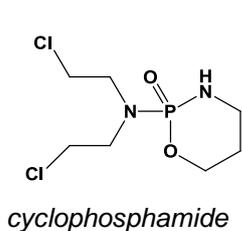
L'angiogenèse tumorale reste malgré tout une cible attractive pour les traitements anti-cancéreux, à condition de tenir compte des limitations avérées ou potentielles lors d'investigations futures. Le développement de substances anti-angiogéniques connaît d'ailleurs un essor considérable depuis quelques années. Plusieurs maladies oculaires, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), sont en effet caractérisées par une angiogenèse anormale et représentent dès lors un deuxième champ d'application pour les traitements anti-angiogéniques [Noel et al. 2007].

I.4. Les traitements anti-cancéreux

A côté des outils chirurgicaux et radiothérapeutiques, les traitements médicamenteux occupent une place importante dans l'arsenal thérapeutique disponible contre le cancer. Il existe plusieurs types de médicaments actuellement disponibles sur le marché et leur classification est basée sur leur mécanisme d'action vis-à-vis des cellules cancéreuses.

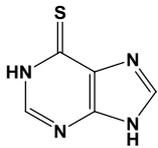
La majorité des substances anti-cancéreuses fait partie de la classe des cytostatiques, c'est-à-dire des médicaments capables de bloquer la prolifération cellulaire. Les cytostatiques exercent un effet particulièrement efficace au niveau des cellules présentant un taux de prolifération élevé, comme c'est le cas pour les cellules cancéreuses. Une grande partie des cellules saines de l'organisme n'est pas concernée, à l'exception de certains types particuliers, comme les cellules du tractus gastro-intestinal ou de la moelle osseuse, ce qui peut engendrer des effets indésirables importants. Les médicaments cytostatiques sont à leur tour subdivisés en fonction de leur mécanisme d'action précis et nous donnons un bref aperçu ci-dessous sur l'ensemble des familles connues à l'heure actuelle.

- Les **agents alkylants** sont capables d'alkyler l'ADN des cellules cancéreuses et provoquent un pontage bicaténaire stable. Ceci empêche la séparation des brins et donc la division cellulaire. Cette catégorie renferme les dérivés de type « moutarde à l'azote » (p.ex. le cyclophosphamide) et les dérivés du N-nitroso-urée (p.ex. la fotémustine). Les agents à base de platine (p.ex. le carboplatine) sont généralement aussi repris dans cette famille.

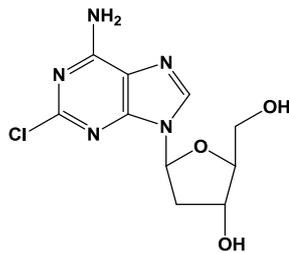


I. Introduction

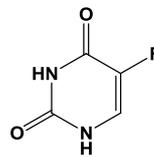
- Le rôle des **anti-métabolites** consiste à s'incorporer dans l'ADN ou dans l'ARN, à la place des bases correctes. Ceci mène à des perturbations de la division et du métabolisme cellulaires. On distingue les analogues de purine (p.ex. la mercaptopurine ou la cladribine) et les analogues de la pyrimidine (p.ex. le 5-fluorouracile ou la cytarabine). Cette classe renferme en outre le méthotrexate qui est un antagoniste de l'acide folique.



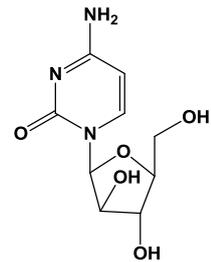
mercaptopurine



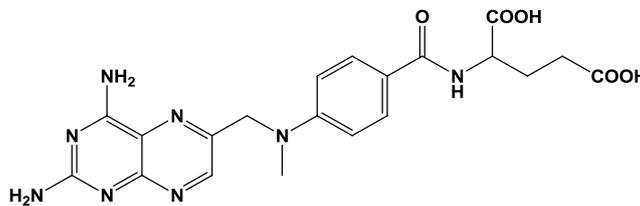
cladribine



5-fluorouracil

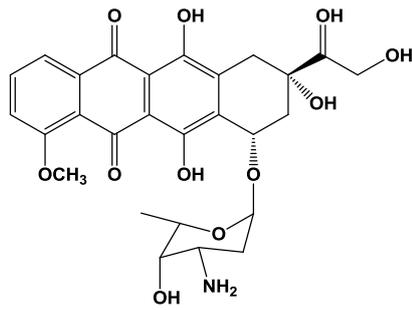


cytarabine

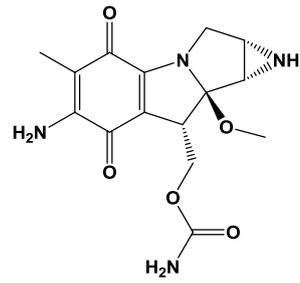


méthotrexate

- Des **antibiotiques** d'origine fongique sont également utilisés comme cytostatiques. Les substances actuellement sur le marché sont les anthracyclines (p.ex. la doxorubicine), la bléomycine, la dactinomycine et la mitomycine C.

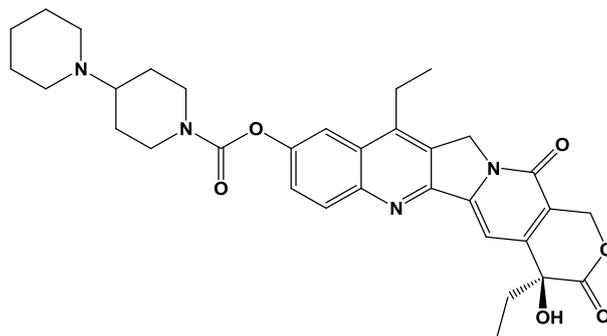


doxorubicine

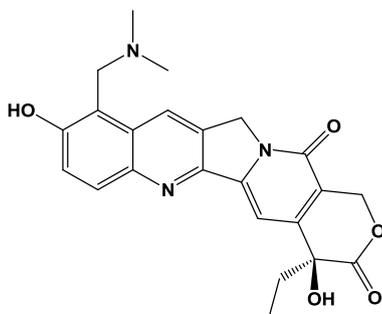


mitomycine C

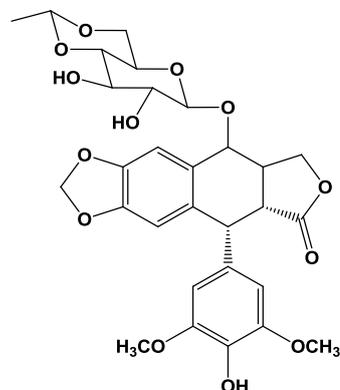
- Les **inhibiteurs de la topo-isomérase** provoquent des ruptures irréversibles du brin d'ADN. On distingue les inhibiteurs de la topoisomérase I (irinotécan et topotécan) et les inhibiteurs de la topoisomérase II (étoposide).



irinotécan



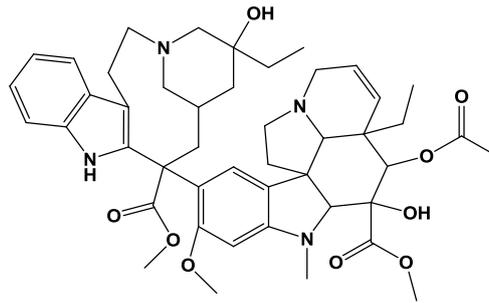
topotécan



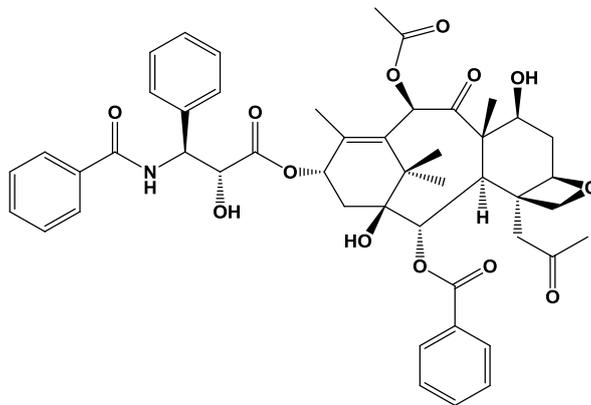
étoposide

I. Introduction

- Les **inhibiteurs des microtubules** se fixent à la tubuline, empêchant ainsi la formation de microtubules. Ceux-ci sont indispensables lors de la séparation des chromosomes au cours de la mitose. Ce groupe comprend les alcaloïdes de la pervenche (p.ex. la vinblastine) et les taxanes (p.ex. la paclitaxel).



vinblastine



paclitaxel

En plus de l'approche purement cytostatique décrite ci-dessus, d'autres stratégies visant des cibles surexprimées dans les cellules tumorales ayant une faible importance au sein des cellules normales ont vu le jour plus récemment :

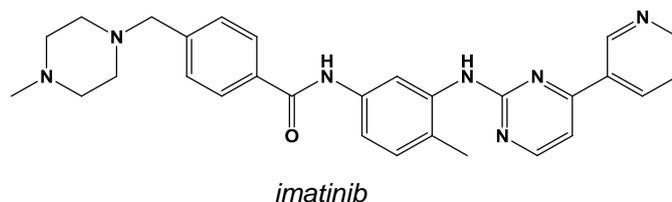
- **Anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux utilisés en oncologie sont d'origine murine ou humaine, soit chimériques ou murins humanisés. Ils sont dirigés contre des

cibles spécifiquement exprimées ou surexprimées par les cellules cancéreuses, en l'occurrence des facteurs de croissance (VEGF), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR) et des antigènes présents à la surface des lymphocytes. Dans ce contexte, on peut citer le cas particulier de l'ibritumomab-tiuxetan, utilisé dans le traitement de lymphomes, qui est un anticorps dirigé contre le CD20 des lymphocytes B sains et cancéreux. L'anticorps est marqué en plus par de l'yttrium-90 radioactif (rayons β). De cette manière, la radioactivité est concentrée spécifiquement au niveau des lymphocytes B sans atteindre les autres cellules de l'organisme.

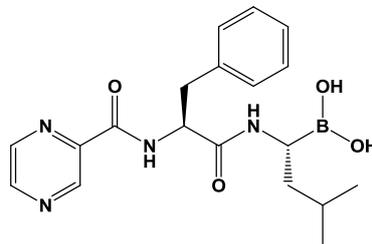
- **Inhibiteurs de tyrosine kinases**

L'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases en oncologie est basée sur le rôle-clé joué par des tyrosine kinases mutées ou dérégulées lors du développement de nombreuses tumeurs. L'exemple le plus connu est sans doute celui de l'imatinib (Glivec[®]) qui est un inhibiteur de la kinase bcr-abl utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cette kinase est le produit d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22 (chromosome de Philadelphie) présente chez 90% des patients atteints de la LMC. Contrairement aux kinases non mutées, bcr-abl est constitutivement actif et provoque une prolifération incontrôlée des leucocytes. Le franc succès connu avec l'imatinib a incité les chercheurs à développer d'autres médicaments dans cette classe, qui peut dès lors être considérée comme l'une des plus prometteuses à l'avenir.



- **Inhibiteurs du protéasome**

Le protéasome est une enzyme intracellulaire responsable de la dégradation de protéines. Cette protéolyse est essentielle pour la survie cellulaire, aussi bien chez les cellules normales que chez les cellules cancéreuses, mais il semblerait que les cellules cancéreuses soient plus dépendantes du bon fonctionnement du protéasome que les cellules normales. Le premier agent thérapeutique de cette nouvelle catégorie est le bortézomib.



bortézomib

Malgré les progrès considérables de la recherche des thérapies anti-cancéreuses alternatives, les agents cytostatiques occupent toujours une place importante dans l'arsenal thérapeutique. Mais leur utilisation s'accompagne de plusieurs inconvénients majeurs. Du fait de leur sélectivité envers les cellules à prolifération rapide, ils affectent également un certain nombre de cellules normales de l'organisme, comme les cellules hématopoïétiques, les cellules du tractus gastro-intestinal et des follicules pileux ou encore les gamètes. Les nombreux effets indésirables – affaiblissement du système immunitaire, nausées, vomissements, perte de cheveux, ... - qui en découlent diminuent largement la qualité de vie des patients.

Le développement de résistances des cellules cancéreuses face aux traitements constitue l'autre problème majeur des chimiothérapies classiques. Les médicaments peuvent subir l'efflux ATP-dépendant à travers la membrane plasmique au moyen de canaux surexprimés par les cellules cancéreuses. L'élucidation de ces mécanismes a néanmoins permis d'orienter les recherches vers le développement

de traitements adjuvants permettant de bloquer les canaux d'efflux [Baumert & Hilgeroth 2009]. A cela s'ajoutent les résistances dues à des changements au niveau de l'absorption, du métabolisme, du catabolisme voire de l'excrétion des substances actives [Perez-Tomas 2006].

Le nombre croissant de malades ainsi que les effets indésirables et les résistances générés par les thérapies cytostatiques conventionnelles soulignent la nécessité de poursuivre et d'intensifier les recherches, en particulier celles qui s'intéressent aux stratégies alternatives [Szekeres & Novotny 2002; Nygren & Larsson 2003].

Dans ce contexte, des médicaments capables d'inhiber l'invasion tumorale et l'angiogenèse en tant qu'adjuvants aux thérapies cytostatiques représentent une autre approche prometteuse et devraient permettre avant tout de réduire le développement de métastases.

I.5. Les protéases

Dans les chapitres précédents, nous avons souligné à plusieurs reprises l'importance au niveau tumoral des protéases (ou peptidases), que ce soit pour dégrader la matrice extracellulaire, pour percer des membranes basales ou pour libérer des facteurs sous leur forme active. Les protéases constituent donc des cibles potentielles pour des stratégies anti-cancéreuses alternatives, en particulier pour empêcher l'invasion tumorale ou l'angiogenèse.

Selon la nomenclature officielle (EC - angl. *enzyme commission*), les protéases appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3) au sein duquel elles constituent le sous-groupe des peptidases (EC 3.4), qui est à son tour subdivisé en plusieurs familles. Ce sont des enzymes à distribution ubiquitaire qui effectuent l'hydrolyse des liaisons peptidiques au sein des protéines. Elles agissent à la fois au niveau intracellulaire, essentiellement en activant des pro-enzymes, et extracellulaire, par exemple au sein de la digestion, de la cicatrisation ou de la cascade de coagulation. Par ailleurs, il est fait une distinction entre exopeptidases et endopeptidases. Les exopeptidases effectuent la protéolyse à partir des extrémités, en clivant l'acide aminé N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxypeptidases). Les endopeptidases coupent à des endroits spécifiques à l'intérieur de la chaîne peptidique. Selon la nature du site catalytique, les endopeptidases sont divisées en différents sous-groupes : endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), à cystéine (3.4.22), à acide aspartique (3.4.23), à thréonine (3.4.25) et les métalloendopeptidases (3.4.24).

I.5.1. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine représentent un groupe de peptidases extrêmement vaste. Elles sont présentes dans tous les organismes vivants (procaryotes, eucaryotes, virus) et possèdent des fonctions très variées. Selon la base de données MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), elles sont classées en 13 « clans » et en 46 familles en tenant compte d'homologies structurales [Barrett et al. 2001; Rawlings et al. 2010].

Le site actif des peptidases à sérine est caractérisé par la présence d'une « triade catalytique » constituée des résidus sérine 195, histidine 57 et aspartate 102 (numérotation selon la séquence du chymotrypsinogène). La réaction catalytique peut être scindée en deux parties, à savoir l'acylation de l'enzyme (figure I-4) suivie de la désacylation de l'acyl-enzyme (figure I-5). La première étape commence par la formation d'un complexe de Michaelis non covalent entre le substrat et l'enzyme. Le carbonyle de la liaison peptidique subit ensuite l'attaque nucléophile par l'oxygène de la fonction hydroxyle de Ser-195 - activée par His-57 selon un mécanisme de catalyse basique - et il se forme un premier intermédiaire tétraédrique. Celui-ci est stabilisé grâce à la formation de ponts H entre l'oxyanion de la liaison scissile et des N-H de la chaîne peptidique (notamment Gly-193). La décomposition du premier intermédiaire aboutit à la formation de l'acyl-enzyme stable et la libération de l'amine R_1-NH_2 . Lors de la deuxième étape, l'oxygène d'une molécule d'eau attaque l'acyl-enzyme pour former un deuxième intermédiaire tétraédrique. La protonation de Ser-195 par l'ion imidazolium de His-57 mène à la décomposition du deuxième intermédiaire suivie de la libération de l'acide carboxylique R_2-COOH et la régénération de Ser-195. La présence de Asp-102 assure la stabilisation du noyau imidazolium de His-57 [Warshel et al. 1989].

I. Introduction

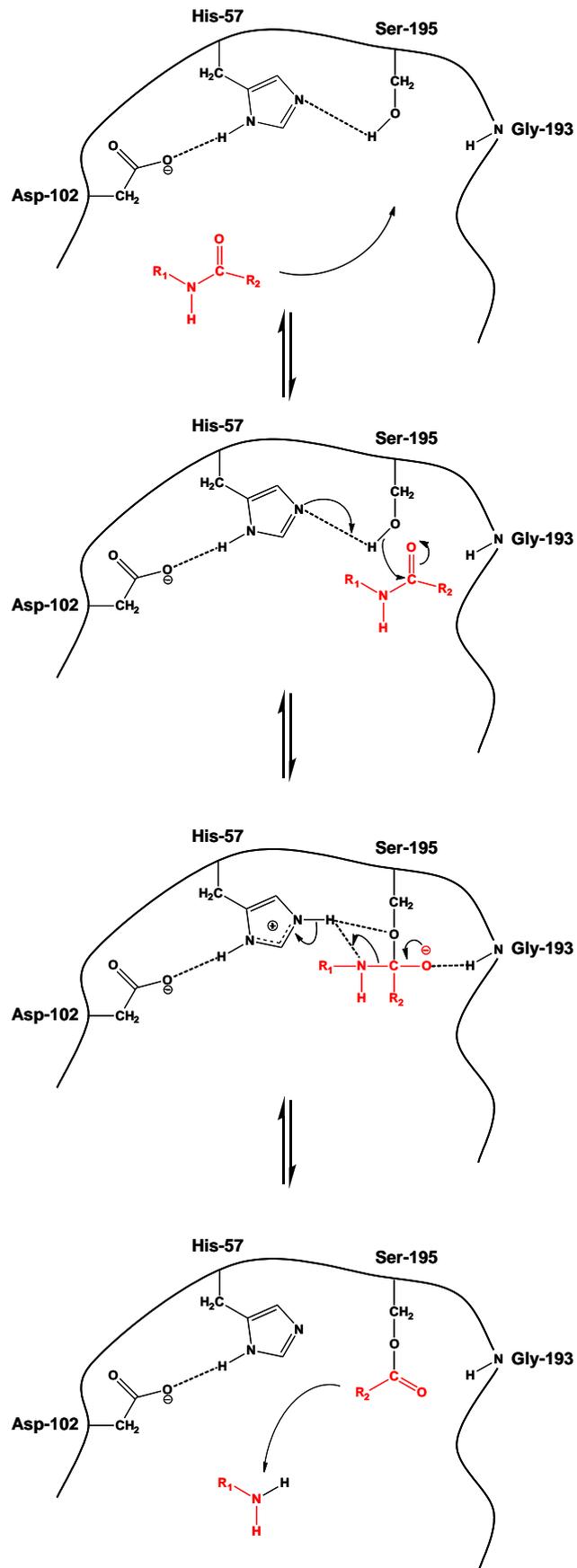


Figure I-4 : Mécanisme d'action des protéases à sérine : acylation de l'enzyme

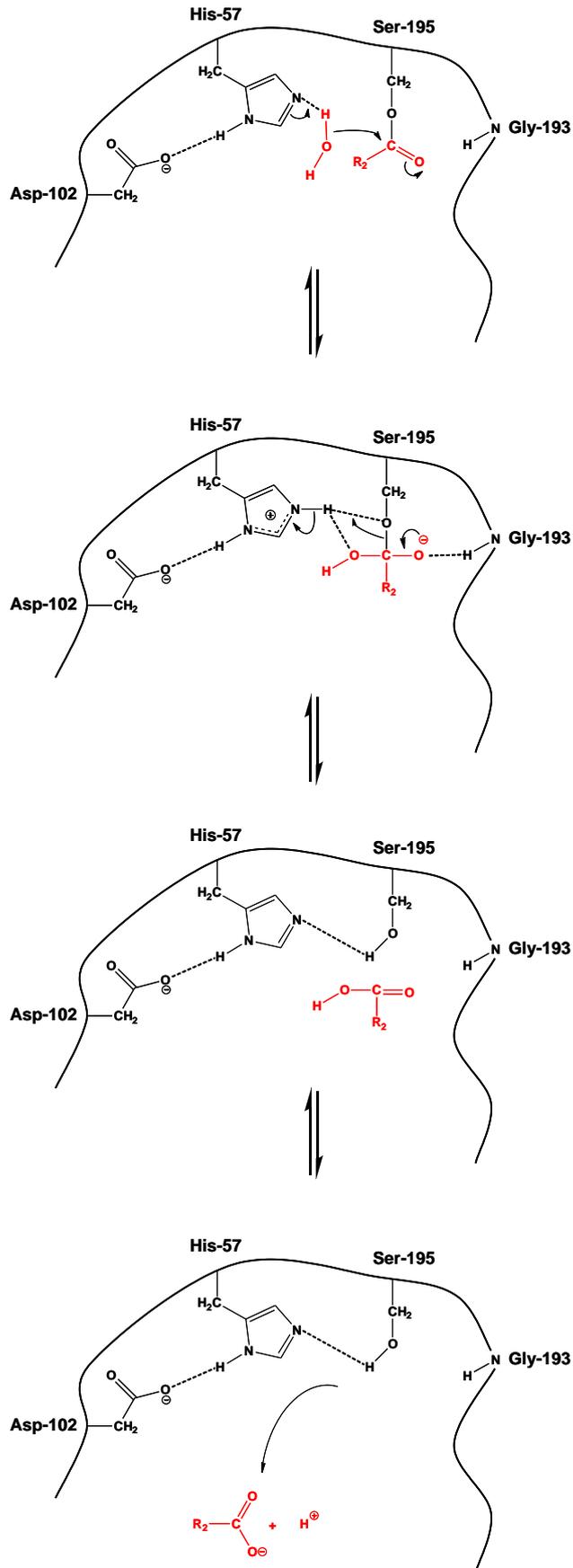
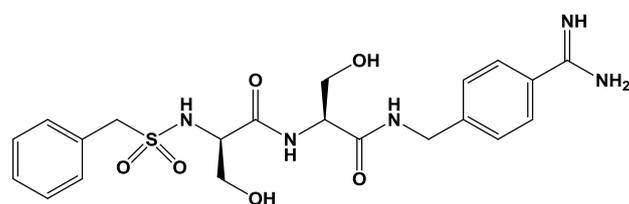


Figure I-5 : Mécanisme d'action des protéases à sérine : désacylation de l'enzyme

I. Introduction

Les enzymes apparentées à la trypsine (angl. *trypsin-like enzymes*) constituent l'un des principaux groupes de protéases à sérine. Il renferme des enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine), lysosomiales (cathepsine G) et fibrinolytiques (plasmine, activateurs du plasminogène). Les activateurs du plasminogène (PAs) convertissent le zymogène (plasminogène) en plasmine. La plasmine, initialement décrite pour son rôle lors de la fibrinolyse, possède un large spectre d'activités, notamment la dégradation de composantes de la matrice extracellulaire. Il existe deux types de PAs : le PA de type urokinase (uPA) et le PA de type tissulaire (tPA). Alors que le tPA est surtout impliqué dans la thrombolyse, l'uPA intervient principalement dans des mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire et est dès lors davantage associé aux tumeurs. Comme la plasmine, les PAs sont sécrétés sous forme de zymogènes (pro-uPA et pro-tPA) et nécessitent l'activation par des protéases. L'activité des deux PAs est contrôlée par deux inhibiteurs endogènes (PAI-1 et PAI-2). L'uPA possède par ailleurs un récepteur membranaire (uPAR), ce qui permet de confiner l'activité protéolytique à la surface cellulaire [Noel et al. 1997].

Un certain nombre de tentatives visant à développer des thérapies anti-cancéreuses basées sur une inhibition de l'uPA ou l'uPAR sont décrites. On y retrouve principalement des approches biomoléculaires telles que des siRNAs ou des protéines chimères renfermant la fraction de l'uPA qui se fixe à l'uPAR [Hofmeister et al. 2008], mais aussi une série de dérivés de la benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4-amidinobenzylamine (voir ci-dessous) possédant un pouvoir inhibiteur important envers l'uPa [Schweinitz et al. 2004].



benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4-amidinobenzylamide

I.5.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéinases matricielles (ou matrixines) sont des acteurs essentiels dans un grand nombre de processus biologiques, notamment au niveau du remodelage de la matrice extracellulaire et de la disponibilité des facteurs de croissance. Elles interviennent dans la morphogenèse embryonnaire, la cicatrisation des plaies et/ou la réparation tissulaire au sens large, mais également dans la progression de maladies telles que l'arthrite, le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Les MMPs sont caractérisées par la présence dans leur site actif d'ions de zinc. A l'heure actuelle, 24 MMPs humaines sont connues [Visse & Nagase 2003; Folgueras et al. 2004; Murphy & Nagase 2008]. Les différentes variations structurales rencontrées au sein de la famille des MMPs sont visualisées dans la figure I-6. Les MMPs renferment un domaine catalytique conservé, un pro-peptide qui maintient l'enzyme dans un état inactif et un peptide signal nécessaire pour la sécrétion de l'enzyme. La plupart des MMPs possèdent en outre un domaine de type « hémopexine » (angl. *hemopexin-like domain*) C-terminal qui intervient dans la reconnaissance spécifique du substrat et qui est relié au domaine catalytique au moyen d'une région charnière (angl. *hinge*) riche en proline. Cette structure typique (domaine catalytique, pro-peptide, peptide signal, domaine hémopexine) est retrouvée pour les collagénases 1-3, les stromélysines 1 et 2 ainsi que pour quatre autres MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20 et MMP-27). Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) sont dépourvues du domaine hémopexine et les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) possèdent un domaine appelé *fibronectin-like* facilitant la fixation au collagène. Les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) sont caractérisées par un domaine transmembranaire C-terminal permettant l'ancrage des enzymes dans la membrane cellulaire. Elles possèdent en outre un site de clivage *furin-like* entre le domaine catalytique et le pro-peptide. Ce motif *furin-like* est présent également chez trois MMPs sécrétées (MMP-11, MMP-21 et MMP-28) qui ne peuvent pas être classées dans les catégories précédentes et chez deux MMPs transmembranaires (MMP-23A et MMP-23B) qui diffèrent structurellement des MT-MMPs typiques.

I. Introduction

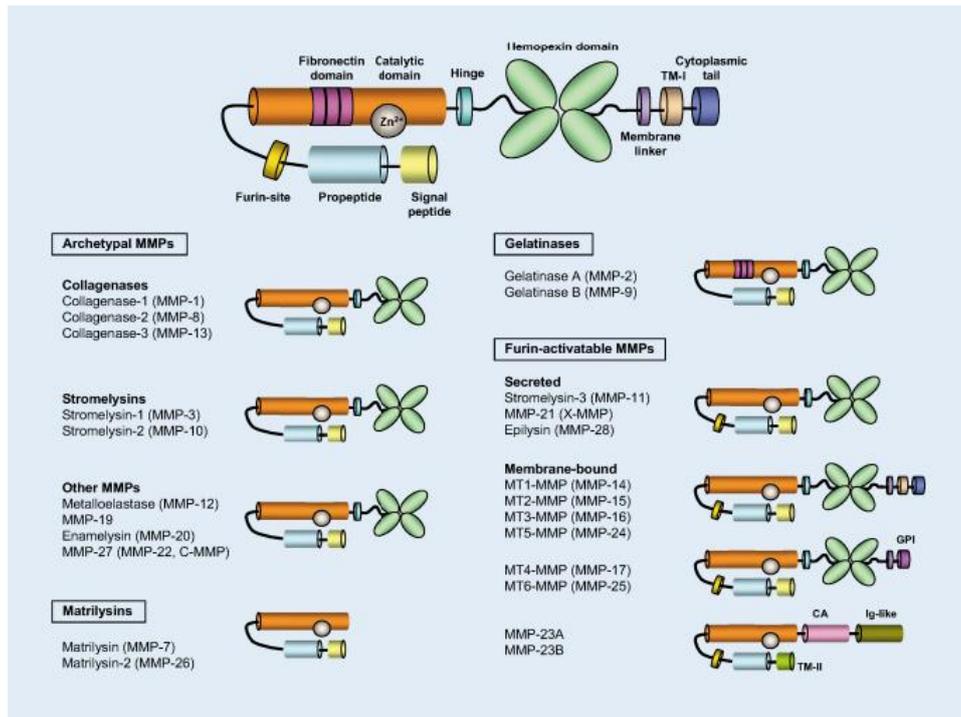


Figure I-6 : Les métalloprotéinases matricielles (d'après Folgueras 2004)

Le site actif des MMPs contient un ion Zn^{2+} structural et un deuxième ion Zn^{2+} catalytique. Ce dernier est maintenu en place grâce à la présence de trois résidus histidine, de trois ions calcium et d'une structure peptidique contenant un résidu méthionine, appelée « *Met-turn* ». A l'état inactif, l'ion Zn^{2+} est complexé à un groupement SH d'un résidu cystéine du pro-peptide, qui est remplacé par une molécule d'eau lors de l'activation par clivage protéolytique du pro-peptide. La protéolyse par les MMPs s'effectue généralement en amont d'un acide aminé contenant une chaîne hydrophobe (Leu, Ile, Met, Phe ou Tyr). Ce résidu hydrophobe est accueilli dans la poche S1 spécifique [Murphy & Nagase 2008].

L'activation des pro-enzymes (ou zymogènes) commence par la rupture de la liaison cystéine- Zn^{2+} , suivie d'une protéolyse par des MMPs déjà activées ou par des protéases à sérine (p.ex. la plasmine). La plupart des MMPs sont sécrétées sous la forme de zymogènes et leur activation protéolytique a lieu dans le milieu extracellulaire, à l'exception de celles qui possèdent le motif *furin-like* (MT-MMPs, MMPs-11, -21, 23 et -28). Celles-ci sont clivées par des protéases à sérine intracellulaires dans le cytoplasme. La MMP-2 est activée à la surface cellulaire par

un mécanisme particulier impliquant des MT-MMPs et un inhibiteur tissulaire des MMPs (TIMP-2) [Sternlicht & Werb 2001; Visse & Nagase 2003].

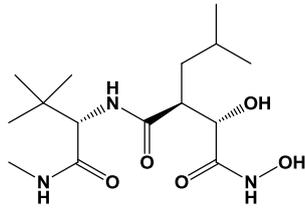
Dans leur ensemble, les MMPs sont capables de dégrader la plupart des constituants de la matrice extracellulaire, comme par exemple les collagènes I-XVI, l'élastine, la fibronectine, la laminine ou la vitronectine. En même temps, la matrice constitue un réservoir de molécules bio-actives, dont la libération est donc contrôlée du moins partiellement par les MMPs. Les MMPs clivent également un grand nombre de protéines qui ne sont pas des constituants de la matrice extracellulaire. On y retrouve par exemple des proMMPs et des précurseurs de protéases à sérine ou encore le pro-TNF α . Une liste assez complète des substrats des MMPs est fournie par R. Visse et H. Nagase [Visse & Nagase 2003].

L'activité protéolytique des MMPs est régulée par des inhibiteurs endogènes connus sous le nom de TIMPs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Quatre types différents ont été identifiés chez l'Homme (TIMP-1 à -4). Les TIMPs forment des complexes équimolaires stables avec les MMPs en chélatant l'atome de zinc catalytique par leur domaine N-terminal, bloquant ainsi l'accès au site actif. Les TIMPs sont en principe capables d'inhiber toutes les MMPs avec un certain degré de spécificité. Ainsi, TIMP-2 et TIMP-3 inhibent la MT1-MMP, alors que TIMP-1 ne l'inhibe pas. TIMP-1 est un inhibiteur relativement faible de MT3-MMP et TIMP-3 semble avoir plus d'affinité pour MMP-9 que pour les autres MMPs [Sternlicht & Werb 2001; Murphy & Nagase 2008].

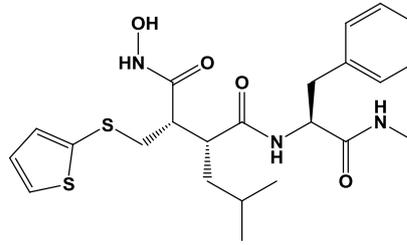
Du fait des implications nombreuses des MMPs dans les mécanismes cancéreux et angiogéniques, différentes classes d'inhibiteurs synthétiques ont été développées et décrites (figure I-7). Parmi celles-ci, on retrouve des molécules peptidomimétiques de type hydroxamate (marimastat, batimastat), des tétracyclines (metastat), des bisphosphonates, une pyrimidine-2,4,6-trione (Ro 28-2653) et un certain nombre d'inhibiteurs non peptidomimétiques (prinomastat, rebimastat, BAY 12-9566). Mais la plupart de ces inhibiteurs ont fourni des résultats cliniques décevants (absence d'effets bénéfiques et apparition d'effets indésirables importants), ce qui est notamment attribué, dans le cas d'inhibiteurs à large spectre,

I. Introduction

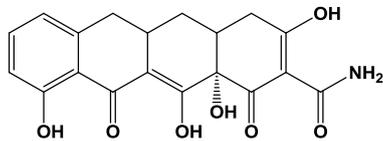
au fait que certaines MMPs possèdent des fonctions favorables au développement tumoral alors que d'autres MMPs semblent l'inhiber [Vihinen et al. 2005; Hofmeister et al. 2008].



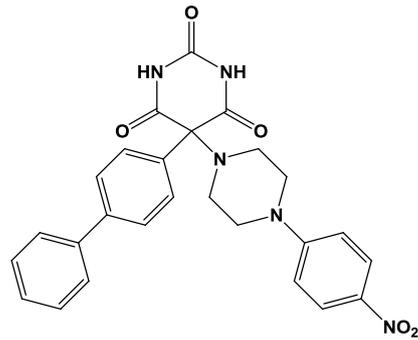
marimastat



batimastat



metastat



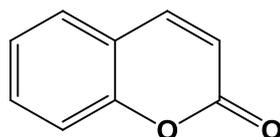
Ro 28-2653

Figure I-7 : exemples d'inhibiteurs des MMPs

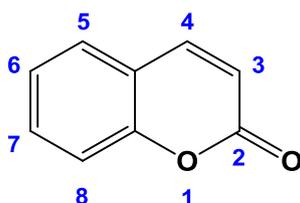
I.6. Coumarines et cancer

I.6.1. Généralités sur les coumarines

La coumarine est le nom usuel désignant la 2H-1-benzopyran-2-one



La numérotation du noyau coumarinique se fait comme suit :



La structure de la coumarine renferme une fonction lactone, qui s'ouvre en milieu basique et se referme en milieu acide.

La coumarine est une substance naturelle que l'on retrouve comme métabolite secondaire dans certaines plantes, comme par exemple le mélilot (*Melilotus officinalis*) ou la fève de tonka (*Dipteryx odorata*). En plus de la coumarine elle-même, de nombreuses molécules d'origine végétale renfermant le noyau coumarinique sont décrites (figure I-8). Hormis quelques rares cas, celles-ci sont hydroxylées en position 7, l'ombelliférone (7-hydroxycoumarine) étant l'exemple le plus simple. Cette fonction phénol est fréquemment méthylée (herniarine) ou engagée dans une liaison hétérosidique (skimmine, cichoriine). Un autre élément structural commun à beaucoup de coumarines est la prénylation, principalement en position 6 ou 8 du noyau coumarinique (osthol, subérosine) et plus rarement une O-prénylation. Cette prénylation est à l'origine des furanocoumarines (psoralène,

I. Introduction

angélicine) et des pyranocoumarines (xanthylétine). Des structures 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées sont également rencontrées [Bruneton 1999].

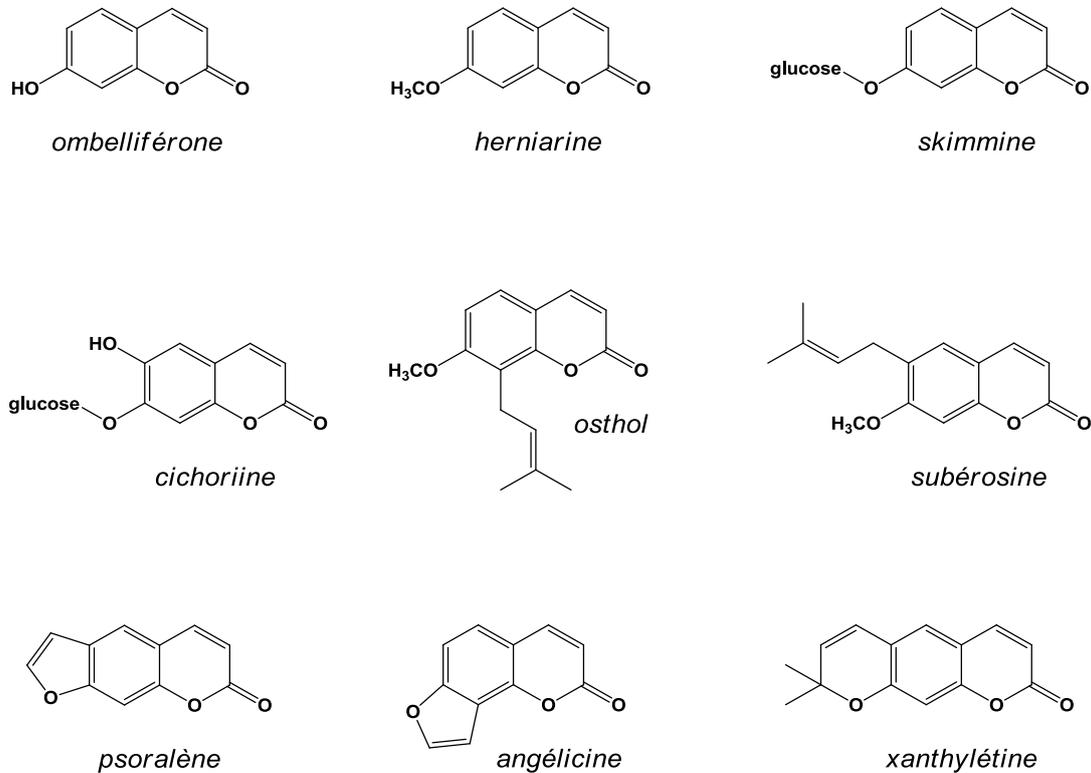


Figure I-8 : exemples de dérivés coumariniques d'origine végétale

Différentes propriétés pharmacologiques ont été attribuées aux coumarines naturelles, notamment des effets vasoprotecteurs, antioedémateux, antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens, cytotoxiques, ... L'extrait de mélilot et l'esculoside peuvent être utilisés dans le traitement du lymphoedème post-mastectomie ou dans l'insuffisance veinolympatique. Mais l'intérêt thérapeutique des drogues contenant des coumarines et des dérivés coumariniques isolés est relativement limité [Hoult & Paya 1996; Bruneton 1999].

Par contre, des dérivés synthétiques de la 4-hydroxycoumarine sont utilisés en thérapeutique comme **anticoagulants oraux**, trois produits étant commercialisés actuellement, à savoir la warfarine (Marevan[®]), l'acénocoumarol (Sintrom[®]) et la phenprocoumone (Marcoumar[®]). Ces molécules présentent une analogie structurale

avec la vitamine K et agissent en tant qu'inhibiteurs de la vitamine K époxyde réductase au sein de la cascade de coagulation (figure I-9).

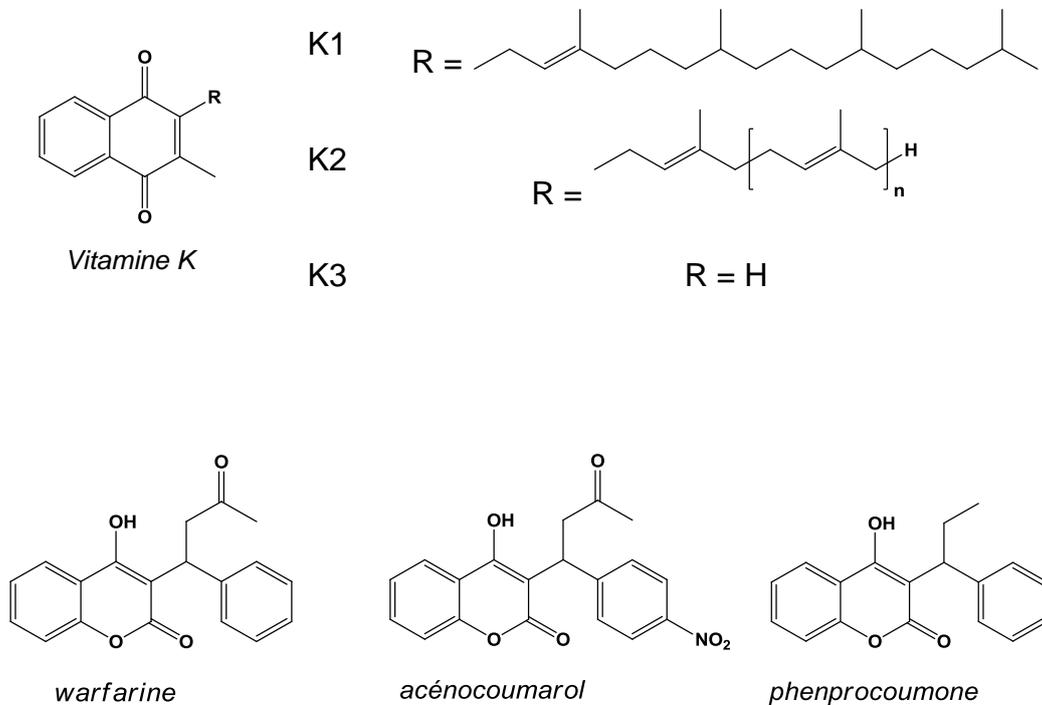
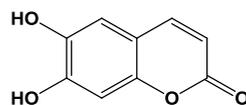


Figure I-9 : vitamine K et anticoagulants coumariniques

Depuis une quinzaine d'années, un nombre important de dérivés coumariniques naturels, héli-synthétiques ou synthétiques a été étudié en tant qu'agents anticancéreux potentiels. Voici quelques exemples :

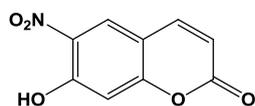
- L'esculétine (6,7-dihydroxycoumarine) empêche la prolifération des cellules leucémiques HL-60 par induction d'apoptose [Chu et al. 2001; Wang et al. 2002].



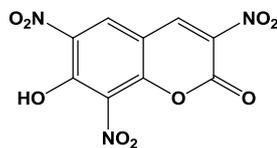
esculétine

I. Introduction

- Des dérivés nitrés de l'ombelliférone ont fait l'objet de travaux approfondis concernant leur potentiel cytotoxique envers des cellules de carcinome rénal et de mélanome [Finn et al. 2002; Finn et al. 2003; Finn et al. 2004b, 2004a, 2005].

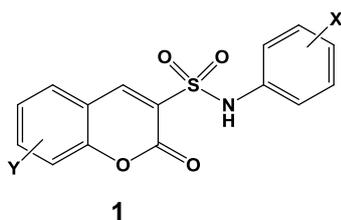


6-nitroombelliférone



3,6,8-trinitroombelliférone

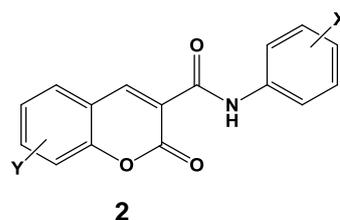
- Des coumarin-3-(*N*-aryl)-sulfonamides (**1**) et des coumarin-3-(*N*-aryl)-carboxamides (**2**) inhibent la prolifération de différentes lignées cancéreuses en agissant sur des kinases de la signalisation intracellulaire en aval des récepteurs aux facteurs de croissance [Reddy et al. 2004; Reddy et al. 2005].



1

X = F, Br, OH, OMe, NH₂

Y = Cl, Br, OMe, OEt



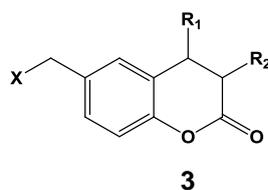
2

X = Cl, Br, I, NH₂, NO₂

Y = H, Cl, Br, OEt

I.6.2. Coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine

Depuis les années 1970, les chercheurs s'intéressent au développement de dérivés coumariniques capables d'inhiber des protéases à sérine. Les premières molécules de cette nouvelle classe étaient des halométhylidihydrocoumarines (**3**), qui agissent comme substrat suicide de l' α -chymotrypsine (α -CT) [Bechet et al. 1973].



3

X = Cl, Br

Les auteurs de ces travaux postulent un mécanisme d'action (figure I-10) selon lequel l'inhibiteur coumarinique est engagé dans un complexe de Michaelis avec l'enzyme. Il y a ensuite une attaque nucléophile par la sérine du site actif (Ser-195), ce qui provoque l'ouverture de la fonction lactone. Après élimination de l'halogène (X), la méthylène quinone résultante alkylerait un résidu histidine du site actif (E-Nu-H) pour inactiver l'enzyme.

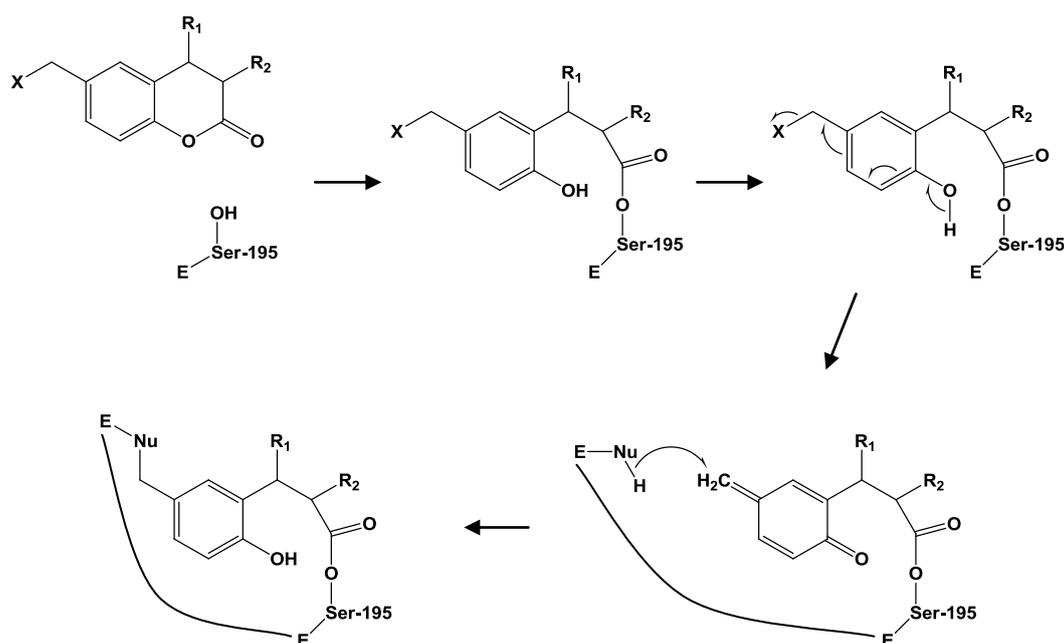


Figure I-10 : Mécanisme de l'inhibition de l' α -CT par les halométhylcoumarines

C'est sur base de ces résultats qu'a débuté l'intérêt pour les coumarines au sein du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège. Le but de ces travaux était de découvrir des inhibiteurs synthétiques de deux classes de protéases à sérine - les protéases « *chymotrypsine-like* » et « *elastase-like* » - largement impliquées dans un grand nombre de pathologies, en utilisant l' α -CT et l'élastase leucocytaire humaine (HLE - angl. *Human Leucocyte Elastase*) comme outils de criblage [Pochet et al. 1996]. Les dérivés coumariniques issus de ces travaux sont caractérisés par la présence d'un groupement électroattracteur en position 3, ce qui augmente le caractère électrophile de la lactone et facilite donc

I. Introduction

l'attaque nucléophile par la sérine. L'ensemble des pharmacomodulations effectuées dans le cadre de ce projet est représenté à la figure I-11.

