

..... NNT/NL : 2022AIXM0109/010ED250

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 24 février 2022 par

Romain Mustière

Synthèse de nouvelles thiénopyrimidinones et analogues à visée antiplasmodiale

Discipline	• Composition du jury	
Sciences Chimiques	• Dr Alexandra DASSONVILLE-KLIMPT	Rapporteuse
École doctorale	• Université de Picardie Jules Verne	
ED 250 – Sciences Chimiques de Marseille	• Pr Marc LE BORGNE	Rapporteur
Laboratoire/Partenaires de recherche	• Université Claude Bernard Lyon 1	
Institut de Chimie Radicalaire (ICR) – UMR	• Dr Sandrine ALIBERT	Examinatrice
CNRS 7273	• Aix-Marseille Université	
	• Pr Dominique MAZIER	Examinatrice
	• Sorbonne Université	
	• Pr Patrice VANELLE	Directeur de thèse
	• Aix-Marseille Université	
	• Dr Nicolas PRIMAS	Co-directeur de thèse
	• Aix-Marseille Université	
	•	
	•	

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de thèse et avant de l'exposer, je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé et/ou m'ayant soutenu de près ou de loin durant ce travail de thèse. Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres du jury.

Je remercie le Professeur Patrice Vanelle, directeur de ce travail de thèse et directeur de l'équipe PCR, de m'avoir accepté pour réaliser ce travail de thèse et je le remercie aussi de sa bienveillance, son attention et de sa rigueur qu'il a montré durant ces 3 années.

Je remercie du fond du cœur le Docteur Nicolas Primas, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir guidé et avoir été à mon écoute ainsi que pour sa bonne humeur et sa sympathie quotidienne durant ces 3 années. Ses connaissances et ses conseils ont permis à ces travaux d'être ce qu'ils sont. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance pour la réalisation de ce travail. Je n'aurais pas pu avoir meilleur encadrant !

Je remercie le Docteur Alexandra Dassonville-Klimpt, de l'université de Picardie Jules Verne, d'avoir accepté d'être rapporteuse pour ce travail de thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour sa disponibilité et sa venue.

Je remercie le Professeur Marc Le Borgne, de l'université Lyon 1 Claude Bernard, d'avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux. Je tiens à lui faire part de ma reconnaissance pour sa disponibilité et sa venue.

Je remercie le Professeur Dominique Mazier, de Sorbonne Université, d'avoir accepté le rôle d'examinatrice au sein de ce jury, ainsi que pour son rôle de partenaire essentiel avec l'équipe « Paludisme : identification et validation pré-clinique de nouvelles cibles thérapeutiques » du CIMI de Paris.

Je remercie le Docteur Sandrine Alibert, d'Aix-Marseille Université, d'avoir accepté de rejoindre ce jury comme examinatrice ainsi que pour sa sympathie lors de nos rencontres dans les couloirs de la faculté de pharmacie.

Je remercie tous les membres et ex-membres de l'équipe PCR rencontrés durant ces trois années.

Je tiens tout d'abord à remercier Romain Paoli-Lombardo sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Merci de m'avoir accompagné et d'avoir formé avec moi ce duo qui aura mis l'ambiance quotidiennement au sein du laboratoire. En espérant continuer à passer d'excellents moments avec toi durant les années à venir.

Je remercie aussi chaleureusement le Docteur Dyhia Amrane, qui au côté de Romain, a su rajouter de la bonne humeur dans mon quotidien durant les 2 années et demie partagées à ses côtés. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance et j'espère le meilleur pour la suite de ta carrière.

Je remercie Viviana Dell'Orco qui a participé durant son stage de M2 à ces travaux de thèse et qui a permis de les faire avancer significativement. Ta spontanéité, ta gentillesse et ton charmant accent d'Italie ont été une agréable parenthèse lors de ton passage au labo 8.