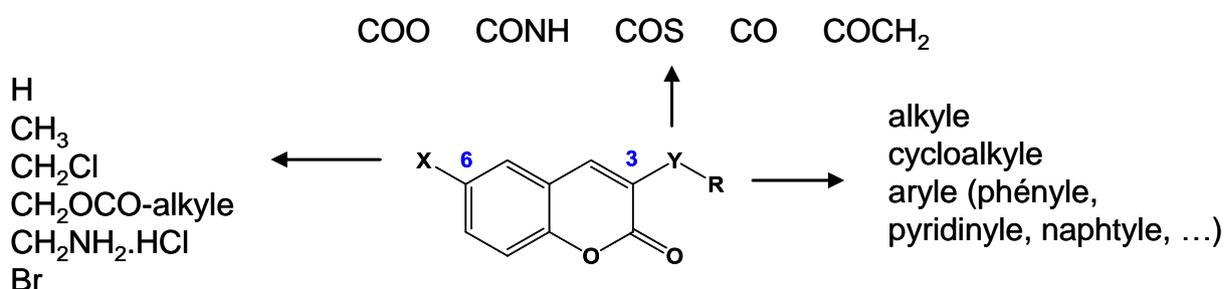


Figure I-11 : Pharmacomodulation des inhibiteurs coumariniques de protéases à sérine

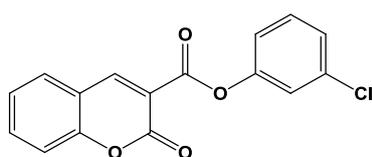
L'étude du pouvoir inhibiteur de ces composés vis-à-vis de l' α -CT et de la HLE a permis de mettre en évidence un certain nombre de relations structure-activité. En ce qui concerne l' α -CT, les dérivés portant une fonction ester ou thioester en position 3 sont plus actifs que les amides et les cétones correspondants [Pochet et al. 2000]. La présence d'un noyau aromatique (R) augmente largement l'activité par rapport aux dérivés alkyle ou cycloalkyle [Pochet et al. 1996]. La meilleure inhibition de la HLE est obtenue avec les composés possédant une fonction ester et un groupement pyridin-3-yle en position 3 [Doucet et al. 1999].

L'importance de la présence d'une fonction « alkylante » en position 6 a également été étudiée. Elle est indispensable pour inhiber et inactiver l' α -CT et l'activité est fortement réduite lorsqu'on la remplace par un méthyle ou un acétoxyméthyle [Pochet et al. 2000]. L'inhibition de la HLE au contraire est maintenue en absence d'une fonction alkylante [Doucet et al. 1999]. On assiste dans ce cas à la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme stable menant à une inhibition transitoire réversible.

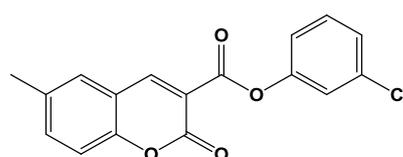
I.6.3. Coumarines en tant qu'inhibiteurs de l'invasion tumorale et de l'angiogénèse

Le succès des coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine a incité les chercheurs à exploiter les résultats obtenus dans le contexte de pathologies caractérisées par une activité protéolytique anormalement accrue. Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, l'invasion tumorale et l'angiogénèse – deux événements-clé dans le processus de la cancérogenèse – sont en effet hautement dépendants de l'activité coordonnée d'enzymes protéolytiques. C'est pour cette raison que le développement de dérivés coumariniques capables d'inhiber l'invasion tumorale ou l'angiogénèse constituait une suite logique des recherches [Kempen et al. 2003; Kempen et al. 2008].

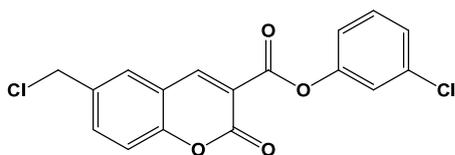
Quatre composés issus des travaux précédents (LP69, LP70, LP8 et LP46) ont dès lors été étudiés dans un modèle *in vitro* d'invasion tumorale, en l'occurrence le test de chémoinvasion en « chambres de Boyden ». Ce modèle permet d'évaluer la capacité de cellules cancéreuses (ici : des cellules HT1080 de fibrosarcome humain) à traverser un filtre recouvert d'une matrice biologique (ici : du collagène de type IV) en présence d'un chémoattractant (ici : du sérum de veau foetal, FCS - angl. *fetal calf serum*).



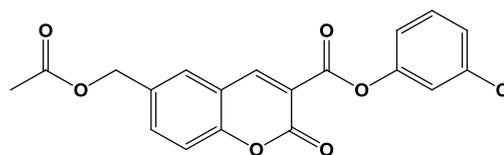
LP69



LP70



LP8



LP46

I. Introduction

Ces expériences ont révélé que le composé chlorométhyle (LP8), qui était l'inhibiteur le plus puissant de l' α -CT à ce moment-là, n'inhibe que faiblement l'invasion des cellules tumorales. Une inhibition moyenne est obtenue avec le LP69 et le LP70. Le dérivé acétoxyméthyle (LP46) quant à lui est peu actif à 0,1 μ M et 1 μ M, mais induit plus de 90% d'inhibition à une concentration de 10 μ M et a dès lors été choisi comme molécule de référence pour l'optimisation qui allait suivre. Les pharmacomodulations effectuées dans ce contexte s'articulaient principalement autour des positions 3 et 6 du noyau coumarinique et de la position 3' du noyau phényle (figure I-12).

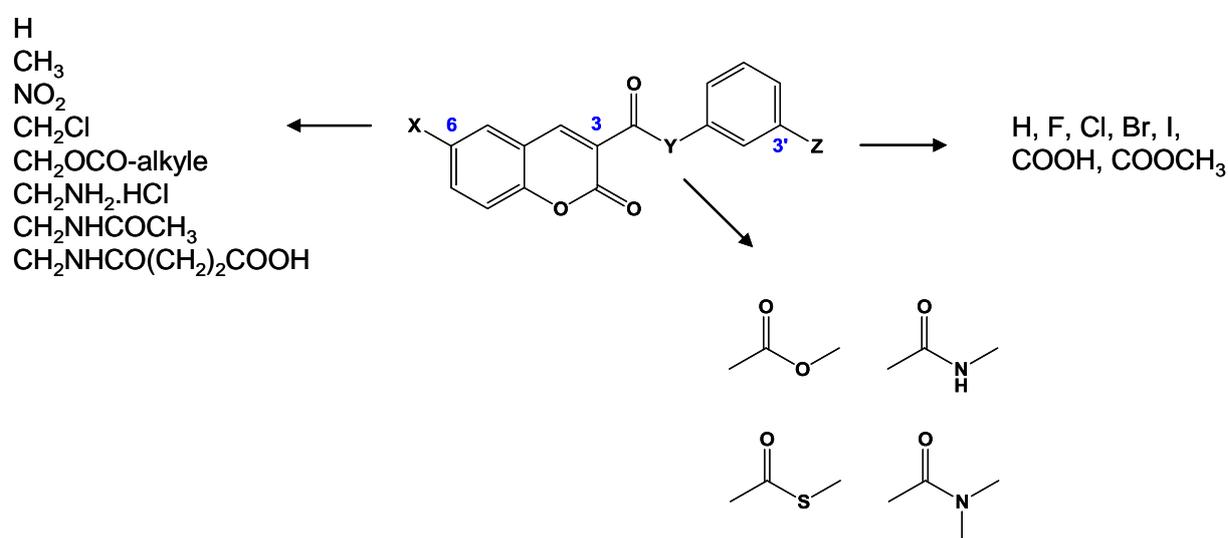
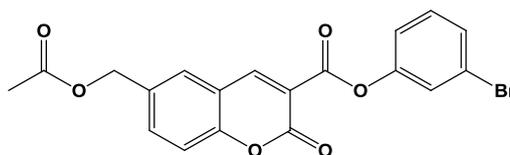


Figure I-12 : Pharmacomodulation des inhibiteurs coumariniques de l'invasion tumorale

L'évaluation de ces composés dans le test en « chambres de Boyden » a montré que le remplacement de la fonction ester en position 3 du noyau coumarinique par un thioester ou un amide mène à une diminution importante du pouvoir anti-invasif. La suite des recherches s'est par conséquent focalisée sur les dérivés possédant une fonction ester en 3.

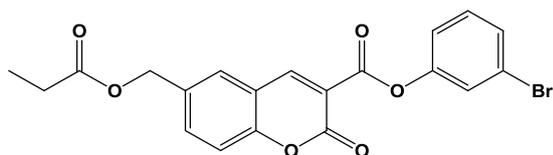
En ce qui concerne la nature de l'halogène en position 3', il a été constaté que la meilleure activité biologique est obtenue avec un atome de brome (en série 6-

acétoxyméthyle, IK9), l'inhibition à 0,1 μM et 1 μM étant significativement plus importante que celle obtenue avec l'analogue chloré (LP46) aux mêmes concentrations. Les composés possédant une fonction acide carboxylique ou carboxylate de méthyle en position 3' sont complètement inactifs, quel que soit le substituant en position 6.

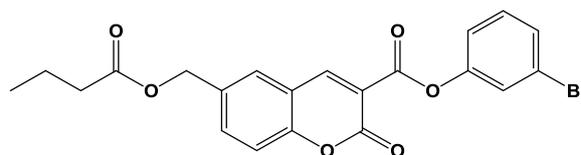


IK9

Les premières modulations en position 6 concernaient la longueur et l'encombrement de la chaîne alkyle. L'évaluation biologique des composés obtenus a révélé que l'activité diminue significativement lorsque la chaîne est allongée (propionoxyméthyle [IK40], butyroxyméthyle [IK37], valéryloxyméthyle [S20], ...). Lorsque la chaîne est ramifiée (diméthylacétoxyméthyle [IK38], triméthylacétoxyméthyle [S22]), l'inhibition est légèrement inférieure à celle du dérivé 6-acétoxyméthyl-3'-bromo (IK9). Des résultats du même ordre de grandeur sont obtenus lorsque l'acétoxyméthyle est remplacé par un acétamidométhyle (IK49) ou un NO₂ (IK45). Une inhibition d'environ 70% est conservée avec le dérivé 6- β -carboxypropionamidométhyle (IK50) à 10 μM , tandis que le dérivé aminométhyle (IK48) est peu actif. Globalement, la meilleure activité anti-invasive a donc été obtenue avec les composés possédant un groupement acétoxyméthyle en position 6 (IK9, LP46).

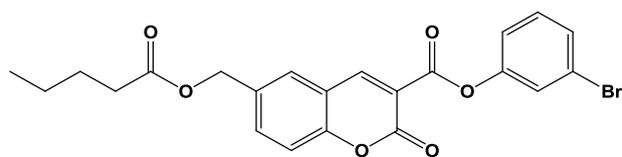


IK40

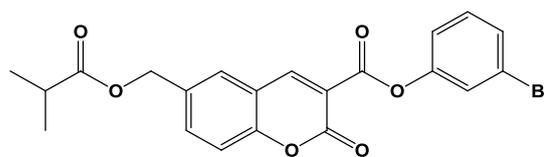


IK37

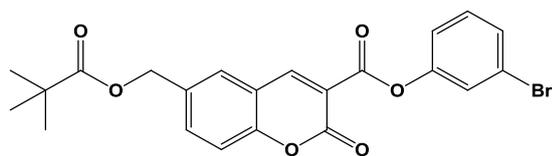
I. Introduction



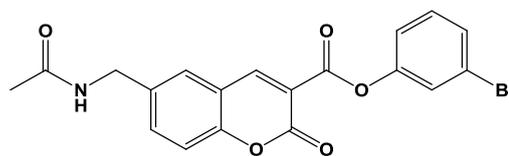
S20



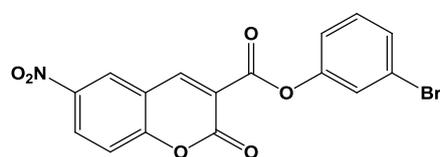
IK38



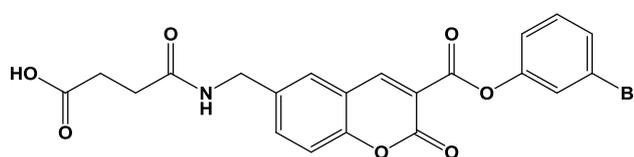
S22



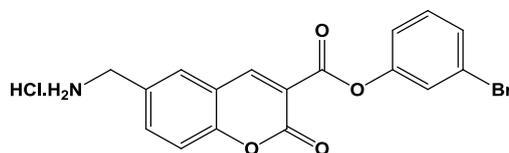
IK49



IK45



IK50



IK48

Sur base des résultats encourageants obtenus dans le test de chémo-invasion en « chambres de Boyden », l'IK9 et le LP46 ont été sélectionnés pour être évalués dans un modèle de croissance tumorale *in vivo*. Une suspension de cellules tumorales (HT1080 ou MDA-MB231) dans du matrigel (membrane basale reconstituée) est injectée à des souris athymiques « nues » traitées par un des deux composés coumariniques. Ces expériences ont révélé que le dérivé bromé (IK9) est capable de réduire l'incidence tumorale (HT1080) ainsi que le volume des tumeurs résultantes (HT1080 et MDA-MB231). Le dérivé chloré (LP46) quant à lui ne modifie pas significativement les différents paramètres étudiés dans ces modèles [Kempen et al. 2003].

Les deux composés ont été étudiés également en tant qu'agents anti-angiogéniques potentiels, car l'angiogenèse peut être considérée comme étant une invasion contrôlée de cellules endothéliales. Dans un modèle *ex vivo* d'anneaux aortiques de rats, c'est encore l'IK9 qui s'est démarqué en réduisant significativement le nombre de vaisseaux néo-formés, leur longueur maximale ainsi que le nombre de branchements. Il a été testé ensuite dans un modèle d'angiogenèse *in vivo*, à savoir le test de néovascularisation choroïdale chez la souris, dans lequel il a provoqué une diminution importante de l'angiogenèse à 20 et 40 mg/kg [Hemmer et al. 2010].

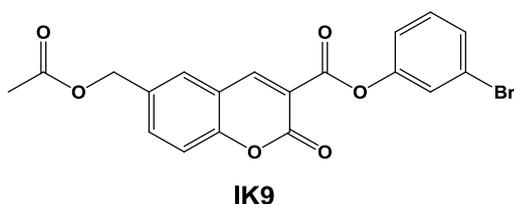
De manière assez surprenante, l'activité anti-invasive et anti-angiogénique des dérivés coumariniques n'a pas pu être mise en relation avec une inhibition de protéases à sérine. L'IK9 et le LP46 n'inhibent que faiblement l' α -CT et la HLE et sont inactifs sur l'urokinase et la plasmine. Inversement, le LP8 est un inhibiteur puissant de l' α -CT et possède un pouvoir inhibiteur moyen envers l'urokinase et la plasmine, mais ne réduit que faiblement l'invasion tumorale dans le test en « chambres de Boyden » [Kempen et al. 2003]. Face à cette situation inattendue, les chercheurs se sont alors tournés vers d'autres cibles potentielles permettant d'expliquer les propriétés pharmacologiques de l'IK9, en s'intéressant notamment aux MMPs 2 et 9, aux cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) et aux lipoxygénases (5-LOX). L'IK9 n'a cependant pas montré une activité inhibitrice envers ces enzymes [Kempen 2005]. Son mécanisme d'action reste donc obscur à l'heure actuelle. En plus de ceci, il faut s'attendre à des soucis de stabilité métabolique, notamment un risque accru d'hydrolyse par les estérases plasmatiques et hépatiques, car la structure de l'IK9 renferme deux fonctions esters et une lactone. Enfin, l'IK9 est très peu soluble dans l'eau.

Mais malgré ses problèmes d'hydrosolubilité et de stabilité d'une part et notre ignorance de son mécanisme d'action d'autre part, l'IK9 possède des propriétés pharmacologiques intéressantes qui nous encouragent à investiguer davantage cette famille de coumarines dans le cadre de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse.

I. Introduction

II. PRÉSENTATION DU TRAVAIL

La présente thèse s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs ayant abouti au développement de l'IK9 en tant qu'agent anti-invasif et anti-angiogénique. L'IK9 est capable d'inhiber l'invasion *in vitro* des cellules HT1080 de fibrosarcome humain en « chambres de Boyden » et de réduire l'incidence et la croissance *in vivo* de tumeurs chez des souris athymiques nues. Son pouvoir anti-angiogénique a été mis en évidence dans un modèle *ex vivo* d'anneaux d'aorte de rats et au niveau de la néovascularisation choroïdale *in vivo* chez la souris. L'ensemble de ces résultats ouvre des perspectives intéressantes à l'IK9 en tant qu'agent anti-cancéreux potentiel, capable d'agir au niveau de plusieurs étapes-clé du processus de cancérogenèse, tels que l'invasion locale, la dissémination métastatique ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins indispensables à la croissance tumorale. Son pouvoir anti-angiogénique lui confère en plus des potentialités thérapeutiques dans des maladies oculaires caractérisées par une angiogenèse anormale, comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge.



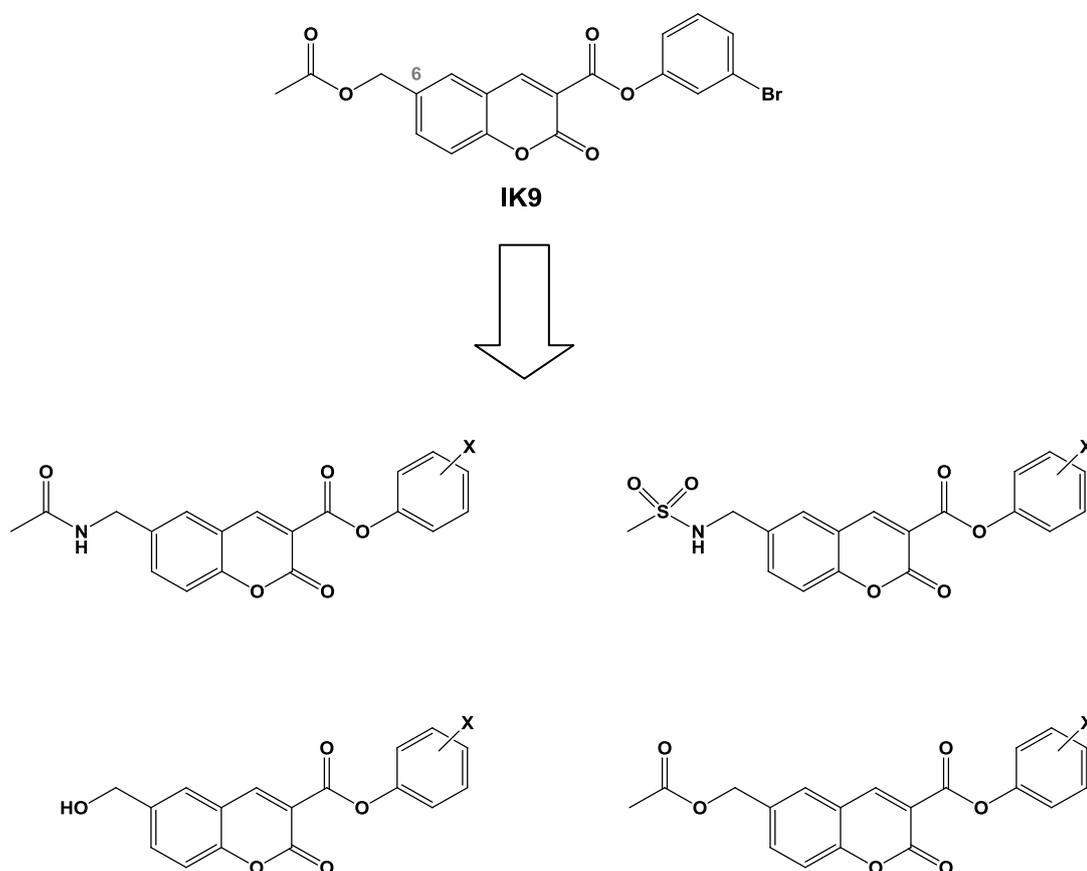
Malgré son profil pharmacologique prometteur, les perspectives d'un développement éventuel de l'IK9 en tant que médicament sont limitées. Sa structure chimique renferme deux fonctions esters et une lactone, ce qui est peu favorable à une stabilité métabolique suffisante, avec un risque accru d'une hydrolyse par les estérases plasmatiques et hépatiques. Il est par ailleurs très peu soluble dans l'eau. D'une part, cela s'avère problématique lors de son investigation dans des expériences pharmacologiques. D'autre part, on peut s'attendre à des problèmes ADME (ensemble des processus pharmacocinétiques concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un médicament), notamment dans le cas d'une éventuelle administration orale.

II. Présentation du travail

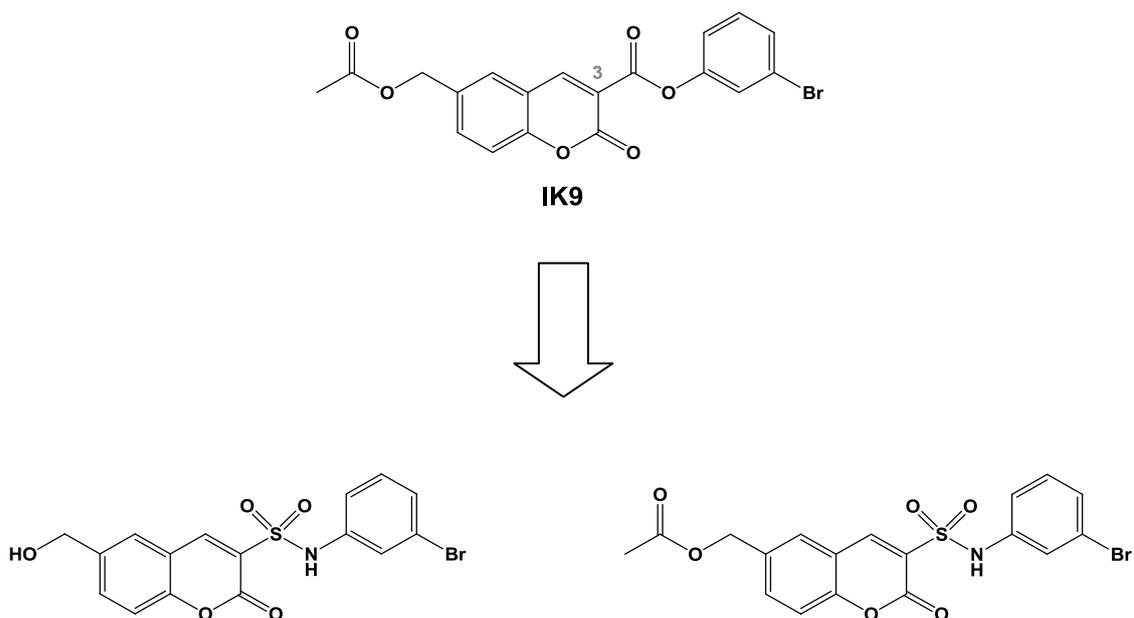
Les travaux décrits dans ce manuscrit ont comme objectif premier le développement de molécules apparentées à l'IK9, dont les propriétés pharmacologiques sont équivalentes, mais dont les caractéristiques en termes de solubilité et de stabilité sont modifiées de manière à obtenir un profil pharmacocinétique plus approprié.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes donc intéressés à la synthèse et à l'évaluation biologique d'analogues de l'IK9 possédant des groupements chimiques susceptibles d'augmenter l'hydrosolubilité et sur lesquels nous remplaçons les fonctions fragiles par des fonctions métaboliquement plus stables.

Les premières pharmacomodulations concernent la position 6 du noyau coumarinique, sur laquelle le groupement acétoxyméthyle est remplacé par un acétamidométhyle, un méthylsulfonylaminométhyle ou un hydroxyméthyle. Nous avons étudié accessoirement aussi l'influence sur l'activité biologique de la nature et de la position de l'halogène (X) sur le noyau phényle.



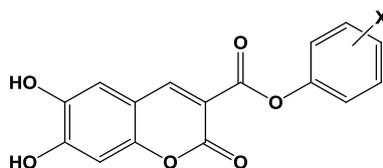
L'ester en position 3 du noyau coumarinique constitue un second pôle de modulation visé dans ce travail. Nos possibilités sont néanmoins réduites dans la mesure où plusieurs modifications ont déjà été effectuées antérieurement (amides, thioesters) [Kempen et al. 2008]. Nous nous sommes dès lors limités au remplacement de cet ester par une fonction sulfonamide.



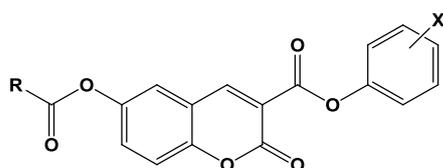
De nombreuses substances hydroxycoumariniques possédant une activité anticancéreuse sont décrites dans la littérature. C'est pourquoi nous nous sommes proposés de synthétiser une série de dérivés apparentés à l'IK9 qui sont hydroxylés en position 6 et/ou 7 du noyau coumarinique. L'introduction d'une fonction phénol est à priori favorable à une nette augmentation de la solubilité aqueuse.



II. Présentation du travail



Une dernière série de composés que nous avons développés dans le cadre de ce travail répondent à la structure générale suivante :



R = alkyle

Ces structures représentent la forme acylée des 6-hydroxycoumarines présentées ci-dessus et peuvent être considérées en même temps comme homologues inférieurs de l'IK9, car le CH_2 entre le noyau coumarinique et l'ester en position 6 est absent.

Biologiquement, le pouvoir anti-invasif *in vitro* de tous les composés synthétisés est déterminé dans un modèle en « chambres de Boyden », en utilisant des cellules HT1080 de fibrosarcome humain. Ces tests sont réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement de l'Université de Liège.

Un deuxième volet du travail est consacré au mécanisme d'action de l'IK9, qui est inconnu à l'heure actuelle. Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, ce composé était initialement conçu comme inhibiteur de protéases à sérine capable de réduire l'invasion tumorale. Il s'est avéré cependant que l'effet anti-invasif et anti-angiogénique de l'IK9 ne peut pas être clairement mis en relation avec une inhibition de protéases à sérine. Il n'agit pas non plus en tant qu'inhibiteur des MMPs 2 et 9, des cyclo-oxygénases 1 et 2 ou de la lipoxygénase 5. Ainsi, nous avons décidé d'explorer quelques mécanismes d'action potentiels :

- un approfondissement de l'effet anti-angiogénique de l'IK9, en étudiant son effet sur l'invasion, la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales ;
- une étude de l'effet de l'IK9 sur l'expression, la sécrétion et l'activation des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080 de fibrosarcome humain ;
- une étude préliminaire d'un effet inhibiteur éventuel de l'IK9 au niveau de trois récepteurs de type tyrosine kinase (VEGFR, PDGFR et EGFR) et des tyrosines kinases de la transduction intracellulaire du signal.

En résumé, le présent travail comprend donc trois objectifs majeurs :

- la synthèse d'analogues de l'IK9, en introduisant des fonctions susceptibles d'augmenter l'hydrosolubilité et la stabilité ;
- la détermination du pouvoir anti-invasif des composés synthétisés dans le test de chémoinvasion en « chambres de Boyden » ;
- l'étude du mécanisme d'action de l'IK9.

II. Présentation du travail

III. STRATÉGIES DE SYNTHÈSE

III.1. Méthodes de synthèse générales des coumarines

Nous commençons cette partie par un bref survol de quelques méthodes couramment utilisées pour synthétiser des composés renfermant le noyau coumarinique, à savoir les réactions de Perkin, de Pechmann et de Knoevenagel. En ce qui nous concerne, des voies de synthèse mettant en œuvre la condensation de Knoevenagel ont été majoritairement utilisées.

- **La réaction de Perkin**

La réaction de Perkin (figure III-1) correspond à une condensation aldolique de l'anhydride acétique avec le salicyaldéhyde (*ortho*-hydroxybenzaldéhyde) en présence d'un sel alcalin de l'acide acétique [Perkin 1868; Johnson 1942; Chandrasekhar & Karri 2006].

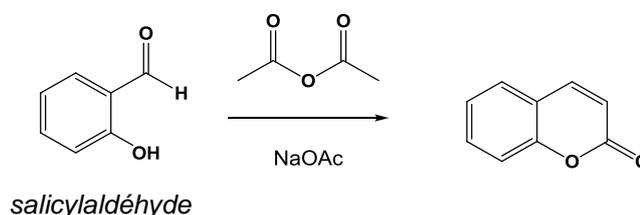


Figure III-1 : La réaction de Perkin

Le mécanisme réactionnel de cette synthèse fait intervenir une forme « énolée » de l'anhydride acétique (figure III-2), qui va effectuer l'attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du salicyaldéhyde. Une déshydratation suivie d'une estérification intramoléculaire fournit le noyau coumarinique (figure III-3).

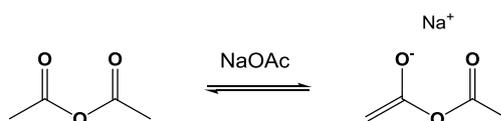


Figure III-2 : « Énolisation » de l'anhydride acétique

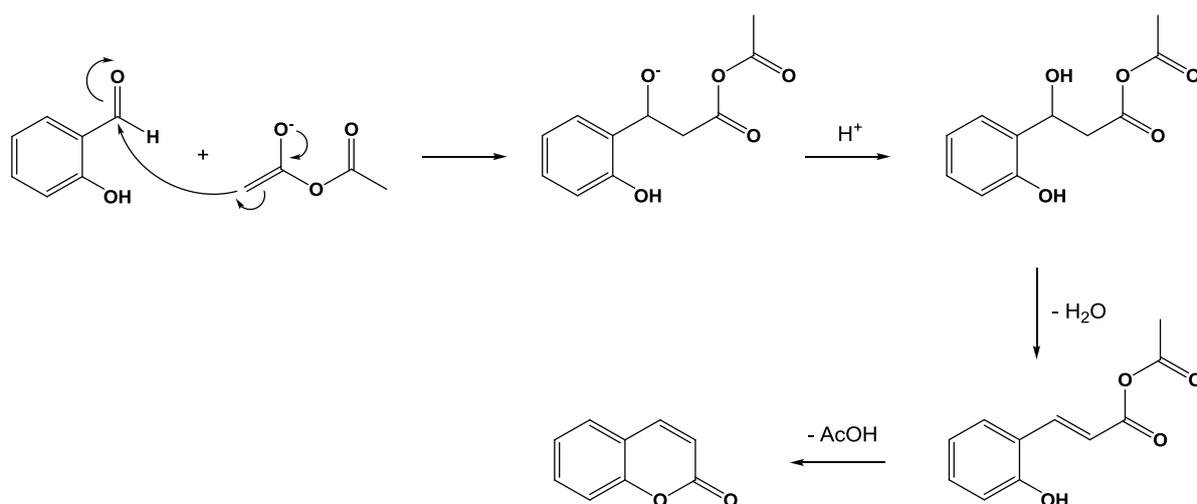


Figure III-3 : Mécanisme de la réaction de Perkin

- **La réaction de Pechmann**

La réaction de Pechmann (figure III-4) consiste en une condensation d'un phénol avec un β -cétoester en milieu acide. Le mécanisme réactionnel implique une transestérification suivie d'une cyclisation en présence d' AlCl_3 (Friedel-Crafts) et d'une déshydratation [Pechmann 1884; Woodruff 1955; Campos-Toimil et al. 2002].

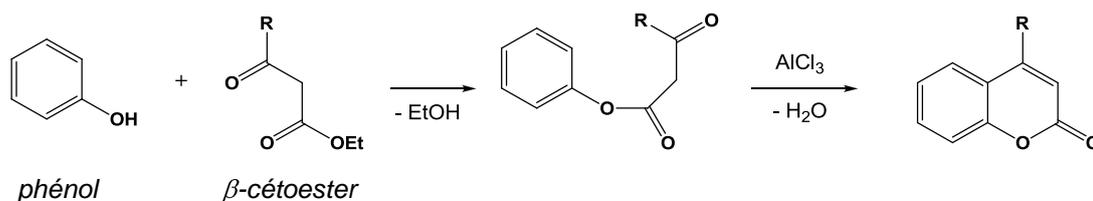


Figure III-4 : La réaction de Pechmann

- **La réaction de Knoevenagel**

La réaction (ou condensation) de Knoevenagel [Knoevenagel 1898; Jones 1967] est une réaction apparentée à la condensation aldolique, faisant intervenir un aldéhyde et un composé à méthylène actif, comme par exemple l'acide malonique ou un ester de l'acide malonique, avec une base faible comme catalyseur. Cette réaction conduit à la formation de produits α,β -insaturés par déshydratation

intramoléculaire. Avec l'acide malonique comme réactif à méthylène actif, le bilan de la réaction se présente comme suit (figure III-5):

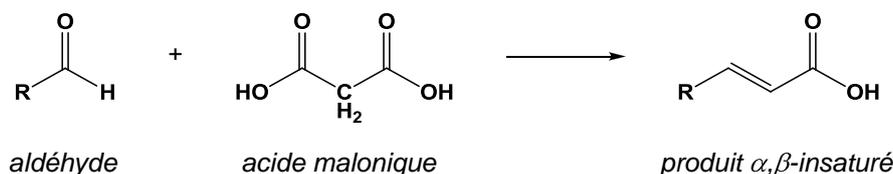


Figure III-5 : La condensation de Knoevenagel

De nombreuses variantes de la réaction de Knoevenagel sont utilisées et décrites, notamment en ce qui concerne la nature du réactif à méthylène actif. Ceux-ci peuvent être représentés par $Z\text{-CH}_2\text{-Z}$, $Z\text{-CHR-Z}$ ou $Z\text{-CHR}_1\text{R}_2$, Z étant un groupement électroattracteur suffisamment puissant pour permettre une éventuelle déprotonation du méthylène. L'acide malonique et ses esters sont les plus fréquemment utilisés, mais la réaction peut s'effectuer également avec d'autres réactifs tels que le malononitrile [Fringuelli et al. 2003], l'acide de Meldrum [Song et al. 2003], l'acétoacétate d'éthyle [Lau et al. 2008] ou le nitrométhane [Crowell & Peck 1953] (figure III-6). Pour ce qui est des catalyseurs, on emploie le plus souvent des amines ou de l'ammoniaque. L'utilisation conjointe d'une amine et d'un acide carboxylique en tant que catalyseurs est aussi fréquente.

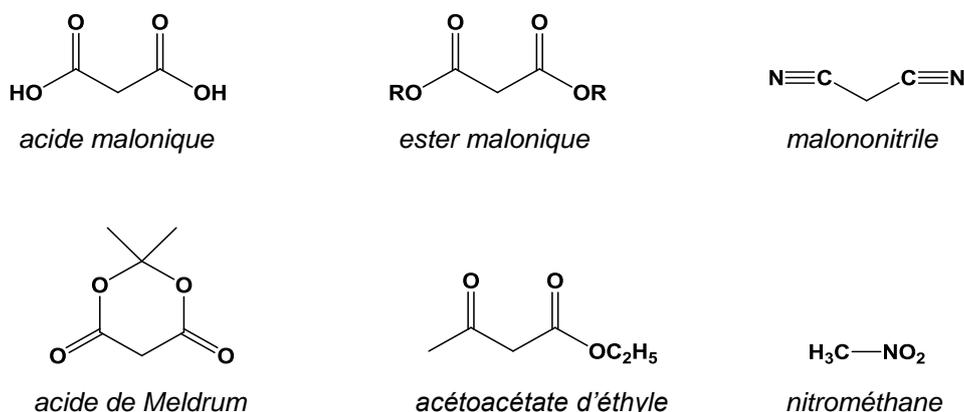


Figure III-6 : Dérivés possédant un méthylène actif

III. Stratégies de synthèse

Afin d'illustrer le mécanisme réactionnel de la condensation de Knoevenagel, nous avons choisi la réaction entre le salicylaldéhyde et le malonate de diéthyle en présence de pipéridine. Cet exemple nous permet en même temps de faire la transition vers l'obtention des coumarines.

Le mécanisme réactionnel de la condensation de Knoevenagel a fait l'objet de certaines controverses par le passé. Pendant de nombreuses années, on pensait que la pipéridine servait uniquement à la déprotonation du méthylène actif, qui à son tour effectuait une attaque nucléophile sur la fonction carbonyle de l'aldéhyde. Mais des doutes à propos de la réactivité de l'aldéhyde et de la capacité de la pipéridine à déprotoner le méthylène d'un malonate subsistaient [Crowell & Peck 1953; Carey & Sundberg 1997]. On favorise à l'heure actuelle un mécanisme selon lequel il se forme un ion iminium par réaction entre l'aldéhyde et la pipéridine. La réactivité de l'iminium envers le malonate est en effet largement supérieure à celle de l'aldéhyde. De même, le malonate n'est pas nécessairement déprotoné, mais se retrouve sous une forme « énoI » par catalyse acide ou basique. Le mécanisme de la réaction de Knoevenagel se subdivise dès lors en plusieurs étapes (figure III-7):

- formation d'un ion iminium (**III**) par réaction entre la salicylaldéhyde (**I**) et la pipéridine (**II**) en présence d'un acide (HB^+) avec élimination d'une molécule d'eau ;
- « énoIisation » du malonate de diéthyle par catalyse acide (HB^+) ou basique (B) pour former l'« énoI » (**IV**) ;
- attaque nucléophile de l'« énoI » (**IV**) sur l'iminium (**III**) pour former l'intermédiaire **V** ;
- protonation de l'azote pipéridinique sur l'intermédiaire **V**, suivie d'une déprotonation en β de l'intermédiaire **VI** menant à la formation de l'intermédiaire **VII** et à la régénération de la pipéridine (**II**).

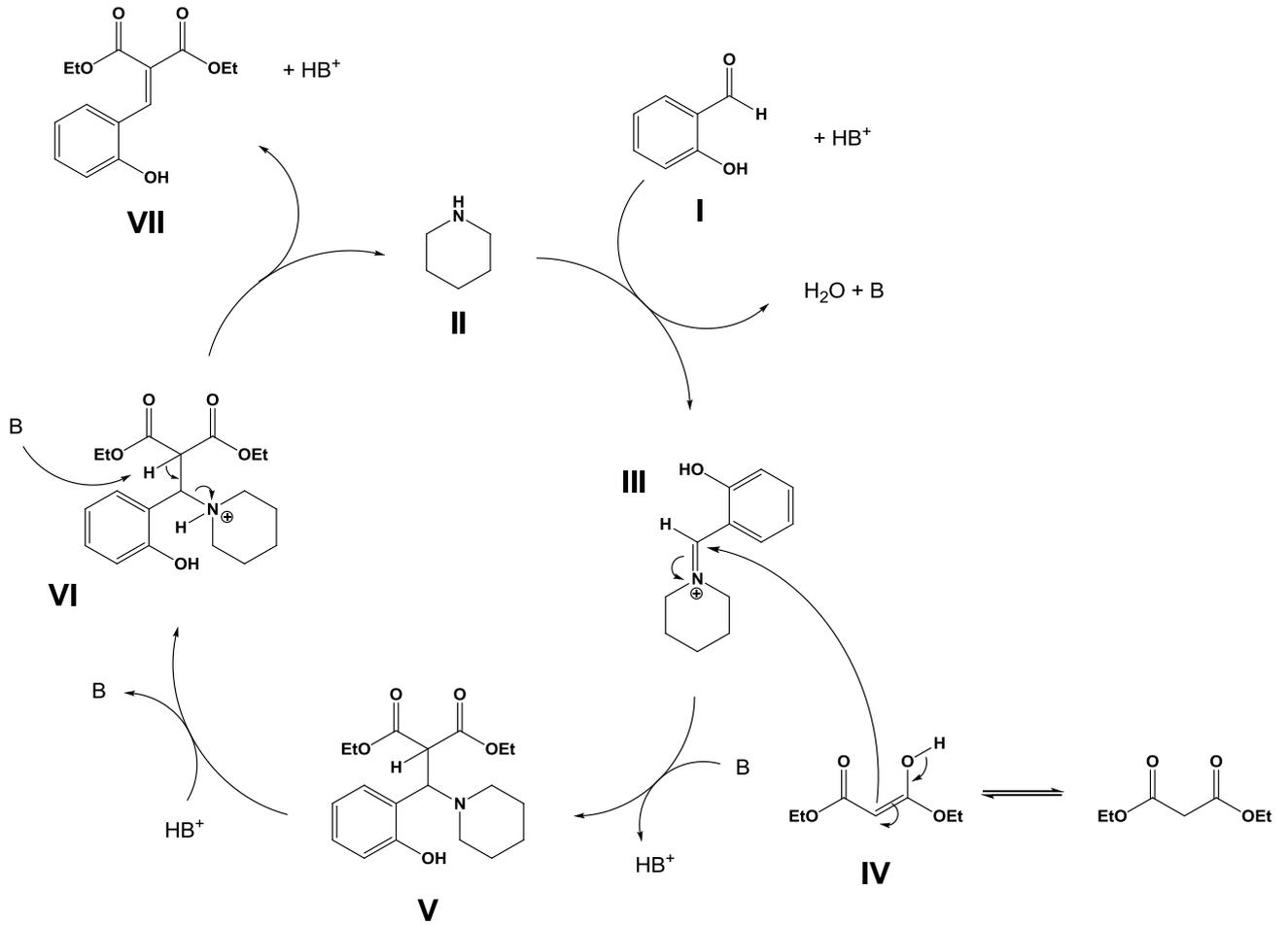


Figure III-7 : Mécanisme réactionnel de la condensation de Knoevenagel

La condensation de Knoevenagel est en principe terminée avec l'obtention de l'intermédiaire **VII**. Cependant, dans l'exemple que nous avons choisi, une étape supplémentaire s'ajoute. Il s'agit d'une transestérfication intramoléculaire se traduisant par une fermeture de cycle (lactonisation), ce qui permet d'obtenir le noyau coumarinique (figure III-8).

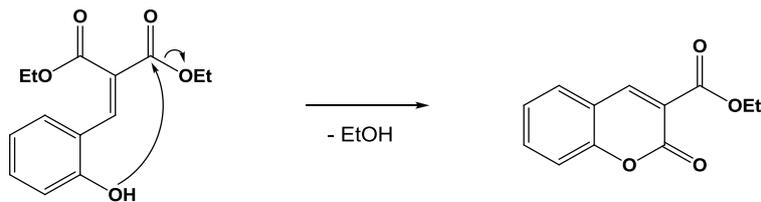


Figure III-8 : Lactonisation

III. Stratégies de synthèse

La condensation de Knoevenagel entre le salicyaldéhyde et un ester de l'acide malonique est largement utilisée pour synthétiser des esters de l'acide coumarine-3-carboxylique (figure III-9) [Horning et al. 1955; Chimenti et al. 2004; Zhou et al. 2008]. La majorité des dérivés coumariniques développés au sein du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège par le passé sont obtenus par des réactions de ce genre [Pochet et al. 1996; Doucet et al. 1999; Pochet et al. 2000; Kempen et al. 2008].

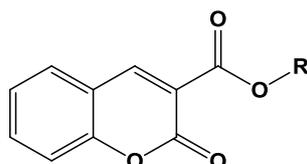
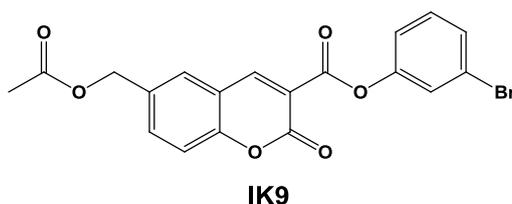
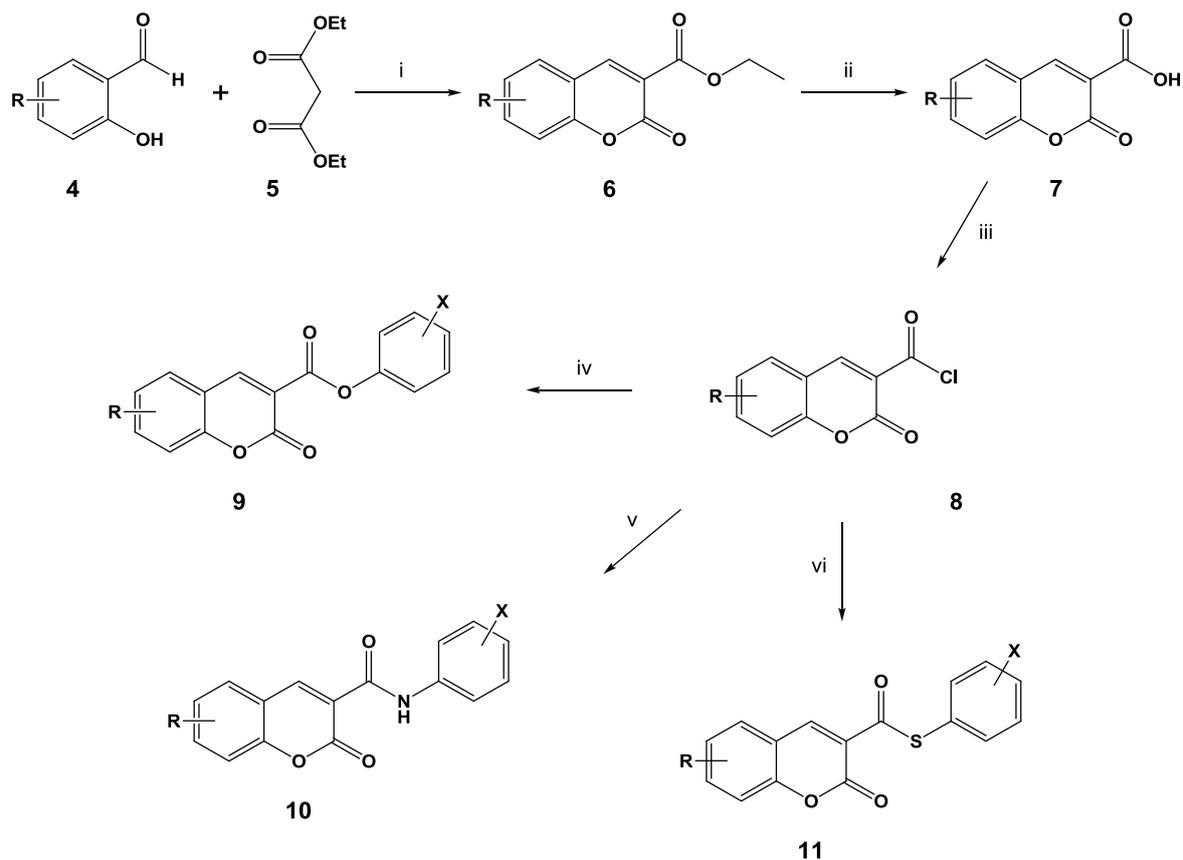


Figure III-9 : esters de l'acide coumarine-3-carboxylique

III.2. Stratégies de synthèse adoptées pour obtenir les nouveaux dérivés coumariniques

Le composé de référence IK9 et la plupart de ses analogues synthétisés par le passé (9-11) ont été obtenus par une voie de synthèse « classique » (figure III-10) qui inclut une réaction de type Knoevenagel entre un dérivé du salicyaldéhyde (4) et le malonate de diéthyle (5) en présence de pipéridine et d'acide acétique dans l'éthanol à chaud. L'ester éthylique (6) résultant est hydrolysé par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium pour donner l'acide coumarine-3-carboxylique (7) correspondant. Celui-ci est transformé, par l'action du chlorure de thionyle, en chlorure d'acide (8) qui est condensé avec un phénol, une aniline ou un thiophénol approprié [Pochet et al. 1996; Pochet et al. 2000; Kempen et al. 2008].