Je remercie Oscar Leonardo Avendaño dont la bonne humeur permanente et le sens de l'humour s'étoffant à mesure que son français s'améliore me pousse à lui souhaiter que le meilleur pour sa thèse et la suite de sa carrière. Je te souhaite le meilleur à toi et à Bibi et j'espère arpenter de nouveau les calanques à tes côtés.

Je remercie le Docteur Guillaume Tintori avec lequel j'ai apprécié nos discussions sur tout et n'importe quoi avec Romain ainsi que son impressionnante culture musicale. Je lui souhaite le meilleur à lui et sa petite famille.

Je remercie le Docteur Arona Fall dont la belle chimie a su illuminer le laboratoire durant sa thèse. Je lui souhaite bonne réussite dans son escapade normande.

Je remercie le Docteur Omar Khoumeri, le McGiver du laboratoire, pour ses avis éclairés en matière de réactions chimiques ainsi que pour sa bonne humeur quotidienne et son sens de l'humour à toute épreuve.

Je remercie le Docteur Youssef Kabri, le maître de colonnes chromatographiques, pour nos discussions footballistiques enflammées et son expertise sur les couplages pallado-catalysés.

Je remercie Vincent Montero pour sa sympathie durant ces deux ans ensemble et je lui souhaite le meilleur pour la suite de sa thèse.

Je remercie le Docteur Vincent Remusat pour son travail au service RMN, indispensable durant ces travaux ainsi que son implication majeure dans le bon fonctionnement du laboratoire.

Je remercie le Docteur Cédric Spitz pour sa sympathie et sa tranquillité permanente.

Je remercie Françoise Arrechi pour sa gentillesse et sa douceur permanente ainsi que son implication quotidienne majeure dans le bon fonctionnement du laboratoire.

Je remercie Aurélien Cloet, Nadhrata Assani, Alexandre Benech et le Docteur Tataye Moussounda pour les bons moments passés durant ces derniers mois en leur compagnie.

Je remercie Nassim Salem, Mélanie Matteudi et Lucas Almeida pour les bons moments passés en leur compagnie pendant et après leur passage au laboratoire.

Je remercie le Docteur Yuxi Xiao qui a été d'une patience à toute épreuve pour supporter le duo de Romain dans la salle étudiante pendant trois ans.

Je tiens enfin à remercier le reste des membres de l'équipe PCR :

- Les Professeurs Thierry Terme, Maxime Crozet et Pascal Rathelot ;
- Les Docteurs Fanny Mathias, Manon Roche, Caroline Castera – Ducros, Julie Broggi, Marc Montana, Christophe Curti, Armand Gellis, Sébastien Redon et Gamal Giuglio-Tonolo ;
- Marion Casanova, Hugo Roux, Thérèse Schembri et Gilles Arrechi.

Je tiens aussi à remercier les personnes avec lesquelles j'ai pu échanger au sein de ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur Pierre Verhaeghe pour tous ses avis éclairés sur la direction de ce travail et son optimisme permanent.

Je remercie le Docteur Céline Deraeve pour son aide dans ces travaux et pour les méthodes qu'elles a su me transmettre durant mon stage de master 2 et qui m'ont aidé durant ces trois ans.

Je remercie nos partenaires de l'UMR VITROME : Mr Sébastien Hutter pour son implication majeure dans ce travail par le biais des tests d'activité sur stade sanguin de *P. falciparum* et de cytotoxicité, ainsi que le Pr Nadine Azas et le Dr Anita Cohen.

Je remercie les membres de l'IBMM de Montpellier qui participe à nos côtés à ce travail sur le noyau thiénopyrimidinone : Prisca Lagardère accompagnée des Professeurs Vincent Lisowski et Nicolas Masurier.

Je remercie les Docteurs Nadia Amanzougaghene, Shahin Tajeri, Valérie Soulard et Jean-François Franetich pour leur travail sur les différents tests d'activité sur le stade hépatique.