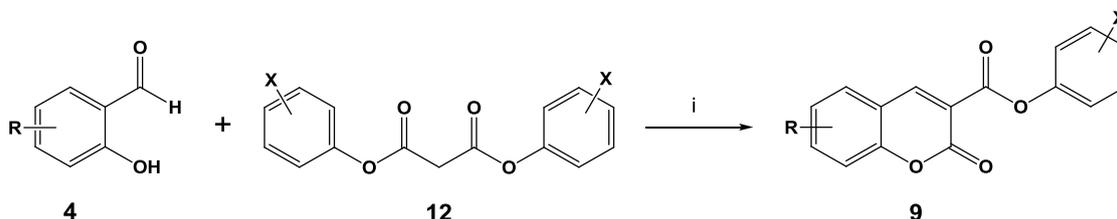
Réactifs : (i) pipéridine, acide acétique, C_2H_5OH ; (ii) $NaOH$, H_2O ; (iii) $SOCl_2$; (iv) $X-C_6H_4OH$, pyridine, 1,4-dioxane ; (v) $X-C_6H_4NH_2$, pyridine, 1,4-dioxane ; (vi) $X-C_6H_4SH$, pyridine, 1,4-dioxane.

Figure III-10 : Voie de synthèse « classique » pour l'obtention des dérivés de l'acide coumarine-3-carboxylique

Cette stratégie de synthèse ne convient cependant pas pour tous les nouveaux composés coumariniques que nous envisageons de préparer dans le cadre de ce travail. L'utilisation de chlorure de thionyle est en effet incompatible pour l'obtention des composés portant des fonctions alcool ou phénol. C'est pourquoi nous avons développé un autre procédé au cours duquel la condensation de Knoevenagel se réalise entre un dérivé du salicylaldéhyde (4) et un ester phénolique de l'acide malonique (12) (figure III-11). Cette méthode rend accessible d'une part les séries hydroxylées (6-hydroxyméthyle, 6-hydroxy, 7-hydroxy et 6,7-dihydroxy, voir tableaux III-3, III-7 III-8 et III-9). D'autre part, nous évitons ainsi le passage par un chlorure d'acide, cette étape constituant le stade le plus critique du schéma de synthèse classique. Comme catalyseurs, nous utilisons toujours le couple

III. Stratégies de synthèse

pipéridine/acide acétique. En ce qui concerne le solvant, nous avons remplacé l'éthanol par le 1,4-dioxane, en vue d'éviter un problème de transestérification entre le produit obtenu et l'éthanol. Dans ces conditions, la réaction s'effectue à froid et la durée est généralement inférieure à une heure.



Réactifs : (i) pipéridine, acide acétique, 1,4-dioxane.

Figure III-11 : Condensation de type Knoevenagel entre un dérivé du salicylaldéhyde et un ester phénylique de l'acide malonique

Nous utilisons cette nouvelle stratégie pour la synthèse de la plupart des nouveaux composés, à l'exception des 6-acétoxyméthylcoumarines (**20-26** ; tableau III-1 page 60) et des coumarine-3-sulfonamides (**66-67** ; tableau III-6 page 66). Les 6-acétoxyméthylcoumarines, qui ne diffèrent de l'IK9 que par la nature et la position de l'halogène, sont obtenues selon la voie « classique » et les coumarine-3-sulfonamides sont préparées au moyen d'une réaction de Knoevenagel faisant intervenir le bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (**13** ; figure III-12) en tant que réactif à méthylène actif.

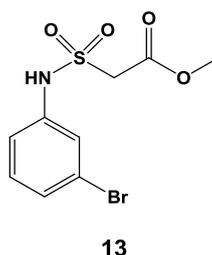
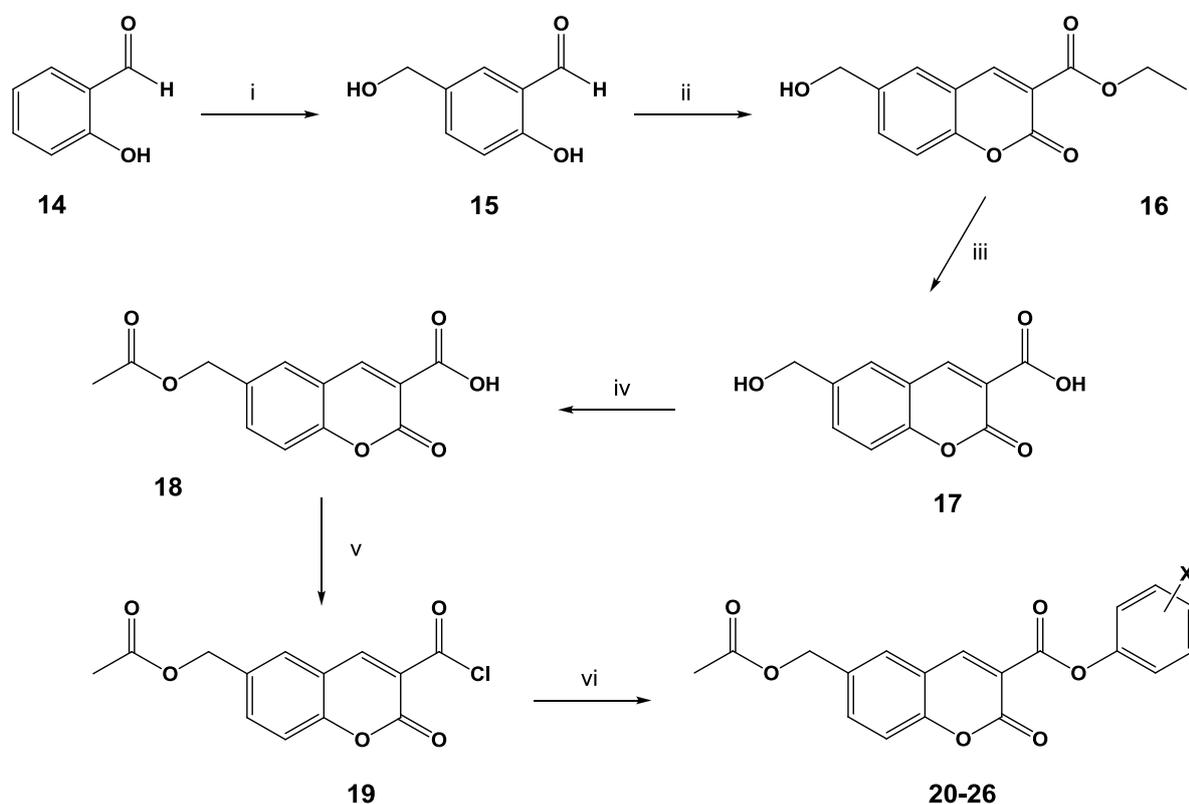


Figure III-12 : bromoanilinosulfonylacétate de méthyle

III.2.1. Synthèse des 6-acétoxyméthylcoumarines

La première étape du schéma (figure III-13) conduit au 5-hydroxyméthylsalicylaldéhyde (**15**) selon un procédé [Stoermer & Behn 1901]

consistant à hydroxyméthyliser le salicyaldéhyde (**14**) par l'action du formaldéhyde en milieu acide à chaud. Le produit ainsi formé (**15**) est engagé dans une condensation de type Knoevenagel avec le malonate de diéthyle en présence de pipéridine et d'acide acétique dans l'éthanol. L'ester éthylique obtenu (**16**) est hydrolysé par chauffage à reflux dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 10%, suivie d'une acidification par de l'acide chlorhydrique afin de refermer le noyau lactonique. Le groupement hydroxyméthyle est ensuite transformé en groupement acétoxyméthyle par réaction de l'intermédiaire **17** avec l'anhydride acétique. L'acide carboxylique obtenu (**18**) réagit avec le chlorure de thionyle pour former le chlorure d'acide correspondant (**19**). Celui-ci réagit avec un phénol approprié en présence de pyridine dans le dioxane pour obtenir les produits attendus (**20-26** ; tableau III-1).



Réactifs : (i) formaldéhyde, HCl ; (ii) malonate de diéthyle, pipéridine, acide acétique, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; (iii) NaOH, H_2O ; (iv) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$; (v) SOCl_2 ; (vi) $\text{X-C}_6\text{H}_4\text{OH}$, pyridine, 1,4-dioxane.

Figure III-13 : Synthèse des 6-acétoxyméthylcoumarines

III. Stratégies de synthèse

Le rendement global de la voie de synthèse présentée ci-dessus est inférieur à 10%, ce qui s'explique notamment par le fait que le rendement de l'étape i se situe en général entre 20 et 30%. L'étape vi est par ailleurs limitante dans la mesure où le chlorure d'acide est instable lorsqu'il est en contact avec l'air ambiant, ce qui nécessite une manipulation rapide. L'avantage de la méthode est le nombre assez important d'étapes communes à mettre en œuvre pour l'obtention des différents produits (méthode convergente). Les différents dérivés 6-acétoxyméthylcoumariniques obtenus par cette voie sont repris dans le tableau III-1.

N°	X
20	2-F
21	4-F
22	2-Cl
23	4-Cl
24	2-Br
25	4-Br
26	3-CN

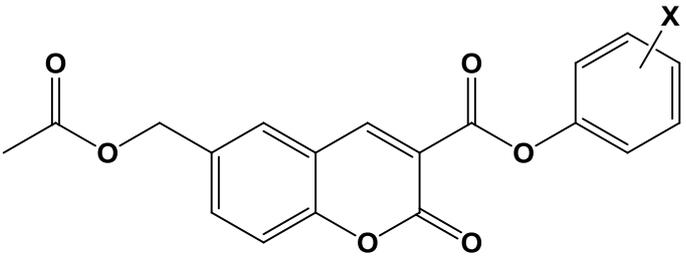
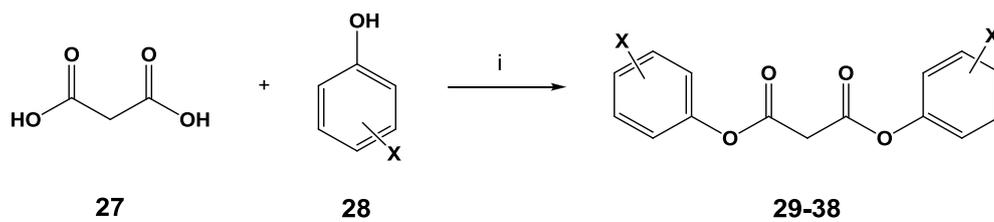


Tableau III-1 : 6-acétoxyméthylcoumarines synthétisées

III.2.2. Synthèse des esters phénoliques de l'acide malonique

L'action d'un phénol approprié (**28**) sur l'acide malonique (**27**) en présence de trichlorure de phosphore (PCl_3) à chaud (figure III-14) conduit à l'obtention des esters phénoliques de l'acide malonique (**29-38** ; tableau III-2).



Réactif : (i) OPCl_3

Figure III-14 : Synthèse des esters phényles de l'acide malonique

N°	X
29	H
30	2-F
31	3-F
32	4-F
33	2-Cl
34	3-Cl
35	4-Cl
36	2-Br
37	3-Br
38	4-Br

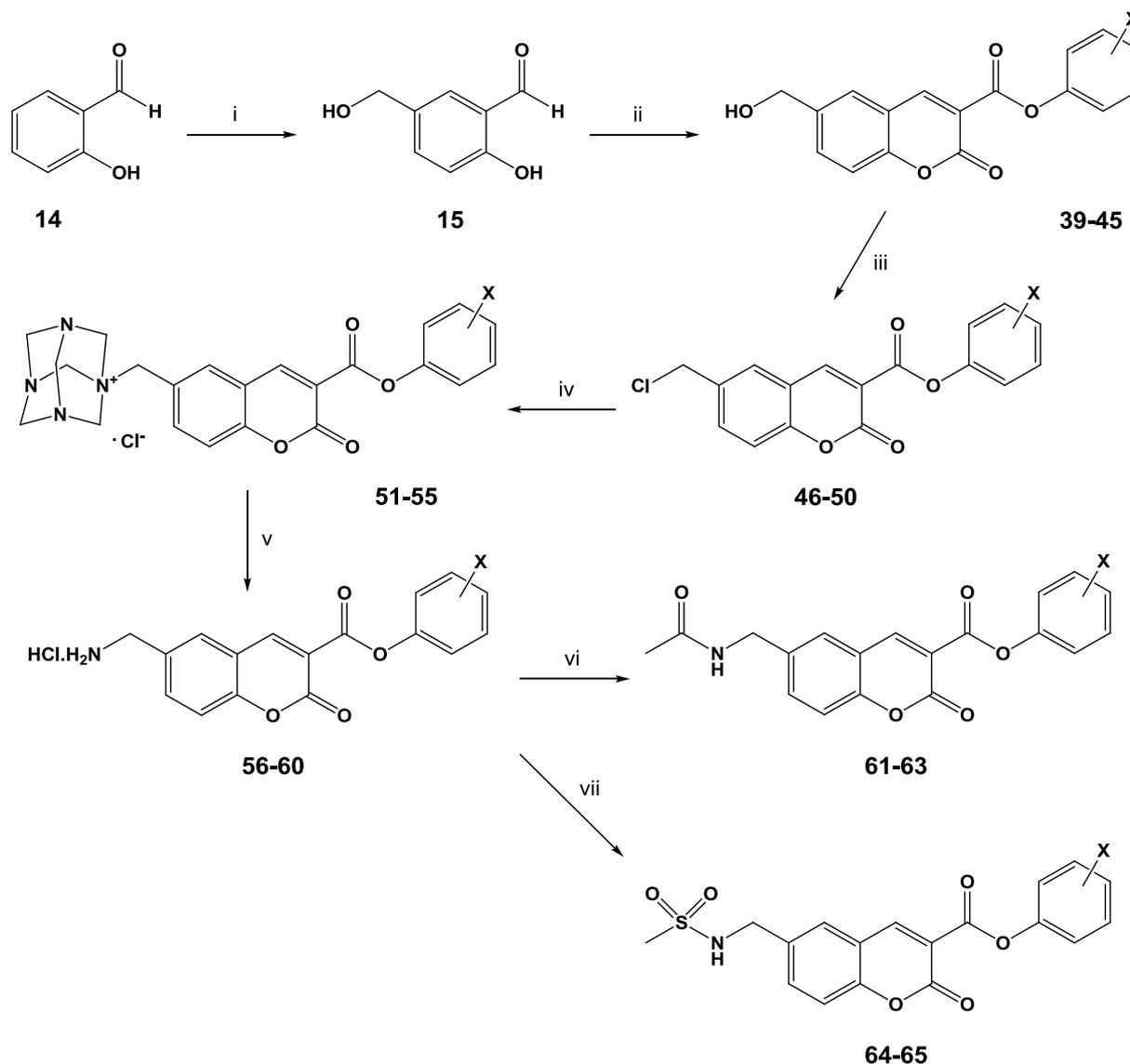
OC(=O)CC(=O)Oc1ccc(X)cc1

Tableau III-2 : esters phényles de l'acide malonique synthétisés

III.2.3. Synthèse des 6-hydroxyméthylcoumarines, des 6-acétamidométhylcoumarines et des 6-méthylsulfonylaminométhylcoumarines

La voie de synthèse présentée ici (figure III-15) permet l'accès à trois des différentes classes de dérivés coumariniques visées par ce travail. Nous obtenons tout d'abord les dérivés 6-hydroxyméthylés (**39-45** ; tableau III-3), intermédiaires-clés pour la synthèse des 6-acétamidométhylcoumarines (**61-63** ; tableau III-4) et des 6-méthylsulfonylaminométhylcoumarines (**64-65** ; tableau III-5).

La synthèse commence par la préparation du 5-hydroxyméthylsalicylaldéhyde (**15**) (obtenu comme décrit dans le paragraphe III.2.1.), suivie d'une condensation de type Knoevenagel entre le 5-hydroxyméthylsalicylaldéhyde (**15**) et un ester phényle de l'acide malonique (**29-38**) en présence de pipéridine et d'acide acétique dans le dioxane. Les dérivés 6-hydroxyméthylés ainsi obtenus (**39-45**) sont transformés en dérivés 6-chlorométhylés (**46-50**) par l'action du chlorure de thionyle, puis en dérivés 6-aminométhylés (**56-60**) par la réaction de Delépine [Delépine 1895]. Lors de celle-ci, les intermédiaires 6-chlorométhylés (**46-50**) sont d'abord transformés en chlorures d'hexaminium (**51-55**) en présence d'hexaméthylènetétramine (HMTA) dans le chloroforme. Les sels d'hexaminium (**51-55**) sont ensuite hydrolysés dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique pour fournir les chlorhydrates d'amine correspondants (**56-60**). Cette réaction s'accompagne de la formation de chlorure d'ammonium et de formaldéhyde. Les chlorhydrates d'amine ainsi formés (**56-60**) réagissent soit avec l'anhydride acétique en présence de triéthylamine (TEA) pour former les dérivés 6-acétamidométhylés **61-63**, soit avec le chlorure de méthanesulfonyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile pour donner les dérivés 6-méthylsulfonylaminométhylés **64** et **65**.



Réactifs : (i) formaldéhyde, HCl ; (ii) ester phényle de l'acide malonique (**29-38**), pipéridine, acide acétique, 1,4-dioxane ; (iii) SOCl_2 ; (iv) HMTA, CHCl_3 ; (v) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, HCl ; (vi) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, TEA ; (vii) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, K_2CO_3 , CH_3CN .

Figure III-15 : Synthèses des 6-hydroxyméthylcoumarines, des 6-acétamidométhylcoumarines et des 6-méthylsulfonylamino-méthylcoumarines

Une différence majeure de cette voie de synthèse par rapport au schéma classique est l'utilisation d'esters phényles de l'acide malonique au lieu du malonate de diéthyle. L'étape ii est beaucoup plus rapide que la réaction correspondante avec le malonate de diéthyle du schéma classique et se réalise par ailleurs à froid. La réaction avec les esters phényles de l'acide malonique ne peut

III. Stratégies de synthèse

en effet pas être effectuée à chaud, car ces derniers résistent mal à la chaleur. Cette méthode nous a permis de synthétiser les différents dérivés hydroxyméthylés en deux étapes. La première étape reste identique à celle du schéma classique, avec des rendements faibles (20-30%). Les rendements de la deuxième étape sont par contre nettement plus élevés et peuvent atteindre 70-90%. Les différents composés hydroxyméthylés obtenus par cette méthode sont représentés dans le tableau III-3.

N°	X
39	H
40	3-F
41	4-F
42	3-Cl
43	4-Cl
44	3-Br
45	4-Br

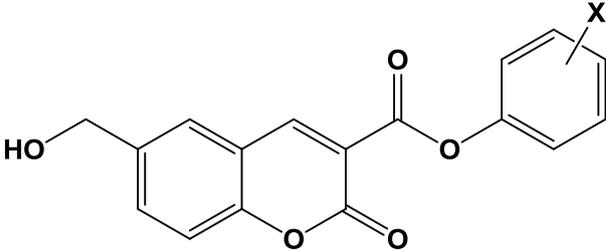
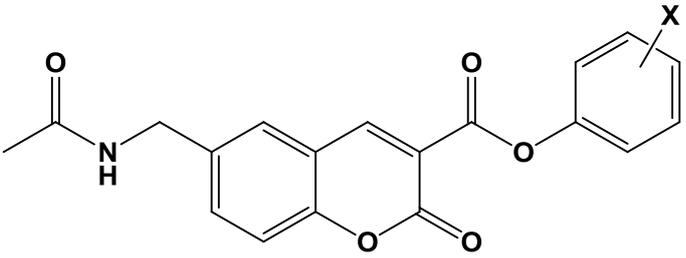


Tableau III-3 : 6-hydroxyméthylcoumarines synthétisées

La préparation des chlorhydrates de 6-aminométhylcoumarine par la réaction de Delépine (étapes iv et v, figure III-15) ne nous a pas posé de souci majeur. Il en est de même pour les étapes finales vi et vii, où nous avons cependant des rendements nettement plus importants pour l'étape vi des acétamides. Les tableaux III-4 et III-5 reprennent respectivement les dérivés 6-acétamidométhylés (**61-63**) et 6-méthylsulfonylaminométhylés (**64-65**) synthétisés. Les acétamides **61**, **62** et **63** ont été synthétisés en complément à des composés (X = 3-F, 3-Cl et 3-Br) déjà décrits précédemment [Kempen et al. 2008]. Ces derniers avaient été obtenus initialement par la voie classique (figure III-10). L'utilisation de la nouvelle méthode (passage par un dérivé hydroxyméthyle en utilisant la condensation de Knoevenagel avec des esters phényles de l'acide malonique) a dès lors permis de réduire le nombre d'étapes et d'augmenter le rendement.

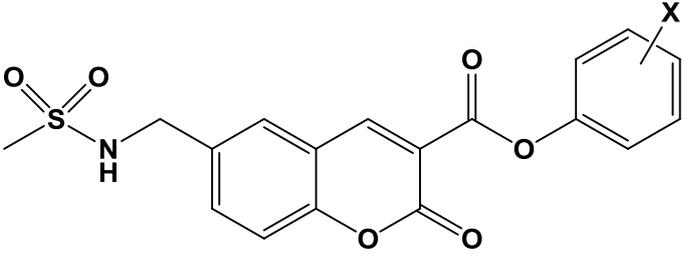
N°	X
61	4-F
62	4-Cl
63	4-Br



The chemical structure shows a coumarin core with an acetamido group (-NHCOCH₃) at the 6-position and a methyl group at the 7-position. A phenoxy group is attached at the 3-position, with a substituent X at the 4-position of the phenoxy ring.

Tableau III-4 : 6-acétamidométhylcoumarines synthétisées

N°	X
64	3-Cl
65	3-Br



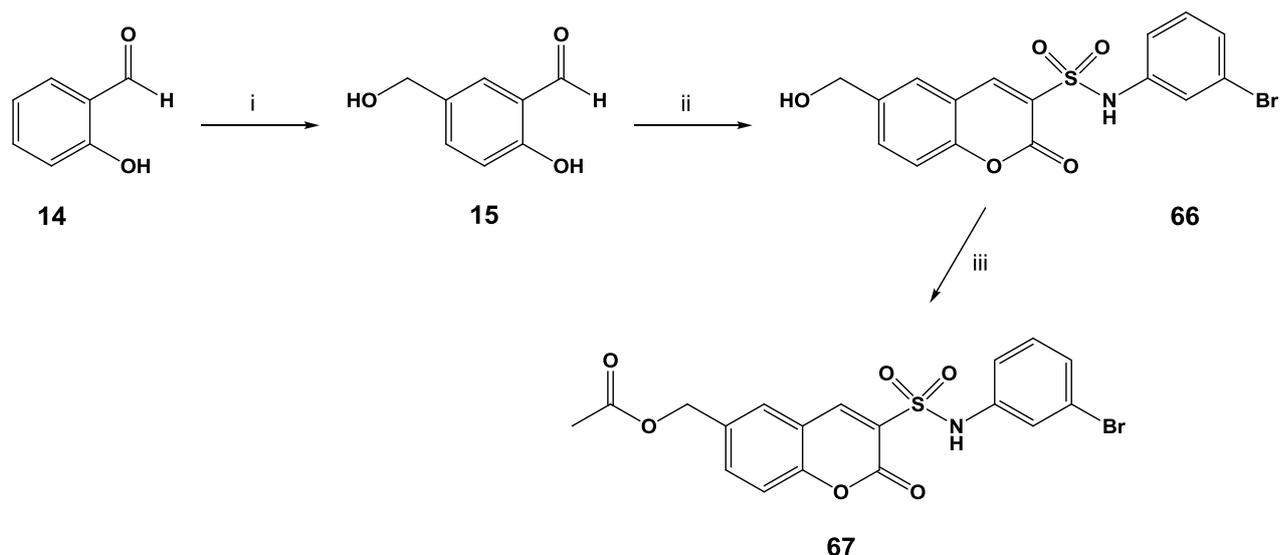
The chemical structure shows a coumarin core with a methylsulfonylamino group (-NHCOCH₃) at the 6-position and a methyl group at the 7-position. A phenoxy group is attached at the 3-position, with a substituent X at the 3-position of the phenoxy ring.

Tableau III-5 : 6-méthylsulfonylaminométhylcoumarines synthétisées

III.2.4. Synthèse des coumarine-3-sulfonamides

Une condensation de type Knoevenagel entre le 5-hydroxyméthylsalicylaldéhyde (**15**) et le bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (**13**) (figure III-16) est utilisée pour préparer les coumarine-3-sulfonamides (tableau III-6) [Reddy et al. 2004]. La réaction s'effectue à chaud dans l'éthanol en présence de pipéridine. Le composé **66** obtenu réagit avec l'anhydride acétique pour former le composé **67**.

III. Stratégies de synthèse



Réactifs : (i) formaldéhyde, HCl ; (ii) bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (13), pipéridine, C₂H₅OH ; (iii) (CH₃CO)₂O.

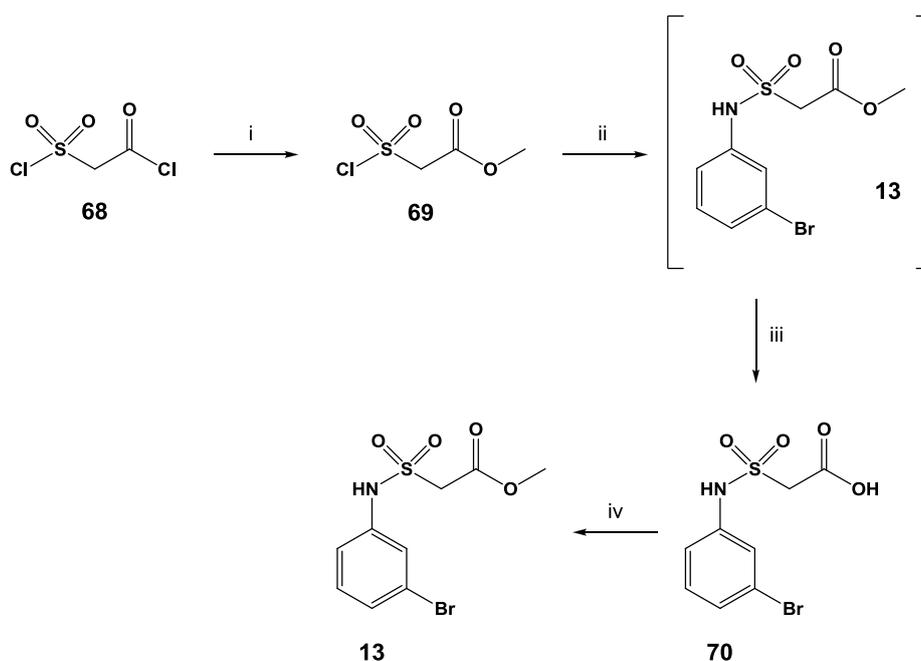
Figure III-16 : Synthèse des coumarine-3-sulfonamides

L'étape ii s'effectue facilement avec un bon rendement (85%) tandis que l'étape iii nécessite plusieurs étapes de purification, avec un rendement faible (36%). Les deux composés issus de cette voie de synthèse sont repris dans le tableau III-6.

N°	Y	
66	CH ₂ OH	
67	CH ₂ OCOCH ₃	

Tableau III-6 : coumarine-3-sulfonamides synthétisées

Le bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (**13**) quant à lui est synthétisé à partir du chlorure de chlorosulfonylacétyle (**68**) qui réagit avec un équivalent de méthanol dans l'éther diéthylique pour former le chlorosulfonylacétate de méthyle (**69**) (figure III-17). Celui-ci est mis en réaction avec un léger excès de 3-bromoaniline dans le tétrahydrofurane en présence de triéthylamine pour obtenir le bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (**13**). Le passage par l'acide carboxylique **70** s'impose pour des raisons de purification. Il est en effet nécessaire de traiter le produit brut de la réaction ii par de l'hydroxyde de sodium en solution aqueuse (étape iii), afin de séparer le composé **13** de l'excès de 4-bromoaniline. Or, ceci s'accompagne de l'hydrolyse de l'ester méthylique qui est régénéré par action du chlorure de thionyle à chaud dans le méthanol (étape iv). Le rendement global de la voie de synthèse est d'environ 50%.

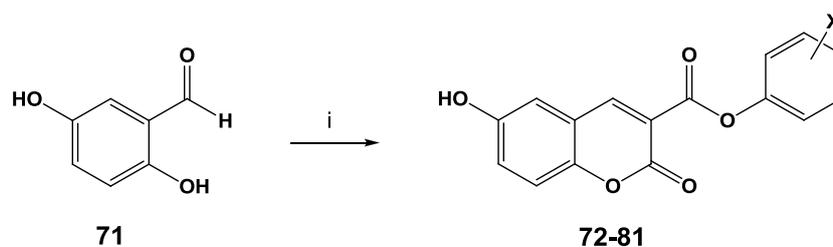


Réactifs : (i) CH₃OH, (C₂H₅)₂O ; (ii) 3-bromoaniline, TEA, THF; (iii) NaOH, H₂O; (iv) CH₃OH, SOCl₂.

Figure III-17 : Synthèse du bromoanilinosulfonylacétate de méthyle

III.2.5. Synthèse des 6-hydroxycoumarines, des 7-hydroxycoumarines et des 6,7-dihydroxycoumarines

Les 6-hydroxycoumarines **72-81** sont obtenues en une seule étape par une condensation de type Knoevenagel entre le 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (**71**) et un ester phénylique de l'acide malonique (**29-38**) (figure III-18).



Réactifs : (i) ester phénylique de l'acide malonique (**29-38**), pipéridine, acide acétique, 1,4-dioxane.

Figure III-18 : Synthèse des 6-hydroxycoumarines

Les rendements de cette réaction étaient très faibles initialement. Nous avons pu y remédier partiellement en effectuant la réaction à froid. Comme nous l'avons déjà expliqué dans le chapitre III.2.3. au sujet de la synthèse des 6-hydroxyméthylcoumarines, les esters phényliques de l'acide malonique supportent mal la chaleur ce qui rend impossible l'obtention de réactions complètes dans des conditions de chauffe intensive, même après quelques jours à reflux. En effectuant la réaction à température ambiante, les réactions arrivent rapidement à complétion en quelques minutes à froid. Un gain substantiel de rendement a été obtenu lorsque que le milieu réactionnel est additionné d'acide chlorhydrique dilué au terme de la réaction. Les différents dérivés 6-hydroxycoumariniques synthétisés par cette méthode (**72-81**) sont repris dans le tableau III-7.

N°	X
72	H
73	2-F
74	3-F
75	4-F
76	2-Cl
77	3-Cl
78	4-Cl
79	2-Br
80	3-Br
81	4-Br

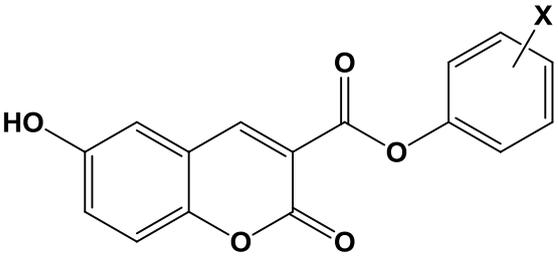
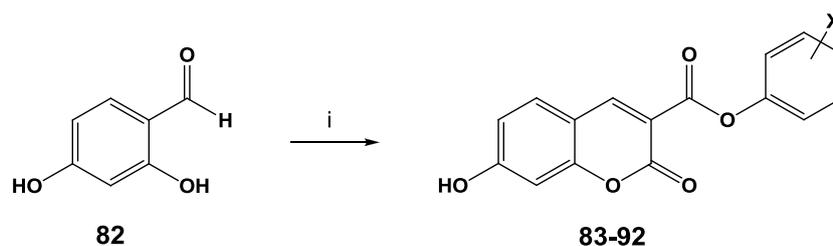


Tableau III-7 : 6-hydroxycoumarines synthétisées

Les 7-hydroxycoumarines (**83-92** ; tableau III-8) sont obtenues selon un procédé similaire (figure III-19), en faisant réagir un ester phénolique de l'acide malonique (**29-38**) avec le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (**82**).



Réactifs : (i) ester phénolique de l'acide malonique (**29-38**), pipéridine, acide acétique, 1,4-dioxane.

Figure III-19 : Synthèse des 7-hydroxycoumarines

Les commentaires faits précédemment à propos de la synthèse des 6-hydroxycoumarines sont valables aussi pour la préparation des 7-

III. Stratégies de synthèse

hydroxycoumarines, qui sont obtenus également par une réaction à froid et en ajoutant de l'acide chlorhydrique dilué au milieu réactionnel au terme de la réaction. Cependant, en comparant ces réactions à celles de la série 6-hydroxy, nous constatons que les temps de réaction sont plus longs et que les rendements sont plus faibles.

N°	X
83	H
84	2-F
85	3-F
86	4-F
87	2-Cl
88	3-Cl
89	4-Cl
90	2-Br
91	3-Br
92	4-Br

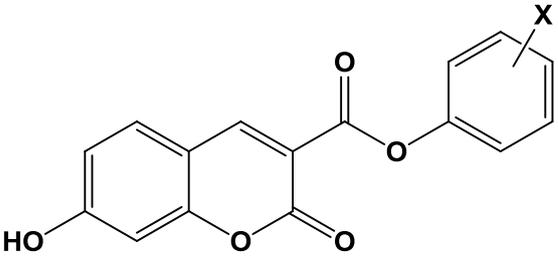
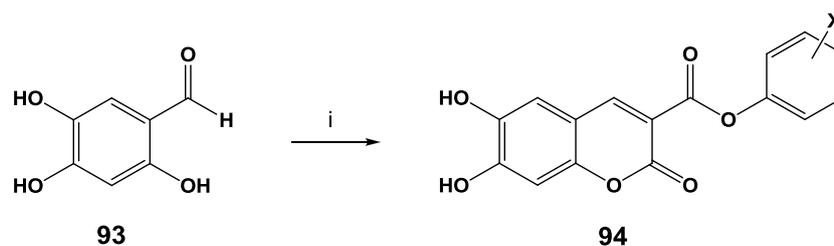


Tableau III-8 : 7-hydroxycoumarines synthétisées

La méthode de synthèse utilisée pour les coumarines hydroxylées en position 6 ou 7 peut s'appliquer également aux 6,7-dihydroxycoumarines (figure III-20 ; tableau III-9). Nous avons cependant rencontré des problèmes importants de purification dans cette série, un seul produit (avec X = H) ayant été obtenu avec une pureté suffisante et avec un rendement acceptable (36%).



Réactifs : (i) malonate de diphényle (**29**), pipéridine, acide acétique, 1,4-dioxane.

Figure III-20 : Synthèse des 6,7-dihydroxycoumarines

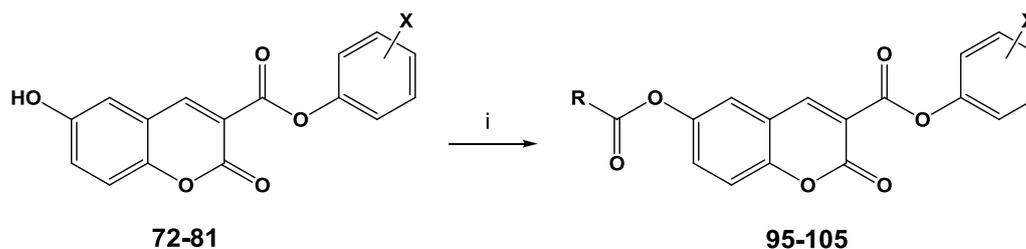
N°	X	
94	H	

Tableau III-9 : 6,7-dihydroxycoumarine synthétisée

III.2.6. Synthèse des 6-acyloxycoumarines

L'estérification de la fonction phénol des 6-hydroxycoumarines (**72-81**) par un anhydride approprié (figure III-21) nous permet de préparer les 6-acétoxycoumarines **95-101**, les 6-propionoxycoumarines **102** et **103** ainsi que les 6-butyroxycoumarines **104** et **105** (tableau III-10).

III. Stratégies de synthèse



Réactifs : (i) $(R-CO)_2O$.

Figure III-21 : Synthèse des 6-acyloxycoumarines

La synthèse et la purification de ces composés est facile et les rendements sont acceptables (60-90%). Nous n'avons d'ailleurs pas observé des différences majeures de rendement en fonction de la nature de la chaîne R. Les différents composés 6-acyloxy obtenus par cette méthode sont repris dans le tableau III-10.

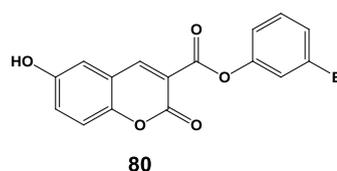
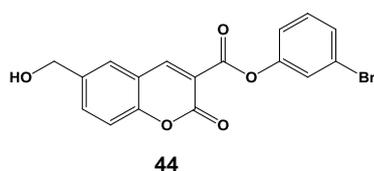
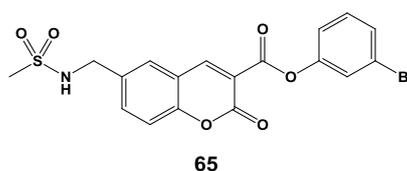
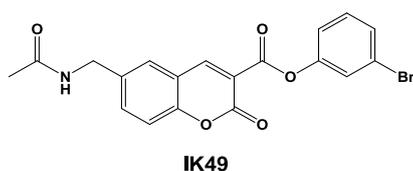
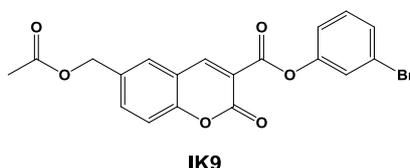
N°	X	R
95	H	CH ₃
96	3-F	CH ₃
97	4-F	CH ₃
98	3-Cl	CH ₃
99	4-Cl	CH ₃
100	3-Br	CH ₃
101	4-Br	CH ₃
102	3-Cl	C ₂ H ₅
103	3-Br	C ₂ H ₅
104	3-Cl	C ₃ H ₇
105	3-Br	C ₃ H ₇

Tableau III-10 : 6-acyloxycoumarines synthétisées

IV. SOLUBILITÉ ET STABILITÉ

IV.1. Solubilité

Un des buts du présent travail consiste à développer des analogues de l'IK9 en augmentant l'hydrosolubilité par rapport à ce dernier. Afin d'évaluer l'impact des différentes pharmacomodulations sur la solubilité, nous avons réalisé une étude (en collaboration avec le Département de Pharmacie des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur, Dr. R. Frédérick et Dr. L. Pochet) lors de laquelle nous avons déterminé la solubilité à température ambiante de l'IK9 et de 6 molécules apparentées (figure IV-1) dans un tampon phosphate de pH7,4 additionné de 5% de DMSO, en effectuant le dosage de solutions saturées par une technique de chromatographie liquide (HPLC) avec détection par UV. Les 6 molécules (IK49, composés **65**, **44**, **80**, **66** et **67**) sont choisies de manière à exemplifier les différentes modulations effectuées en positions 3 et 6 du noyau coumarinique.



../..

IV. Solubilité et stabilité



Figure IV-1 : Molécules sélectionnées pour l'étude d'hydrosolubilité et de stabilité

Le dosage par HPLC est réalisé en phase inverse (colonne C18 ; gradient acétonitrile/acide acétique en solution aqueuse à 0,1%) et par détection UV à 220 nm.

Les droites d'étalonnage, permettant la conversion de l'aire sous la courbe des pics en concentration, sont réalisées à l'aide de 5 solutions de concentration connue (3.13, 12.5, 50, 200 et 500 μM) des composés dans l'acétonitrile avec 5% de DMSO. La droite d'étalonnage obtenue avec l'IK9, représentant l'aire sous la courbe (AUC), est montrée en guise d'exemple (figure IV-2). Les autres droites sont fournies en annexe à la page 201.

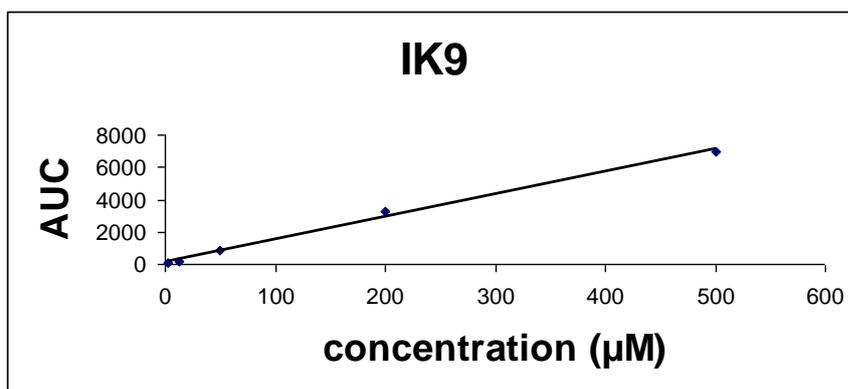


Figure IV-2 : Droite d'étalonnage obtenue pour l'IK9

La solubilité des différents composés dans un tampon phosphate de pH7,4 additionné de 5% de DMSO est déterminée à l'aide de plaques de filtration Millipore. 10 μL de solution mère à 10 mM dans le DMSO sont ajoutés à 190 μL de tampon et

la suspension est agitée à température ambiante pendant 1h30. Après la filtration, la concentration des différents composés dans le filtrat est mesurée par la méthode HPLC mentionnée ci-dessus. Les solubilités obtenues sont renseignées dans le tableau IV-1.

Composé	Solubilité (μM)
IK9	ND
IK49	ND
65	ND
44	13 ± 1
80	13 ± 1
66	398 ± 3
67	110 ± 1

Tableau IV-1 : Solubilités dans un tampon phosphate à pH7,4 (+ 5% de DMSO) et à température ambiante ; les résultats sont exprimés en concentration (μM) \pm s.d. (n = 3) ; ND = non détectable

La concentration d'IK9 dans les conditions choisies est inférieure à la limite de détection de la technique utilisée. Le remplacement de la fonction ester en position 6 par une amide (IK49) ou une sulfonamide (**65**) ne permet pas de passer au delà de ce seuil. Lorsque nous introduisons une fonction OH, sous forme d'un groupement hydroxyméthyle (**44**) ou d'une fonction phénol (**80**), la concentration est de l'ordre de 13 μM . Une augmentation importante est observée pour les composés possédant une fonction sulfonamide en position 3, avec une concentration d'environ 100 μM pour le dérivé 6-acétoxyméthyle (**67**) et d'environ 400 μM pour le dérivé 6-hydroxyméthyle (**66**). Les valeurs obtenues ne correspondent néanmoins pas à des solubilités absolues dans l'eau à pH7,4, car cela dépend de plusieurs paramètres, comme par exemple la température, la force ionique, le pourcentage de co-solvant (DMSO) ou encore de la stabilité des composés. Il s'agissait plutôt d'évaluer le gain de solubilité par rapport à l'IK9. Notre essai a donc permis de mettre en évidence une légère augmentation avec une fonction alcool ou phénol en position 6 et une

augmentation importante avec une fonction sulfonamide en position 3. Aucun gain de solubilité détectable n'a été obtenu avec une fonction amide ou sulfonamide en position 6.

IV.2. Stabilité

La structure de l'IK9 renferme deux esters et une fonction lactone rendant le composé susceptible à l'hydrolyse par des estérases plasmatiques ou hépatiques, ce qui nous a incités à évaluer la stabilité de l'IK9 et de plusieurs molécules apparentées (figure IV-1, pages 73-74). A cette fin, nous avons utilisé un modèle simple simulant les conditions d'évaluation biologique et qui consiste à préparer des solutions à 10 μM dans du MEM (angl. *Minimum Essential Medium*) à pH7,4 et en présence de 5% de DMSO (co-solvant), ces solutions étant incubées à 37°C. Des dosages réguliers par HPLC permettent de déterminer la dégradation des composés en fonction du temps. Les profils de stabilité obtenus avec l'IK9 et avec les composés **66** et **67** sont représentés ci-dessous (figures IV-3, IV-4 et IV-5). Des exemples de chromatogrammes sont fournis en annexe à la page 204.