Je remercie nos partenaires du CERMN : le Professeur Aurélie Malzert-Fréon, le Docteur Marc Since ainsi que Mmes Peggy Suzanne et Sophie Corvaisier.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, le Professeur Stéphane Gastaldi et les Docteurs Anouk Siri, Ahlem Bouhlel, Sébastien Maria et Paul Brémond pour leur écoute et leurs conseils concernant ces travaux.

Je tiens enfin à remercier de tout mon cœur mes parents qui m'ont soutenu durant ces trois années malgré la distance depuis la Normandie. Ça y est, les études sont finies. Je remercie aussi ma famille et plus particulièrement mes grands-parents pour leur amour et leur soutien depuis toujours.

Je souhaite aussi remercier des personnes qui ont fait partie de mon quotidien durant ces trois années et qui par leur simple présence et nos discussions m'ont soutenu. Merci à Bobo, Sancho, Timmeh, Baka, Tobi, Jimbo, Skryah, Mochi, Balls, Fruits, Terrah, Ber et Tae.

Et pour terminer je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale et ses généreux donateurs qui ont permis le financement de ces travaux de thèse (code projet DCM20181039565).

Table des matières

Table des abréviations	1
Table des illustrations	4
Liste de publications et communications dans des congrès scientifiques.....	15
Introduction générale	17
Chapitre 1 : Le paludisme, première parasitose mondiale	20
1. Généralités sur le paludisme.....	21
1.1. Le parasite : <i>Plasmodium spp.</i>	21
1.1.1. Phylogénie de <i>Plasmodium</i>	21
1.1.2. Les différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	22
1.2. Le vecteur : <i>Anopheles spp.</i>	23
1.3. Epidémiologie du paludisme.....	25
1.3.1. Répartition du paludisme dans le monde	26
1.3.2. Evolution du nombre de cas et de décès dûs au paludisme depuis 2000	26
1.3.3. Le paludisme en France.....	28
1.3.4. Objectifs de l’OMS dans la lutte contre le paludisme.....	28
1.3.5. Moyens engagés dans la lutte antipaludique	29
1.4. Le cycle de développement de <i>Plasmodium</i>.....	30
1.4.1. Phase hépatocytaire.....	31
1.4.2. Phase érythrocytaire	32
1.4.3. Phase sporogonique.....	33
1.5. Physiopathologie du paludisme.....	33
1.5.1. L’accès palustre simple.....	34
1.5.2. L’accès palustre grave	35
1.6. Méthodes pour le diagnostic du paludisme	36
2. La chimiothérapie antiparasitaire	38
2.1. Les dérivés de la quinoléine.....	40
2.1.1. La quinine	40
2.1.2. Les 4-aminoquinoléines	41
2.1.3. Les 8-aminoquinoléines	43
2.2. Les arylaminoalcools	44
2.3. Dérivés quinoléiques et arylaminoalcools : un mécanisme d’action encore flou .	46
2.4. L’atovaquone	49
2.5. Les antifolates.....	50