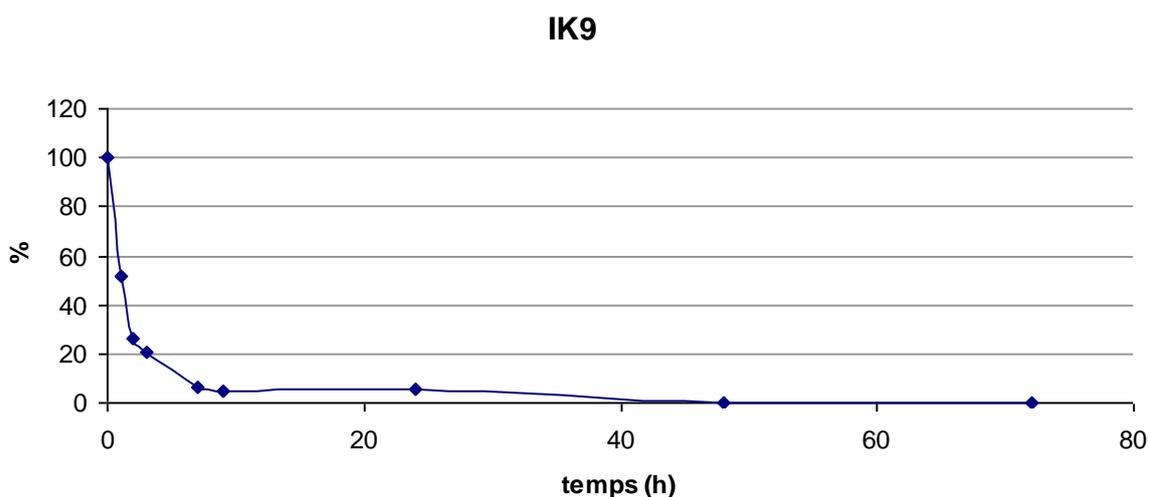


Figure IV-3 : Profil de stabilité de l'IK9 (10 μM) dans du MEM à 37°C

composé 66

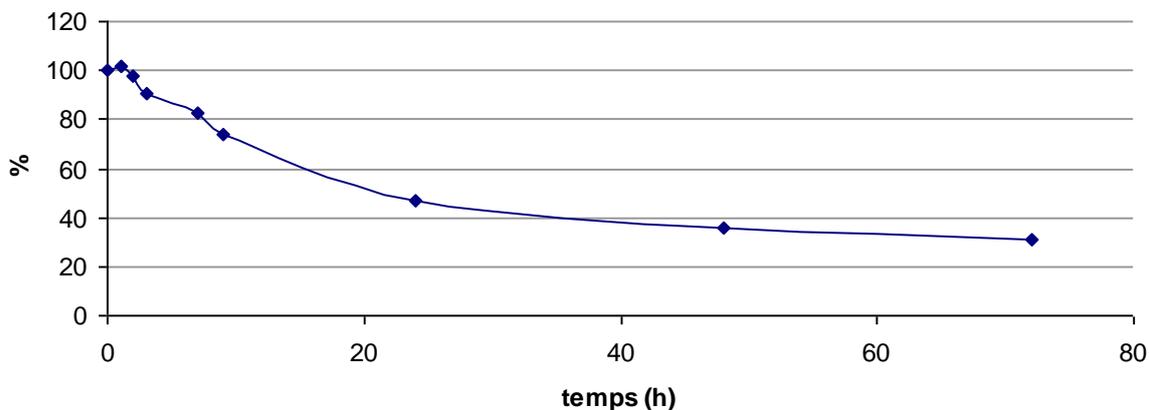


Figure IV-4 : Profil de stabilité du composé **66** (10 µM) dans du MEM à 37°C

composé 67

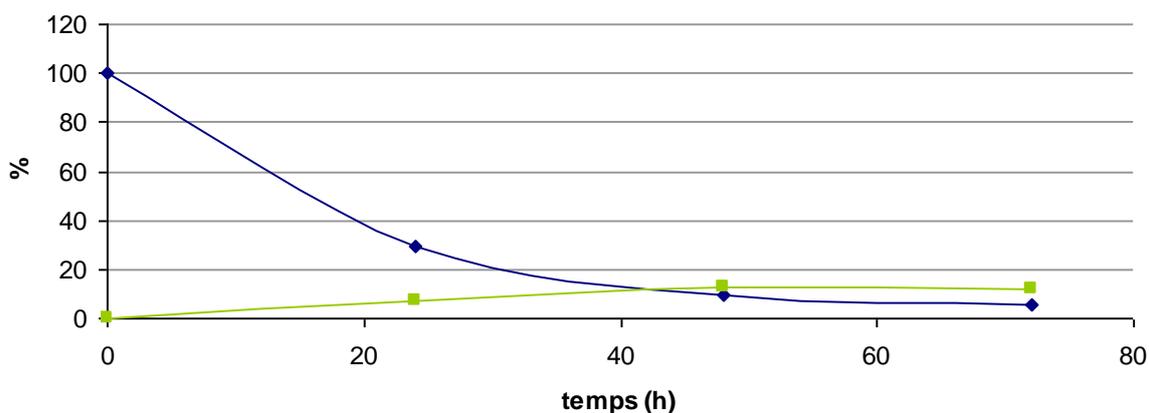


Figure IV-5 : Profil de stabilité du composé **67** (10 µM) dans du MEM à 37°C ; —■— formation du composé **66**

En ce qui concerne l'IK9, nous constatons une dégradation assez rapide d'environ 50% après une heure d'incubation et une disparition quasi complète au bout de 10 heures. Nous observons en même temps l'apparition de 3-bromophénol, ce qui signifie que l'ester en position 3 du noyau coumarinique est hydrolysé. Des profils similaires sont obtenus avec l'IK49 et les composés **44**, **65** et **80**, tous caractérisés par la présence d'une fonction ester en 3 (données non présentées).

IV. Solubilité et stabilité

Avec les composés **66** et **67**, possédant une fonction sulfonamide en cette position, la dégradation est beaucoup plus lente. Pour le composé **66**, la concentration ne diminue pas significativement pendant les premières heures d'incubation. Des dégradations de respectivement 50% pour le composé **66** et de 70% pour le composé **67** sont observées après 24 heures. L'analyse des chromatogrammes obtenus pour le composé **67** révèle par ailleurs l'apparition d'un pic correspondant au composé **66**, ce qui signifie que l'ester du groupement 6-acétoxyméthyle présent chez le composé **67** s'hydrolyse en groupement hydroxyméthyle. Nous devrions observer théoriquement la même chose pour l'IK9, avec l'apparition ici d'un pic correspondant au composé **44**, mais la cinétique de dégradation de l'ester en position 6 est nettement plus lente que celle de l'ester en position 3, et n'est dès lors pas détectable dans les conditions de l'expérience.

Pour conclure, nous pouvons donc dire qu'une amélioration sensible de la stabilité est obtenue en remplaçant la fonction ester en position 3 du noyau coumarinique par une fonction sulfonamide.

V. DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTI-INVASIF DES NOUVEAUX DÉRIVÉS COUMARINIQUES SYNTHÉTISÉS

Le pouvoir anti-invasif des nouveaux composés coumariniques est déterminé en utilisant un test de chémoinvasion en « chambres de Boyden » (en collaboration avec le Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement de l'Université de Liège, Prof. A. Noël et Prof. J.-M. Foidart). Il s'agit d'un modèle initialement développé dans les années 60 pour étudier le chimiotactisme des cellules immunitaires [Boyden 1962], mais qui trouve également de nombreuses applications en cancérologie, en particulier dans l'étude de la migration et l'invasion des cellules cancéreuses dans différentes conditions. Il en existe plusieurs variantes qui sont néanmoins toutes caractérisées par la présence de deux compartiments séparés par une membrane poreuse susceptible d'être traversée par les cellules.

Le modèle que nous avons choisi (figure V-1) est constitué d'une plaque à 24 puits équipés d'inserts délimités vers le bas par un filtre poreux en polycarbonate recouvert d'une couche de collagène de type IV. La migration des cellules est stimulée grâce à un gradient chimotactique généré par la présence de sérum de veau foetal (FBS - angl. *fetal bovine serum*) dans le compartiment inférieur et accentuée par une différence de concentration d'albumine sérique bovine (BSA - angl. *bovine serum albumin*) entre les deux compartiments. En ce qui concerne les cellules, nous avons - comme dans les travaux antérieurs effectués par des membres du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique [Kempen et al. 2003; Kempen et al. 2008] - travaillé avec une souche de cellules HT1080 de fibrosarcome humain. Le composé à évaluer (10 μM) est présent dans les deux compartiments des chambres, en utilisant du DMSO à 0,1% comme co-solvant.

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

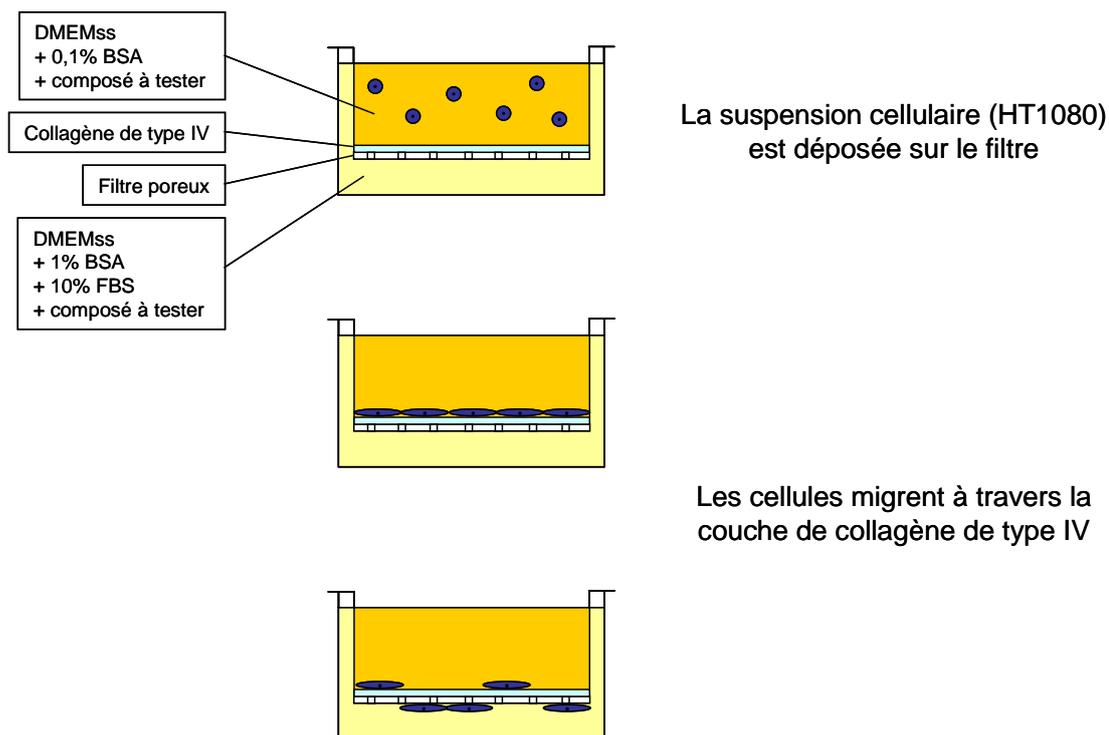
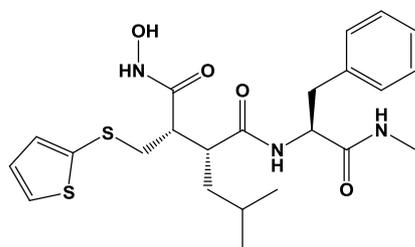


Figure V-1 : Le test de chémoinvasion en « chambres de Boyden »

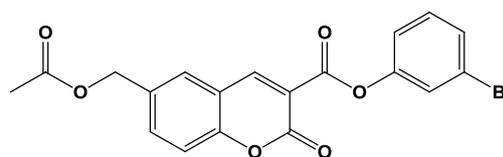
Au début de l'expérience, la suspension de cellules HT1080 est déposée dans le compartiment supérieur et le système est incubé pendant 48 heures. Afin de maintenir un gradient chimotactique, les milieux de culture et les solutions de composé à tester sont changés après 24 heures. Au terme de l'incubation, les cellules sont fixées dans le méthanol à -20°C , puis colorées par du colorant Giemsa. Les cellules ayant migré, présentes à la face inférieure des filtres, sont comptées à l'aide d'un microscope et du logiciel ImageJ et les résultats sont exprimés en pourcentage (%) par rapport aux puits contrôles, c'est-à-dire les inserts ayant contenu du milieu de culture avec 0,1% de DMSO (véhicule), mais sans composé à étudier.

Les résultats sont comparés à ceux de deux composés de référence, l'IK9 et le BB94 (batimastat), ce dernier étant un inhibiteur de MMPs à large spectre. Le BB94 est connu pour son activité anti-invasive importante [Maquoi et al. 2004] et produit environ 90% d'inhibition à $10\ \mu\text{M}$ dans le modèle que nous utilisons. Avec

l'IK9 à 10 μ M, nous obtenons 57% d'inhibition de l'invasion des cellules HT1080 (cf. tableau V-1).



BB94



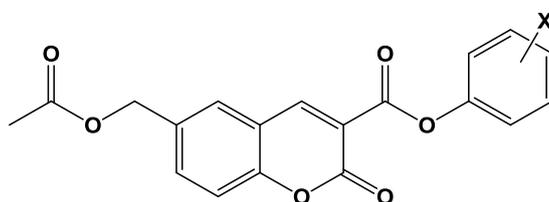
IK9

Avant de présenter les résultats obtenus dans le test en « chambres de Boyden », il nous semble indispensable de faire une remarque préliminaire par rapport à la stabilité des différentes molécules, telle que nous l'avons décrite dans le chapitre IV.2. En effet, le temps de demi-vie de certains de nos composés dans un milieu de culture à pH7,4 et à 37°C est de l'ordre d'une heure. Sachant que l'expérience de chémo-invasion s'étend sur 48 heures, y compris un changement de milieu après 24 heures, les taux d'inhibition que nous avons déterminés ne correspondent peut-être pas au potentiel inhibiteur absolu, l'activité mesurée étant éventuellement influencée par la dégradation des composés. Cette réflexion doit pourtant être relativisée dans la mesure où nous ne savons rien à propos de l'interaction des composés avec leur cible biologique et donc de l'importance de la stabilité des composés dans ce modèle.

La grande majorité des molécules développées lors des travaux précédents sont caractérisées par la présence d'un halogène en position *meta* du noyau benzénique de l'ester phénylique [Kempen et al. 2003; Kempen et al. 2008]. Dès lors, il nous a semblé pertinent d'étudier les positions *ortho* et *para*. Nous avons donc évalué dans un premier temps une série de composés qui diffèrent de l'IK9 seulement par la nature et la position du substituant X sur le noyau benzénique, mais

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

qui possèdent toujours l'enchaînement acétoxyméthyle en position 6. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau V-1.



N°	X	Invasion (en % du contrôle)
BB94		11,9 ± 2,2
20	2-F	86,3 ± 7,8
IK10	3-F	41,1 ± 6,0 **
21	4-F	52,1 ± 1,1
22	2-Cl	100,0 ± 6,6
LP46	3-Cl	49,0 ± 13,1 *
23	4-Cl	60,8 ± 8,2
24	2-Br	89,0 ± 8,1
IK9	3-Br	43,1 ± 7,5 **
25	4-Br	46,6 ± 10,4 **
26	3-CN	82,6 ± 4,4

Tableau V-1 : Invasion des cellules HT1080 en présence des 6-acétoxyméthylcoumarines. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n≥3 ; * : P<0,05 et ** : P<0,01).

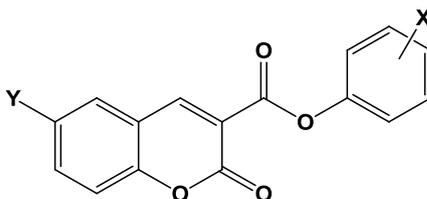
Nous constatons que l'inhibition la plus importante au sein de cette série est obtenue avec les composés précédemment décrits, c'est-à-dire ceux qui sont halogénés en position *meta* (IK10, LP46 et IK9). Lorsque l'halogène se trouve en position *para* (**21**, **23** et **25**), l'inhibition est légèrement diminuée par rapport aux composés halogénés en *meta*. Par opposition aux travaux antérieurs [Kempen

2003], nous n'observons pas de différences significatives en ce qui concerne la nature de l'halogène. L'activité anti-invasive est par contre quasiment nulle lorsque l'halogène se trouve en position *ortho* (**20**, **22** et **24**), ce qui nous a amené à ne plus considérer cette position pour les pharmacomodulations qui suivent. Enfin, le remplacement de l'halogène en position *meta* par une fonction cyano (**26**) se traduit par une forte diminution du potentiel inhibiteur.

Une deuxième série de pharmacomodulations concerne la position 6 du noyau coumarinique, sur laquelle nous avons remplacé le groupement acétoxyméthyle par des groupements acétamidométhyles et méthylsulfonylaminométhyles. La série acétamidométhyle a déjà été partiellement explorée par le passé et a montré une activité proche de celle obtenue avec les composés acétoxyméthyles [Kempen et al. 2008]. C'est pourquoi nous avons tenté d'explorer davantage cette famille, en développant des composés halogénés en position 4 du noyau benzénique.

Dans les conditions d'évaluation biologique, tous les dérivés amides (IK49, IK53, **62** et **63**) se sont cependant avérés inactifs (tableau V-2), indépendamment de la nature et de la position de l'halogène. Des résultats plus encourageants sont obtenus avec les sulfonamides, pour lesquelles nous obtenons des invasions résiduelles de 51% avec le dérivé 3-chloro (**64**) et de 59% avec le dérivé 3-bromo (**65**). Leur activité anti-invasive est donc relativement proche de celle de l'IK9.

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés



N°	X	Y	Invasion (en % du contrôle)
<i>BB94</i>			11,9 ± 2,2
<i>IK9</i>			43,1 ± 7,5
IK53	3-Cl	CH ₂ NHCOCH ₃	108,4 ± 15,7
62	4-Cl	CH ₂ NHCOCH ₃	105,9 ± 12,7
IK49	3-Br	CH ₂ NHCOCH ₃	108,6 ± 4,4
63	4-Br	CH ₂ NHCOCH ₃	93,9 ± 10,0
64	3-Cl	CH ₂ NHSO ₂ CH ₃	51,4 ± 7,4 *
65	3-Br	CH ₂ NHSO ₂ CH ₃	58,7 ± 12,8

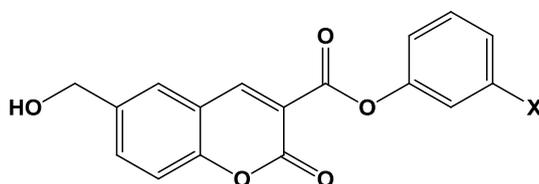
Tableau V-2 : Invasion des cellules HT1080 en présence des 6-acétamidométhylcoumarines et des 6-méthylsulfonylaminométhylcoumarines. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n≥3 ; * : P<0,05).

Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises, la structure chimique de l'IK9 renferme deux fonctions esters et une fonction lactone et il serait dès lors imaginable que son activité biologique soit due - au moins partiellement - à la présence de produits d'hydrolyse actifs. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à une série de composés sur lesquels le groupement acétoxyméthyle en position 6 est remplacé par un hydroxyméthyle, qui correspond à la forme hydrolysée de l'acétoxyméthyle.

L'inhibition de l'invasion obtenue avec ce type de composés (tableau V-3) est de l'ordre de 40 à 60% et est donc proche de celle obtenue avec leurs analogues 6-acétoxyméthyles. Une différence d'activité significative en fonction de la nature de

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

l'halogène n'a pas été observée, bien que les dérivés possédant un atome de fluor (**40**) ou de brome (**44**) semblent être légèrement plus actifs que l'analogue chloré.

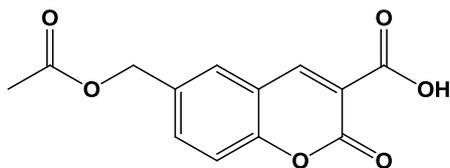


N°	X	Invasion (en % du contrôle)
<i>BB94</i>		11,9 ± 2,2
<i>IK9</i>		43,1 ± 7,5
39	H	58,5 ± 14,8
40	F	42,2 ± 6,6 *
42	Cl	54,1 ± 14,9
44	Br	49,5 ± 9,5 **

Tableau V-3 : Invasion des cellules HT1080 en présence des 6-hydroxyméthylcoumarines. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n≥3 ; * : P<0,05 et ** : P<0,01).

Dans le même ordre d'idées, nous avons évalué le pouvoir anti-invasif de l'acide **18**, qui correspond à la forme hydrolysée de l'ester en position 3. Cependant, aucune inhibition de l'invasion n'a été observée avec ce composé (tableau V-4).

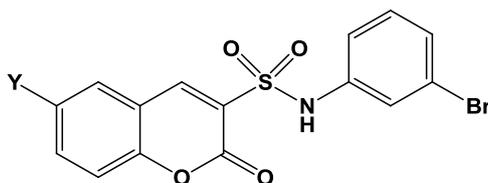
V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés



N°	Invasion (en % du contrôle)
<i>BB94</i>	11,9 ± 2,2
<i>IK9</i>	43,1 ± 7,5
18	111,4 ± 23,6

Tableau V-4 : Invasion des cellules HT1080 en présence de l'acide 6-acétoxyméthylcoumarine-3-carboxylique. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n=3).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la modulation de la fonction ester en position 3 du noyau coumarinique. Rappelons dans ce contexte que cette fonction a été précédemment remplacée par des fonctions amide et thioester, ce qui s'est traduit par une diminution importante de l'activité biologique [Kempen et al. 2008]. Dans le cadre du présent travail, nous avons décidé de remplacer l'ester par une fonction sulfonamide, en maintenant le groupement 6-acétoxyméthyle ou en remplaçant ce dernier par un groupement hydroxyméthyle. Le noyau benzénique quant à lui est substitué par un atome de brome en position 3. Les résultats en « chambres de Boyden » obtenus avec ces deux composés sont repris dans le tableau V-5.



N°	Y	Invasion (en % du contrôle)
BB94		11,9 ± 2,2
IK9		43,1 ± 7,5
66	CH ₂ OH	47,3 ± 11,0 **
67	CH ₂ OCOCH ₃	61,2 ± 6,4 *

Tableau V-5 : Invasion des cellules HT1080 en présence des coumarine-3-sulfonamides. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n=6 ; * : P<0,05 et ** : P<0,01).

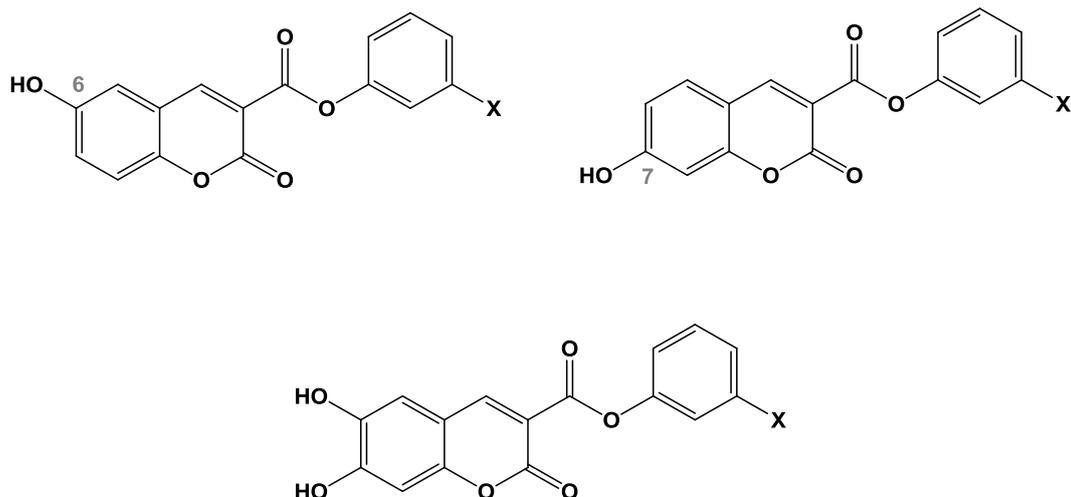
L'invasion résiduelle avec les molécules portant une fonction sulfonamide en position 3 est de 47% pour le dérivé 6-hydroxyméthyle (**66**) et de 61% pour le dérivé 6-acétoxyméthyle (**67**). Ces deux résultats sont donc du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec les analogues 6-hydroxyméthyles (**44**) et 6-méthylsulfonaminométhyles (**65**) correspondants. Mais contrairement à ces derniers, les composés **66** et **67** sont significativement plus solubles dans l'eau (cf. chapitre IV). Le composé **66** possède par ailleurs la particularité de ne plus avoir de fonction ester au sein de sa structure chimique (exception faite de la fonction lactone), ce qui se traduit par un gain substantiel de stabilité. En tenant compte à la fois de l'activité biologique, de l'hydrosolubilité et de la stabilité, l'intérêt des coumarine-3-sulfonamides hydroxyméthylées en position 6 en tant que successeurs potentiels de l'IK9 est dès lors indéniable.

Nous avons ensuite abordé une série de dérivés coumariniques hydroxylés en position 6 et/ou 7 du noyau coumarinique (tableau V-6). Une activité anti-invasive est observée dans les séries 6-hydroxy et 7-hydroxy, avec des différences assez importantes en fonction de la nature de l'halogène sur le noyau benzénique. Ainsi, le

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

dérivé non-halogéné est faiblement actif en série 6-hydroxy (**72**) et inactif en série 7-hydroxy (**83**). Le dérivé fluoré est inactif dans les deux séries (**74** et **85**), tandis que le dérivé bromé est peu actif en série 6-hydroxy (**80**) et moyennement actif en série 7-hydroxy (**91**). Par contre, les dérivés portant un atome de chlore en position *meta* montrent une inhibition importante d'environ 70% (30% d'invasion résiduelle), à la fois en série 6-hydroxy (**77**) et en série 7-hydroxy (**88**) et sont donc les molécules les plus actives dans cette famille. Lorsque les positions 6 et 7 sont hydroxylées toutes les deux (**94**), nous constatons l'absence d'un effet inhibiteur envers l'invasion tumorale, ce qui n'est cependant pas très significatif, puisque les dérivés monohydroxylés non halogénés **72** et **83** sont également peu actifs.

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés



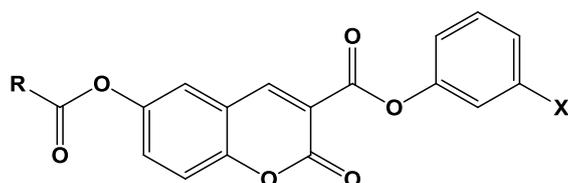
N°	X	position OH	Invasion (en % du contrôle)
<i>BB94</i>			11,9 ± 2,2
<i>IK9</i>			43,1 ± 7,5
72	H	6	72,4 ± 8,3
74	F	6	105,8 ± 1,8
77	Cl	6	31,0 ± 4,9 **
80	Br	6	74,8 ± 10,2
83	H	7	109,9 ± 19,0
85	F	7	123,0 ± 25,6
88	Cl	7	27,6 ± 9,9 *
91	Br	7	57,4 ± 17,9
94	H	6,7	124,4 ± 13,0

Tableau V-6 : Invasion des cellules HT1080 en présence des 6-hydroxycoumarines, des 7-hydroxycoumarines et des 6,7-dihydroxycoumarines. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n≥3 ; * : P<0,05 et ** : P<0,01).

Les dérivés 6-acyloxy, obtenus par acylation des 6-hydroxycoumarines se différencient des dérivés 6-acétoxyméthyles par l'absence de CH₂ entre le noyau coumarinique et la fonction ester en position 6. Ils représentent la dernière famille

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

que nous avons étudiée dans le modèle d'invasion tumorale (tableau V-7). Dans cette série, nous observons une diminution importante de l'activité par rapport à la série 6-acétoxyméthyle, se traduisant par une inactivité des dérivés **95** (X = H), **96** (X = F) et **98** (X = Cl) et par une inhibition moyenne avec 66% d'invasion résiduelle pour le dérivé bromé (**100**). Lorsque la chaîne acyle est allongée (dérivés **103** et **105**), nous observons une perte totale de cette activité inhibitrice.



N°	X	R	Invasion (en % du contrôle)
<i>BB94</i>			11,9 ± 2,2
<i>IK9</i>			43,1 ± 7,5
95	H	CH ₃	91,9 ± 5,9
96	F	CH ₃	88,1 ± 3,0
98	Cl	CH ₃	86,8 ± 9,9
100	Br	CH ₃	66,3 ± 7,6
103	Br	C ₂ H ₅	107,7 ± 4,0
105	Br	C ₃ H ₇	107,3 ± 4,8

Tableau V-7 : Invasion des cellules HT1080 en présence des 6-acyloxycoumarines. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (moyenne ± s.e.m. ; n=3).

Globalement, les expériences en « chambres de Boyden » nous permettent de tirer un certain nombre d'informations pertinentes concernant les relations structure-activité des différentes séries synthétisées (figure V-2).

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

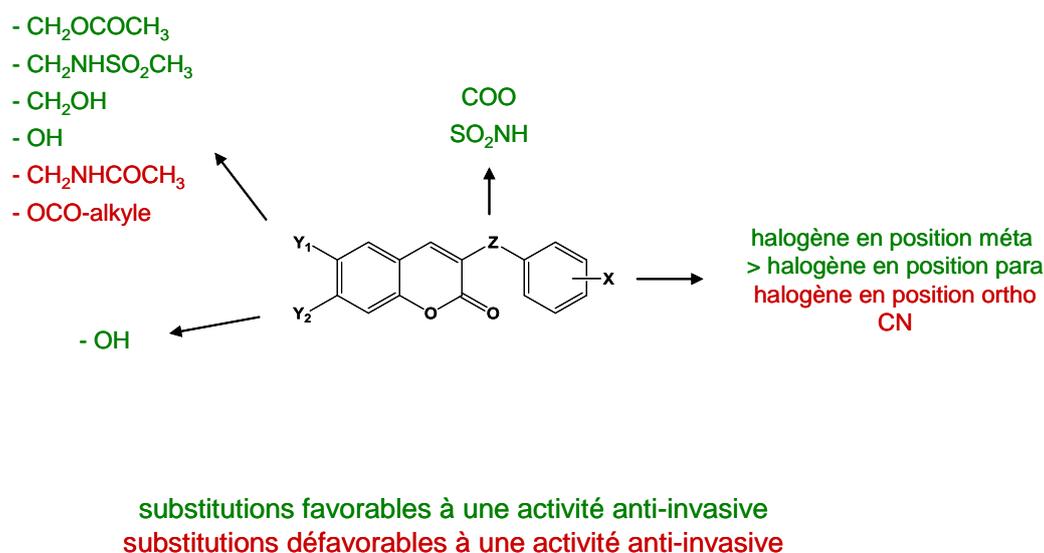


Figure V-2 : Aperçu des différentes pharmacomodulations favorables et défavorables à une activité anti-invasive

En ce qui concerne la position 6 du noyau coumarinique, trois substituants sont favorables à une bonne inhibition de l'invasion, à savoir les groupements acétoxyméthyle, hydroxyméthyle et méthylsulfonylaminométhyle, pour lesquels les activités sont sensiblement équivalentes. Le groupement acétamidométhyle quant à lui est responsable d'une perte quasi totale de l'activité.

Pour ce qui est de l'halogène sur le noyau benzénique, la position 3 (*meta*) prime sur la position 4 (*para*), alors que la position 2 (*ortho*) est peu favorable à une inhibition. Les résultats obtenus ne nous permettent cependant pas de tirer des conclusions pertinentes concernant la nature de l'halogène, même si l'atome de brome est généralement celui qui donne la meilleure activité. Ces éléments laissent donc penser que la position 3, en faisant abstraction de la nature de l'halogène, est à favoriser pour obtenir une bonne inhibition des capacités invasives des cellules dans notre modèle en « chambres de Boyden ».

Quant à la question de l'activité de l'IK9 éventuellement due à la présence de produits d'hydrolyse actifs, nous pouvons affirmer que la présence d'une fonction

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

ester en position 3 est importante, l'acide **18** étant inactif, alors que la fonction ester au sein du groupement en position 6 ne semble pas être indispensable, car les composés 6-hydroxyméthyles possèdent un pouvoir anti-invasif assez proche de celui de l'IK9.

Lorsque la fonction ester en position 3 est remplacée par une fonction sulfonamide, l'activité anti-invasive n'est pas significativement modifiée si la position 6 porte un groupement hydroxyméthyle (**44** vs. **66**). *A contrario*, une diminution d'activité est observée en série 6-acétoxyméthyle (IK9 vs. **67**).

Pour les séries 6- et 7-hydroxy, une inhibition voisine de celle de l'IK9 est obtenue avec les dérivés 3-chloro **77** et **88**, tandis que les autres dérivés sont nettement moins actifs (X = H ou Br) ou inactifs (X = F), ceci contrastant avec les familles précédentes où la nature de l'halogène semble non-déterminante selon nos résultats.

Enfin, le remplacement du groupement acétoxyméthyle en position 6 par un groupement acyloxy s'est révélé finalement peu intéressant, car des inhibitions inférieures à 10% sont obtenues avec la plupart des dérivés de cette famille.

Les relations structure-activité mises en évidence font donc ressortir plusieurs composés coumariniques (figure V-3) dont l'activité anti-invasive est équivalente à celle de l'IK9. En même temps, les substitutions favorables à une inhibition que nous avons pu dégager ont permis et devront permettre d'optimiser les paramètres de pharmacomodulation et constituent des éléments utiles en vue de maîtriser les problèmes de solubilité et d'hydrolyse potentiels.

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

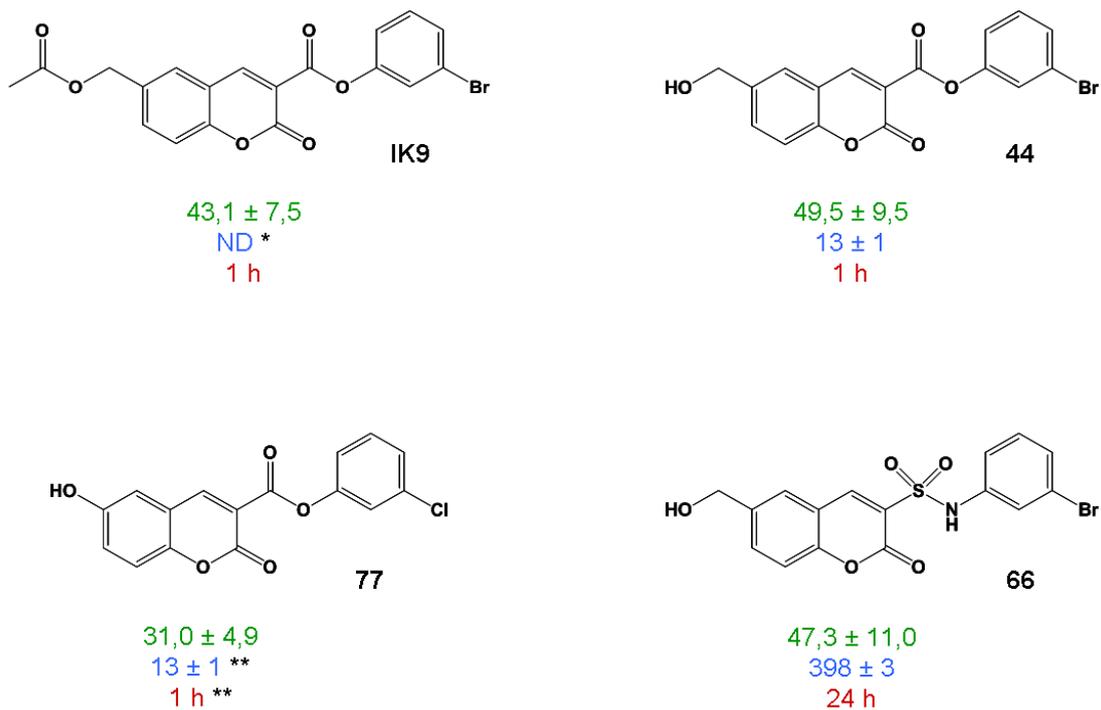


Figure V-3 : Principaux composés « chefs de file » du présent travail

Vert : invasion résiduelle (%) à 10 µM dans le modèle en « chambres de Boyden »

Bleu : solubilité (en µM) dans un tampon phosphate à pH7,4 (+ 5% de DMSO) à température ambiante

Rouge : temps de demi-vie estimé dans le MEM à 37°C

* non détectable ; ** données obtenues avec le dérivé 3'-Br (**80**)

V. Détermination du pouvoir anti-invasif des nouveaux dérivés coumariniques synthétisés

VI. CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE L'IK9

Dans l'introduction, nous avons déjà évoqué la problématique du mécanisme d'action mal défini, voire inconnu de l'IK9. Son développement était fondé sur l'idée de découvrir des composés susceptibles d'inhiber des protéases à sérine intervenant dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse, en vue de trouver des substances potentiellement anticancéreuses. L'IK9 est structuralement apparenté à des dérivés de l'acide coumarine-3-carboxylique possédant un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis de deux protéases à sérine (α -CT et HLE) [Pochet et al. 2004]. Mais, contrairement à ces composés, il n'inhibe pas l' α -CT et la HLE, ni d'autres protéases à sérine telles que l'urokinase (uPA) ou la plasmine [Kempen et al. 2003]. Cependant, l'IK9 s'est avéré être un inhibiteur puissant de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse. D'autres cibles potentielles ont été étudiées par le passé, notamment les métalloprotéases matricielles, les cyclo-oxygénases et les lipoxgénases, mais l'activité biologique de l'IK9 n'a pu être attribuée à une inhibition des MMPs 2 et 9, des COX-1 et -2 ou de la LOX-5 [Kempen 2005]. L'élucidation de la cible biologique serait cependant très utile pour le développement futur de l'IK9, que ce soit pour optimiser les relations structure-activité ou pour prédire d'éventuels effets indésirables. Dans le but de mieux comprendre son mode d'action éventuel, deux pistes prometteuses sont suivies dans le cadre de ce travail, en espérant créer des perspectives pour trouver un jour la cible moléculaire. Il s'agit d'une part de l'effet anti-angiogénique, où nous étudions l'action de l'IK9 envers les cellules endothéliales, et d'autre part des métalloprotéases matricielles (MMPs) 2 et 9, pour lesquelles nous essayons de mettre en évidence un éventuel effet de l'IK9 au niveau de leur expression, de leur sécrétion ou de leur activation. A cela s'ajoutent quelques expériences préliminaires sur différentes tyrosine kinases (récepteurs de type tyrosine kinase et MAPK).

VI.1. Étude de l'effet de l'IK9 au niveau des cellules endothéliales

L'effet anti-angiogénique de l'IK9 a été mis en évidence dans deux modèles différents, la néovascularisation d'anneaux aortiques de rats *ex vivo* et la néovascularisation choroïdale chez la souris *in vivo* [Hemmer et al. 2010]. Il s'agit là de modèles assez complexes impliquant les cellules endothéliales, mais également plusieurs types de cellules périvasculaires (cellules musculaires lisses, péricytes) participant au processus angiogénique. Les deux modèles reprennent avantageusement plusieurs étapes du processus angiogénique, notamment la prolifération, la migration ou l'organisation des cellules endothéliales. Il n'est dès lors pas possible, sur base des données disponibles, de prédire à quel niveau l'IK9 pourrait intervenir. Sachant que l'angiogenèse est considérée comme une invasion cellulaire contrôlée, on pourrait envisager un effet anti-invasif sur les cellules endothéliales, similaire à celui observé avec les cellules cancéreuses HT1080, sous le contrôle de mécanismes propres aux cellules endothéliales ou de facteurs en provenance des cellules périvasculaires, voire de la matrice extracellulaire. Des mécanismes alternatifs non liés à l'invasion endothéliale, comme par exemple la prolifération, l'apoptose ou l'adhésion, doivent être pris en considération également.

La stratégie que nous avons adoptée consiste à passer des modèles complexes utilisés auparavant à des modèles monocellulaires *in vitro*, recherchant individuellement différents paramètres liés à l'angiogenèse, en utilisant des cellules endothéliales de type HUVEC (angl. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

L'effet anti-invasif potentiel de l'IK9, ainsi que celui de son analogue chloré LP46 (dont le pouvoir anti-invasif envers les cellules HT1080 est semblable à celui de l'IK9, mais qui est peu actif sur l'angiogenèse) vis-à-vis des HUVEC a été déterminé dans un modèle en « chambres de Boyden » similaire à celui utilisé pour le criblage des nouveaux dérivés coumariniques. Comme lors du test précédemment décrit (pages 79-80), nous utilisons des inserts comportant un filtre poreux en polycarbonate recouvert de collagène de type IV. La migration des cellules se fait grâce à la présence d'un chémoattractant (FBS) dans le compartiment inférieur et d'un gradient de BSA. Les composés sont testés à une concentration de 10 μ M,

et les résultats sont comparés à ceux du BB94, utilisé à la même concentration. Du DMSO à 0,1% est utilisé comme véhicule.

Les résultats obtenus dans ce test de chémoinvasion (figure VI-1) n'ont cependant pu révéler un effet anti-invasif de l'IK9 ou du LP46 envers les cellules endothéliales, car les taux de migration en présence des composés sont identiques à ceux observés pour les contrôles. Il faut également noter que l'inhibition engendrée par le BB94 n'est que de 12% dans ce modèle.

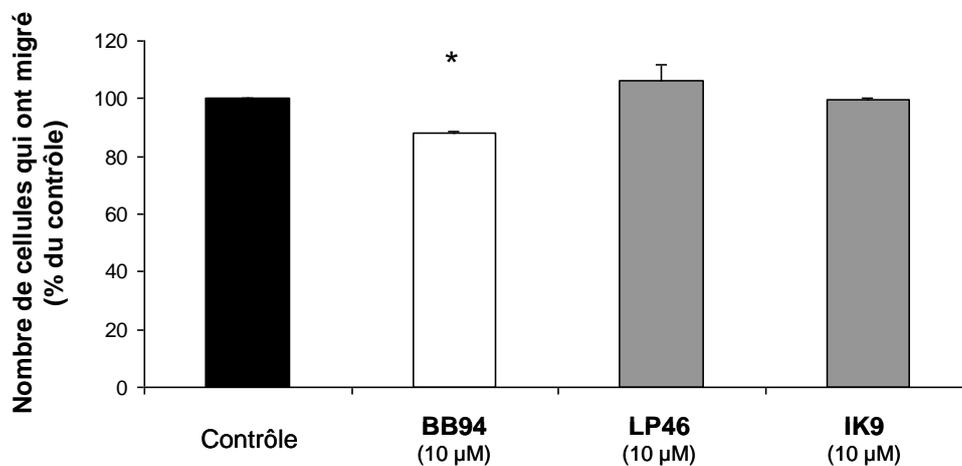
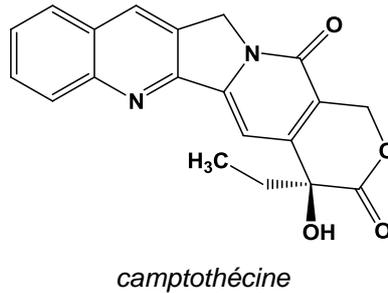


Figure VI-1 : Effet du LP46 et de l'IK9 sur l'invasion des cellules endothéliales de type HUVEC à travers une couche de collagène IV. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; * P<0.05).

Il nous a également semblé utile de déterminer l'effet du LP46 et de l'IK9 sur la croissance des cellules endothéliales. Ceci a été étudié en incubant des HUVEC pendant 72 heures en présence des composés à tester (10 µM). Comme référence, nous utilisons la camptothécine (CPT), qui est un alcaloïde bloquant la prolifération cellulaire en inhibant de manière irréversible la topoisomérase I [Pommier 1998].

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9



Le nombre de cellules dans les différentes conditions testées est mesuré après 0, 24, 48 et 72 heures d'incubation en utilisant un kit CyQuant[®] (figure VI-2). Aux différents temps de mesure, les cellules sont congelées à -70°C. Au moment de l'analyse, l'ensemble des échantillons à tester est décongelé, puis les cellules sont lysées et additionnées d'un marqueur fluorescent qui se fixe à l'ADN libéré lors de la lyse cellulaire. La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques et le nombre de cellules dans chaque puits est déterminé en utilisant une droite d'étalonnage préalablement établie.

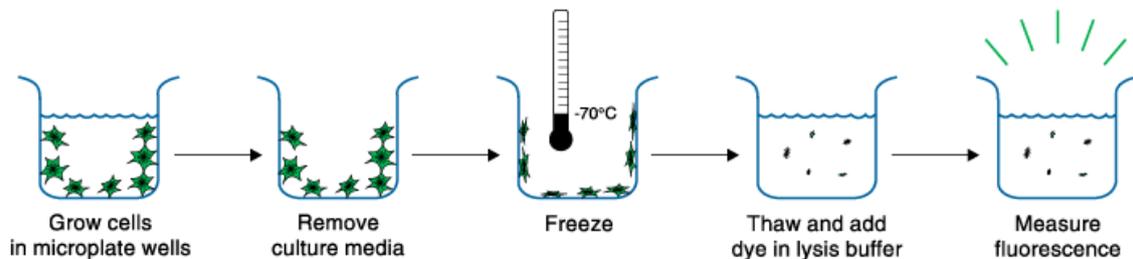


Figure VI-2 : Principe du kit CyQuant[®] utilisé pour étudier la prolifération des cellules endothéliales (Invitrogen)

Les résultats obtenus dans cet essai de prolifération (figure VI-3) indiquent, d'une part, que les HUVEC ne prolifèrent quasiment pas en présence de camptothécine (0,1 μM), et que, d'autre part, le LP46 et l'IK9 à 10 μM n'inhibent pas la croissance des cellules endothéliales, les profils obtenus étant semblables à celui du contrôle.

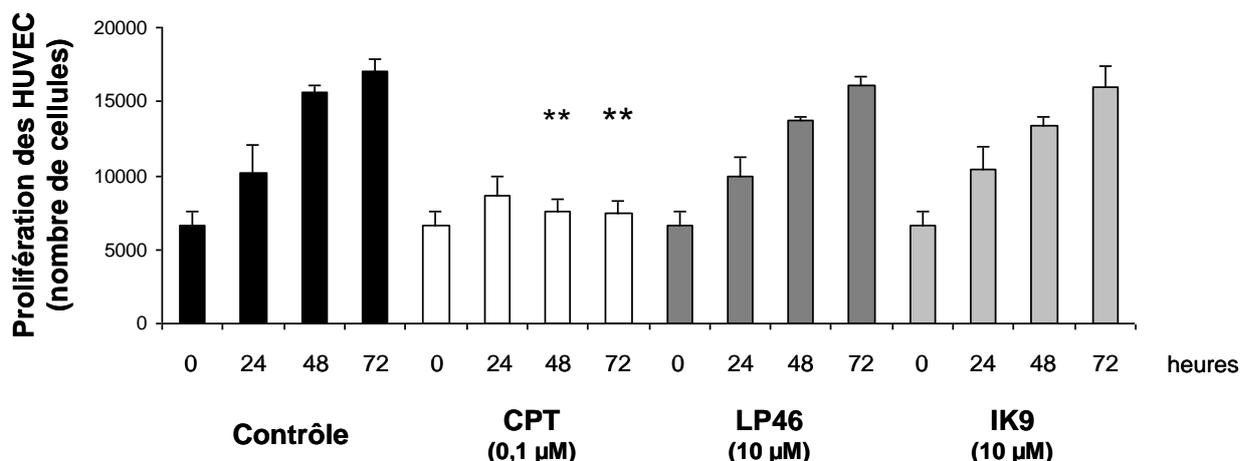


Figure VI-3 : Effet du LP46 et de l'IK9 sur la prolifération des cellules endothéliales de type HUVEC.

Les résultats sont exprimés en nombres de cellules après 0, 24, 48 et 72 heures de traitement (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; ** P<0.01)

En complément aux expériences de prolifération, nous avons vérifié que le LP46 et l'IK9 n'induisent pas une apoptose des cellules endothéliales.

L'apoptose est caractérisée par différents changements morphologiques et structuraux, ce qui permet de distinguer les cellules apoptotiques des cellules viables. Les résidus phosphatidylsérines (PS), masqués dans la membrane plasmique chez la cellule saine, s'externalisent à la surface cellulaire et sont détectables par l'annexine V. Il s'agit d'une protéine qui, en présence de Ca^{2+} , se fixe de manière spécifique aux PS. Lors de l'avancement du processus apoptotique, l'intégrité de la membrane plasmique se perd et les cellules deviennent perméables aux marqueurs de l'ADN tels que la 7-aminoactinomycine (7-AAD) ou l'iodure de propidium (PI - angl. *Propidium Iodide*). L'utilisation conjointe d'annexine V et de PI permet ainsi de distinguer entre cellules viables (non marquées par l'annexine et le PI), cellules en apoptose précoce (marquées par l'annexine V), cellules en apoptose tardive (marquées par l'annexine V et le PI) et cellules nécrotiques (marquées par le PI) [Vermes et al. 1995; Van den Eijnde et al. 1997].

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

Lors de nos expériences, les cellules endothéliales de type HUVEC sont incubées pendant 48 heures en présence d'un des composés à tester (10 μ M) ou de camptothécine (0,1 μ M), puis marquées par l'annexine V-FITC (voir ci-dessous) et le PI et finalement analysées par cytométrie de flux. Après une exposition à un rayonnement laser (488 nm), la fluorescence émise par les cellules marquées est mesurée grâce à un système de filtres. Pour être détectable au sein du cytomètre, l'annexine V est couplée à un fluorochrome, le FITC (angl. *Fluorescein IsoThioCyanate*), tandis que le PI est fluorescent par lui-même. Lors de l'analyse, les fluorescences émises par les deux marqueurs sont enregistrées par des canaux différents (le FITC par FL1 et le PI par FL3) et le résultat se présente sous forme d'un graphique (figure VI-4) sur lequel la réponse de FL1 est représentée en abscisse (quadrant A : cellules non marquées par l'annexine V-FITC ; quadrant B : cellules marquées par l'annexine V-FITC) et la réponse de FL3 en ordonnée (quadrant A : cellules non marquées par le PI ; quadrant C : cellules marquées par le PI). Le quadrant D reprend dès lors les cellules positives pour les deux marqueurs. Le comptage (à l'aide du logiciel WinMDI) du nombre de cellules au sein des différents quadrants nous permet de déterminer les proportions de cellules viables (A), apoptotiques (B : apoptose précoce et D : apoptose tardive) et nécrotiques (C).

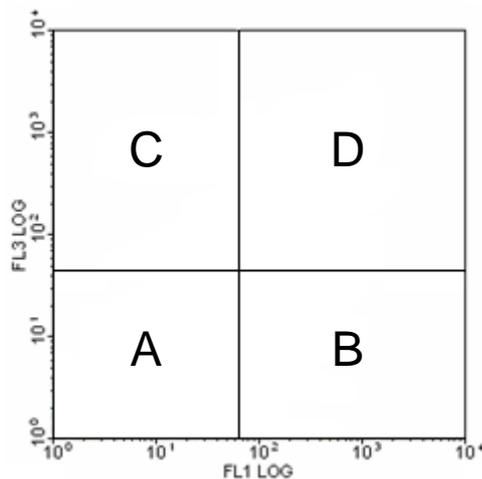


Figure VI-4 : Type de graphique utilisé pour distinguer entre cellules non marquées et cellules marquées par l'annexine V-FITC et/ou le PI.

quadrant A : cellules non marquées ; *quadrant B :* cellules marquées par l'annexine V-FITC ;
quadrant C : cellules marquées par l'annexine V-FITC et le PI ; *quadrant D :* cellules marquées par le

PI

Les résultats montrent que deux tiers des cellules cultivées en conditions contrôle sont viables, qu'environ un tiers des cellules sont apoptotiques et que la proportion de cellules nécrotiques est négligeable (figure VI-5a). Lors du traitement par la camptothécine, les taux de cellules apoptotiques et nécrotiques passent respectivement à 60% et à 20% (figure VI-5b). Avec le LP46 et l'IK9, nous obtenons des profils similaires à celui des conditions contrôle (figure VI-5c et figure VI-5d). Les taux de fixation individuels de l'annexine V-FITC et du PI dans les différentes conditions (figure VI-6) confirment ce résultat ce qui signifie que les deux molécules testées n'induisent pas l'apoptose ou la nécrose des cellules endothéliales.

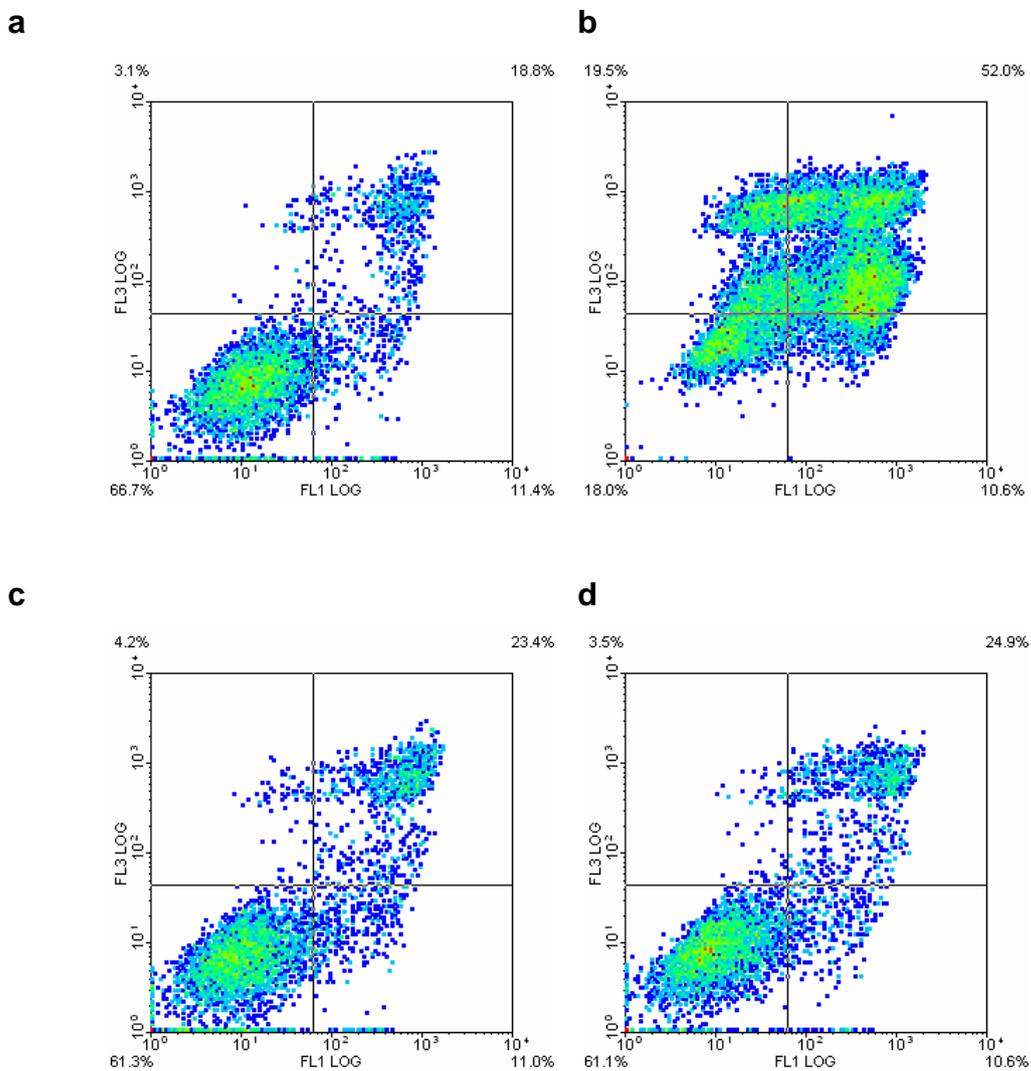


Figure VI-5 : Distribution des cellules endothéliales en cytométrie de flux, en fonction du marquage à l'annexine V-FITC et au PI ; (a) contrôle, (b) CPT à 0,1 µM, (c) LP46 à 10 µM et (d) IK9 à 10 µM.

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

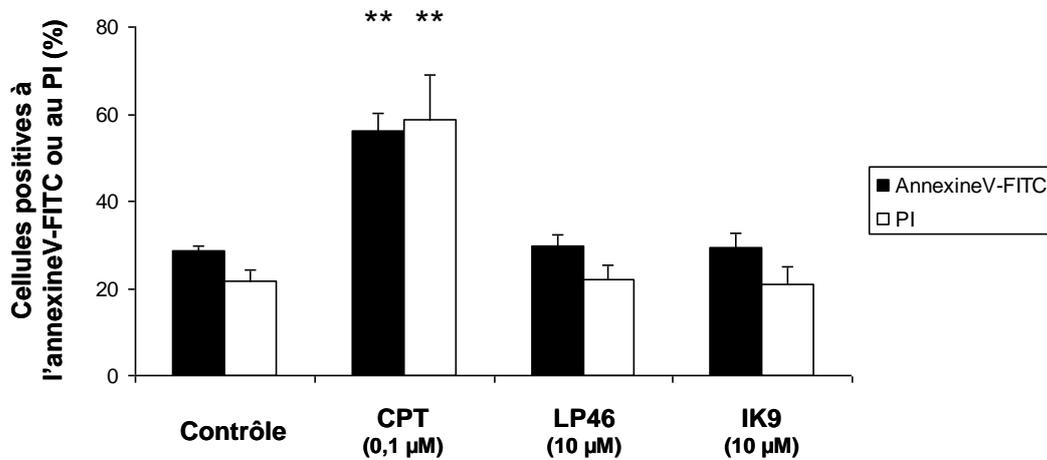


Figure VI-6 : Effet du LP46 et de l'IK9 sur les taux de fixation de l'annexine V-FITC et du PI aux cellules endothéliales. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentages de cellules positives à l'annexine V-FITC et au PI (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; ** P<0.01)

Les différentes expériences concernant les cellules endothéliales ont bien montré que l'IK9 n'a aucun impact sur leur invasion et leur croissance dans des monocultures de type HUVEC, indiquant que l'activité anti-angiogénique de l'IK9 n'est vraisemblablement pas due à une action directe sur les cellules endothéliales. Cette dichotomie apparente entre l'absence d'effets sur les cellules endothéliales isolées et l'activité importante sur les anneaux d'aorte de rat ou la néovascularisation choroïdale chez la souris peut trouver plusieurs explications. Nos observations soulignent clairement l'importance de l'environnement matriciel des cellules endothéliales [Iivanainen et al. 2003; Sottile 2004; Hynes 2007] au sein duquel l'IK9 pourrait interférer avec la synthèse ou la libération de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Alternativement, la possibilité d'un effet indirect sur les cellules endothéliales par interaction avec des cellules périvasculaires [Armulik et al. 2005], présentes dans les modèles *ex vivo* et *in vivo* mais absentes dans les monocultures de cellules endothéliales, est concevable.

VI.2. Étude de l'effet de l'IK9 au niveau de l'expression, de la sécrétion et de l'activation des MMPs 2 et 9

L'idée d'étudier l'effet de l'IK9 sur l'expression, la sécrétion et l'activation des MMPs 2 et 9 repose sur plusieurs arguments factuels.

Tout d'abord, de nombreuses MMPs sont impliquées dans les phénomènes de dégradation de matrice extracellulaire, notamment au niveau de l'invasion des cellules tumorales, le développement de métastases et l'angiogenèse. Le rôle des MMPs 2 et 9 dans ce contexte a été largement étudié [Itoh et al. 1998; John & Tuszynski 2001; Klein et al. 2004; Mook et al. 2004]. Il a ainsi été montré que le potentiel métastatique de nombreux cancers est corrélé à une surexpression de ces deux gélatinases par les cellules tumorales, les cellules du stroma ou les cellules endothéliales. Les MMPs 2 et 9 sont en particulier responsables de la dégradation du collagène de type IV, qui est la composante principale des membranes basales, ce qui fait de ces deux protéases des acteurs de première importance lors de la dissémination des cellules tumorales.

Dans le test de chémoinvasion en « chambres de Boyden » que nous avons choisi pour le criblage des nouveaux dérivés coumariniques, les filtres des inserts sont recouverts de collagène IV, en utilisant des cellules HT1080 de fibrosarcome humain. La dégradation de cette couche de collagène, requise pour le passage des cellules à travers le filtre, serait dès lors dépendante de l'activité des MMPs 2 et 9 sécrétées par les cellules de fibrosarcome.

Tous ces éléments indiquent une potentielle implication des MMPs 2 et 9 dans le mécanisme d'action de l'IK9. Mais, comme nous l'avons déjà évoqué au début de ce chapitre, il n'agit pas comme inhibiteur direct de l'activité protéolytique des deux enzymes [Kempen et al. 2003] et on peut dès lors penser à un effet indirect qui pourrait se situer au niveau de l'expression, de la sécrétion ou de l'activation.

Expression

Nous avons dans un premier temps déterminé l'impact de l'IK9 sur la production de l'ARNm des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080. Pour cela, des cellules HT1080 sont incubées pendant 48 heures en présence de l'IK9 (1 et 10 μ M) ou du véhicule (0,1% de DMSO). L'ARN total des cellules traitées est ensuite extrait et transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse. L'ADNc ainsi synthétisé est soumis à la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR - angl. *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) en présence des amorces sens et réverse de la β -actine (étalon interne), de la MMP-2 et de la MMP-9.

Les résultats sont obtenus par la méthode des cycles seuils ($\Delta\Delta$ Ct). Les valeurs Ct (angl. *Cycle threshold*) mesurées pendant la PCR correspondent au nombre de cycles de réplication nécessaires pour synthétiser une quantité prédéfinie d'ADN. Il s'agit d'une quantification relative lors de laquelle l'expression du gène étudié (MMP) est normalisée à celle d'un gène de référence (la β -actine dans notre cas) en soustrayant pour chaque condition testée le Ct de la β -actine du Ct de la MMP pour obtenir un Δ Ct. Nous calculons ensuite la différence entre le Δ Ct obtenu avec le véhicule (contrôle) et le Δ Ct obtenu avec une condition testée (traitement), ce qui nous donne une valeur $\Delta\Delta$ Ct. Nous élevons finalement 2 à la puissance $\Delta\Delta$ Ct, ce qui représente le ratio d'expression du traitement par rapport au contrôle ($2^{\Delta\Delta$ Ct}).

En résumé :

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{MMP}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actine}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{contrôle}} - \Delta\text{Ct}_{\text{traitement}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Une valeur de $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ égale à 1 ($\Delta\Delta\text{Ct} = 0$) signifie dès lors que la quantité d'ARNm est identique pour le contrôle et pour la condition testée. Lorsque le traitement engendre une diminution de la quantité d'ARNm, $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ est inférieur à 1.

L'effet de l'IK9 sur l'expression d'ARNm des MMPs 2 et 9 est représenté à la figure VI-7.

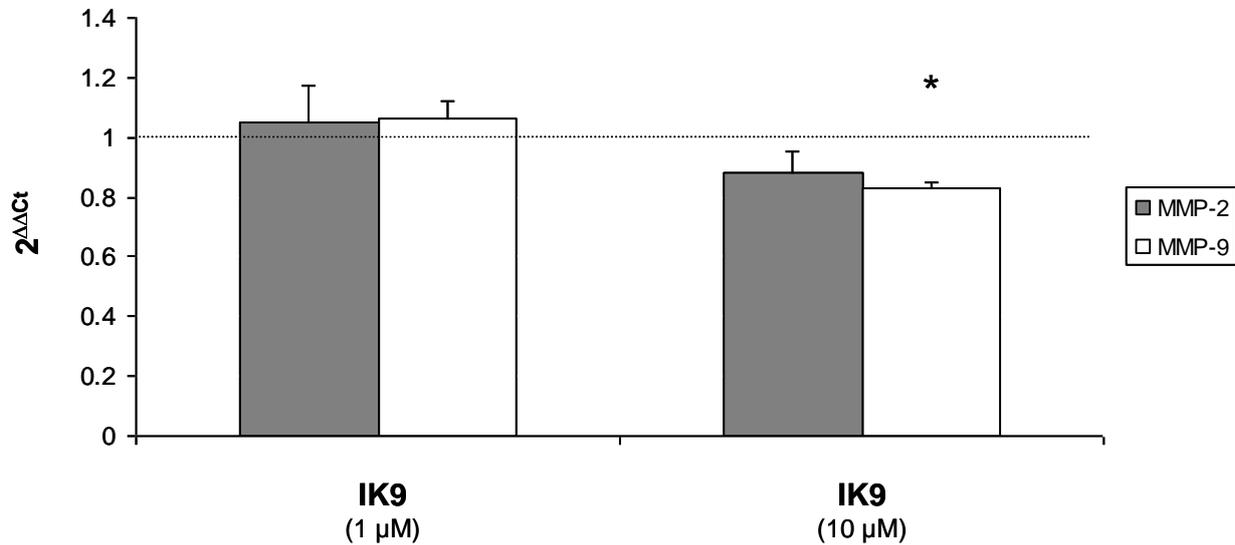


Figure VI-7 : Effet de l'IK9 (à 1 et 10 μ M) sur l'expression d'ARNm des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080. Les résultats sont exprimés en $2^{\Delta\Delta Ct}$ (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; * P<0.05)

Les résultats de la qRT-PCR montrent que l'IK9, à une concentration de 1 μ M, ne modifie pas la quantité d'ARNm des MMPs 2 et 9. A la concentration de 10 μ M, une diminution significative d'environ 20% est observée pour l'ARNm de la MMP-9. Mais cet effet mineur au niveau de l'expression de la MMP-9 doit être considéré comme une contribution marginale, car il ne permet pas d'expliquer pleinement les effets anti-invasifs et anti-angiogéniques importants de l'IK9.

Sécrétion et activité

La sécrétion des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080 de fibrosarcome humain est étudiée en quantifiant les deux protéases dans le surnageant conditionné au moyen de kits ELISA de type « sandwich » (figure VI-8). La surface des puits est greffée d'anticorps d'origine murine spécifiques de la MMP-2 ou de la MMP-9

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

humaines sur lesquels se fixent les MMPs présentes dans les échantillons à analyser. Les puits sont lavés et on y additionne un deuxième anticorps anti-MMP qui est couplé à la biotine. Après un lavage supplémentaire, on ajoute la peroxydase de raifort (HRP, angl. *HorseRadish Peroxydase*) couplée à la streptavidine, qui est une protéine tétramérique d'origine bactérienne possédant une affinité très élevée pour la biotine. La 3,3',5,5'- tétraméthylbenzidine (TMB) ajoutée à la fin est un substrat chromogène de la HRP : il se transforme en produit coloré permettant une quantification par spectrophotométrie. Des courbes standard réalisées à partir d'échantillons de concentration connue des protéines en question permettent de convertir les absorbances mesurées en concentrations.

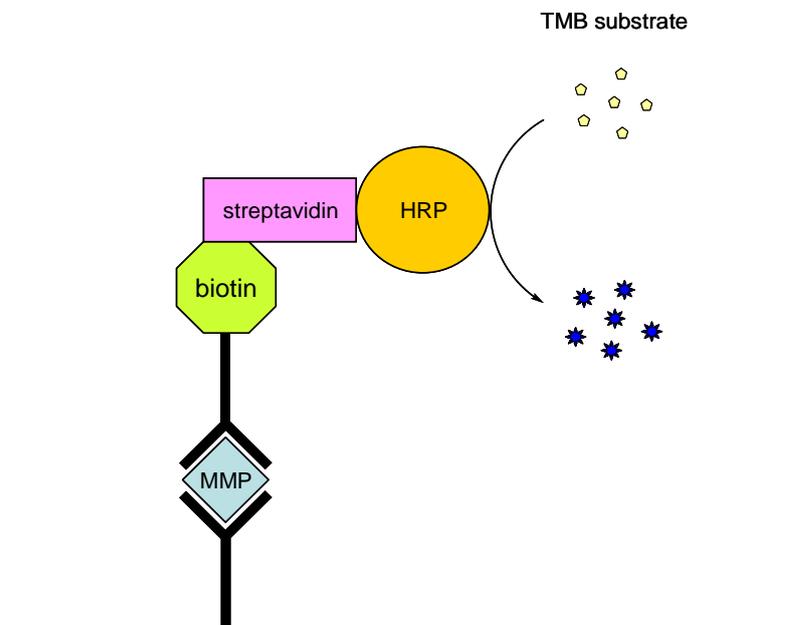
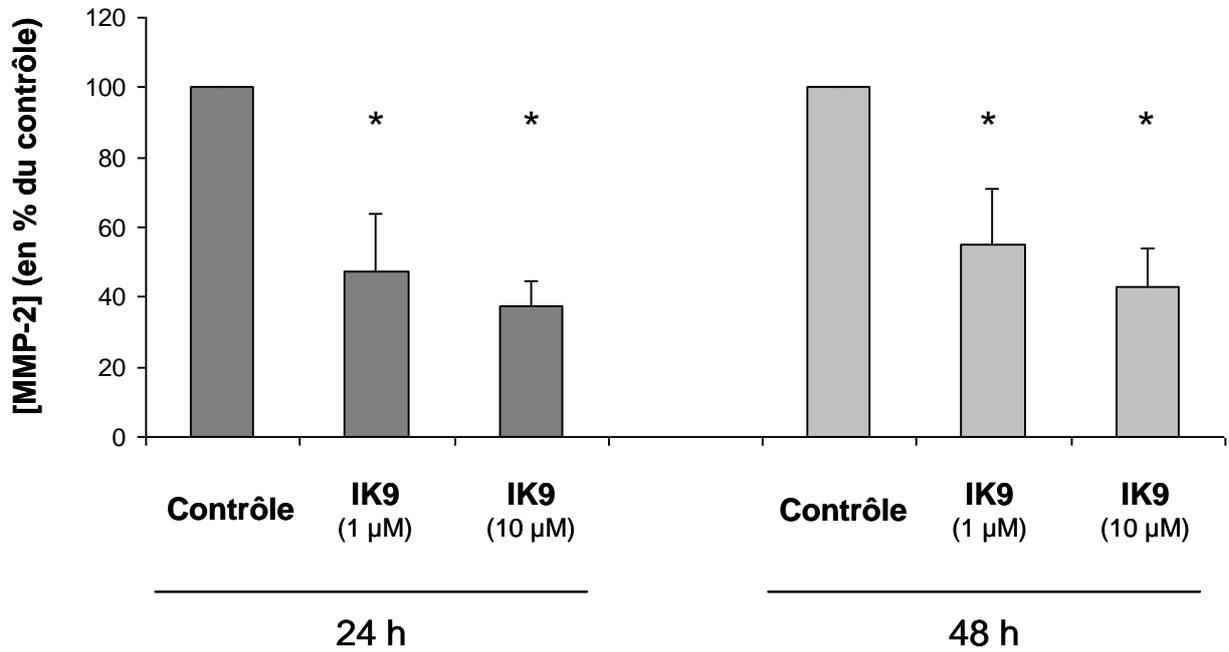


Figure VI-8 : Principe du dosage ELISA utilisé pour étudier la sécrétion des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080

Le dosage des MMPs 2 et 9 est effectué dans du surnageant provenant de cellules HT1080 incubées pendant 24 ou 48 heures en présence de l'IK9 (1 et 10 μM) ou du véhicule (0,1% DMSO). Les résultats obtenus respectivement pour la MMP-2 et la MMP-9 sont représentés dans la figure VI-9.

A



B

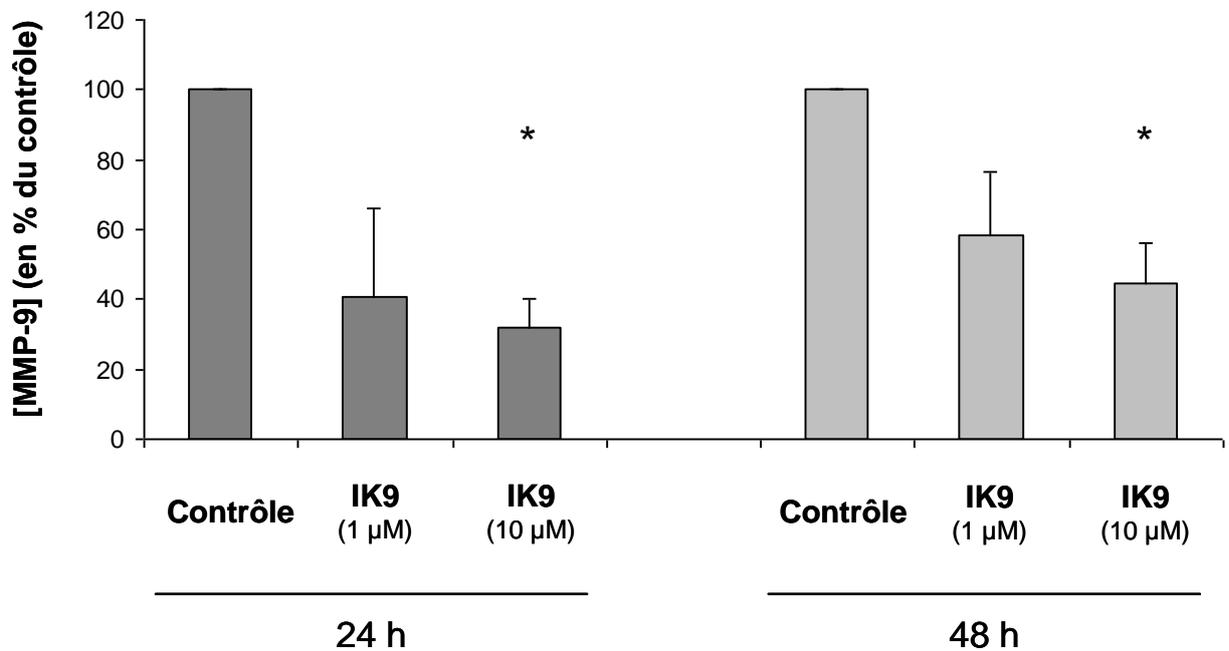


Figure VI-9 : Concentrations de MMP-2 (A) et de MMP-9 (B) dans les surnageants de cellules HT1080 traitées par l'IK9 pendant 24 ou 48 heures, mesurées par dosage ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; * P<0.05)

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

Les résultats de la quantification par ELISA montrent que la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 par les cellules HT1080 est considérablement réduite en présence de l'IK9, aussi bien à 1 μM qu'à 10 μM , sans différence significative entre les deux concentrations. Il faut remarquer que, dans ce test, la distinction entre les proMMPs, les MMPs actives et les complexes MMP-TIMP n'est pas possible. Nous n'obtenons donc pas de renseignement précis quant à la conversion des proMMPs en MMPs actives, ce qui nous a incités à faire des expériences de zymographie en complément aux tests ELISA.

La zymographie correspond à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), lors de laquelle l'activité protéolytique d'une protéase est détectée grâce à l'incorporation d'un substrat spécifique. Dans le cas des MMPs 2 et 9, il s'agit respectivement de la gélatine A (extraite de tête de porc) et de la gélatine B (extraite de tête de bovin). Après la séparation électrophorétique, le SDS est éliminé par échange avec du Triton X-100 ce qui permet la renaturation des protéines. La coloration du zymogramme par du bleu de Coomassie fait apparaître les endroits de digestion du substrat sous forme de bandes claires dont l'intensité est proportionnelle à l'activité gélatinolytique présente dans l'échantillon testé.

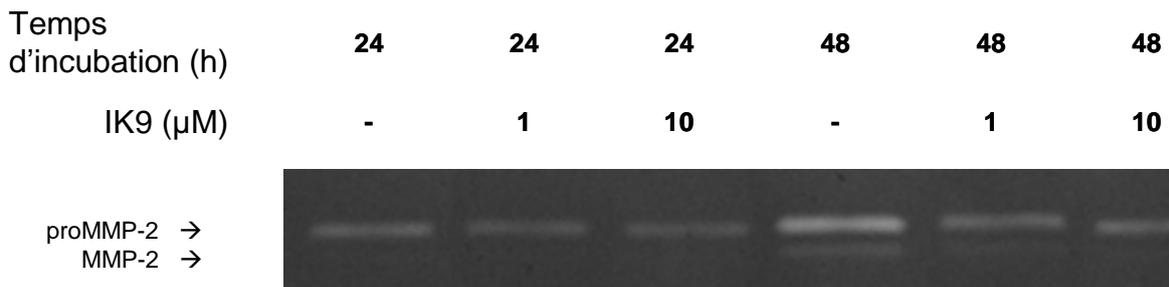
Notons que lors d'une expérience de zymographie, on observe une activité protéolytique des proMMPs, pourtant inactives *in vivo*. Ceci est le résultat des différents traitements de dénaturation et de renaturation subis par les protéines au cours de l'expérience. En utilisant le terme « activité proMMP » dans la suite de l'exposé, nous faisons donc référence à ce phénomène technique classique, observable lors des expériences de zymographie.

Nous avons effectué les zymographies en utilisant des surnageants provenant de cellules HT1080 traités par l'IK9 (1 et 10 μM) ou le véhicule (0,1% DMSO) pendant 24 ou 48 heures. Les zymogrammes obtenus (exemples : figure VI-10) révèlent tout d'abord que les deux MMPs étudiées sont majoritairement présentes sous leur forme proMMP. La MMP-2 active est détectable en faible quantité tandis

que la MMP-9 active se trouve en dessous du seuil de détectabilité. Aucune forme MMP-TIMP n'est visible dans les conditions utilisées.

En ce qui concerne l'intensité des bandes proMMP-2 et proMMP-9 dans les différentes conditions étudiées, une nette augmentation au cours du temps des deux MMPs est visible en conditions contrôle. Après 24 heures en présence de l'IK9, l'activité proMMP-2 semble être légèrement diminuée, tandis que la proMMP-9, déjà très faible en conditions contrôle, disparaît quasiment. Une diminution visible de l'activité proMMP-2 est observée après 48 heures en présence de l'IK9. Dans les mêmes conditions, nous remarquons une réduction importante de l'activité proMMP-9. Une différence d'effet entre les deux concentrations utilisées pour l'IK9 n'est pas détectable sur les zymogrammes.

A



B



Figure VI-10 : Exemples de zymogrammes obtenus à partir de surnageants de cellules HT1080 traitées par l'IK9 pendant 24 ou 48 heures, indiquant (A) l'activité proMMP-2/MMP-2 et (B) l'activité proMMP-9.

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

La quantification de l'activité enzymatique sur les gels par analyse densitométrique nous permet d'avoir une idée précise quant à l'effet de l'IK9 sur l'activité des MMPs 2 et 9 sécrétées par les cellules HT1080. Les valeurs, mesurées sous forme de densité optique intégrée (DOI), sont normalisées à celles du contrôle du temps de mesure correspondant (24 ou 48 h).

En présence de l'IK9, l'activité proMMP-2 est réduite d'environ 30% dès 24 heures d'incubation et aux deux concentrations testées (figure VI-11). Un profil similaire est observé après 48 heures, avec approximativement 60% d'activité résiduelle à 10 μ M. Des bandes correspondant à la forme MMP-2 sont visibles sur les zymogrammes, mais leur intensité est tellement faible qu'une quantification n'est pas possible.

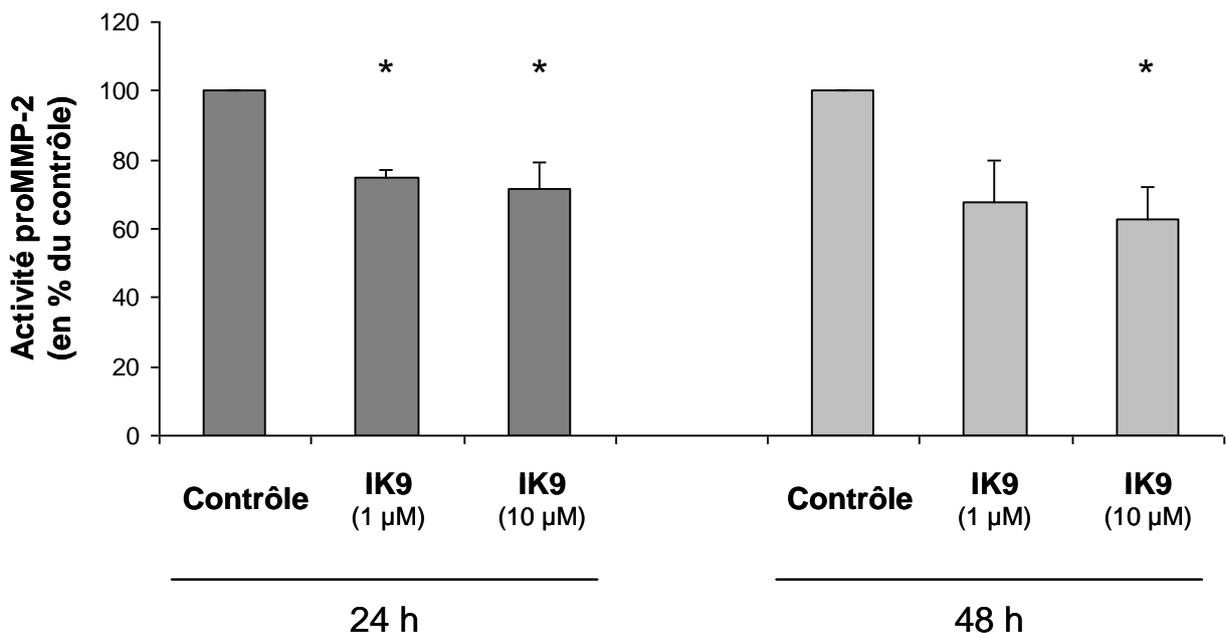


Figure VI-11 : Activité proMMP-2 dans le surnageant de cellules HT1080 traitées par l'IK9 pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; * P<0.05)

Les activités proMMP-9 après 24 heures d'incubation doivent être considérées avec précaution, l'intensité des bandes étant très faible. Une diminution apparente

est néanmoins observée en présence de l'IK9, du moins à 10 μ M. Après 48 heures, une diminution importante de presque 60% est mesurée avec l'IK9 à 10 μ M (figure VI-12). Une activité MMP-9 est indétectable par cette technique, que ce soit après 24 ou 48 heures.

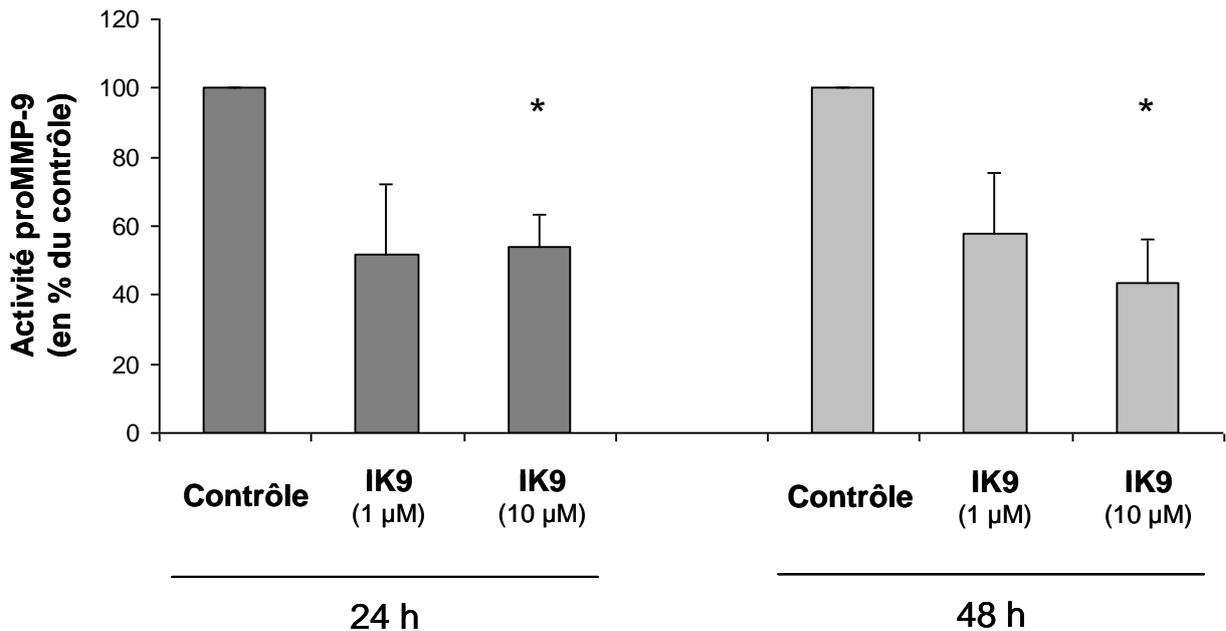


Figure VI-12 : Activité proMMP- 9 dans le surnageant de cellules HT1080 traitées par l'IK9 pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (moyenne \pm s.e.m. ; n=3 ; * P<0.05)

Les expériences d'ELISA et de zymographie ont montré que les activités protéolytiques des métalloprotéases 2 et 9 dans les surnageants provenant de cellules HT1080 traitées par l'IK9 sont significativement diminuées. Pour autant, l'absence d'effets majeurs au niveau des taux d'ARNm des deux protéases indique que l'IK9 agit sur la sécrétion plutôt que sur l'expression, suggérant une inhibition au niveau de mécanismes post-transcriptionnels. Étant donné la grande importance des MMP-2 et -9 lors de l'invasion et de l'angiogenèse en général et dans notre modèle en « chambres de Boyden » en particulier (utilisation de collagène IV dont la dégradation requiert la présence des deux MMPs), cette réduction de la sécrétion

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

que nous avons mise en évidence constitue certainement un élément de réponse substantiel permettant d'expliquer le mécanisme d'action de l'IK9. Ce résultat nous permettra en même temps d'orienter les investigations futures en ciblant plus spécifiquement les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion des deux MMPs. Ainsi, différentes études ont démontré que les proMMPs 2 et 9 sont stockées dans des vésicules cytoplasmiques dont le contenu est déversé dans le milieu extracellulaire en réponse à des stimuli particuliers, comme par exemple par le FGF-2 ou le VEGF [Ginestra et al. 1997; Taraboletti et al. 2002]. D'autres travaux suggèrent un rôle important de protéine kinases de type sérine/thréonine en se basant sur le fait qu'une modification de la sécrétion de la proMMP-9 indépendante de l'expression en ARNm peut être obtenue par des activateurs ou des inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) [Smolian et al. 2001; Annabi et al. 2005]. Lorsque l'on s'intéresse à la régulation des MMPs 2 et 9, les MAPK (angl. *Mitogen-Activated Protein Kinases*), acteurs de la transduction intracellulaire en réponse à divers stimuli en provenance de récepteurs membranaires, sont inévitables. Leur implication dans l'expression des deux protéases est bien établie à l'heure actuelle [Chakraborti et al. 2003]. De plus, certaines données rencontrées dans la littérature indiquent un rôle des MAPK (ERK, p38, ...) dans la sécrétion des MMPs à partir des vésicules cytoplasmiques [Langlois et al. 2009].

VI.3. Étude préliminaire de l'effet de l'IK9 au niveau des récepteurs de type tyrosine kinase et des MAPK

Les récepteurs de type tyrosine kinase (RTKs - angl. *Receptor Tyrosine Kinases*) sont des récepteurs transmembranaires de différents facteurs de croissance, cytokines ou hormones. Ils sont constitués d'une partie extracellulaire N-terminale qui constitue le site de fixation du ligand. Leur partie cytoplasmique (figure VI-13) renferme des résidus tyrosine et un domaine kinase. Après la fixation du ligand, le domaine kinase est activé soit par auto-activation soit par des kinases associées (p.ex. src kinase), ce qui permet la phosphorylation des résidus tyrosines. Ceux-ci représentent des sites de fixation pour des résidus SH₂ des molécules

adaptatrices (Shc, Gab1, Grb, ...) de différentes voies de signalisation telles que Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt ou PLC/PKC/MAPK.

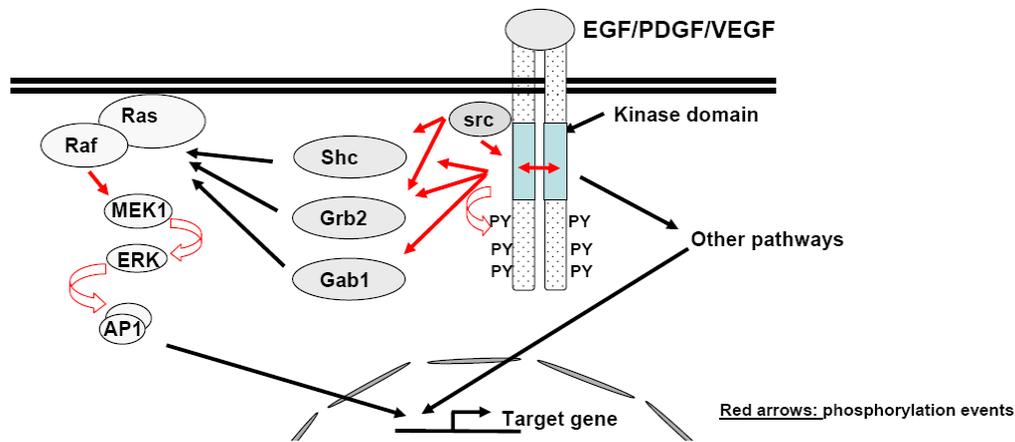


Figure VI-13 : Représentation simplifiée de la transduction intracellulaire des récepteurs de type tyrosine kinase (d'après C. Haan, Université du Luxembourg)

Une des voies de signalisation les mieux connues est celle des MAPK (figure VI-14). Il s'agit d'un système extrêmement complexe regroupant un grand nombre de composantes protéiques. De manière simplifiée, les MAPK sont subdivisées en trois familles, les ERK (angl. *Extracellular signal-Related Kinases*), les p38 MAPK et les JNK (angl. *c-Jun N-terminal Kinases*). Il s'agit de tyrosine kinases organisées en cascade (souvent trois kinases en série → MAPKKK-MAPKK-MAPK) en aval du récepteur, effectuant des phosphorylations successives pour finalement réguler des facteurs de transcription au sein du noyau cellulaire [McCubrey et al. 2007]. Les MAPK interviennent dans de nombreux processus cellulaires, notamment la différenciation, la prolifération, la migration ou l'apoptose.

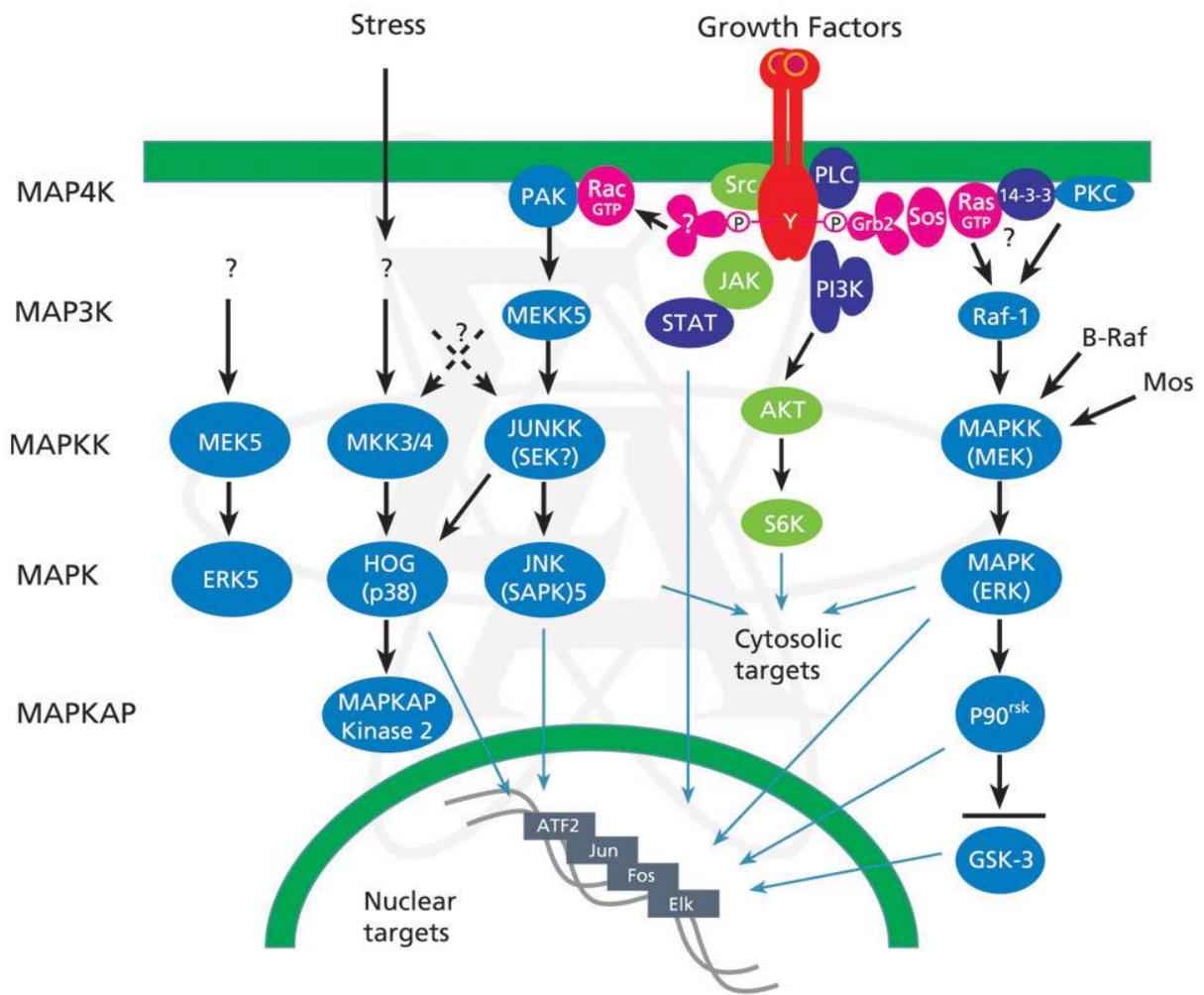
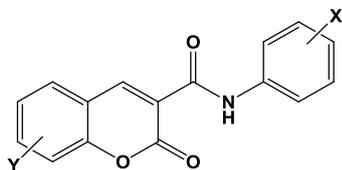


Figure VI-14 : Voies de signalisation intracellulaire de la famille des MAPK (Sigma-Aldrich)

Un grand nombre d'affections cancéreuses est caractérisé par un dysfonctionnement au niveau d'un ou plusieurs récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs de l'EGF (angl. *Epidermal Growth Factor*), du PDGF (angl. *Platelet-Derived Growth Factor*) ou de l'IGF (angl. *Insulin-like Growth Factor*) n'étant que quelques exemples de récepteurs susceptibles de fonctionner de manière aberrante [Ostman 2004; Ranson 2004; Rowinsky 2004; Bianco et al. 2007; Andrae et al. 2008]. De même, les implications des MAPK dans les phénomènes cancéreux, dont l'invasion, sont nombreuses. Il faut également mentionner le rôle du VEGF lors de l'angiogenèse. Les RTKs et les MAPK représentent donc des cibles intéressantes en vue du développement de médicaments anticancéreux et

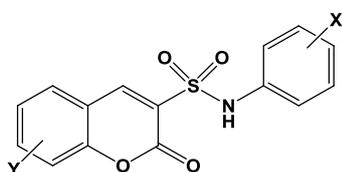
différentes substances, dont des coumarines (figure VI-15), visant ce type de mécanisme ont été investigués.