2.6.	Les antibiotiques à activité antipaludique.....	52
2.7.	L'artémisinine et ses dérivés.....	53
3.	La prévention antipaludique	55
3.1.	La chimioprophylaxie	55
3.1.1.	Dans les pays endémiques	56
3.1.2.	Pour les voyageurs	57
3.2.	La lutte antivectorielle	57
3.2.1.	Les moustiquaires imprégnées d'insecticide	58
3.2.2.	La pulvérisation résiduelle intérieure	59
3.2.3.	Autres moyens de lutte antivectorielle.....	61
Chapitre 2 : Evolutions de la lutte antipaludique face à un parasite multi-résistant et un vecteur tenace.....		63
1.	Les dangers face au progrès de la lutte antipaludique.....	64
1.1.	<i>Plasmodium</i> , un parasite résistant à tous les médicaments sur le marché	64
1.1.1.	<i>Pfcr</i> t et chloroquino-résistance.....	66
1.1.2.	<i>Pfmdr</i> 1 et résistance aux dérivés quinoléiques	68
1.1.3.	<i>Pfpm</i> et résistance à la pipéraquline.....	68
1.1.4.	Mutations dans la voie des folates et sur le cytochrome bc ₁	69
1.1.5.	La résistance à l'artémisinine	69
1.2.	Des anophèles résistants aux insecticides	73
1.3.	Autres dangers menaçant la lutte antipaludique.....	75
2.	La vaccination.....	76
3.	Le développement de nouvelles thérapies antipaludiques.....	78
3.1.	Processus de développement d'un médicament antipaludique	79
3.1.1.	« Hit to lead chemistry » antipaludique	79
3.1.2.	Etudes pré-cliniques et cliniques : TCP et TPP	80
3.2.	Anticiper l'apparition de résistances.....	85
4.	Molécules antipaludiques en cours de développement	87
4.1.	Molécules en phase II des essais cliniques	87
4.1.1.	Le ganaplacide	88
4.1.2.	La cipargamine	90
4.1.3.	La ferroquine	91
4.1.4.	SJ733.....	92
4.1.5.	L'artéfénomel	93
4.1.6.	MMV048.....	93
4.1.7.	DSM265	94
4.2.	Molécules en phase I des essais cliniques	96

4.2.1.	P218.....	96
4.2.2.	ZY19489.....	97
4.2.3.	ACT-451840.....	98
4.2.4.	M5717.....	99
4.3.	Molécules au stade préclinique.....	100
4.4.	Cibles plasmodiales d'intérêt.....	103
5.	Série thiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one et activité antiplasmodiale.....	103
5.1.	Travaux aboutissants au composé M1.....	104
5.2.	Propriétés du composé M1.....	108
5.3.	Le cycle thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidine dans la littérature.....	116
5.3.1.	Autres thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidines antiplasmodiales.....	116
5.3.2.	Thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidines sur le marché ou en essais cliniques.....	118
5.4.	Objectifs des travaux de thèse.....	121
Chapitre 3 : Modulation de la position 6 en série 2-aminothiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one par réactions de couplages pallado-catalysés.....		
1.	Couplages pallado-catalysés et choix du partenaire halogéné de couplage	125
1.1.	Généralités sur les couplages pallado-catalysés.....	125
1.2.	Choix et préparation de l'intermédiaire clé pour les couplages pallado-catalysés	127
2.	Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura en position 6.....	130
2.1.	Généralités sur le couplage de Suzuki-Miyaura.....	130
2.2.	Choix de l'intermédiaire pour le couplage de Suzuki-Miyaura.....	132
2.3.	Couplage de Suzuki-Miyaura en position 5 du dérivé 3.....	135
2.4.	Réaction de cyclisation sur les dérivés issus du couplage de Suzuki-Miyaura.....	138
2.4.1.	Formation du cycle 2-aminopyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.....	138
2.4.2.	Dérivés thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidine synthétisés à partir des thiophènes fonctionnalisés par le couplage de Suzuki-Miyaura.....	139
2.4.3.	Réactions additionnelles.....	141
2.5.	Criblage primaire des composés obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura.....	142
2.5.1.	Principe du test de mesure de la CE ₅₀ sur <i>P. falciparum</i>	142
2.5.2.	Principe du test de mesure de la CC ₅₀ sur lignée cellulaire HepG2.....	143
2.5.3.	Résultats du criblage.....	145
2.6.	Salification des composés.....	148
3.	Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one obtenus par couplage de Sonogashira en position 6.....	150
3.1.	Généralités sur le couplage de Sonogashira.....	150

3.2.	Couplage de Sonogashira en position 6.....	152
3.3.	Résultats du criblage primaire	154
4.	Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one obtenus par couplage de Buchwald-Hartwig en position 6.....	156
4.1.	Généralités sur le couplage de Buchwald-Hartwig.....	156
4.2.	Mise au point des conditions réactionnelles	159
4.3.	Couplage de Buchwald-Hartwig en position 6	161
4.4.	Résultats du criblage primaire	163
5.	Conclusion	164
6.	Experimental part.....	165
6.1.	Materials and methods	165
6.2.	Access to compound 3.....	166
6.3.	Suzuki-Miyaura couplings.....	168
6.4.	Substitution reactions on 29.....	182
6.5.	Cyclisation reaction on compounds from Suzuki-Miyaura couplings.....	183
6.6.	Compounds obtained after additional reactions from cyclisation derivatives.....	200
6.7.	Hydrochloride salts synthesis	202
6.8.	Compounds obtained after Sonogashira coupling	206
6.9.	Compounds obtained from Buchwald-Hartwig coupling.....	210
Chapitre 4 : Analogues de la thiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidine obtenus par stratégie de « <i>scaffold hopping</i> ».....		214
1.	Généralités sur la stratégie de « <i>scaffold hopping</i> ».....	215
1.1.	Principe et méthodes	215
1.2.	Approche retenue pour la synthèse d'analogues de M1.....	217
2.	Série thiéno[2,3-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one	218
2.1.	Le cycle thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine dans la littérature	218
2.2.	Synthèse des dérivés thiéno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.....	220
2.2.1.	Test de la réaction de cyclisation	220
2.2.2.	Voie de synthèse des 2-amino-thiophène-3-carboxylate d'alkyle fonctionnalisé en position 5.....	220
2.2.3.	Oxydation des 2-aryléthanol	221
2.2.4.	Synthèse des 2-amino-thiophène-3-carboxylates d'éthyle fonctionnalisés en position 5.....	222
2.2.5.	Synthèse des thiéno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one	223
2.2.6.	Résultat du criblage primaire	223
3.	Série thiazolopyrimidin-7(6<i>H</i>)-one	224
3.1.	Le cycle thiazolopyrimidine dans la littérature	224

3.2.	Série thiazolo[4,5- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-one.....	226
3.2.1.	Voie de synthèse	226
3.2.2.	Résultats du criblage primaire	229
3.3.	Série thiazolo[5,4- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-one.....	230
4.	Chalcogèno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.....	231
4.1.	Série furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.....	232
4.1.1.	Le cycle furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidine dans la littérature	232
4.1.2.	Synthèse des dérivés furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one	233
4.1.3.	Résultats du criblage primaire	234
4.2.	Série sélénophèno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one	235
4.2.1.	Le sélénium en chimie médicinale	235
4.2.2.	Synthèse des dérivés sélénophèno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one	238
4.2.3.	Résultats du criblage primaire	239
5.	Conclusion	240
6.	Experimental part.....	241
6.1.	Material and methods.....	241
6.2.	Oxydation of 2-phenylethanols	241
6.3.	Synthesis of ethyl 2-aminothiophene-3-carboxylates.....	242
6.4.	Liebeskind-Srogl couplings	243
6.5.	Access to thiazolo[5,4- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-one scaffold	245
6.6.	Synthesis of furane aminoesters.....	246
6.7.	Synthesis of selenophene aminoester.....	249
6.8.	Cyclisation reactions	250
6.9.	Hydrochloride salts synthesis	256
Chapitre 5 : Autres modifications ou tentatives de modification du cycle thiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one		
258		
1.	Synthèse de 7-méthylthiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)ones	259
1.1.	L'effet magique du méthyle ou « magic methyl effect »	259
1.2.	Synthèse des dérivés.....	260
1.3.	Résultats du criblage primaire	263
2.	Synthèse de <i>N</i> - <i>tert</i> -butyl-6-(4-méthylphényl)-4-(alcynyl)thiéno[3,2 <i>d</i>]pyrimidin-2-amines	264
2.1.	Synthèse des dérivés.....	264
2.2.	Résultats du criblage primaire	266
3.	Dérivés comportant une cyclobutylamine en position 2	267
3.1.	Synthèse des dérivés.....	267
3.2.	Résultats du criblage primaire	268