X = Cl, Br, I, NH₂, NO₂

Y = H, Cl, Br, OEt

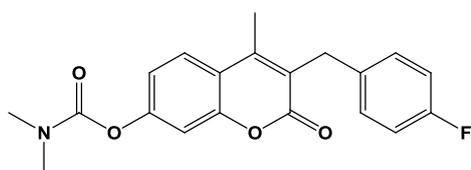
Inhibiteurs de HER-2 et de ERK1 [Reddy et al. 2005]



X = F, Br, OH, OMe, NH₂

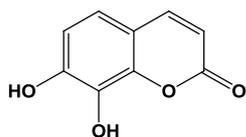
Y = Cl, Br, OMe, OEt

Activateurs de JNK1 [Reddy et al. 2004]



G8935

Inhibiteur allostérique de MEK1 [Han et al. 2005]



daphnétiline

Inhibiteur intracellulaire de l'EGFR, PKA et PKC [Yang et al. 1999]

Figure VI-15 : Exemples d'inhibiteurs coumariniques de RTKs ou de MAPK

En tenant compte du rôle des RTKs et des MAPK lors des processus cancéreux et angiogéniques en général et en particulier lors de la régulation de l'expression et la sécrétion des MMPs et en considérant le fait que plusieurs composés coumariniques exercent un effet anticancéreux par action sur les RTKs/MAPK, nous avons décidé d'effectuer quelques expériences préliminaires à ce

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

sujet (en collaboration avec l'Unité de Recherche des Sciences de la Vie de l'Université du Luxembourg, Dr. C. Haan). Nous avons choisi un modèle qui nous permet d'étudier l'effet de l'IK9 à la fois au niveau de différents RTKs (EGFR, PDGFR et VEGFR) et au niveau d'une voie appartenant aux MAPK, à savoir les ERK. Des cellules surexprimant un des récepteurs étudiés sont incubées en présence de l'IK9, puis stimulées par le facteur de croissance correspondant. Pour l'EGF, nous avons utilisé des cellules A431 qui sont caractérisées par une expression anormalement élevée du récepteur de l'EGF (EGFR). L'effet de l'IK9 sur la signalisation du PDGF est testé sur des fibroblastes 3T3, tandis que des cellules endothéliales de type HUVEC sont employées pour le VEGF. Nous mesurons ensuite le degré de phosphorylation de ERK1 et de ERK2 qui appartiennent à la cascade intracellulaire des MAPK en aval du récepteur. Lorsque le récepteur ou une des kinases en amont de ERK1/2 sont inhibés, la phosphorylation de ERK1/2 est réduite. Le degré de phosphorylation de ERK1/2 est déterminé au moyen d'une immunodétection par Western Blot en utilisant un anticorps spécifique des formes phosphorylées de ERK1/2. L'actine ou Fin 13 servent comme étalons internes, pour vérifier que les dépôts ont été faits de manière homogène.

Pour chaque récepteur, deux temps de stimulation par le facteur de croissance correspondant sont réalisés. L'IK9 est testé à au moins deux concentrations différentes. Des contrôles sans stimulation par le facteur de croissance ou avec le DMSO (= véhicule) sans l'IK9 sont également réalisés. Les figures VI-16, VI-17 et VI-18 montrent les résultats obtenus respectivement pour l'EGF, le PDGF et le VEGF.

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

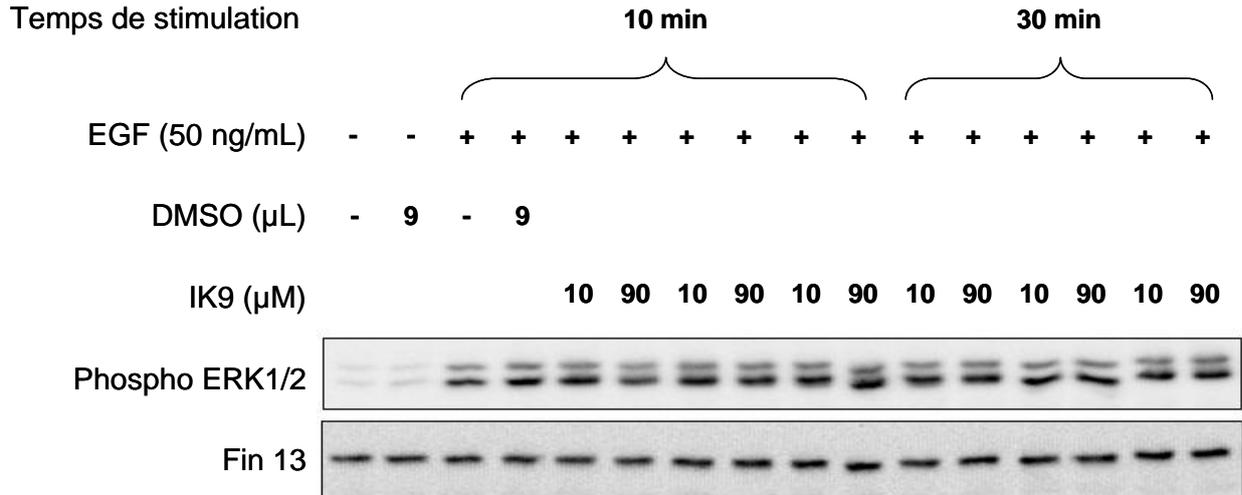


Figure VI-16 : Étude de l'effet de l'IK9 sur la phosphorylation de ERK1/2 induite par l'EGF au niveau des cellules A431

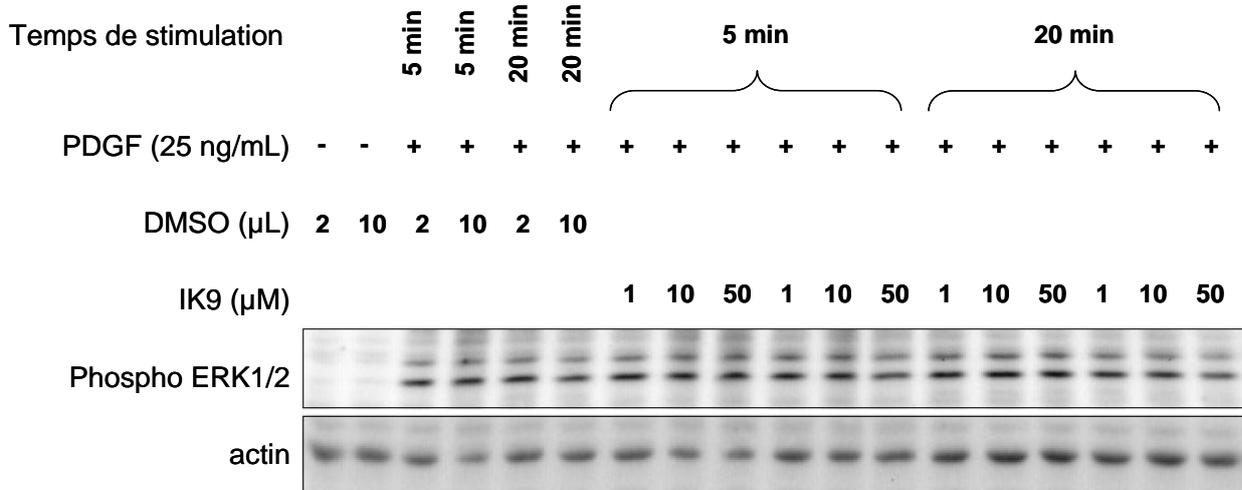


Figure VI-17: Étude de l'effet de l'IK9 sur la phosphorylation de ERK1/2 induite par de PDGF au niveau des fibroblastes 3T3

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

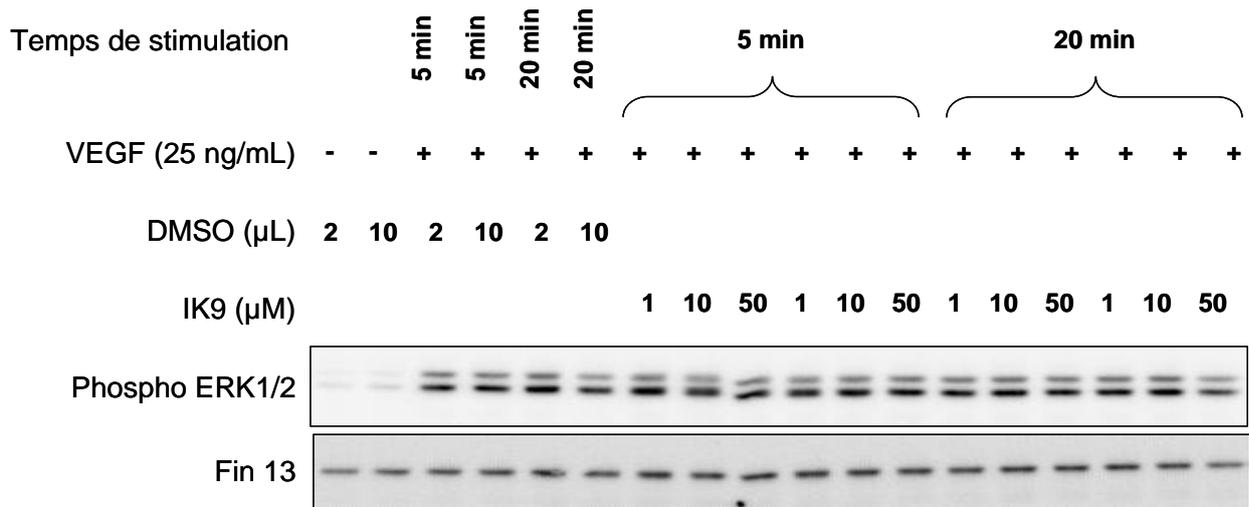


Figure VI-18 : Étude de l'effet de l'IK9 sur la phosphorylation de ERK1/2 induite par le VEGF au niveau des cellules endothéliales de type HUVEC

Les expériences montrent cependant que la phosphorylation de ERK1/2 induite par un facteur de croissance (EGF, PDGF et VEGF) n'est pas diminuée en présence de l'IK9, même aux concentrations élevées de 50 ou 90 µM. Cela signifie en même temps que l'IK9 n'inhibe pas les récepteurs aux facteurs de croissance correspondants, ni au niveau du site de fixation du ligand, ni au niveau des domaines tyrosine kinase intracellulaires et qu'il n'inhibe pas non plus la cascade des MAPK en amont de ERK1/2.

Globalement, les différentes pistes explorées nous permettent de tirer plusieurs conclusions quant au mécanisme d'action de l'IK9 :

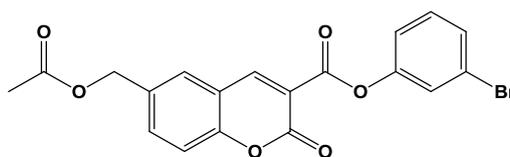
- l'effet anti-angiogénique important de l'IK9 n'est pas le résultat d'une action directe sur les cellules endothéliales, mais plutôt d'un mécanisme impliquant les cellules périvasculaires et la matrice extracellulaire ;
- l'IK9 réduit effectivement la sécrétion des MMPs 2 et 9 par les cellules HT1080 de fibrosarcome humain, par un mécanisme partiellement indépendant de l'expression d'ARNm des deux gélatinases ;

- le mécanisme d'action de l'IK9 n'est probablement pas lié aux récepteurs de l'EGF, du PDGF ou du VEGF, sans pour autant exclure complètement ce type de cibles, car il existe d'autres récepteurs de type tyrosine kinase et d'autres voies de signalisation qui pourraient potentiellement intervenir dans le mécanisme d'action de l'IK9.

VI. Contribution à l'étude du mécanisme d'action de l'IK9

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail est basé sur les résultats obtenus avec le 6-acétoxyméthyl-2-oxo-2*H*-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (IK9), qui a été décrit précédemment comme inhibiteur puissant de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse [Kempen et al. 2003; Kempen et al. 2008].



IK9

Le premier objectif du projet était le développement d'analogues de l'IK9 possédant une activité anti-invasive au moins équivalente, mais dont les propriétés en termes d'hydrosolubilité et de stabilité sont améliorées. En se basant sur la structure de l'IK9, un certain nombre de pharmacomodulations a été conçu (figure VII-1). Nous avons en particulier tenté d'introduire des groupements susceptibles d'augmenter l'hydrosolubilité et de remplacer les fonctions fragiles par des groupements plus stables.

VII. Conclusions et perspectives

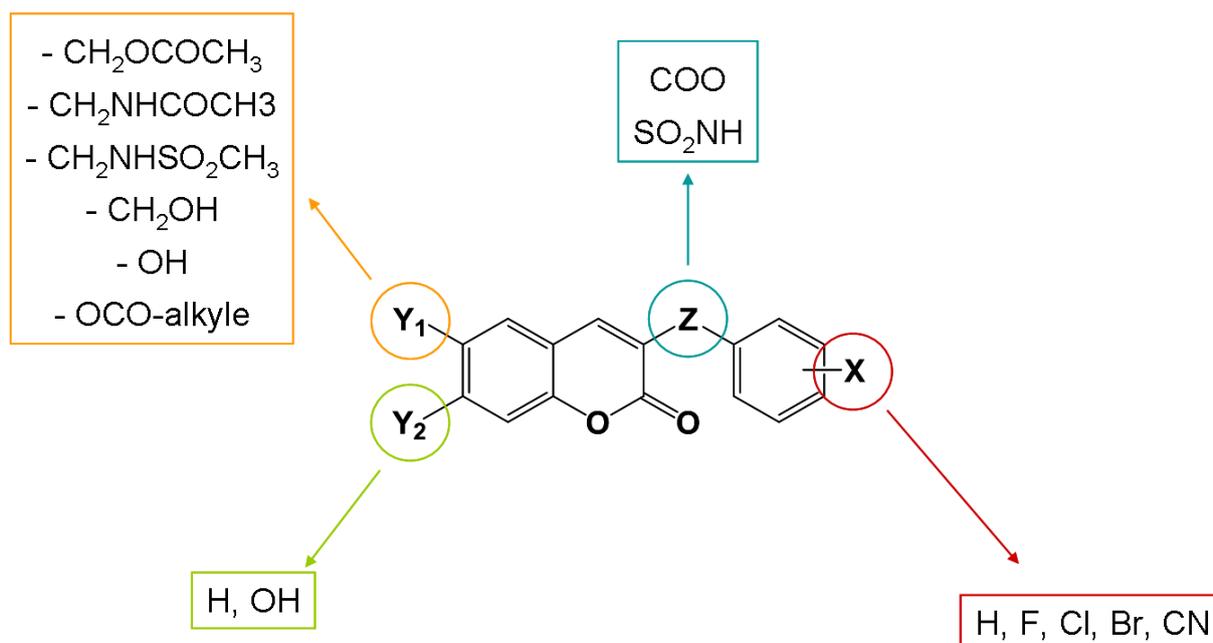


Figure VII-1 : Pharmacomodulations envisagées dans le cadre de ce travail

Toutes les molécules envisagées ont été synthétisées avec succès. Ceci nécessitait la mise au point de différentes voies de synthèse incluant une condensation de type Knoevenagel faisant intervenir des dérivés du malonate de diphenyle. Ce genre de réaction a rendu accessible des analogues hydroxylés, qui n'avaient pas pu être obtenus par les méthodes de synthèse décrites auparavant.

L'étude du pouvoir anti-invasif dans un modèle de « chambres de Boyden » a révélé plusieurs molécules dont l'activité est approximativement équivalente à celle de l'IK9, notamment des dérivés 6-hydroxyméthyle ($Y_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $Z = \text{COO}$), 6-méthylsulfonaminométhyle ($Y_1 = \text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$; $Z = \text{COO}$), 6- et 7-hydroxy (Y_1 ou $Y_2 = \text{OH}$; $Z = \text{COO}$) et les coumarine-3-sulfonamides ($Y_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$; $Z = \text{SO}_2\text{NH}$). En ce qui concerne la nature et la position de l'halogène sur le noyau phényle (X), nous avons mis en évidence que la position 3 (*meta*) est à favoriser pour obtenir une bonne inhibition de l'invasion.

Un gain substantiel de solubilité est obtenu avec les analogues 6-hydroxyméthyle, 6-hydroxy et les coumarine-3-sulfonamides (figure VII-2). Parmi eux, le composé **66** s'est tout particulièrement démarqué, car son hydrosolubilité est

largement supérieure à celle de tous les autres composés décrits dans ce travail. Contrairement à ces derniers, le composé **66** ne possède plus de fonctions ester au sein de sa structure chimique (hormis la lactone), ce qui le rend nettement plus stable au pH physiologique et réduit donc considérablement le risque d'hydrolyse par les estérases plasmatiques ou hépatiques. Tous ces éléments font dès lors de ce composé un candidat sérieux à la succession de l'IK9.

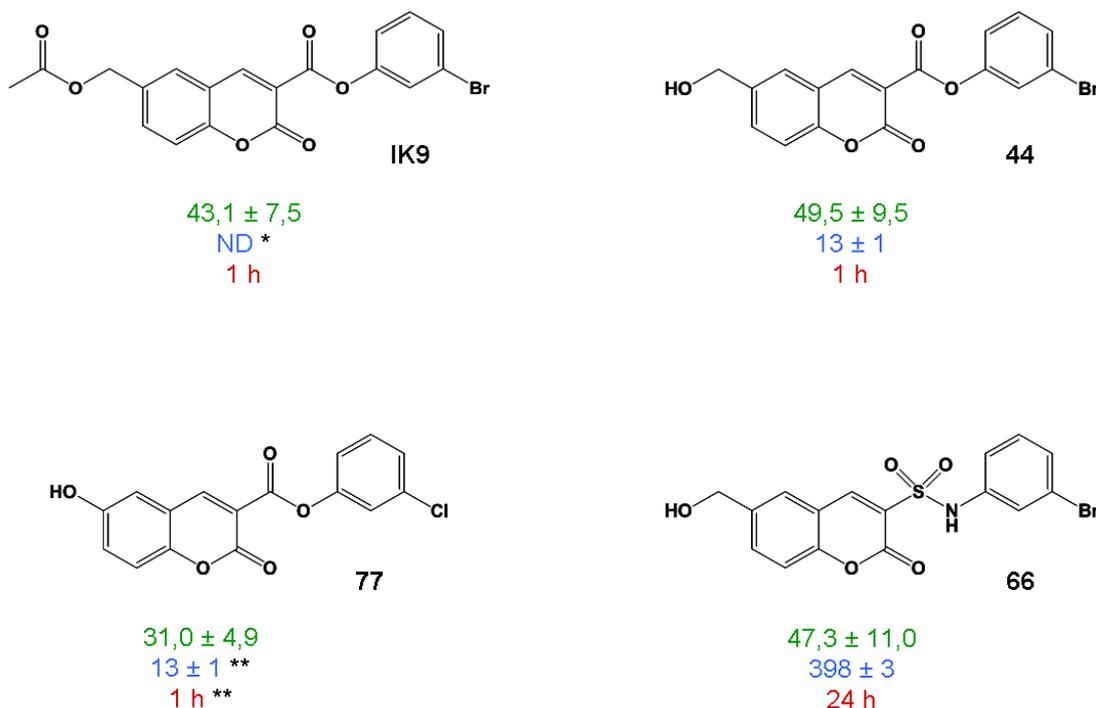


Figure VII-2 : Principaux composés « chefs de file » du présent travail

Vert : invasion résiduelle (%) à 10 µM dans le modèle en « chambres de Boyden »

Bleu : solubilité (en µM) dans un tampon phosphate à pH7,4 (+ 5% de DMSO) à température ambiante

Rouge : temps de demi-vie estimé dans le MEM à 37°C

* non détectable ; ** données obtenues avec le dérivé 3'-Br (**80**)

Nous pouvons donc dire que l'objectif premier du travail, c'est-à-dire le développement de molécules apparentées à l'IK9 possédant une activité biologique équivalente et dont l'hydrosolubilité et la stabilité sont améliorées, a été atteint.

VII. Conclusions et perspectives

Un deuxième aspect du présent travail concerne le mécanisme d'action de l'IK9. Initialement conçu comme inhibiteur de protéases à sérine capable de réduire l'invasion tumorale et l'angiogenèse, il s'est avéré inactif vis-à-vis de plusieurs protéases à sérine et MMPs, de même que sur les cyclo-oxygénases et les lipoxigénases. En adoptant une approche rationnelle ciblée sur des mécanismes cellulaires plutôt que sur des récepteurs ou enzymes isolés faisant figure de cibles potentielles, nous avons cherché à mieux connaître les implications de l'IK9 dans les différents phénomènes d'invasion et d'angiogenèse.

Nous avons pu mettre en évidence dans un premier temps que l'activité anti-angiogénique importante de l'IK9 [Hemmer et al. 2010] ne résulte pas d'une action directe sur les cellules endothéliales, étant donné l'absence d'un effet inhibiteur au niveau de l'invasion et de la croissance de ces cellules. Les résultats obtenus suggèrent donc un mécanisme indirect impliquant des cellules périvasculaires ou la matrice extracellulaire.

Plusieurs éléments indiquent que le mécanisme d'action de l'IK9 pourrait faire intervenir des métalloprotéases matricielles (MMPs), plus particulièrement les MMPs 2 et 9. Des études antérieures ont cependant montré que l'IK9 n'est pas un inhibiteur direct de l'activité enzymatique de ces deux MMPs [Kempen et al. 2003]. Dans le cadre de ce travail, nous avons mis en évidence que l'IK9 diminue légèrement l'expression en ARNm et de manière importante la sécrétion des deux métalloprotéases par les cellules HT1080 de fibrosarcome humain. Cela nous laisse penser que l'IK9 intervient au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de la sécrétion, selon un mécanisme partiellement indépendant de l'expression en ARNm. Étant donné les implications multiples des MMPs 2 et 9 dans les phénomènes d'invasion et d'angiogenèse, les résultats obtenus avec l'IK9 concernant leur sécrétion constituent donc un premier élément exploitable lors de recherches futures. Il sera indispensable de savoir si les effets de l'IK9 dans les différents modèles *in vitro* et *in vivo* (chambres de Boyden, anneaux d'aorte, néovascularisation choroïdale,...) sont bien dus à une diminution de la sécrétion des MMPs 2 et 9. Le cas échéant, les résultats concernant les MMPs devraient considérablement réduire

le champ d'investigation et permettront de se focaliser sur les mécanismes régulant l'expression et la sécrétion des deux protéases.

En complément aux expériences concernant les cellules endothéliales et les MMPs, nous avons réalisé une étude préliminaire destinée à montrer un éventuel effet inhibiteur de l'IK9 au niveau de plusieurs récepteurs de type tyrosine kinase, y compris des kinases de la transduction intracellulaire du signal (MAPK). Concrètement, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de ERK1/2 induite par l'EGF, le PDGF ou le VEGF après stimulation de leurs récepteurs respectifs. L'absence d'une modification par l'IK9 de la phosphorylation de ERK1/2 dans les différents modèles utilisés indique cependant que l'IK9 n'inhibe probablement pas l'EGFR, le PDGFR ou le VEGFR, ni les différentes kinases (domaine intracellulaire des récepteurs et MAPK) en aval impliquées dans la phosphorylation de ERK1/2.

Le présent travail offre de multiples perspectives envisageables dans le cadre du développement de dérivés coumariniques en tant qu'agents anticancéreux potentiels. L'intérêt des nouvelles molécules en tant qu'agents anti-invasifs et anti-angiogéniques, avant tout celui du composé **66**, devra être confirmé dans différents modèles *in vivo*, par exemple la croissance tumorale dans des souris athymiques nues, le test des anneaux d'aorte ou la néovascularisation choroïdale. Il faudra en outre étudier l'effet du composé **66** sur l'expression et la sécrétion des MMPs 2 et 9.

En termes de pharmacomodulations, différents pôles de modification sont concevables à l'avenir (figure VII-3). Sur base des résultats obtenus dans le cadre de ce travail, un élargissement de la série des coumarine-3-sulfonamides paraît prometteur. Nous pensons notamment au développement de 6-hydroxycoumarine-3-sulfonamides (cf. figure VII-1 ; $Y_1 = \text{OH}$ et $Z = \text{SO}_2\text{NH}$). Par ailleurs, plusieurs positions du noyau coumarinique sont peu exploitées, notamment les positions 4, 5, 7 et 8, et pourraient donc faire l'objet d'investigations futures. En ce qui concerne le noyau phényle (en violet), des substituants autres que les halogènes (p.ex. CH_3 , OCH_3 , CF_3 , NH_2 , OH , ...), voire une disubstitution pourraient s'avérer intéressants. Nous pourrions aussi remplacer le noyau phényle par une autre noyau, comme par

VII. Conclusions et perspectives

exemple une pyridine ou un thiophène. Le remplacement de la lactone (en orange) par un enchaînement cétone, amide ou thioester serait une autre possibilité envisageable et permettra de savoir si la lactone est indispensable ou non pour l'activité anti-invasive.

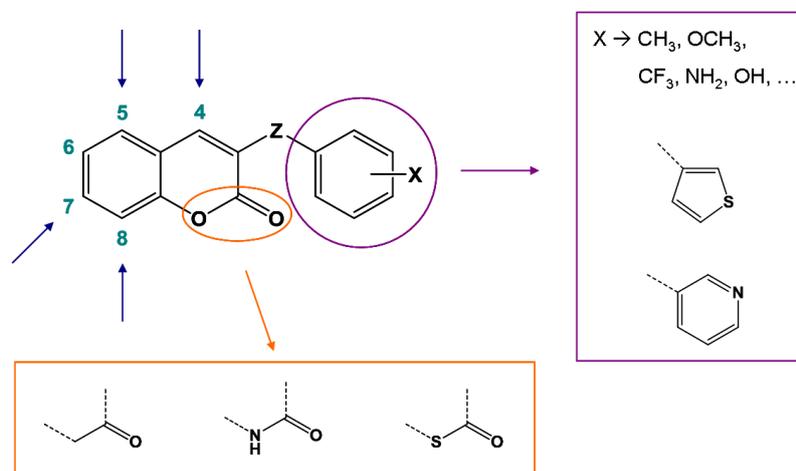


Figure VII-3 : Perspectives de pharmacomodulation

À l'avenir, une certaine priorité devra certainement être accordée à l'élucidation du mécanisme d'action, que ce soit avec l'IK9 ou avec un de ses successeurs potentiels issus de ce travail. D'un point de vue pharmacochimique, la connaissance précise de la cible facilitera largement le développement d'autres analogues en tenant compte des interactions cible/ligand. Cela facilitera le criblage, en l'effectuant idéalement sur un récepteur ou un enzyme isolé, avec une meilleure reproductibilité des résultats, permettant d'effectuer un premier tri avant le passage dans des systèmes plus complexes tels que le test de chémoinvasion en « chambres de Boyden ». Enfin, la compréhension du mécanisme d'action, au même titre que la maîtrise des paramètres pharmacocinétiques liés à la solubilité et la stabilité, sera indispensable lors d'un éventuel développement préclinique d'une ou de plusieurs molécules de cette famille.

VIII. MATÉRIEL ET MÉTHODES

VIII.1. Synthèse organique

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à tube capillaire Stuart SMP3 et n'ont pas été corrigés.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer FT-IR spectrum 1000. Les produits ont été mis en dispersion dans des pastilles de KBr.

Les spectres RMN ^1H ont été pris sur un appareil Bruker Avance (500 MHz) dans du DMSO deutéré. Les déplacements chimiques sont exprimés en unités δ (ppm) en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Nous avons utilisé les abréviations suivantes pour l'interprétation des spectres : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, b = large.

Les analyses élémentaires des composés (C, H, N, S) ont été effectuées sur un appareil Carlo-Erba EA 1108 ou sur un appareil Thermo Electron Corporation Flash EA 1112 (Logiciel Eager 300). Une différence maximale de 0,4% par rapport à la valeur théorique est tolérée.

L'avancement des réactions est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques employées sont des plaques Merck[®] en aluminium recouvertes d'une couche de gel de silice 60 F₂₅₄. L'observation se fait à une longueur d'onde de 254 ou 366 nm.

Toutes les synthèses ont été effectuées avec un équipement conventionnel pour la chimie organique de synthèse (ballons, réfrigérants, ...).

5-hydroxyméthylsalicyaldéhyde (15). Le mélange de 9 mL de salicyaldéhyde **14** (84,46 mmol), 17 mL de solution aqueuse de formaldéhyde (~200 mmol) et 42 mL d'acide chlorhydrique concentré est chauffé au bain-marie à 80°C sous agitation constante durant 20 minutes. Après refroidissement, le surnageant est éliminé par décantation et la masse cristalline rose résiduelle est reprise par 200 mL d'eau bouillante. La suspension obtenue est portée à reflux pendant 30 minutes. Le surnageant est décanté et placé à 4°C pour provoquer la cristallisation du produit final. Sur l'huile résiduelle sont ajoutés une nouvelle fois 200 mL d'eau bouillante et la suspension est portée à reflux pendant 30 minutes. Le surnageant est ajouté au premier décantât. Après refroidissement, le produit est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le chloroforme.

Le produit obtenu est identique à celui décrit précédemment.

[Stoermer & Behn 1901; Pochet et al. 1996]

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate d'éthyle (16). Dans un ballon sont introduits 30 g de 5-hydroxyméthylsalicyaldéhyde **15** (197 mmol), 34,8 g de malonate de diéthyle (217 mmol), 2,5 mL de pipéridine, 1 mL d'acide acétique et 100 mL d'éthanol. Le mélange est porté à reflux pendant 17 heures. A la suspension chaude sont ajoutés 250 mL d'eau bouillante, puis le milieu réactionnel est placé à 4°C. Le précipité obtenu est recueilli par filtration et lavé deux fois avec un mélange méthanol/eau (6 :4, v/v, 200 mL), puis séché. Il est recristallisé dans l'éthanol.

Le produit obtenu est identique à celui décrit précédemment.

[Horning et al. 1955; Pochet et al. 1996]

Acide 6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylique (17). La suspension de 20 g **16** (78 mmol) dans 600 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 10% est portée à reflux pendant 30 minutes. Après refroidissement, la solution est

ajustée à pH 1 par adjonction de HCl 12 N. Le précipité blanc obtenu est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et recristallisé dans l'éthanol ou l'acétonitrile.

Le produit obtenu est identique à celui décrit précédemment.

[Horning et al. 1955; Pochet et al. 1996]

Acide 6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylique (18). 3 g de **17** (13,62 mmol) et 30 mL d'anhydride acétique sont portés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 200 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est dissous dans un minimum de chloroforme et additionné d'éther de pétrole 40-60°C. Le précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé par de l'éther de pétrole 40-60°C et séché.

Le produit obtenu est identique à celui décrit précédemment.

[Horning et al. 1955; Pochet et al. 1996]

Chlorure de l'acide 6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylique (19). La suspension de 1 g de **18** dans 10 mL de chlorure de thionyle est portée à reflux pendant 2 heures et demie. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans 10 mL de toluène sec. Le solvant est éliminé sous pression réduite. La dernière étape est répétée à deux reprises. Le chlorure d'acide ainsi isolé est rapidement engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-fluorophényle (20). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 560 mg de 2-fluorophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous

VIII. Matériel et méthodes

pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 52%

Point de fusion : 140-142°C

IR (KBr) : 3060 (C-H aromatiques) ; 2951 (C-H aliphatiques) ; 1769 (C=O esters) ; 1736 (C=O lactone) ; 1712 ; 1625 ; 1578 ; 1501 ; 1376 ; 1258 ; 1236 ; 1222 ; 1183 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3); 5.17 (s, 2H, CH_2); 7.30-7.45 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.50 (d, 1H, 8-H); 7.80 (d, 1H, 7-H); 8.00 (s, 1H, 5-H); 9.14 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{FO}_6$

	C	H
% calculé	64.05	3.68
% trouvé	63.81	3.51

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (21). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 560 mg de 4-fluorophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 60%

Point de fusion: 205-207°C

IR (KBr) : 3067 (C-H aromatiques) ; 2953 ; 2894 (C-H aliphatiques) ; 1739 (C=O esters et lactone) ; 1629 ; 1580 ; 1502 ; 1248 ; 1232 ; 1184 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3); 5.17 (s, 2H, CH_2); 7.32-7.34 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.50 (d, 1H, 8-H); 7.79 (d, 1H, 7-H); 7.98 (s, 1H, 5-H); 9.08 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{FO}_6$

	C	H
% calculé	64.05	3.68
% trouvé	64.43	3.45

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-chlorophényle (22). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 640 mg de 2-chlorophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 50%

Point de fusion: 140-142°C

IR (KBr) : 3070, 3053, 3028 (C-H aromatiques); 2944, 2890 (C-H aliphatiques); 1773 (C=O esters); 1732 (C=O lactone); 1720; 1624; 1578; 1478; 1372; 1254; 1204 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3); 5.17 (s, 2H, CH_2); 7.39 (t, 1H, 4'-H); 7.45-7.49 (m, 2H, 5'-H, 6'-H); 7.51 (d, 1H, 8-H); 7.66 (d, 1H, 3'-H); 7.80 (d, 1H, 7-H); 8.03 (s, 1H, 5-H); 9.16 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClO}_6$

	C	H
% calculé	61.22	3.52
% trouvé	61.86	3.32

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (23). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 640 mg de 4-chlorophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 55%

Point de fusion: 219-221°C

IR (KBr) : 3066 (C-H aromatiques) ; 2952, 2892 (C-H aliphatiques) ; 1736 (C=O esters et lactone) ; 1628 ; 1579 ; 1486 ; 1368 ; 1249 ; 1229 ; 1196 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3); 5.17 (s, 2H, CH_2); 7.34 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.50 (d, 1H, 8-H); 7.56 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.79 (d, 1H, 7-H); 7.98 (s, 1H, 5-H); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClO}_6$

	C	H
% calculé	61.22	3.52
% trouvé	61.35	3.60

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-bromophényle (24). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 860 mg de 2-bromophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 40%

Point de fusion : 148-150°C

IR (KBr) : 3068, 3068, 3028 (C-H aromatiques) ; 2944, 2890 (C-H aliphatiques) ; 1771 (C=O esters) ; 1729 (C=O lactone) ; 1623 ; 1578 ; 1472 ; 1372 ; 1254 ; 1239 ; 1199 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3) ; 5.17 (s, 2H, CH_2) ; 7.31 (t, 1H, 4'-H) ; 7.44 (d, 1H, 6'-H) ; 7.51 (m, 2H, 8-H ; 5'-H) ; 7.80 (m, 2H, 7-H, 3'-H) ; 8.03 (s, 1H, 5-H) ; 9.16 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{BrO}_6$

	C	H
% calculé	54.70	3.14
% trouvé	54.63	3.00

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (25). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 860 mg de 4-bromophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 55%

Point de fusion: 214-216°C

IR (KBr) : 3066 (C-H aromatiques) ; 2952, 2892 (C-H aliphatiques) ; 1736 (C=O esters et lactone) ; 1627 ; 1579 ; 1482 ; 1367 ; 1249 ; 1229 ; 1196 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH_3) ; 5.17 (s, 2H, CH_2) ; 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H) ; 7.50 (d, 1H, 8-H) ; 7.69 (d, 2H, 3'-H, 5'-H) ; 7.79 (d, 1H, 7-H) ; 7.98 (s, 1H, 5-H) ; 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{BrO}_6$

	C	H
% calculé	54.70	3.14
% trouvé	54.93	2.87

6-acétoxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-cyanophényle (26). A la suspension du chlorure d'acide **19** (~ 4 mmol) dans 10 mL de dioxane anhydre sont ajoutés 596 mg de 3-cyanophénol (5 mmol) et 0,4 mL de pyridine anhydre (5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par le minimum de méthanol. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par du méthanol et séché. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 55%

Point de fusion: 171-173°C

IR (KBr) : 3072 (C-H aromatiques) ; 2944, 2889 (C-H aliphatiques) ; 2233 (C≡N) ; 1776 (C=O esters) ; 1741 (C=O lactone) ; 1718 ; 1625 ; 1578 ; 1378 ; 1238 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 2.10 (s, 3H, CH₃); 5.18 (s, 2H, CH₂); 7.51 (d, 1H, 8-H); 7.67-7.74 (m, 2H, 5'-H, 6'-H); 7.80 (d, 1H, 7-H); 7.84 (d, 1H, 4'-H) ; 7.89 (s, 1H, 2'-H) ; 7.99 (s, 1H, 5-H); 9.13 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : C₂₀H₁₃NO₆

	C	H	N
% calculé	66.12	3.61	3.86
% trouvé	65.92	3.38	3.74

Malonate de diphényle (29). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de phénol et 2 équivalents de de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1%

refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le mélange méthanol/eau.

Rendement : 50%

Point de fusion : 44-45°C

IR (KBr) : 3063, 3042 (C-H aromatiques); 2954 (C-H aliphatiques); 1749 (C=O ester); 1493 ; 1361 ; 1342 ; 1197 ; 1164 ; 1141 ; 1126 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH₂); 7.19 (d, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H, 6'-H); 7.31 (t, 2H, 4-H, 4'-H); 7.46 (t, 4H, 3-H, 5-H, 3'-H, 5'-H).

Analyse élémentaire : C₁₅H₁₂O₄

	C	H
% calculé	70.31	4.42
% trouvé	70.40	4.47

Malonate de di-2-fluorophényle (30). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 2-fluorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. La suspension est extraite par de l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur du MgSO₄ anhydre, puis elle est évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'hexane à chaud, la solution est traitée par du charbon actif et le produit cristallise lors du refroidissement. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par de l'hexane et séché.

Rendement : 60%

Point de fusion : 34-35°C

IR (KBr) : 3060 (C-H aromatiques) ; 2996, 2958 (C-H aliphatiques) ; 1783, 1769 (C=O ester) ; 1601 ; 1499 ; 1356 ; 1274 ; 1254 ; 1139 ; 1100 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 4.30 (s, 2H, CH₂); 7.27-7.44 (m, 8H, 3-H, 3'-H, 4-H, 4'-H, 5-H, 5'-H, 6-H, 6'-H).

Analyse élémentaire : C₁₅H₁₀F₂O₄

	C	H
% calculé	61.65	3.45
% trouvé	61.47	3.49

Malonate de di-3-fluorophényle (31). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 3-fluorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé successivement dans le mélange méthanol/eau et dans l'hexane.

Rendement : 51%

Point de fusion : 55-57°C

IR (KBr) : 3063, 3042 (C-H aromatiques); 2954 (C-H aliphatiques); 1749 (C=O ester); 1493 ; 1361 ; 1342 ; 1197 ; 1164 ; 1141 ; 1126 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 4.13 (s, 2H, CH₂); 7.08 (d, 2H, 6-H, 6'-H); 7.18 (m, 4H, 2-H, 2'-H, 4-H, 4'-H); 7.51 (dd, 2H, 5-H, 5'-H).

Analyse élémentaire : C₁₅H₁₀F₂O₄

	C	H
% calculé	61.65	3.45
% trouvé	61.52	3.50

Malonate de di-4-fluorophényle (32). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 4-fluorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le mélange méthanol/eau.

Rendement : 75%

Point de fusion : 85-87°C

IR (KBr) : 3079 (C-H aromatiques); 2980, 2948 (C-H aliphatiques) ; 1766, 1746 (C=O ester) ; 1503 ; 1367 ; 1188 ; 1156 ; 1142 ; 1125 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.27 (s, 2H, CH_2); 7.36 (m, 4H, 4-H, 6-H, 4'-H, 6'-H); 7.45 (t, 2H, 5-H, 5'-H); 7.62 (d, 2H, 3-H, 3'-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_4$

	C	H
% calculé	61.65	3.45
% trouvé	61.71	3.47

Malonate de di-2-chlorophényle (33). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 2-chlorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le mélange méthanol/eau.

Rendement : 80%

Point de fusion : 37-38°C

IR (KBr) : 3087 (C-H aromatiques); 2955, 2932 (C-H aliphatiques); 1798 (C=O ester) ; 1759 ; 1475 ; 1373 ; 1212 ; 1096 ; 1057 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.27 (s, 2H, CH_2); 7.36 (m, 4H, 4-H, 6-H, 4'-H, 6'-H); 7.45 (t, 2H, 5-H, 5'-H); 7.62 (d, 2H, 3-H, 3'-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_4$

	C	H
% calculé	55.41	3.10
% trouvé	55.70	2.87

Malonate de di-3-chlorophényle (34). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 3-chlorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 43 %

Point de fusion : 59-62 °C

IR (KBr) : 3074 (C-H aromatiques) ; 2971, 2942 (C-H aliphatiques) ; 1781, 1767, 1744 (C=O ester) ; 1589 ; 1470 ; 1370 ; 1332 ; 1200 ; 1155 ; 1134 ; 1114 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH_2); 7.20 (d, 2H, 6-H, 6'-H); 7.37 (s, 2H, 2-H, 2'-H); 7.40 (d, 2H, 4-H, 4'-H); 7.50 (t, 2H, 5-H, 5'-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_4$

	C	H
% calculé	55.41	3.10
% trouvé	55.41	3.14

Malonate de di-4-chlorophényle (35). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 4-chlorophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 65%

Point de fusion : 108-110°C

IR (KBr) : 3097, 3073 (C-H aromatiques); 2949 (C-H aliphatiques) ; 1761, 1747 (C=O ester) ; 1488 ; 1340 ; 1264 ; 1208 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH_2); 7.24 (d, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H, 6'-H); 7.52 (d, 4H, 3-H, 5-H, 3'-H, 5'-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_4$

	C	H
% calculé	55.41	3.10
% trouvé	55.79	2.74

Malonate de di-2-bromophényle (36). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 2-bromophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 80%

Point de fusion : 68-70°C

IR (KBr) : 3080, 3058 (C-H aromatiques) ; 2965, 2933 (C-H aliphatiques) ; 1778 (C=O ester) ; 1746 ; 1469 ; 1355 ; 1209 ; 1130 ; 1113 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.25 (s, 2H, CH_2); 7.29 (t, 2H, 4-H, 4'-H); 7.35 (d, 2H, 6-H, 6'-H); 7.49 (t, 2H, 5-H, 5'-H); 7.76 (d, 2H, 3-H, 3'-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_4$

	C	H
% calculé	43.51	2.43
% trouvé	43.85	2.52

Malonate de di-3-bromophényle (37). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 3-bromophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1%

VIII. Matériel et méthodes

refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 43%

Point de fusion : 64-66°C

IR (KBr) : 3070 (C-H aromatiques) ; 2976, 2943 (C-H aliphatiques) ; 1770 (C=O ester) ; 1743 ; 1584 ; 1469 ; 1364 ; 1190 ; 1139 ; 1120 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 4.11 (s, 2H, CH₂); 7.24 (d, 2H, 6-H, 6'-H); 7.43 (t, 2H, 5-H, 5'-H); 7.49 (s, 2H, 2-H, 2'-H); 7.54 (d, 2H, 4-H, 4'-H).

Analyse élémentaire : C₁₅H₁₀Br₂O₄

	C	H
% calculé	43.51	2.43
% trouvé	43.70	2.00

Malonate de di-4-bromophényle (38). Un équivalent d'acide malonique **27**, 2 équivalents de 4-bromophénol et 2 équivalents de trichlorure de phosphoryle sont chauffés à 100°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est versé lentement dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% refroidie à 0°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché. Il est recristallisé dans le méthanol.

Rendement : 73 %

Point de fusion : 125-126 °C

IR (KBr) : 3088 (C-H aromatiques) ; 2946 (C-H aliphatiques) ; 1763 (C=O ester) ; 1742 ; 1481 ; 1377 ; 1203 ; 1142 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH₂); 7.18 (d, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H, 6'-H); 7.65 (d, 4H, 3-H, 5-H, 3'-H, 5'-H).

Analyse élémentaire : $C_{15}H_{10}Br_2O_4$

	C	H
% calculé	43.51	2.43
% trouvé	43.50	1.79

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de phényle (39).

200 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (1,31 mmol), 500 mg de malonate de diphenyle **29** (1,95 mmol), 4 gouttes de pipéridine et 2 gouttes d'acide acétique dans 6 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 22%

Point de fusion : 187-188°C

IR (KBr) : 3350, 3270 (O-H) ; 3067 (C-H aromatiques) ; 2929, 2882 (C-H aliphatiques) ; 1778 (C=O ester) ; 1760 (C=O lactone) ; 1711 ; 1621 ; 1573 ; 1492 ; 1380 ; 1247 ; 1226 ; 1215 ; 1200 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.59 (d, 2H, CH_2); 5.42 (t, 1H, OH); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.33 (t, 1H, 4'-H); 7.45-7.51 (m, 3H, 8-H, 3'-H, 5'-H); 7.73 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{17}H_{12}O_5$

	C	H
% calculé	68.92	4.08
% trouvé	68.57	4.09

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-fluorophényle (40). 140 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (0,92 mmol), 770 mg de malonate de di-3-fluorophényle **31** (2,66 mmol), 5 gouttes de pipéridine et 3

VIII. Matériel et méthodes

gouttes d'acide acétique dans 8 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 28%

Point de fusion : 173-178°C

IR (KBr) : 3343 (O-H) ; 3057 (C-H aromatiques) ; 2929, 2882 (C-H aliphatiques) ; 1781 (C=O ester) ; 1763 (C=O lactone) ; 1714 ; 1621 ; 1606 ; 1573 ; 1486 ; 1377 ; 1242 ; 1214 ; 1132 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.59 (d, 2H, CH_2); 5.43 (t, 1H, OH); 7.16-7.22 (m, 2H, 4'-H, 6'-H); 7.27 (d, 1H, 2'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.56 (dd, 1H, 5'-H); 7.74 (d, 1H, 7-H); 7.91 (s, 1H, 5-H); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_5$

	C	H
% calculé	64.97	3.53
% trouvé	64.53	3.51

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (41). 400 mg de 5-hydroxyméthylsilyaldéhyde **15** (2,63 mmol), 1,1 g de malonate de di-4-fluorophényle **32** (3,76 mmol), 8 gouttes de pipéridine et 4 gouttes d'acide acétique dans 12 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 20 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 96%

Point de fusion : 190-192°C

IR (KBr) : 3341 (O-H) ; 3061 (C-H aromatiques) ; 2888 (C-H aliphatiques) ; 1777 (C=O ester) ; 1758 (C=O lactone) ; 1711 ; 1619 ; 1572 ; 1502 ; 1377 ; 1245 ; 1217 ; 1186 ; 1117 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.58 (d, 2H, CH_2); 5.42 (t, 1H, OH); 7.32-7.34 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.73 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.08 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_5$

	C	H
% calculé	64.97	3.53
% trouvé	64.57	3.53

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (42). 200 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (1,31 mmol), 620 mg de malonate de di-3-chlorophényle **34** (1,91 mmol), 4 gouttes de pipéridine et 2 gouttes d'acide acétique dans 6 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 11%

Point de fusion : 162-165°C

IR (KBr) : 3526 (O-H) ; 3058 (C-H aromatiques) ; 2921, 2878 (C-H aliphatiques) ; 1732 (C=O ester et lactone) ; 1621 ; 1574 ; 1471 ; 1239 ; 1195 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.58 (d, 2H, CH_2); 5.43 (t, 1H, OH); 7.30 (d, 1H, 6'-H); 7.42 (d, 1H, 4'-H); 7.45-7.48 (m, 2H, 8-H, 2'-H); 7.52 (t, 1H, 5'-H); 7.73 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.10 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{17}H_{11}ClO_5$

	C	H
% calculé	61.74	3.35
% trouvé	62.00	3.33

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (43). 400 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (2,63 mmol), 1,24 g de malonate de di-4-chlorophényle **35** (3,81 mmol), 8 gouttes de pipéridine et 4 gouttes d'acide acétique dans 12 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 20 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 75%

Point de fusion : 182-185°C

IR (KBr) : 3450 (O-H) ; 3092, 3067 (C-H aromatiques) ; 2926, 2871 (C-H aliphatiques) ; 1771 (C=O ester et lactone) ; 1720 ; 1622 ; 1576 ; 1486 ; 1377 ; 1246 ; 1222 ; 1203 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.58 (d, 2H, CH_2); 5.42 (t, 1H, OH); 7.34 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.55 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.73 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{17}H_{11}ClO_5$

	C	H
% calculé	61.74	3.35
% trouvé	61.39	3.35

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (44). 200 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (1,31 mmol), 800

mg de malonate de di-3-bromophényle **37** (1,93 mmol), 4 gouttes de pipéridine et 2 gouttes d'acide acétique dans 6 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le mélange chloroforme/hexane.