4. Tentatives de modulations n'ayant pas abouti	269
4.1. Dérivés 2-aminométhyle	269
4.2. Remplacement de l'azote en position 2 par un autre hétéroatome	270
4.3. Synthèse de dérivés comportant un carbocycle saturé en position 6	271
5. Experimental part	273
5.1. Materials and methods	273
5.2. C-H arylation	273
5.3. Sonogashira couplings at position 4	274
5.4. Cyclisations	276
Chapitre 6 : Résultats biologiques supplémentaires et étude RSA	281
1. Criblage secondaire : Activité sur le stade hépatique	282
1.1. Molécules testées	282
1.2. Principe du test sur le stade hépatique	283
1.2.1. Modèles employés	283
1.2.2. Déroulement du test	284
1.1. Résultats des tests sur le stade hépatique	285
2. Criblage secondaire : mesure de la stabilité métabolique	286
2.1. Principe du test	286
2.2. Résultats	286
3. Etude des relations structure-activité de la série thiéno[3,2-<i>d</i>]pyrimidin-4(3<i>H</i>)-one	288
3.1. Effet du substituant en <i>para</i> du cycle phényle	288
3.2. Effet sur la nature du cycle en position 6	291
3.3. Effet du linker entre le cycle phényle et le cycle thiénoypyrimidinone	292
3.4. Effet de la modification du cycle thiophène	294
3.5. Effet des autres modifications	295
3.6. Bilan RSA de la série thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one	296
Conclusion générale et perspectives	297
Annexes	301

Liste des annexes :

Annexe 1. Paramètres permettant de définir le risque de résistance pour un composé antiplasmodial. D'après Duffey <i>et al.</i> ¹⁹⁰	302
Annexe 2. Publication soumise auprès du journal <i>RSC Advances</i> et en cours de relecture par les pairs.....	303
Annexe 3. Manuscrit de la future publication concernant les travaux de <i>scaffold hopping</i>	321
Annexe 4. Résultats des différents composés testés sur hépatocytes simiens infectés par <i>P. berghei</i> . EEf : <i>Exo-Erythrocytic Form</i>	348

Table des abréviations

- **ABC** : *ATP Binding Casser*
- **AcAS** : Acétyl-CoenzymeA synthétase
- **ACBP** : *Acyl-CoA-Binding Protein*
- **ACPR** : *Adequate Clinical and Parasitic Response*
- **ACT** : *Artemisinin-based Combined Therapy* – Thérapie combinée à base d'artémisinine
- **Ac β** : Adénylyl cyclase bêta
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **APP** : Aminopeptidase P
- **ATP** : Adénosine Tri-Phosphate
- **ATP4** : *P-type cation translocating ATPase*
- **Bkt** : tyrosine kinase de Bruton
- **BTB** : *Broad-complex, Tramtrack and Bric a Brac*
- **CC₅₀** : Concentration Cytotoxique à 50 %
- **CE₅₀** : Concentration Efficace à 50 %
- **CI₅₀** : Concentration Inhibitrice à 50 %
- **CIRC** : Centre International de Recherche contre le Cancer
- **cIRS** : Isoleucine-tRNA ligase
- **CLK** : *Cyclin-Dependent-Like Kinase*
- **CPR** : Cytochrome P450 Réductase
- **CRT** : *Chloroquine Resistance Transporter*
- **CysRS** : Cystéine-tRNA transférase
- **CytB** : Cytochrome Bc₁
- **DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane
- **DHFR** : DiHydroFolate Réductase
- **DHODH** : DiHydroOrotate DésHydrogénase
- **DHPS** : DiHydroPtérote Synthase
- **DMF** : DiMéthylFormamide
- **DMP** : Periodinane de Dess-Martin
- **EGFR** : *Epidermal Growth Factor Receptor*
- **EMP** : *Erythrocyte Membrane Protein*
- **Eq** : Equivalent

- **FDA** : *Food and Drug Administration*
- **FEE** : Forme Exo-Erythrocytaire
- **F/GGPPS** : Géranylgeranyl pyrophosphatase synthase
- **G6PD** : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase
- **GCN5** : Histone acétyltransférase GCN5
- **GTS** : *Global Technical Strategy* – Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme
- **HRMS** : *High Resolution Mass Spectrometry* – Spectrométrie de Masse Haute Résolution
- **HRP** : *Histidine-Rich Protein*
- **Hs** : *Homo sapiens*
- **HT** : Hexose transférase
- **HSP70/HSP90** : Protéine de choc thermique 70 (ou 90)
- **IBX** : Acide orthoiodoxybenzoïque
- **iPr** : Isopropyle
- **MDR** : *Multi-Drug Resistant transporter*
- **MMV** : *Medicines for Malaria Venture*
- **M.O.** : Micro-ondes
- **mTOR** : *molecular Target Of Rapamicyn*
- **MTT** : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
- **NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- **NCR1** : *Niemann-Pick type C1-related protein*
- **NMT** : *N-myristoyl transférase*
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PAK4** : *p21-activated kinase*
- **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*
- **PDEβ** : Phosphodiesterase béta
- **Pf** : *Plasmodium falciparum*
- **PheRS** : Phénylalananyl-tRNA transférase
- **PI3K** : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
- **PI4K** : Phosphatidyl-Inositol 4-Kinase
- **PIDA** : diacétate d'iodobenzène
- **PKG** : Protéine Kinase G
- **PM** : Plasmépsine

- **PNP** : Purine Nucléoside Phosphorylase
- **ProRS** : *Prolyl-tRNA synthetase*
- **Pv** : *Plasmodium vivax*
- **QSA** : *Quiescent-Stage Assay*
- **Rdt** : Rendement
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- **RSA** : Relation Structure-Activité ou lorsqu'il s'agit d'un test, Ring-stage Survival Assay
- **SerRS** : *Cytosolic seryl-tRNA synthetase*
- **tBu** : *tert-butyle*
- **t.a.** : Température ambiante
- **TCP** : *Target Candidate Profile*
- **TDR** : Test de Diagnostic Rapide
- **TPP** : *Target Product Profile*

Table des illustrations

Figures :

Figure 1. Répartition des principales espèces d'anophèles dans le monde. D'après Sachs <i>et al.</i> ¹³	24
Figure 2. Carte, datant de 2020, indiquant les pays où le paludisme est endémique (en rouge), où aucun cas de paludisme endémique n'a été détecté en 2019 (en orange), depuis 2018 (en rose) ou depuis au moins 2016 (en bleu) ainsi que les pays considérés sans paludisme après 2000 (en vert). D'après l'OMS.....	26
Figure 3. Graphique représentant l'évolution du nombre de cas de paludisme par an entre 2000 et 2019 dans le monde. Chiffres de l'OMS. ¹⁴	27
Figure 4. Graphique représentant l'évolution du nombre de décès dûs au paludisme entre 2000 et 2019 dans le monde. Chiffres de l'OMS. ¹⁴	28
Figure 5. Cellule(s) HepG2 infectée(s) par <i>P. berghei</i> observées au microscope classique (à gauche), au microscope électronique en transmission (au centre) et au microscope électronique à balayage (à droite). D'après Sturm <i>et al.</i> ²⁸	31
Figure 6. Images au microscope d'hématies infectées par des trophozoïtes jeunes (stade anneau, à gauche), des trophozoïtes matures (au centre) et des schizontes (à droite). Photos d'Ashley <i>et al.</i>	32
Figure 7. A gauche, représentation des différents stades d'un gamétocyte. D'après Meibalan <i>et al.</i> ³¹ A droite, érythrocytes infectés par un gamétocyte femelle (à gauche) et un gamétocyte mâle (à droite) observés au microscope électronique à balayage. D'après Maier <i>et al.</i> ²⁵	33
Figure 8. Surface d'un érythrocyte sain (à gauche) et d'un érythrocyte infecté par <i>Plasmodium</i> (à droite) obtenue par microscopie électronique. D'après Maier <i>et al.</i> ²⁵	36
Figure 9. A gauche, un frotti sanguin et à droite, une goutte épaisse.	38
Figure 10. Structure chimique et numérotation du noyau quinoléine.....	40
Figure 11. Structure chimique, de gauche à droite, de la quinine, de la quinidine, de la cinchonine et de la cinchonidine.....	41
Figure 12. Structures chimiques des 4-aminoquinoléines antipaludiques (avec leur noyau en bleu).....	41
Figure 13. Structures chimiques des 8-aminoquinoléines antipaludiques (avec leur noyau en bleu).....	44