Rendement : 15%

Point de fusion : 157-159°C

IR (KBr) : 3504 (O-H) ; 3059 (C-H aromatiques) ; 2947, 2928, 2877 (C-H aliphatiques) ; 1765 (C=O ester) ; 1748 (C=O lactone) ; 1621 ; 1572 ; 1472 ; 1377 ; 1245 ; 1221 ; 1196 ; 1115 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.59 (d, 2H, CH_2); 5.42 (t, 1H, OH); 7.34 (d, 1H, 6'-H); 7.45-7.48 (m, 2H, 8-H, 5'-H); 7.55 (d, 1H, 4'-H); 7.61 (s, 1H, 2'-H); 7.74 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.10 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrO}_5$

	C	H
% calculé	54.42	2.96
% trouvé	53.98	2.96

6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (45). 200 mg de 5-hydroxyméthylslicylaldéhyde **15** (1,31 mmol), 800 mg de malonate de di-4-bromophényle **38** (1,93 mmol), 4 gouttes de pipéridine et 2 gouttes d'acide acétique dans 6 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 30 minutes. Au terme de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est mis en suspension dans 10 mL de méthanol. Le précipité est recueilli par filtration, lavé avec le minimum de méthanol et recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 81%

Point de fusion : 173-174°C

VIII. Matériel et méthodes

IR (KBr) : 3339 (O-H) ; 3066 (C-H aromatiques) ; 2941 (C-H aliphatiques) ; 1761 (C=O ester et lactone) ; 1718 ; 1621 ; 1574 ; 1482 ; 1379 ; 1244 ; 1216 ; 1197 ; 1170 ; 1113 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.58 (d, 2H, CH_2); 5.42 (t, 1H, OH); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.68 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.73 (d, 1H, 7-H); 7.90 (s, 1H, 5-H); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrO}_5$

	C	H
% calculé	54.42	2.96
% trouvé	54.45	2.95

6-chlorométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (46). 1,65 g (5,25 mmol) de **41** sont agités à reflux dans 30 mL de chlorure de thionyle pendant 3 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 90 mL d'eau. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 96%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.88 (s, 2H, CH_2); 7.32-7.34 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.52 (d, 1H, 8-H); 7.85 (d, 1H; 7-H); 8.05 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

6-chlorométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (48). 600 mg (1,81 mmol) de **43** sont agités à reflux dans 10 mL de chlorure de thionyle pendant 3 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 30 mL d'eau. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 96%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.88 (s, 2H, CH_2); 7.34 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.52 (d, 1H, 8-H); 7.56 (d; 2H, 3'-H, 5'-H); 7.86 (d, 1H; 7-H); 8.05 (s, 1H, 5-H); 9.08 (s, 1H, 4-H).

6-chlorométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (50). 1,65 g (4,40 mmol) de **45** sont agités à reflux dans 25 mL de chlorure de thionyle pendant 3 heures. Après refroidissement, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 75 mL d'eau. Cette suspension est extraite par du chloroforme et la phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre. Le produit est recristallisé dans le chloroforme. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 75%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.89 (s, 2H, CH_2); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.52 (d, 1H, 8-H); 7.69 (d; 2H, 3'-H, 5'-H); 7.86 (d, 1H; 7-H); 8.06 (s, 1H, 5-H); 9.10 (s, 1H, 4-H).

Chlorure de 6-hexaméthylènetétrammoniométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (51). 1,50 g d'hexaméthylènetétramine (10,7 mmol) sont ajoutés à une solution de 1,55 g de **46** (4,66 mmol) dans 60 mL de chloroforme. Le mélange est porté à reflux pendant 18 heures. Le précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé par du chloroforme et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 88%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.20 (s, 2H, CH_2); 4.42-5.12 (m, 12H, HMTA^+); 7.34-7.36 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.65 (d, 1H, 8-H); 7.88 (d, 1H, 7-H); 8.12 (s, 1H, 5-H); 9.14 (s, 1H, 4-H).

Chlorure de 6-hexaméthylènetétrammoniométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (53). 0,46 g d'hexaméthylènetétramine (3,28 mmol) sont ajoutés à une solution de 0,50 g de **48** (1,43 mmol) dans 30 mL de chloroforme. Le mélange est porté à reflux pendant 18 heures. Le précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé par du chloroforme et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 53%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.20 (s, 2H, CH_2); 4.42-5.13 (m, 12H, HMTA^+); 7.35 (m, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.57 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.65 (d, 1H, 8-H); 7.88 (d, 1H, 7-H); 8.12 (s, 1H, 5-H); 9.14 (s, 1H, 4-H).

Chlorure de 6-hexaméthylènetétrammoniométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (55). 1 g d'hexaméthylènetétramine (7,13 mmol) est ajouté à une solution de 1,20 g de **50** (3,05 mmol) dans 50 mL de chloroforme. Le mélange est porté à reflux pendant 18 heures. Le précipité obtenu est recueilli par filtration, lavé par du chloroforme et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 33%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.19 (s, 2H, CH_2); 4.42-5.11 (m, 12H, HMTA^+); 7.29 (m, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.64 (d, 1H, 8-H); 7.70 (s, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.88 (d, 1H, 7-H); 8.11 (s, 1H, 5-H); 9.14 (s, 1H, 4-H).

Chlorhydrate de 6-aminométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (56). 1,8 g de **51** (3,81 mmol) sont mis en présence de 12 mL d'éthanol et de 3 mL d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 1h30. Après refroidissement du milieu réactionnel, le précipité est recueilli par filtration et lavé avec le minimum d'éthanol. Il est ensuite mis en suspension dans l'eau afin de se débarrasser du chlorure d'ammonium. Le précipité est recueilli par

filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement: 83%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH_2); 7.33-7.34 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.58 (d, 1H, 8-H); 7.94 (d, 1H, 7-H); 8.04 (s, 1H, 5-H); 8.53 (t, 3H, NH_3^+); 9.01 (s, 1H, 4-H).

Chlorhydrate de 6-aminométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (58). 0,35 g de **53** (0,72 mmol) sont mis en présence de 2,3 mL d'éthanol et de 0,6 mL d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 1h30. Après refroidissement du milieu réactionnel, le précipité est recueilli par filtration et lavé avec le minimum d'éthanol. Il est ensuite mis en suspension dans l'eau afin de se débarrasser du chlorure d'ammonium. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 71%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH_2); 7.35 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.55-7.59 (m, 3H, 8-H, 3'-H, 5'-H); 7.94 (d, 1H, 7-H); 8.03 (s, 1H, 5-H); 8.51 (t, 3H, NH_3^+); 9.03 (s, 1H, 4-H).

Chlorhydrate de 6-aminométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (60). 0,5 g de **55** (0,94 mmol) sont mis en présence de 5 mL d'éthanol et de 0,75 mL d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 1h30. Après refroidissement du milieu réactionnel, le précipité est recueilli par filtration et lavé avec le minimum d'éthanol. Il est ensuite mis en suspension dans l'eau afin de se débarrasser du chlorure d'ammonium. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 78%

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 4.12 (s, 2H, CH_2); 7.29 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.58 (d, 1H, 8-H); 7.69 (d, 2H, 3'-H, 5'-H) ; 7.94 (d, 1H, 7-H); 8.03 (s, 1H, 5-H); 8.52 (t, 3H, NH_3^+); 9.02 (s, 1H, 4-H).

6-acétamidométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (61). 500 mg de **56** (1,43 mmol) et 0,3 mL de triéthylamine dans 20 mL d'anhydride acétique sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Au terme de la réaction, 70 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité blanc est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché.

Rendement : 84%

Point de fusion : 249-252°C

IR (KBr) : 3294 (N-H) ; 3072 (C-H aromatiques) ; 2930 (C-H aliphatiques) ; 1773 (C=O ester) ; 1755 (C=O lactone) ; 1711 (C=O amide) ; 1649 ; 1574 ; 1501 ; 1246 ; 1220 ; 1189 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 1.90 (s, 3H, CH_3); 4.33 (d, 2H, CH_2); 7.33 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.67 (d, 1H, 7-H); 7.82 (s, 1H, 5-H); 8.47 (t, 1H, NH); 9.08 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{FNO}_5$

	C	H	N
% calculé	64.23	3.97	3.94
% trouvé	64.02	3.98	4.37

6-acétamidométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (62). 180 mg de **58** (0,49 mmol) et 0,1 mL de triéthylamine dans 7,2 mL d'anhydride acétique sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Au terme de la réaction, 36 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à

température ambiante pendant 1 heure. Le précipité blanc est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché.

Rendement : 60%

Point de fusion : 246-247°C

IR (KBr) : 3288 (N-H); 3071 (C-H aromatiques); 2930 (C-H aliphatiques); 1756 (C=O ester et lactone); 1714 (C=O amide); 1649 ; 1574 ; 1486 ; 1243 ; 1221 ; 1201 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 1.90 (s, 3H, CH_3); 4.33 (d, 2H, CH_2); 7.34 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.55 (d, 2H, 3'-H, 5'-H) 7.67 (d, 1H, 7-H); 7.82 (s, 1H, 5-H); 8.46 (t, 1H, NH); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{ClNO}_5$

	C	H	N
% calculé	61.38	3.80	3.77
% trouvé	61.20	3.74	4.16

6-acétamidométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (63). 250 mg de **60** (0,61 mmol) et 0,12 mL de triéthylamine dans 7,6 mL d'anhydride acétique sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Au terme de la réaction, 38 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité blanc est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché.

Rendement : 98%

Point de fusion : 241-246°C

IR (KBr) : 3289 (N-H) ; 3072 (C-H aromatiques) ; 1760 (C=O ester et lactone) ; 1716 (C=O amide) ; 1647 ; 1622 ; 1573 ; 1484 ; 1240 ; 1201 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 1.90 (s, 3H, CH_3); 4.33 (d, 2H, CH_2); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.46 (d, 1H, 8-H); 7.67-7.69 (m, 3H, 7-H, 3'-H, 5'-H); 7.82 (s, 1H, 5-H); 8.46 (t, 1H, NH); 9.09 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{19}H_{14}BrNO_5$

	C	H	N
% calculé	54.83	3.39	3.37
% trouvé	54.28	3.41	3.68

6-méthylsulfonylaminométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (64). 100 mg de **57** (0,27 mmol) dans 5 mL d'acétonitrile sont agités à température ambiante pendant une nuit en présence de 130 mg de chlorure de méthanesulfonyle (1,15 mmol) et de 200 mg de K_2CO_3 (1,43 mmol). Quand la réaction est terminée, le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est additionné d'une solution aqueuse de HCl 0,1 N jusqu'à pH 1. Le précipité résultant est recueilli par filtration et lavé avec de l'eau. Il est repris une deuxième fois par de l'acide chlorhydrique 0,1 N et la suspension est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ anhydre et le volume est réduit. Le précipité obtenu est recueilli par filtration et séché.

Rendement : 48%

Point de fusion : 205-210°C

IR (KBr): 3258 (N-H); 3083, 3066 (C-H aromatiques); 2934 (C-H aliphatiques); 1775 (C=O ester); 1732 (C=O lactone); 1625; 1577; 1377; 1317; 1244; 1221; 1200; 1158 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 2.93 (s, 3H, CH_3); 4.26 (d, 2H, CH_2); 7.30 (d, 1H, 6'-H); 7.42 (d, 1H, 4'-H); 7.48-7.55 (m, 3H, 8-H, 2'-H, 5'-H); 7.70 (t, 1H, SO_2NH); 7.77 (d, 1H, 7-H); 7.93 (s, 1H, 5-H); 9.11 (s, 1H, 5-H).

Analyse élémentaire : $C_{18}H_{14}ClNO_6S$

	C	H	N	S
% calculé	53.01	3.46	3.43	7.86
% trouvé	52.87	3.63	3.48	7.79

6-méthylsulfonylaminométhyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (65). 300 mg de **59** (0,73 mmol) dans 15 mL d'acétonitrile sont agités à température ambiante pendant une nuit en présence de 330 mg de chlorure de méthanesulfonyle (2,92 mmol) et de 500 mg de K_2CO_3 (3,65 mmol). Quand la réaction est terminée, le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est additionné d'une solution aqueuse de HCl 0,1 N jusqu'à pH 1. Le précipité résultant est recueilli par filtration et lavé avec de l'eau. Il est repris une deuxième fois par de l'acide chlorhydrique 0,1 N et la suspension est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ anhydre et le volume est réduit. Le précipité obtenu est recueilli par filtration et séché.

Rendement : 7%

Point de fusion : 219-222°C

IR (KBr): 3257 (N-H); 3082, 3062 (C-H aromatiques); 2928 (C-H aliphatiques); 1776 (C=O ester); 1761 (C=O lactone); 1716; 1624; 1577; 1376; 1315; 1244; 1220; 1196; 1158 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 2.91 (s, 3H, CH_3); 4.26 (d, 2H, CH_2); 7.34 (d, 1H, 6'-H); 7.47 (t, 1H, 5'-H); 7.50 (d, 1H, 8-H); 7.55 (d, 1H, 4'-H); 7.61 (s, 1H, 2'-H); 7.70 (t, 1H, SO_2NH); 7.76 (d, 1H, 7-H); 7.93 (s, 1H, 5-H); 9.11 (s, 1H, 5-H).

Analyse élémentaire : $C_{18}H_{14}BrNO_6S$

	C	H	N	S
% calculé	47.80	3.12	3.10	7.09
% trouvé	47.76	3.18	3.21	6.99

3-bromoanilinosulfonylacétate de méthyle (13). À une solution de 2 g de chlorure de chlorosulfonylacétyle **68** (11,30 mmol) dans 20 mL d'éther diéthylique, on ajoute lentement la quantité équimolaire de méthanol (0,46 mL; 11,30 mmol) dans 10 mL d'éther diéthylique. Le mélange est agité à 10°C pendant une heure. Au terme de la réaction, le solvant est éliminé sous pression réduite et le produit obtenu est rectifié sous vide. Il est ensuite mis en solution dans 20 mL de THF anhydre et additionné d'une solution de 1,23 mL de 3-bromoaniline (11,30 mmol) et de 1,57 mL

VIII. Matériel et méthodes

de triéthylamine (11,30 mmol) dans 10 mL de THF anhydre. Le mélange est agité sous atmosphère inerte d'azote à température ambiante pendant 3 heures. Le précipité blanc est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris par 30 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 10%. La solution est extraite par du chloroforme et la phase aqueuse est acidifiée par du HCl 0,1 N. Le précipité résultant **70** est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. 1 g de **70** (3,40 mmol) est dissous dans 100 mL de méthanol et la solution est refroidie à -10°C. On ajoute goutte à goutte 0,72 mL de chlorure de thionyle (9,93 mmol) et le mélange est chauffé à reflux pendant 1 heure. Au terme de la réaction, le volume du mélange réactionnel est réduit par évaporation sous pression réduite et le résidu est repris par 80 mL d'eau. Le mélange est extrait par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éther de pétrole 40-60°C et le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par de l'éther de pétrole 40-60°C et séché. Il est engagé dans l'étape suivante sans autre purification.

Rendement : 47%

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 3.64 (s, 3H, CH₃); 4.23 (s, 2H, CH₂); 7.23 (d, 1H, 6-H); 7.31 (m, 2H, 4-H, 5-H); 7.39 (s, 1H, 2-H); 10.42 (s, 1H, SO₂NH).

N-(3-bromophényl)-6-hydroxyméthyl-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-sulfonamide (66). À une solution de 250 mg de 5-hydroxyméthylsalicyaldéhyde **15** (1,64 mmol) dans 3,5 mL d'éthanol sont ajoutés 560 mg de **13** (1,82 mmol) et 1 goutte de pipéridine. La solution est portée à reflux pendant 3 heures. Au terme de la réaction, le milieu réactionnel est placé à 4°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par de l'éthanol et séché.

Rendement : 85%

Point de fusion : 196-199°C

IR (KBr) : 3326 (O-H et N-H) ; 3064 (C-H aromatiques) ; 2937, 2839 (C-H aliphatiques) ; 1697 (C=O lactone) ; 1621 ; 1573 ; 1478 ; 1339 ; 1176 ; 1162 cm⁻¹.

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 4.55 (d, 2H, CH_2); 5.41 (t, 1H, OH); 7.16-7.22 (m, 3H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.33 (s, 1H, 2'-H); 7.43 (d, 1H, 8-H); 7.71 (d, 1H, 7-H); 7.94 (s, 1H, 5-H); 8.99 (s, 1H, 4-H); 10.81 (s, 1H, SO_2NH).

Analyse élémentaire: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_5\text{S}$

	C	H	N	S
% calculé	46.84	2.95	3.41	7.81
% trouvé	46.48	2.93	3.63	7.48

***N*-(3-bromophényl)-6-acétoxyméthyl-2-oxo-2*H*-1-benzopyrane-3-sulfonamide (67)**. 500 mg de **66** (1,22 mmol) et 5 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 30 minutes. Après refroidissement, 20 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Elle est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris par le mélange éther diéthylique/éther de pétrole 40-60°C (1 : 1 ; v/v) et le précipité est recueilli par filtration. Il est dissous dans de l'acétone. La solution est traitée par du charbon et filtrée. Le filtrat est concentré par évaporation sous pression réduite et lentement additionné d'eau distillée. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché.

Rendement : 36%

Point de fusion : 140-142°C

IR (KBr) : 3271 (O-H et N-H) ; 3053 (C-H aromatiques) ; 1745 (C=O ester) ; 1726 (C=O lactone) ; 1572 ; 1478 ; 1298 ; 1346 ; 1242 ; 1175 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 2.09 (s, 3H, CH_3); 5.14 (d, 2H, CH_2); 7.18-7.22 (m, 3H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.34 (s, 1H, 2'-H); 7.47 (d, 1H, 8-H); 7.77 (d, 1H, 7-H); 8.01 (s, 1H, 5-H); 8.98 (s, 1H, 4-H); 10.82 (s, 1H, SO_2NH).

Analyse élémentaire: $C_{18}H_{14}BrNO_6S$

	C	H	N	S
% calculé	47.80	3.12	3.10	7.09
% trouvé	47.95	3.11	3.61	6.84

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de phényle (72). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,5 g de malonate de diphenyle **29** (5,85 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 62%

Point de fusion : 212-214°C

IR (KBr) : 3374 (O-H) ; 3045 (C-H aromatiques) ; 1748 (C=O ester et lactone) ; 1574 ; 1448 ; 1386 ; 1363 ; 1328 ; 1276 ; 1245 ; 1191 ; 1163 ; 1117 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.22 (d, 1H, 7-H); 7.27-7.29 (m, 3H, 5-H, 2'-H, 6'-H); 7.31-7.35 (m, 2H, 8-H, 4'-H); 7.49 (t, 2H, 3'-H, 5'-H); 9.00 (s, 1H, 4-H); 9.97 (s, 1H, OH).Analyse élémentaire : $C_{16}H_{10}O_5$

	C	H
% calculé	68.09	3.57
% trouvé	68.03	3.61

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-fluorophényle (73). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,75 g de malonate de di-2-fluorophényle **30** (5,99 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes.

Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 28%

Point de fusion : 203-205°C

IR (KBr) : 3196 (O-H); 2960 (C-H aromatiques); 1769 (C=O ester et lactone); 1694 ; 1675 ; 1574 ; 1499 ; 1450 ; 1270 ; 1257 ; 1247, 1236 ; 1225 ; 1178 ; 1137 ; 1121 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.23 (d, 1H, 7-H); 7.31 (s, 1H, 5-H); 7.33-7.47 (m, 5H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 9.08 (s, 1H, 4-H); 9.99 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{FO}_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	63.76	3.05

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-fluorophényle (74). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,75 g de malonate de di-3-fluorophényle **31** (5,99 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 74%

Point de fusion : 226-228°C

IR (KBr) : 3435 (O-H) ; 3097, 3076, 3064 (C-H aromatiques) ; 1740 (C=O ester et lactone) ; 1604 ; 1573 ; 1487 ; 1450 ; 1385 ; 1364 ; 1329 ; 1278 ; 1246 ; 1206 ; 1139 ; 1123 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.16 (d, 1H, 6'-H); 7.21 (d, 1H, 7-H); 7.25-7.29 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 5-H); 7.35 (d, 1H, 8-H); 7.54 (dd, 1H, 5'-H); 9.03 (s, 1H, 4-H); 9.99 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9FO_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	63.90	3.05

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (75). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,75 g de malonate de di-4-fluorophényle **32** (5,99 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 78%

Point de fusion : 234-235°C

IR (KBr) : 3286 (O-H) ; 3060, 3044 (C-H aromatiques) ; 2847 (C-H aliphatiques) ; 1722 (C=O ester et lactone) ; 1568 ; 1500 ; 1487 ; 1376 ; 1267 ; 1227 ; 1181 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.22 (d, 1H, 7-H) ; 7.28 (s, 1H, 5-H) ; 7.32-7.35 (m, 5H, 8-H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H) ; 9.01 (s, 1H, 4-H) ; 9.98 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9FO_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	63.87	3.05

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-chlorophényle (76). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,95 g de malonate de di-2-chlorophényle **33** (6 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le

précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 32%

Point de fusion : 219-222°C

IR (KBr) : 3216 (O-H); 3066 (C-H aromatiques); 1770 (C=O ester et lactone) ; 1688 ; 1670 ; 1576 ; 1478 ; 1449 ; 1270 ; 1236 ; 1224 ; 1204 ; 1138 ; 1114 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.24 (d, 1H, 7-H); 7.33 (s, 1H, 5-H); 7.36 (d, 1H, 8-H); 7.39 (t, 1H, 4'-H); 7.45-7.50 (m, 2H, 5'-H, 6'-H); 7.66 (d, 1H, 3'-H); 9.09 (s, 1H, 4-H); 9.99 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClO}_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	60.31	2.89

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (77). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,95 g de malonate de di-3-chlorophényle **34** (6 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 77%

Point de fusion : 234-237°C

IR (KBr) : 3406 (O-H); 3059 (C-H aromatiques); 1777 (C=O ester) ; 1747 (C=O lactone) ; 1593 ; 1573 ; 1450 ; 1365 ; 1276 ; 1243 ; 1222 ; 1203 ; 1114 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.23 (d, 1H, 7-H); 7.28-7.31 (m, 2H, 5-H, 6'-H); 7.35 (d, 1H, 8-H); 7.42 (d, 1H, 4'-H); 7.48 (s, 1H, 2'-H); 7.53 (t, 1H, 5'-H); 9.03 (s, 1H, 4-H); 9.99 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9ClO_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	60.63	2.85

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (78). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 1,95 g de malonate de di-4-chlorophényle **35** (6 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 69%

Point de fusion : 204-206°C

IR (KBr) : 3391 (O-H); 3099, 3064 (C-H aromatiques); 1739 (C=O ester et lactone); 1573 ; 1490 ; 1453 ; 1281 ; 1249 ; 1211 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.22 (d, 1H, 7-H); 7.29 (s, 1H, 5-H); 7.33-7.35 (m, 3H, 8-H, 2'-H, 6'-H); 7.55 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 9.02 (s, 1H, 4-H); 9.98 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9ClO_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	61.41	2.92

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-bromophényle (79). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 2,5 g de malonate de di-2-bromophényle **36** (6,04 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le

précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 50%

Point de fusion : 218-221°C

IR (KBr) : 3231 (O-H); 3065 (C-H aromatiques); 1771 (C=O ester et lactone) ; 1687 ; 1666 ; 1575 ; 1473 ; 1449 ; 1270 ; 1236 ; 1224 ; 1202 ; 1136 ; 1113 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.24 (d, 1H, 7-H); 7.29-7.34 (m, 2H, 5-H, 4'-H); 7.36 (d, 1H, 8-H); 7.44 (d, 1H, 6'-H); 7.52 (t, 1H, 5'-H); 7.79 (d, 1H, 3'-H); 9.10 (s, 1H, 4-H); 9.99 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrO}_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.05	2.55

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (80). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 2,5 g de malonate de di-3-bromophényle **37** (6,04 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 64%

Point de fusion : 198-205°C

IR (KBr) : 3391 (O-H); 3061 (C-H aromatiques) ; 1748 (C=O ester et lactone) ; 1574 ; 1471 ; 1450 ; 1245 ; 1193 ; 1116 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.22 (d, 1H, 7-H); 7.28 (s, 1H, 5-H); 7.34 (m, 2H, 8-H, 6'-H); 7.46 (t, 1H, 5'-H); 7.55 (d, 1H, 4'-H); 7.60 (s, 1H, 2'-H); 9.02 (s, 4-H); 9.97 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9BrO_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.58	2.14

6-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (81). 700 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde **71** (5,14 mmol), 2,5 g de malonate de di-4-bromophényle **38** (6,04 mmol), 0,2 mL de pipéridine et 0,08 mL d'acide acétique dans 10 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 68%

Point de fusion : 211-214°C

IR (KBr) : 3268 (O-H) ; 3065 (C-H aromatiques) ; 1748 (C=O ester et lactone) ; 1690 ; 1673 ; 1574 ; 1483 ; 1446 ; 1273 ; 1239 ; 1219 ; 1196 ; 1117 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 7.22 (d, 1H, 7-H); 7.29 (s, 1H, 5-H); 7.33-7.35 (m, 3H, 8-H, 2'-H, 6'-H); 7.55 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 9.02 (s, 1H, 4-H); 9.98 (s, 1H, OH).Analyse élémentaire : $C_{16}H_9BrO_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.05	2.56

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de phényle (83). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de diphenyle **29** (3,90 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel

est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 30%

Point de fusion : 269-272°C

IR (KBr) : 3294 (O-H) ; 3046 (C-H aromatiques) ; 1708 (C=O ester et lactone) ; 1610 ; 1560 ; 1506 ; 1492 ; 1332 ; 1320 ; 1239 ; 1211 ; 1182, 1165 ; 1136 ; 1118 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.25 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.31 (t, 1H, 4'-H); 7.48 (t, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 8.99 (s, 1H, 4-H); 11.23 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$

	C	H
% calculé	68.09	3.57
% trouvé	67.85	3.58

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-fluorophényle (84). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-2-fluorophényle **30** (3,42 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 22%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3274 (O-H) ; 3072 (C-H aromatiques) ; 1720 (C=O ester et lactone) ; 1599 ; 1562 ; 1496 ; 1332 ; 1254 ; 1211 ; 1165 ; 1136 ; 1114 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.29-7.45 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); 7.85 (d, 1H, 5-H); 9.05 (s, 1H, 4-H); 11.30 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9FO_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	63.65	3.02

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-fluorophényle (85). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-3-fluorophényle **31** (3,42 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 38%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3288 (O-H); 3084, 3058 (C-H aromatiques); 1721 (C=O ester et lactone); 1616 ; 1568 ; 1502 ; 1374 ; 1334 ; 1244 ; 1211 ; 1168 ; 1126 ; cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.14 (d, 1H, 6'-H); 7.19 (t, 1H, 4'-H); 7.24 (d, 1H, 2'-H); 7.52 (dd, 1H, 5'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 9.00 (s, 1H, 4-H); 11.27 (s, 1H, OH).Analyse élémentaire : $C_{16}H_9FO_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	64.72	3.03

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (86). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-4-fluorophényle **32** (3,42 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite,

le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 28%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3237 (O-H); 3094, 3058 (C-H aromatiques); 1721 (C=O ester et lactone) ; 1620 ; 1566 ; 1504 ; 1372 ; 1324 ; 1249 ; 1211 ; 1182 ; 1165 ; 1150 ; 1118 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm): 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.88 (d, 1H, 6-H); 7.30 (d, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.82 (d, 1H, 5-H); 9.98 (s, 1H, 4-H); 11.26 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{FO}_5$

	C	H
% calculé	64.01	3.02
% trouvé	64.16	3.04

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-chlorophényle (87). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-2-chlorophényle **33** (3,08 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 18%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3307 (O-H); 3087, 3065 (C-H aromatiques); 1756 (C=O ester et lactone); 1689 ; 1605 ; 1557 ; 1503 ; 1479 ; 1264 ; 1223 ; 1201 ; 1156 ; 1130 cm^{-1} .

VIII. Matériel et méthodes

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.37 (t, 1H, 4'-H); 7.42-7.48 (m, 2H, 5'-H, 6'-H); 7.64 (d, 1H, 3'-H); 7.87 (d, 1H, 5-H); 9.06 (s, 1H, 4-H); 11.31 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClO}_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	60.69	2.86

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (88). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-3-chlorophényle **34** (3,08 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 29%

Point de fusion : 247-250°C

IR (KBr) : 3344 (O-H) ; 3073 (C-H aromatiques) ; 1757 (C=O ester et lactone) ; 1703 ; 1615 ; 1560 ; 1506 ; 1377 ; 1321 ; 1263 ; 1195 ; 1165 ; 1133 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.27 (d, 1H, 6'-H); 7.40 (d, 1H, 4'-H); 7.44 (s, 1H, 2'-H); 7.51 (t, 1H, 5'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 9.00 (s, 1H, 4-H); 11.24 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClO}_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	60.20	2.48

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (89). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1 g de malonate de di-4-chlorophényle **35** (3,08 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 24%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3336 (O-H) ; 3064 (C-H aromatiques) ; 1763 (C=O ester et lactone) ; 1705 ; 1601 ; 1566 ; 1489 ; 1448 ; 1380 ; 1195 ; 1123 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.31 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.53 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 8.99 (s, 1H, 4-H); 11.23 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClO}_5$

	C	H
% calculé	60.68	2.86
% trouvé	60.82	2.93

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 2-bromophényle (90). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1,3 g de malonate de di-2-bromophényle **36** (3,14 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 20%

Point de fusion : > 300°C

VIII. Matériel et méthodes

IR (KBr) : 3324 (O-H) ; 3087, 3058 (C-H aromatiques) ; 1755 (C=O ester et lactone) ; 1687 ; 1603 ; 1555 ; 1505 ; 1474 ; 1289 ; 1263 ; 1199 ; 1156 ; 1129 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.79 (s, 1H, 8-H); 6.90 (d, 1H, 6-H); 7.29 (t, 1H, 4'-H); 7.41 (d, 1H, 6'-H); 7.50 (t, 1H, 5'-H); 7.77 (d, 1H, 3'-H); 7.88 (d, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H); 11.31 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrO}_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.43	2.52

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (91). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1,3 g de malonate de di-3-bromophényle **37** (3,14 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 10%

Point de fusion : $> 300^\circ\text{C}$

IR (KBr) : 3340 (O-H) ; 3090, 3069 (C-H aromatiques) ; 1756 (C=O ester et lactone) ; 1704 ; 1615 ; 1564 ; 1507 ; 1377 ; 1321 ; 1263 ; 1207 ; 1165 ; 1132 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.31 (d, 1H, 6'-H); 7.45 (t, 1H, 5'-H); 7.53 (d, 1H, 4'-H); 7.57 (s, 1H, 2'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 9.00 (s, 1H, 4-H); 11.24 (s, 1H, OH).

Analyse élémentaire : $C_{16}H_9BrO_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.24	2.13

7-hydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (92). 360 mg de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (2,64 mmol), 1,3 g de malonate de di-4-bromophényle **38** (3,14 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 14%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3331 (O-H) ; 3064 (C-H aromatiques) ; 1766 (C=O ester et lactone) ; 1703 ; 1600 ; 1565 ; 1486 ; 1449 ; 1381 ; 1193 ; 1124 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.78 (s, 1H, 8-H); 6.89 (d, 1H, 6-H); 7.25 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.66 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.83 (d, 1H, 5-H); 8.99 (s, 1H, 4-H); 11.23 (s, 1H, OH).Analyse élémentaire : $C_{16}H_9BrO_5$

	C	H
% calculé	53.21	2.51
% trouvé	53.25	2.17

6,7-dihydroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de phényle (94). 400 mg de 2,4,5-trihydroxybenzaldéhyde **93** (2,63 mmol), 1 g de malonate de diphényle **29** (3,90 mmol), 0,1 mL de pipéridine et 0,04 mL d'acide acétique dans 5 mL de dioxane sont agités à température ambiante pendant 2 heures. Ensuite, le

VIII. Matériel et méthodes

milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé avec le minimum d'eau et séché. Il est recristallisé dans le mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole 40-60°C.

Rendement : 36%

Point de fusion : > 300°C

IR (KBr) : 3350 (O-H) ; 3062 (C-H aromatiques) ; 1753 (C=O ester et lactone) ; 1700 ; 1626 ; 1570 ; 1519 ; 1350 ; 1297 ; 1265 ; 1193 ; 1159 ; 1119 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 6.80 (s, 1H, 8-H); 7.24-7.25 (m, 3H, 5-H, 2'-H, 6'-H); 7.31 (t, 1H, 4'-H); 7.47 (t, 2H, 3'-H, 5'-H); 8.92 (s, 1H, 4-H); 10.00 (s, 1H, 6-OH); 10.90 (s, 1H, 7-OH).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_6$

	C	H
% calculé	64.43	3.38
% trouvé	64.47	3.17

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de phényle (95). 900 mg de **72** (3,19 mmol) et 10 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 60 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 69%

Point de fusion : 197-200°C

IR (KBr) : 3072 (C-H aromatiques) ; 1736 (C=O esters et lactone) ; 1625 ; 1573 ; 1487 ; 1372 ; 1290 ; 1246 ; 1230 ; 1211 ; 1189 ; 1161 ; 1122 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.33 (t, 1H, 4'-H); 7.50 (t, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.54-7.60 (m, 2H, 7-H, 8-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.05 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{18}H_{12}O_6$

	C	H
% calculé	66.67	3.73
% trouvé	66.80	3.60

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-fluorophényle (96). 400 mg de **74** (1,33 mmol) et 7 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 35 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 66%

Point de fusion : 178-184°C

IR (KBr) : 3074 (C-H aromatiques) ; 1736 (C=O esters et lactone) ; 1626 ; 1608 ; 1572 ; 1487 ; 1370 ; 1288 ; 1244 ; 1226 ; 1205 ; 1161 ; 1133 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.16 (d, 1H, 6'-H); 7.21 (t, 1H, 5'-H); 7.27 (d, 1H, 2'-H); 7.52-7.61 (m, 3H, 7-H, 8-H, 4'-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).Analyse élémentaire : $C_{18}H_{11}FO_6$

	C	H
% calculé	63.16	3.24
% trouvé	63.51	3.09

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-fluorophényle (97). 1 g de **75** (3,33 mmol) et 12 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 80 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 87%

VIII. Matériel et méthodes

Point de fusion : 207-211°C

IR (KBr) : 3072 (C-H aromatiques) ; 1761 (C=O esters) ; 1737 (C=O lactone) ; 1626 ; 1574 ; 1503 ; 1374 ; 1367 ; 1288 ; 1248 ; 1224 ; 1181 ; 1162 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.33 (d, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H); 7.55 (d, 1H, 8-H); 7.59 (d, 1H, 7-H); 7.78 (s, 1H, 5-H); 9.05 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{FO}_6$

	C	H
% calculé	63.16	3.24
% trouvé	63.51	3.11

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (98). 750 mg de **77** (2,37 mmol) et 12,5 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 80 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 80%

Point de fusion : 173-180°C

IR (KBr) : 3074 (C-H aromatiques) ; 1750 (C=O esters) ; 1734 (C=O lactone) ; 1629 ; 1592 ; 1573 ; 1477 ; 1285 ; 1245 ; 1227 ; 1215 ; 1160 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.30 (d, 1H, 6'-H); 7.43 (d, 1H, 4'-H); 7.47 (s, 1H, 2'-H); 7.51-7.56 (m, 2H, 8-H, 5'-H); 7.60 (d, 1H, 7-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{ClO}_6$

	C	H
% calculé	60.27	3.09
% trouvé	60.34	2.90

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-chlorophényle (99). 4 mg de **78** (1,26 mmol) et 6 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 30 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 60%

Point de fusion : 215-217°C

IR (KBr) : 3070 (C-H aromatiques) ; 1739 (C=O esters et lactone) ; 1625 ; 1572 ; 1487 ; 1372 ; 1287 ; 1243 ; 1225 ; 1207 ; 1162 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.34 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.54-7.61 (m, 4H, 7-H, 8-H, 3'-H, 5'-H); 7.78 (s, 1H, 5-H); 9.06 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{ClO}_6$

	C	H
% calculé	60.27	3.09
% trouvé	60.33	3.13

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (100). 1 g de **80** (2,77 mmol) et 15 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 80 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 81%

Point de fusion : 163-167°C

IR (KBr) : 3072 (C-H aromatiques) ; 1749 (C=O esters) ; 1735 (C=O lactone) ; 1629 ; 1584 ; 1573 ; 1473 ; 1285 ; 1244 ; 1226 ; 1214 ; 1160 ; 1120 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.33 (d, 1H, 6'-H); 7.47 (t, 1H, 5'-H); 7.54-7.60 (m, 4H, 7-H, 8-H, 2'-H, 4'-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{18}H_{11}BrO_6$

	C	H
% calculé	53.62	2.75
% trouvé	53.81	2.60

6-acétoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 4-bromophényle (101). 1 g de **81** (2,77 mmol) et 15 mL d'anhydride acétique sont chauffés à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, 80 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 89%

Point de fusion : 201-206°C

IR (KBr) : 3070 (C-H aromatiques) ; 1738 (C=O esters et lactone) ; 1625 ; 1573 ; 1484 ; 1371 ; 1286 ; 1244 ; 1224 ; 1203 ; 1164 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 2.33 (s, 3H, CH_3); 7.28 (d, 2H, 2'-H, 6'-H); 7.55 (d, 1H, 8-H); 7.59 (d, 1H, 7-H); 7.69 (d, 2H, 3'-H, 5'-H); 7.78 (s, 1H, 5-H); 9.06 (s, 1H, 4-H).Analyse élémentaire : $C_{18}H_{11}BrO_6$

	C	H
% calculé	53.62	2.75
% trouvé	53.47	2.58

6-propionoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (102). 500 mg de **77** (1,58 mmol) et 5 mL d'anhydride propionique sont chauffés à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, 30 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 nuit. Le précipité est recueilli par filtration, lavé par de l'eau et séché. Il est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 54%

Point de fusion : 152-154°C

IR (KBr) : 3075 (C-H aromatiques) ; 2982, 2942, 2881 (C-H aliphatiques) ; 1774 (C=O esters) ; 1760 (C=O lactone) ; 1718 ; 1572 ; 1492 ; 1375 ; 1263 ; 1249 ; 1225 ; 1204 ; 1169 ; 1145 ; 1117 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 1.16 (t, 3H, CH_3); 2.67 (q, 2H, CH_2); 7.30 (d, 1H, 6'-H); 7.43 (d, 1H, 4'-H); 7.48 (s, 1H, 2'-H); 7.51-7.61 (m, 3H, 7-H, 8-H, 5'-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClO}_6$

	C	H
% calculé	61.22	3.52
% trouvé	61.05	3.50

6-propionoxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (103). 600 mg de **80** (1,66 mmol) et 6 mL d'anhydride propionique sont chauffés à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, 35 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 nuit. Elle est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 65%

Point de fusion : 154-156°C

IR (KBr) : 3077, 3059 (C-H aromatiques) ; 2984, 2942 (C-H aliphatiques) ; 1769 (C=O esters et lactone) ; 1714 ; 1619 ; 1572 ; 1469 ; 1375 ; 1264 ; 1241 ; 1221 ; 1196 ; 1162 ; 1140 ; 1121 cm^{-1} .

^1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 1.15 (t, 3H, CH_3); 2.67 (q, 2H, CH_2); 7.34 (d, 1H, 6'-H); 7.47 (t, 1H, 5'-H); 7.55-7.62 (m, 4H, 7-H, 8-H, 2'-H, 4'-H); 7.79 (s, 1H, 5-H); 9.08 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{19}H_{13}BrO_6$

	C	H
% calculé	54.70	3.14
% trouvé	54.45	2.87

6-butyroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-chlorophényle (104). 250 mg de **77** (0,79 mmol) et 2,5 mL d'anhydride butyrique sont chauffés à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, 15 mL d'eau sont ajoutés et la suspension est agitée à température ambiante pendant 1 nuit. Elle est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 39%

Point de fusion : 146-148°C

IR (KBr) : 3075 (C-H aromatiques) ; 2969, 2880 (C-H aliphatiques) ; 1774 (C=O esters et lactone) ; 1719 ; 1573 ; 1492 ; 1374 ; 1249 ; 1225 ; 1204 ; 1167 ; 1145 ; 1117 cm^{-1} .

1H RMN (DMSO d_6) δ (ppm) : 0.99 (t, 3H, CH_3) ; 1.69 (sext., 2H, $-CH_2-CH_2-CH_3$) ; 2.62 (t, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_3$) ; 7.29 (d, 1H, 6'-H) ; 7.42 (d, 1H, 4'-H) ; 7.47 (s, 1H, 2'-H) ; 7.51-7.60 (m, 3H, 7-H, 8-H, 5'-H) ; 7.79 (s, 1H, 5-H) ; 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : $C_{20}H_{15}ClO_6$

	C	H
% calculé	62.11	3.91
% trouvé	62.12	3.92

6-butyroxy-2-oxo-2H-1-benzopyrane-3-carboxylate de 3-bromophényle (105). 500 mg de **80** (1,38 mmol) et 5 mL d'anhydride butyrique sont chauffés à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, 30 mL d'eau sont ajoutés et la

suspension est agitée à température ambiante pendant 1 nuit. Elle est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre et évaporée sous pression réduite. Le résidu est recristallisé dans l'acétonitrile.

Rendement : 63%

Point de fusion : 145-147°C

IR (KBr) : 3086, 3038 (C-H aromatiques) ; 2962, 2931, 2874 (C-H aliphatiques) ; 1771 (C=O esters et lactone) ; 1725 ; 1572 ; 1471 ; 1372 ; 1264 ; 1243, 1224, 1194, 1143, 1118 cm⁻¹.

¹H RMN (DMSO d₆) δ (ppm) : 0.99 (t, 3H, CH₃); 1.69 (sext., 2H, -CH₂-CH₂-CH₃); 2.62 (t, 2H, -CH₂-CH₂-CH₃); 7.33 (d, 1H, 6'-H); 7.47 (t, 1H, 5'-H); 7.54-7.60 (m, 4H, 7-H, 8-H, 2'-H, 4'-H); 7.80 (s, 1H, 5-H); 9.07 (s, 1H, 4-H).

Analyse élémentaire : C₁₉H₁₃BrO₆

	C	H
% calculé	55.70	3.51
% trouvé	55.31	3.22

VIII.2. Solubilité et stabilité

VIII.2.1. Solubilité

Les dosages par HPLC sont effectués en utilisant un système « Agilent 1100 series LC/MSD » avec détection UV à 220 nm, équipé d'une colonne C18 Zorbax SB (100 x 3 mm ; 3,5 µm). La phase mobile est constituée d'un gradient d'acétonitrile et d'acide acétique en solution aqueuse à 0,1% (5-95% d'acétonitrile en 5 minutes ; maintien pendant 3 minutes ; retour vers 5% d'acétonitrile en 0,1 min ; maintien pendant 5,4 minutes). Le débit est de 0,5 mL par minute et le volume d'injection est de 10 µL.

Les droites d'étalonnage sont réalisées sur base de 5 solutions de concentration connue, préparées selon le schéma représenté ci-dessous (tableau VIII-1).

Solution N°	[drogue] désirée (µM)	Volume de solution mère à 10 mM dans le DMSO ou tel qu'indiqué	Volume acétonitrile	Volume de DMSO à ajouter	Volume final de la solution (µL)	% final en DMSO
1	500	10	190	0	200	5
2	200	10	475	15	500	5
3	50	100 µL de solution 2	285	15	400	5
4	12.5	100 µL de solution 3	285	15	400	5
5	3.13	100 µL de solution 4	285	15	400	5

Tableau VIII-1

100 µL de chaque solution sont transférés dans les vials HPLC et analysés par la méthode LC/MS décrite ci-dessus.

Le test de solubilité est réalisé en utilisant des plaques de filtration Millipore (*MultiScreen Solubility Filter Plate*). Dans chaque puits sont dispensés 190 µL de tampon phosphate à pH7,4 et 10 µL de solution mère à 10 mM dans le DMSO. La plaque est recouverte et agitée rpm pendant 1h30 à température ambiante. Après l'incubation, la plaque est filtrée pendant 30-60 secondes utilisant un collecteur Millipore et les filtrats (160 µL) sont transférés dans une plaque 96 puits. 40 µL d'acétonitrile sont ajoutés dans chaque puits et agités pendant 5 minutes à température ambiante (200-300 rpm). 100 µL de chaque solution sont transférés dans les vials HPLC et analysés par la méthode LC/MS décrite ci-dessus.

Le tampon phosphate à pH7,4 est préparé à l'aide de deux solutions :

A : solution à 0,05 M en Na_2HPO_4 et 0,02 M en NaCl

B : solution à 0,05 M en NaH_2PO_4 et 0,02 M en NaCl

La solution A est placée dans un récipient et additionnée de solution B jusqu'à pH7,4.

VIII.2.2. Stabilité

Les dosages par HPLC sont effectués en utilisant une colonne C18 Hypersil BDS (150 x 4,6 mm ; 3 µm). La phase mobile est constituée d'un gradient acétonitrile/eau (5-95% d'acétonitrile en 15 minutes ; maintien pendant 3 minutes ; retour vers 5% d'acétonitrile en 7 minutes; maintien pendant 5 minutes). Le débit est de 0,8 mL par minute et le volume d'injection est de 60 µL.

Pour l'expérience de stabilité, 950 µL de MEM (*Minimum Essential Medium*) additionnés de 50 µL de solution mère à 200 µM du composé à tester dans le DMSO sont incubés à 37°C. Aux différents temps de mesure, 200 µL de solution incubée sont ajoutés à 800 µL d'un mélange acétonitrile/eau 50/50 (v/v). 400 µL de la solution

VIII. Matériel et méthodes

ainsi préparée sont transférés dans les vials HPLC et analysés par la méthode décrite ci-dessus.

VIII.3. Évaluation biologique

VIII.3.1. Culture cellulaire

Les cellules HT1080 de fibrosarcome humain sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) additionné de 2 mM de glutamine, de pénicilline-streptomycine (100 UI/mL – 100 µg/mL) et de 10% de FBS (angl. *Fetal Bovine Serum*). La croissance cellulaire se fait dans des boîtes de culture (*T-flask* 75 cm², Nunc, Costar) à 37°C dans une atmosphère humide (5% de CO₂).

Les cellules endothéliales (HUVEC ; ATCC # CC-2519) sont cultivées dans du milieu de culture MCDB131 additionné de 2 mM de L-glutamine, de pénicilline-streptomycine (100 UI/mL – 100 µg/mL), de 50 µg/mL d'héparine, de 5 µg/mL d'ECGS (angl. *Endothelial Cell Growth Supplement*), 25 mM d'Hepes et 10% de FBS. La croissance cellulaire se fait à 37°C dans une atmosphère humide (5% de CO₂) dans des boîtes de Petri recouvertes de gélatine (5 mL d'une solution à 2 mg/mL dans l'acide acétique à 0,1%).

Tous les réactifs de culture sont fournis par Gibco-BRL.

VIII.3.2. Test de chémoinvasion en « chambres de Boyden » sur cellules HT1080 de fibrosarcome humain

« Coating » des chambres de culture avec du collagène de type IV

Les filtres en polycarbonate de 6,5 mm (taille des pores de 8 µm) des chambres de culture cellulaire Transwell (Costar), placés dans les puits d'une plaque de 24 puits, sont recouverts avec une solution de collagène de type IV (Sigma C7521), purifié à partir de placenta humain, amené à une concentration de 200 µg/mL dans du tris (3/4 du volume de collagène) et de l'eau : 3, puis 5, puis 10 µL de cette solution sont introduits successivement au centre des filtres, ces derniers étant séchés dans une hotte à flux laminaire après chaque ajout. Une solution de collagène à 100 µg/mL est alors ajoutée à raison de deux fois 100 µL au centre des

VIII. Matériel et méthodes

filtres. La quantité finale est de cette façon de l'ordre de $\pm 24 \mu\text{g}$ de collagène. Avant leur utilisation, les filtres et la plaque de 24 puits sont rincés deux fois avec de l'eau stérile et incubés pendant une heure à 37°C dans du DMEM sans sérum.

Préparation de la suspension cellulaire HT1080

Les cellules HT1080 sont récoltées à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. Après un traitement avec de la trypsine-EDTA, les cellules sont collectées dans 10 mL de DMEM complet (= DMEM + suppléments + sérum) et elles sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Le surnageant est écarté et le culot est repris avec 10 mL de DMEM sans sérum. La suspension cellulaire est placée à l'incubateur pendant 30 minutes dans une atmosphère humide à 37°C . Les cellules sont ensuite centrifugées et enfin diluées dans le même milieu additionné de 0,1% de BSA (angl. *Bovine Serum Albumin*, fraction V, Sigma) pour atteindre une densité de 6×10^5 cellules par mL. Le comptage des cellules récoltées est effectué en chambre de Thomas.

Essai de chémo-invasion

L'effet potentiel des dérivés coumariniques (utilisés à la concentration de 10 μM) sur l'invasion des cellules HT1080 a été évalué dans le test en « chambre de Boyden ». Les puits des chambres (voir figure V-1 à la page 80) contiennent 600 μL de DMEM, additionné de 10% de FBS (agissant en tant que chémoattractant), de 1% de BSA et de 0,6 μL de solution d'inhibiteur (10 mM dans du DMSO). Le filtre, quant à lui, est recouvert de 100 μL de suspension cellulaire (6×10^4 cellules), de 200 μL de DMEM additionné de 0,1% de BSA et de 0,3 μL de solution d'inhibiteur. Les chambres sont alors incubées pendant 48 heures dans une atmosphère humide à 37°C . Afin de maintenir un gradient chémotactique, les milieux en dessous et au-dessus des filtres ainsi que les solutions à tester sont renouvelés après 24 heures. Après cela, les inserts sont vidés, rincés dans du PBS et placés dans 1 mL de méthanol à -20°C . 200 μL de méthanol sont rajoutés par-dessus et les inserts sont laissés à -20°C pendant 30 minutes. Ils sont ensuite vidés et séchés soit pendant une heure à 37°C , soit pendant une nuit à température ambiante. Les inserts sont alors placés dans 1 mL de Giemsa (Fluka 489000) dilué à 4% dans l'eau ultrapure et on y ajoute 300 μL de Giemsa par-dessus (20 minutes sous agitation). Ensuite, les

inserts sont rincés deux fois à l'eau courante et une fois à l'eau ultrapure puis nettoyés à l'intérieur avec un coton tige humide (pour éliminer les cellules qui n'ont pas migré). La membrane est découpée avec un scalpel fin, rincée avec de l'eau ultrapure, égouttée sur un papier et placée sur une lame porte-objet. Les cellules de la face inférieure, c'est-à-dire celles qui ont migré à travers le collagène, sont alors comptées à l'aide d'un microscope (Vanox AH3, Olympus) et en utilisant le logiciel ImageJ. Pour chaque concentration, un minimum de trois chambres de Boyden est effectué ($n \geq 3$). Les résultats sont exprimés sous la forme de pourcentage (\pm s.e.m.) par rapport au nombre de cellules contrôle.

VIII.3.3. Étude de l'effet de l'IK 9 sur l'invasion, la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales (HUVEC)

Essai de chémo-invasion en « chambres de Boyden »

L'effet potentiel des dérivés coumariniques (à la concentration de 10 μ M) sur l'invasion des cellules endothéliales a été évalué dans un test en « chambres de Boyden », utilisant des inserts de culture cellulaire Transwell (Costar) recouverts avec du collagène de type IV (détails : voir chapitre VIII.3.2.). Les HUVEC sont récoltées à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. Après un traitement avec de la trypsine-EDTA, les cellules sont collectées dans 2 mL de MCDB131 complet et elles sont centrifugées pendant 10 minutes à 180 g. Le surnageant est écarté et le culot est repris avec 10 mL de MCDB131 sans sérum. La suspension cellulaire est placée à l'incubateur pendant 30 minutes dans une atmosphère humide à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et enfin diluées dans le même milieu additionné de 0,1% de BSA pour atteindre une concentration de 10^6 cellules par mL. Le comptage des cellules récoltées est effectué en chambre de Thomas.

Les puits des chambres contiennent 600 μ L de MCDB131, additionné de 10% de FBS (agissant en tant que chémoattractant), de 1% de BSA et de 0,6 μ L de solution d'inhibiteur (10^{-2} M dans du DMSO). Le filtre, quant à lui, est recouvert de 100 μ L de suspension cellulaire (10^5 cellules), de 200 μ L de MCDB131 additionné de 0,1% de BSA et de 0,3 μ L de solution d'inhibiteur. Les chambres sont alors incubées

VIII. Matériel et méthodes

pendant 24 heures dans une atmosphère humide à 37°C. Après cela, les inserts sont vidés, rincés dans du PBS et placés dans 1 mL de méthanol à -20°C. 200 µL de méthanol sont rajoutés par-dessus et les inserts sont laissés à -20°C pendant 30 minutes. Ils sont ensuite vidés et séchés soit pendant une heure à 37°C, soit pendant une nuit à température ambiante. Les inserts sont alors placés dans 1 mL de Giemsa (Fluka 489000) dilué à 4% dans l'eau ultrapure et on y ajoute 300 µL de Giemsa par-dessus (20 minutes sous agitation). Ensuite, les inserts sont rincés deux fois à l'eau courante et une fois à l'eau ultrapure puis nettoyés à l'intérieur avec un coton tige humide (pour éliminer les cellules qui n'ont pas migré). La membrane est découpée avec un scalpel fin, rincée avec de l'eau ultrapure, égouttée sur un papier et placée sur une lame porte-objet. Les cellules de la face inférieure, c'est-à-dire celles qui ont migré à travers le collagène, sont alors comptées à l'aide d'un microscope (Vanox AH3, Olympus) et en utilisant le logiciel ImageJ. Trois essais sont réalisés, chacun en triplicate (n = 3). Les résultats sont exprimés sous la forme en pourcentage (\pm s.e.m.) par rapport au nombre de cellules contrôle.

Essai de prolifération

Les HUVEC sont récoltées par trypsination à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 minutes à 180 g et amenée à une densité de 3×10^4 cellules par mL dans du milieu complet. La suspension cellulaire estensemencée dans une plaque à 96 puits (150 µL/puits) et incubée sans composé à tester pendant 24 heures. Le milieu de culture est ensuite remplacé par 150 µL de milieu complet contenant l'IK 9 (10 µM), la camptothécine (0,1 µM) ou le véhicule (0,1% de DMSO). Après 0, 24, 48 ou 72 heures d'incubation, le milieu de culture est éliminé et la plaque de culture est placée à -80°C. La prolifération est mesurée à l'aide d'un kit de prolifération CyQuant® (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, Pays-Bas). Au moment de l'analyse, les plaques sont décongelées et les puits sont remplis par 150 µL d'un mélange contenant un tampon de lyse et un marqueur fluorescent dans de l'eau stérile. Après 2-5 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la fluorescence est mesurée sur un lecteur de plaques à 480 et 520 nm de longueur d'onde. Le nombre de cellules est déterminé à l'aide d'une courbe étalon

préalablement établie, qui nous permet de convertir la fluorescence brute mesurée en nombre de cellules. Trois essais sont réalisés, chacun en triplet ($n = 3$) et les résultats sont exprimés sous forme de nombre de cellules (\pm s.e.m.) aux différents temps de mesure.

Essai d'apoptose

Les HUVEC sont récoltées par trypsination à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 minutes à 180 g et amenée à une densité de 6×10^4 cellules par mL dans du milieu complet. La suspension cellulaire estensemencée dans une plaque à 6 puits (2 mL/puits) et incubée sans composé à tester pendant 24 heures. Le milieu de culture est ensuite remplacé par 2 mL de milieu complet contenant l'IK9 (10 μ M), la camptothécine (0,1 μ M) ou le véhicule (0,1% de DMSO). Après 48 heures d'incubation, les cellules sont récoltées, centrifugées et placées à 4°C. Après l'élimination du surnageant et un lavage par 1 mL de *binding buffer* (10 mM HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2), les cellules sont marquées par addition de 100 μ L de *binding buffer*, de 10 μ L de la solution d'AnnexineV-FITC (Becton-Dickinson, Erembodegem, Belgium) et de 10 μ L de la solution d'iodure de propidium (50 μ g/mL). Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. On ajoute ensuite 400 μ L de *binding buffer* et l'analyse par cytométrie de flux est effectuée dans l'heure qui suit, en utilisant un cytomètre Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Brea, CA). Les données sont traitées à l'aide du logiciel WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute, San Diego, CA). Trois essais sont réalisés, chacun en triplet ($n = 3$) et les résultats sont exprimés en pourcentage (\pm s.e.m.) de cellules positives à l'AnnexineV-FITC ou à l'iodure de propidium.

VIII.3.4. Étude de l'effet de l'IK9 sur l'expression et la sécrétion des métalloprotéases matricielles 2 et 9

VIII.3.4.1. Mesure de l'expression en ARNm par PCR quantitative en temps réel

Préparation de la suspension cellulaire HT1080 et incubation en présence de l'IK9

Les cellules HT1080 sont récoltées par trypsination à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. La suspension cellulaire est centrifugée à 400 g pendant 5 minutes et amenée à une densité de 10^4 cellules par mL dans du DMEM complet. La suspension cellulaire estensemencée dans une plaque à 6 puits (2 mL/puits) et incubée pendant 24 heures sans composé à tester. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du DMEM complet contenant l'IK9 (1 μ M et 10 μ M) ou le véhicule (0,1% de DMSO) et le tout est incubé dans une atmosphère humide à 37°C.

PCR quantitative en temps réel

Après 48 heures d'incubation, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. L'extraction de l'ARN total des cellules est effectuée à l'aide du kit *Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit* (Invitek GmbH, Berlin, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'ARN extrait est quantifié sur un spectrophotomètre *NanoDrop* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Pour effectuer la transcription inverse (RT-PCR kit Invitrogen, Merelbeke, Belgique), un volume d'éluat contenant 500 ng d'ARN est mélangé avec de l'eau stérile (ad 12 μ L), 2 μ L de la solution de dNTP à 10 mM et 1 μ L de la solution *Random Hexamers* et incubé dans le thermocycleur pendant 5 minutes à 65°C, puis pendant 2 minutes à 4°C. On ajoute ensuite 8 μ L d'un mélange contenant 4 μ L de *cDNA synth. buffer*, 1 μ L de la solution de DTT, 1 μ L de la solution *RNAse out*, 1 μ L d'eau et 1 μ L de la solution de transcriptase inverse et on incube dans le thermocycleur selon le schéma suivant : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 50°C et 5 minutes à 85°C. Après l'addition de 1 μ L de la solution de RNAse H et l'incubation à 37°C pendant 25 minutes, les échantillons de ADNc résultants sont maintenus à 4°C.

La PCR quantitative en temps réel est réalisée dans un mélange contenant 20 nM des amorces sens et inverse de la β -actine, de la MMP-2 et de la MMP-9, 15 ng de cDNA et le iQ SYBR Green supermix (100 mM KCl ; 40 mM Tris-HCl pH8,4 ; 0,4 mM de chaque dNTP ; 50 U.mL⁻¹ iTaq DNA polymérase ; 6 mM MgCl₂ ; SYBR Green I ; 20 nM fluorescéine ainsi que des stabilisateurs). La polymérisation s'effectue dans les conditions suivantes : 95°C pendant 3 minutes, puis 40 cycles à 95°C pendant 10 secondes et à 60°C pendant 30 secondes. Pour la PCR quantitative en temps réel, nous avons utilisé le *iQ5 Real-time PCR detection system* (Bio-Rad, Nazareth, Belgique). Trois essais sont réalisés, chacun en triplet (n = 3) et les résultats sont exprimés en $2^{\Delta\Delta Ct}$ (\pm s.e.m.), comme expliqué à la page 104.

VIII.3.4.2. Mesure de la sécrétion de MMP-2 et de MMP-9

Préparation de la suspension cellulaire HT1080 et incubation en présence de l'IK 9

Les cellules HT1080 sont récoltées par trypsination à partir de cultures présentant un degré de confluence de 80%. La suspension cellulaire est centrifugée à 400 g pendant 5 minutes et amenée à une concentration de 10⁴ cellules par mL dans du DMEM complet.

La suspension cellulaire estensemencée dans une plaque à 6 puits (2 mL/puits) et incubée pendant 24 heures sans composé à tester. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du DMEM à 0,1 % de FBS contenant l'IK9 (1 μ M et 10 μ M) ou le véhicule (0,1% de DMSO) et le tout est incubé dans une atmosphère humide à 37°C. Au terme de l'incubation, les surnageants sont prélevés, centrifugés pendant cinq minutes à 1500 tours par minute et congelés à -20°C.

Dosage ELISA

La quantité de MMP-2 et -9 dans les échantillons de surnageant prélevés est mesurée en utilisant des kits ELISA (Calbiochem[®] MMP-2 Elisa kit, Merck, Darmstadt, Allemagne ; RayBio[®] Human MMP-9 Elisa kit, RayBiotech, Norcross, GA) et en suivant les instructions du fabricant. Trois essais sont réalisés, chacun en

VIII. Matériel et méthodes

triplet (n = 3). La concentration en MMP est exprimée en pourcentage (\pm s.e.m.) par rapport au contrôle.

Zymographie

Le gel de migration est réalisé avec 10% de SDS, 10% d'acrylamide, et un mélange de gélatines de type A et B à raison de 5 mg/mL chacune. Le gel de concentration est réalisé sans gélatine avec 4% d'acrylamide et 10% de SDS. Les échantillons de surnageant sont ajoutés au tampon de Laemmli (dilution 1/2) dépourvu d'agents réducteurs et déposés sur le gel de concentration. Après la migration (2 h, 100 V constants), les protéines du gel sont renaturées par échange du SDS avec du triton X-100 (3 fois 15 minutes d'incubation avec 2,5% de triton X-100). Le gel est incubé pendant 24 heures à 37°C dans du tampon (50 mM Tris-HCl ; pH7,4 ; 10 mM CaCl₂ et 0,05% Brij 35). L'incubation terminée, l'activité gélatinolytique est révélée par 15 minutes d'incubation dans du bleu de Coomassie (0,1% de bleu de Coomassie, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique), puis 5 minutes dans du décolorant (30% de méthanol et 10% d'acide acétique). Les gels sont contrastés pendant 24 h à 4°C dans une solution de contrastant (5% de glycérol et 10% d'acide acétique). Les zymographies ont été numérisées à l'aide du système Chemilux Imager (Intas, Göttingen, Allemagne) et leur analyse densitométrique a été réalisée grâce au logiciel Gel Pro Express 4.0 (Intas). Le logiciel représente l'étendue (axe x) et l'intensité (axe y) de la bande de substrat lysé par l'enzyme. L'aire délimitée sous la courbe, représentant l'activité enzymatique, est ensuite calculée. Trois essais sont réalisés, chacun en triplet (n = 3). Les résultats, mesurés sous forme de densité optique intégrée (DOI), sont exprimés en pourcentage (\pm s.e.m.) par rapport au contrôle.

VIII.3.5. Récepteurs aux facteurs de croissance de type tyrosine kinase

Culture cellulaire et stimulation

Les cellules endothéliales de type HUVEC sont cultivées comme décrit à la page 181. Les cellules A431 et 3T3 sont maintenues dans du DMEM additionné de 10% de FCS, 100 mg/L de streptomycine et 60 mg/L de pénicilline.

Les cellules de type HUVEC, A431 et 3T3 sont stimulées respectivement avec 25 ng/mL de VEGF, 25 ng/mL d'EGF ou 50 ng/mL de PDGF. L'IK9 en solution dans le DMSO ou le DMSO seul sont ajoutés 30 minutes avant la stimulation par un des facteurs de croissance, comme indiqué dans les figures VI-16, VI-17 et VI-18 aux pages 117 et 118.

Lyse cellulaire, immunoprécipitation et analyse par Western blot

Toutes les étapes de lyse et d'immunoprécipitation sont réalisées à 4°C en utilisant des tampons réfrigérés. Les cellules sont lysées en utilisant un tampon de lyse contenant 30 mM de tris/HCl à pH6,7, 5% de glycérol, 2,5% de mercaptoéthanol et 1% de SDS. Les lysats sont analysés ensuite par SDS-PAGE. Les protéines séparées sont transférées sur une membrane en polyfluorure de polyvinylidène (Amersham Pharmacia Biotech) et la détection est effectuée en utilisant un anticorps anti-phospho-Erk1/2 (Cell Signalling). Après le détachement du premier anticorps, la membrane est analysée par des anticorps contre Fin13 (Transduction Laboratories) ou l'actine (Chemikon), afin de vérifier l'homogénéité des dépôts. Les anticorps secondaires conjugués à la HRP (angl. *horseradish peroxidase*) sont fournis par Dako. Les signaux sont détectés en utilisant une solution ECL (angl. *Electrochemiluminescence*) contenant 2,5 mM de luminol, 2,6 mM de peroxyde d'hydrogène, 100 mM de tris/HCl à pH8,8 et 0,2 mM d'acide paracoumarique.

VIII.4. Analyse statistique

Les résultats biologiques obtenus sont évalués statistiquement par le test d'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.

IX. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22(10):1276-312.
- Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, Hawkins R, Dulude H, Daigneault L, Ruiz M, Wisniewski J, Garde S, Rabbani SA, Panchal C, Wu JJ, Beliveau R. 2005. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 22(5):429-39.
- Armstrong LC, Bornstein P. 2003. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22(1):63-71.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97(6):512-23.
- Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134(2-3):95-102.
- Baumert C, Hilgeroth A. 2009. Recent advances in the development of P-gp inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* 9(4):415-36.
- Bechet JJ, Dupaix A, Yon J, Wakselman M, Robert JC, Vilkas M. 1973. Inactivation of alpha-chymotrypsin by a bifunctional reagent, 3,4-dihydro-3,4-dibromo-6-bromomethylcoumarin. *Eur J Biochem* 35(3):527-39.
- Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G. 2007. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8):1416-31.
- Bogenrieder T, Herlyn M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22(42):6524-36.
- Boyden S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115(3):453-66.
- Bruneton J. 1999. Coumarines. *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales*. Tec & Doc ed. p 263-278.
- Campos-Toimil M, Orallo F, Santana L, Uriarte E. 2002. Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 12(5):783-6.
- Carey FA, Sundberg RJ. 1997. Les réactions de condensation catalysées par les amines. *Chimie Organique Avancée (Tome 2): de Boeck & Larcier*. p 83-84.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070):932-6.

IX. Références bibliographiques

- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2):269-85.
- Chandrasekhar S, Karri P. 2006. Revised mechanism and improved methodology for the Perkin condensation. Resuscitation of the mechanism involving benzal acetate and the improbability of the enolate of acetic anhydride. *Tetrahedron Letters* 47:2249-51.
- Chimenti F, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Granese A, Befani O, Turini P, Alcaro S, Ortuso F. 2004. Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study. *Bioorg Med Chem Lett* 14(14):3697-703.
- Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. 2001. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 416(1-2):25-32.
- Crowell TI, Peck DW. 1953. Kinetic Evidence for a Schiff Base Intermediate in the Knoevenagel Condensation. *Journal of the American chemical society* 75:1075-1077.
- Delépine M. 1895. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 13:352-61.
- Doucet C, Pochet L, Thierry N, Pirotte B, Delarge J, Reboud-Ravaux M. 1999. 6-Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. *J Med Chem* 42(20):4161-71.
- Dvorak HF. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315(26):1650-9.
- Eccles SA, Welch DR. 2007. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369(9574):1742-57.
- Fayette J, Soria JC, Armand JP. 2005. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41(8):1109-16.
- Feron O. 2004. Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25(10):536-42.
- Ferrara N. 2009. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(6):789-91.
- Finn G, Creaven B, Egan D. 2003. Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hydroxycoumarin mediates apoptosis in renal carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 481(2-3):159-67.
- Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. 2004a. Investigation of intracellular signalling events mediating the mechanism of action of 7-hydroxycoumarin and 6-nitro-7-hydroxycoumarin in human renal cells. *Cancer Lett* 205(1):69-79.

- Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. 2004b. A study of the role of cell cycle events mediating the action of coumarin derivatives in human malignant melanoma cells. *Cancer Lett* 214(1):43-54.
- Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. 2005. Activation of mitogen activated protein kinase pathways and melanogenesis by novel nitro-derivatives of 7-hydroxycoumarin in human malignant melanoma cells. *Eur J Pharm Sci* 26(1):16-25.
- Finn GJ, Kenealy E, Creaven BS, Egan DA. 2002. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett* 183(1):61-8.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. 2004. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48(5-6):411-24.
- Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21):1182-6.
- Folkman J. 1997. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Exs* 79:1-8.
- Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16):10931-4.
- Fringuelli F, Piermatti O, Pizzo F. 2003. One-pot synthesis of 3-carboxycoumarins via consecutive Knoevenagel and Pinner reactions in water. *Synthesis* 15:2331-2334.
- Germanov E, Berman JN, Guernsey DL. 2006. Current and future approaches for the therapeutic targeting of metastasis (review). *Int J Mol Med* 18(6):1025-36.
- Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, Dolo V, Nagase H, Mignatti P, Vittorelli ML. 1997. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 272(27):17216-22.
- Han S, Zhou V, Pan S, Liu Y, Hornsby M, McMullan D, Klock HE, Haugen J, Lesley SA, Gray N, Caldwell J, Gu XJ. 2005. Identification of coumarin derivatives as a novel class of allosteric MEK1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 15(24):5467-73.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hemmer M, Kempen I, De Tullio P, Frankenne F, Lambert V, Blacher S, Bueb JL, Foidart JM, Noel A, Tschirhart E, Pirotte B. 2010. New Biological Investigations on 3-Bromophenyl 6-Acetoxyethyl-2-oxo-2-*H*-1-Benzopyran-3-Carboxylate as Anti-angiogenic Agent. *Drug Development Research* 71(3):209-218.

IX. Références bibliographiques

- Hofmeister V, Schrama D, Becker JC. 2008. Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother* 57(1):1-17.
- Horning EC, Horning MG, Dimmig DA. 1955. 3-Carbethoxycoumarin. *Organic Syntheses Coll.* 3:165-167.
- Hoult JR, Paya M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 27(4):713-22.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23):2335-42.
- Hynes RO. 2007. Cell-matrix adhesion in vascular development. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:32-40.
- Iizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. 2008. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1786(2):87-104.
- Iivanainen E, Kahari VM, Heino J, Elenius K. 2003. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech* 60(1):13-22.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. 1998. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58(5):1048-51.
- John A, Tuszynski G. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 7(1):14-23.
- Johnson JR. 1942. The Perkin Reaction and Related Reactions. *Org. React.* p 210-266.
- Jones G. 1967. The Knoevenagel Condensation. *Organic Reactions* 15(204):204-597.
- Kempen I. 2005. Étude des dérivés coumariniques dans une nouvelle approche thérapeutique de l'invasion tumorale: Université de Liège.
- Kempen I, Hemmer M, Counerotte S, Pochet L, de Tullio P, Foidart JM, Blacher S, Noel A, Frankenne F, Pirotte B. 2008. 6-Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid derivatives in a new approach of the treatment of cancer cell invasion and metastasis. *Eur J Med Chem* 43(12):2735-50.
- Kempen I, Papapostolou D, Thierry N, Pochet L, Counerotte S, Masereel B, Foidart JM, Reboud-Ravaux M, Noel A, Pirotte B. 2003. 3-Bromophenyl 6-acetoxymethyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate inhibits cancer cell invasion in vitro and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* 88(7):1111-8.

- Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. 2004. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 50(2):87-100.
- Knoevenagel E. 1898. Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 31:2596-2619.
- Langlois A, Chouinard F, Flamand N, Ferland C, Rola-Pleszczynski M, Laviolette M. 2009. Crucial implication of protein kinase C (PKC)-delta, PKC-zeta, ERK-1/2, and p38 MAPK in migration of human asthmatic eosinophils. *J Leukoc Biol* 85(4):656-63.
- Lau WN, Yeung KL, Martin-Aranda R. 2008. Knoevenagel condensation reaction between benzaldehyde and ethyl acetoacetate in microreactor and membrane microreactor. *Microporous and Mesoporous Materials* 115(1-2):156-163.
- Li H, Fan X, Houghton J. 2007. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 101(4):805-15.
- Maquoi E, Sounni NE, Devy L, Olivier F, Frankenne F, Krell HW, Grams F, Foidart JM, Noel A. 2004. Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin Cancer Res* 10(12 Pt 1):4038-47.
- Mattot V, Pourties A, Soncin F, Vandebunder B. 1998. La morphogenèse de l'arbre vasculaire. De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques. *Med-Sci.* 14:437-447.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1263-84.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705(2):69-89.
- Murphy G, Nagase H. 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 29(5):290-308.
- Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. 1997. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 17(5):221-39.
- Noel A, Jost M, Lambert V, Lecomte J, Rakic JM. 2007. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol Med* 13(8):345-52.

IX. Références bibliographiques

- Nygren P, Larsson R. 2003. Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs. *J Intern Med* 253(1):46-75.
- Ostman A. 2004. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(4):275-86.
- Pacifico F, Leonardi A. 2006. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol* 72(9):1142-52.
- Pechmann Hv. 1884. Neue Bildungsweise der Coumarine. Synthese des Daphnetins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 17(1):929-36.
- Perez-Tomas R. 2006. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* 13(16):1859-76.
- Perkin WH. 1868. On the hydride of aceto-salicyl. *Journal of Chemical Society* 21:181.
- Perret GY, Crepin M. 2008. New pharmacological strategies against metastatic spread. *Fundam Clin Pharmacol* 22(5):465-92.
- Pochet L, Doucet C, Dive G, Wouters J, Masereel B, Reboud-Ravaux M, Pirotte B. 2000. Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of alpha-chymotrypsin and human leukocyte elastase. *Bioorg Med Chem* 8(6):1489-501.
- Pochet L, Doucet C, Schynts M, Thierry N, Boggetto N, Pirotte B, Jiang KY, Masereel B, de Tullio P, Delarge J, Reboud-Ravaux M. 1996. Esters and amides of 6-(chloromethyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as inhibitors of alpha-chymotrypsin: significance of the "aromatic" nature of the novel ester-type coumarin for strong inhibitory activity. *J Med Chem* 39(13):2579-85.
- Pochet L, Frederick R, Masereel B. 2004. Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors. *Curr Pharm Des* 10(30):3781-96.
- Pommier Y. 1998. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors. *Biochimie* 80(3):255-70.
- Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57(20):4593-9.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):159-78.

- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16(3):107-21.
- Ranson M. 2004. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 90(12):2250-5.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue):D227-33.
- Reddy NS, Gumireddy K, Mallireddigari MR, Cosenza SC, Venkatapuram P, Bell SC, Reddy EP, Reddy MV. 2005. Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1. *Bioorg Med Chem* 13(9):3141-7.
- Reddy NS, Mallireddigari MR, Cosenza S, Gumireddy K, Bell SC, Reddy EP, Reddy MV. 2004. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett* 14(15):4093-7.
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. 2007. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia* 21(1):44-52.
- Ribatti D, Vacca A, Presta M. 2000. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 35(5):227-31.
- Rowe RG, Weiss SJ. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol* 18(11):560-74.
- Rowinsky EK. 2004. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 55:433-57.
- Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke IJ, Arlt MJ, Sturzebecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Kruger A, Sturzebecher J. 2004. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* 279(32):33613-22.
- Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. 2000. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 19(1-2):181-90.
- Smolian H, Aurer A, Sittinger M, Zacher J, Bernimoulin JP, Burmester GR, Kolkenbrock H. 2001. Secretion of gelatinases and activation of gelatinase A (MMP-2) by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biol Chem* 382(10):1491-9.
- Song A, Wang X, Lam KS. 2003. A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with *ortho*-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Letters* 44(9):1755-1758.

IX. Références bibliographiques

- Sottile J. 2004. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 1654(1):13-22.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Stoermer R, Behn K. 1901. Synthese aromatischer Alkohole mit Formaldehyd. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 34:2455-2460.
- Szekeres T, Novotny L. 2002. New targets and drugs in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 11(3):117-25.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 160(2):673-80.
- Thurston G. 2003. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 314(1):61-8.
- Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw CI, Vermeij-Keers C. 1997. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 4(4):311-6.
- Vandenbunder B, Fafeur V, Wernert N, Stéhelin D. 1994. Analyse moléculaire de l'angiogénèse tumorale. *Med-Sci.* 10:516-527.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1):39-51.
- Vihinen P, Ala-aho R, Kahari VM. 2005. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 5(3):203-20.
- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8):827-39.
- Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH. 2002. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Lett* 183(2):163-8.
- Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman F, Hwang JK. 1989. How do serine proteases really work? *Biochemistry* 28(9):3629-37.
- Wikman H, Vessella R, Pantel K. 2008. Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *Apmis* 116(7-8):754-70.

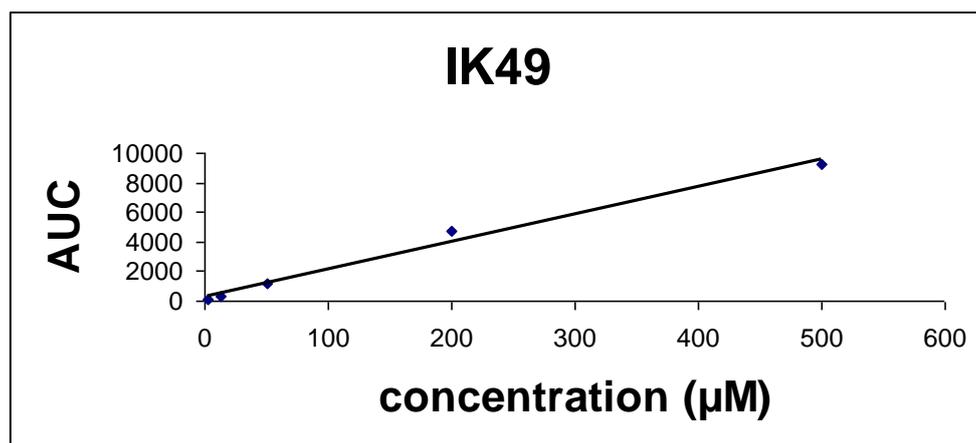
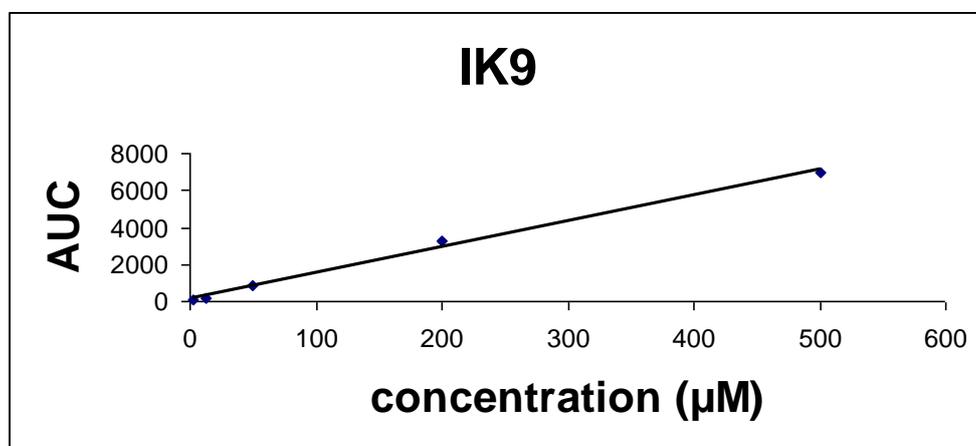
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10(2):145-7.
- Woodruff EH. 1955. 4-methylcoumarin. *Organic Syntheses Coll.* p 581-3.
- Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P. 1999. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 260(3):682-5.
- Zetter BR. 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49:407-24.
- Zhou X, Wang XB, Wang T, Kong LY. 2008. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorg Med Chem* 16(17):8011-21.

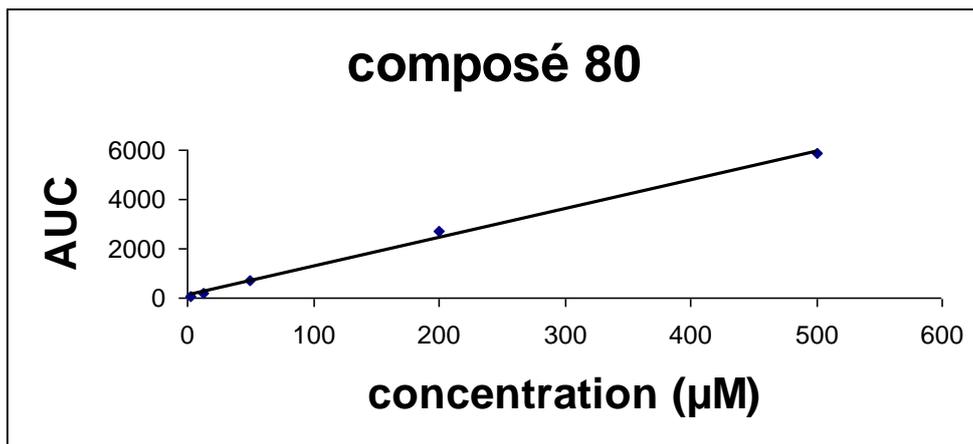
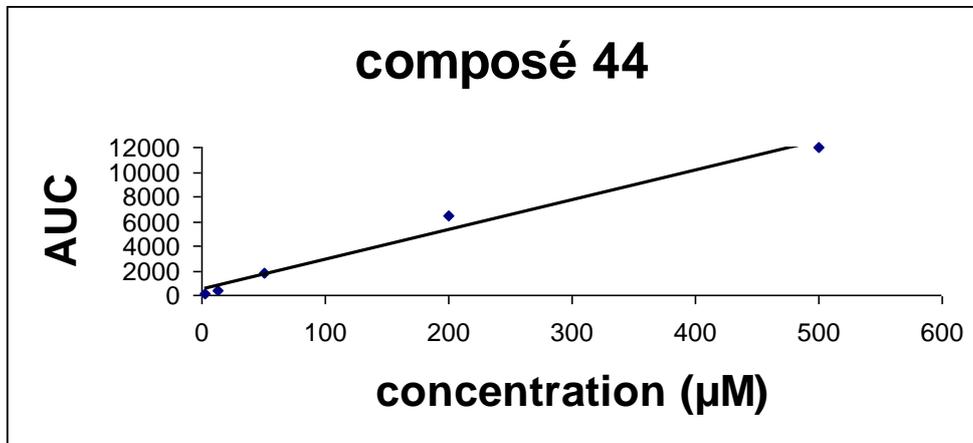
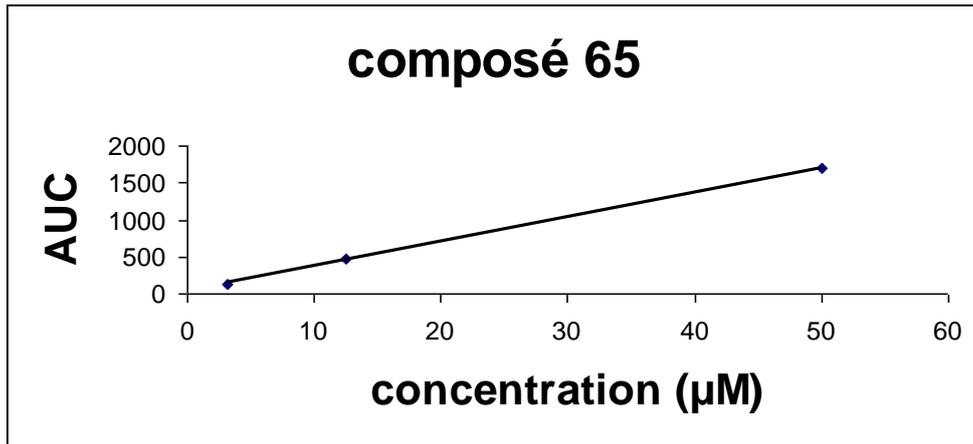
IX. Références bibliographiques

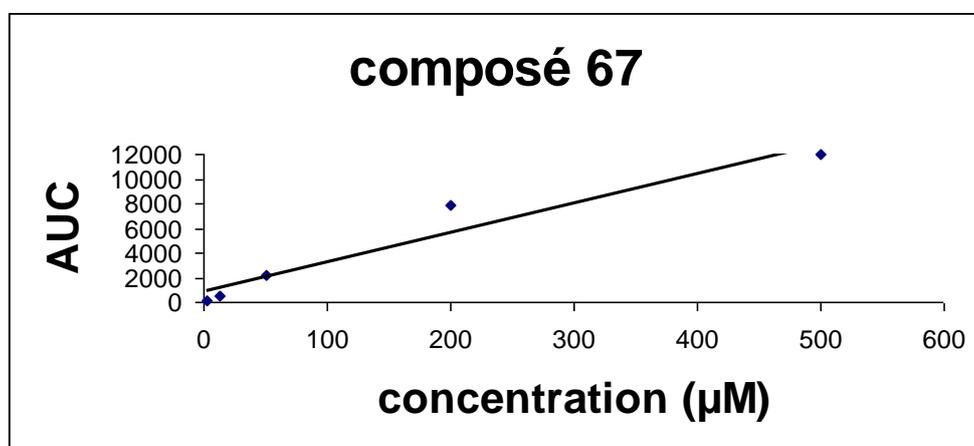
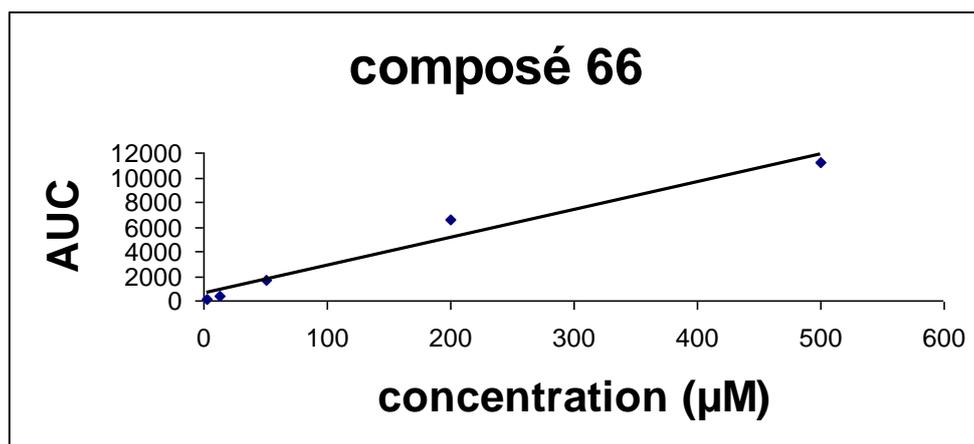
X. ANNEXES

Annexe 1

Droites d'étalonnage réalisées dans le cadre des expériences de solubilité

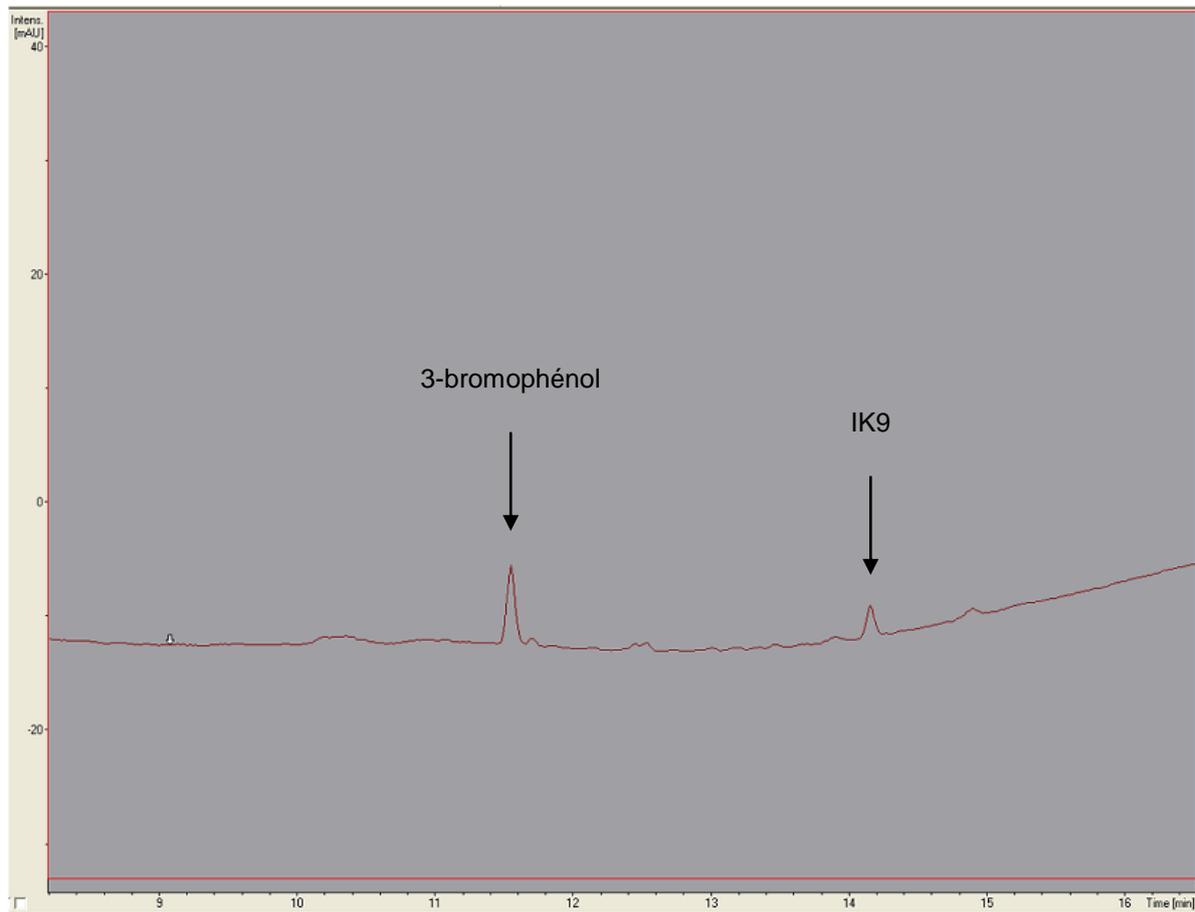




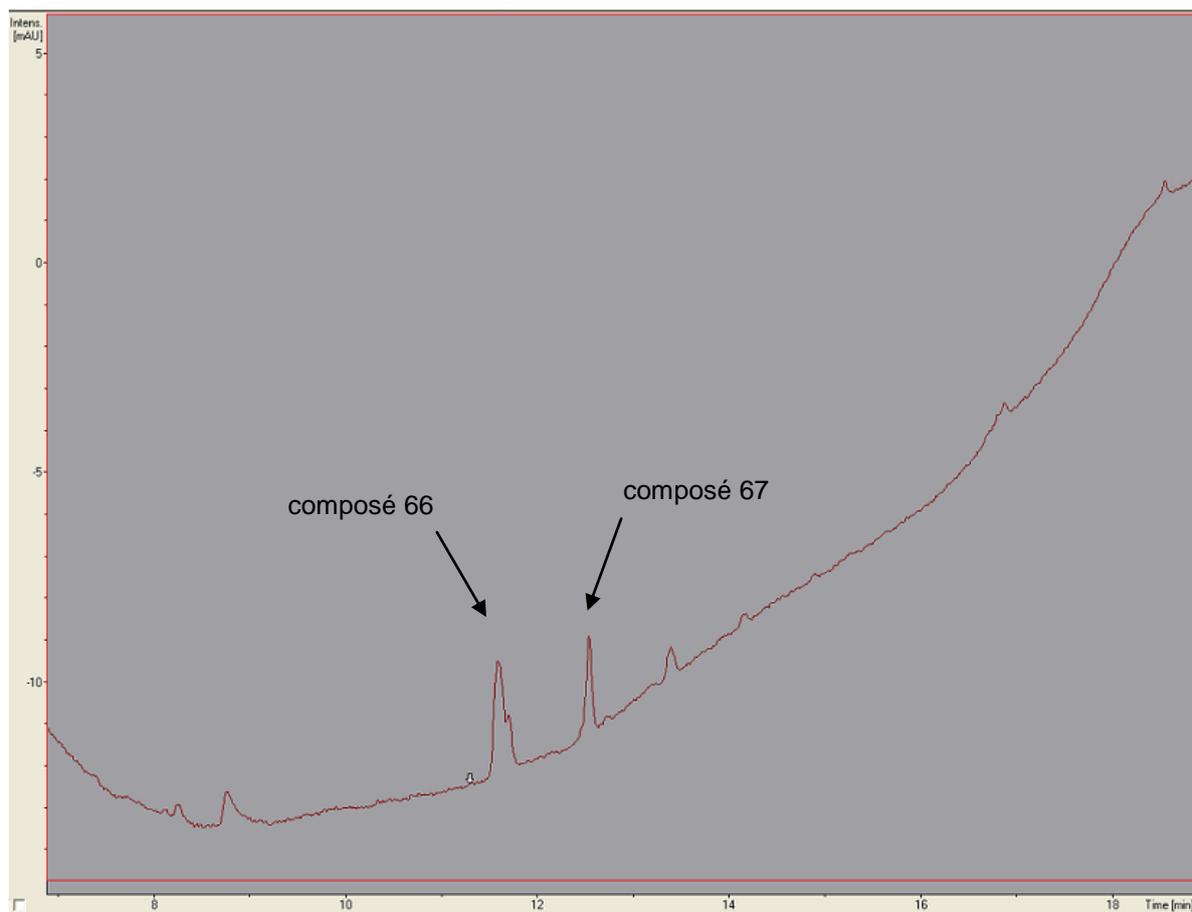


Annexe 2

Exemples de chromatogrammes obtenus lors de l'étude de stabilité



Chromatogramme obtenu pour l'IK9 après 24 heures d'incubation dans du MEM (+ 5% DMSO) à 37°C



Chromatogramme obtenu pour le composé **67** après 72 heures d'incubation dans du MEM (+ 5% DMSO) à 37°C