Figure 14. Structures chimiques de l'énantiomère (+) de la méfloquine (à gauche) et de la luméfantine (à droite).....	45
Figure 15. Structures chimiques de l'atovaquone et d'une ubiquinone.	49
Figure 16. Structures chimiques, en haut, du proguanil (à gauche) et du cycloguanil (à droite) et en bas, de l'acide folique.	51
Figure 17. Structures chimiques de la sulfadoxine (à gauche) et de l'acide <i>para</i> -aminobenzoïque (à droite).....	51
Figure 18. Structure chimique de la pyriméthamine	52
Figure 19. Structures chimiques (de gauche à droite) de la clindamycine, de la doxycycline et de la tétracycline.	53
Figure 20. Structure chimique de l'artémisinine.	53
Figure 21. Structures chimiques (de gauche à droite) de l'artésunate, de l'artéméter et de la dihydroartémisinine.	55
Figure 22. Moustiquaires imprégnées d'insecticides au-dessus de lits.....	58
Figure 23. Structures chimiques des pyréthrinoïdes utilisés sur les moustiquaires imprégnées d'insecticides ainsi que de la pyréthrine I, molécule d'origine naturelle appartenant aux pyréthrines desquelles dérivent les pyréthrinoïdes.	59
Figure 24. Structures chimiques des insecticides utilisés pour la pulvérisation résiduelle intérieure.....	60
Figure 25. Répartition géographique de la résistance à la choroquine (orange), à la sulfadoxine-pyriméthamine (bleu) et à l'artémisinine (vert) en Afrique et en Asie du Sud-Est (2018). D'après Haldar <i>et al.</i> ¹²¹	66
Figure 26. Evolution de la répartition géographique de la résistance à la chloroquine. D'après Packard. ¹³¹	67
Figure 27. Régions de la protéine <i>PfK13</i> et localisation des principales mutations. D'après Oujj <i>et al.</i> ¹⁵²	71
Figure 28. Répartition géographique et proportions de mutations du gène <i>k13</i> (A, KelchX = autres mutations que C580Y) et de l'amplification des plasmepsines 2 et 3 (B) entre 2011 et 2018. D'après van der Pluijm <i>et al.</i> ¹⁵⁸	72
Figure 29. Nombre de catégories d'insecticides dans chaque pays endémique pour lesquelles les anophèles sont confirmés comme résistants. ¹⁷	73
Figure 30. Evolution de la mortalité observée chez <i>A. gambiae</i> (A) et <i>A. funestus</i> (B). Données provenant de tests effectués avec de la deltaméthrine (bleu) ou de la cyperméthrine (orange). D'après Ransson et Lissenden. ¹⁶³	74

Figure 31. Structure chimique du butoxyde de pipéronyle.....	75
Figure 32. Organismes mis en relation via un partenariat pour développement de produits (PDP).....	78
Figure 33. Représentation du risque de résistance pour un composé antipaludique, défini selon 6 paramètres différents. D'après Duffey <i>et al.</i> ¹⁹⁰	86
Figure 34. Composés ayant atteint la phase II des essais cliniques contre le paludisme.....	88
Figure 35. Composés en phase I des essais cliniques contre le paludisme.	96
Figure 36. Comparaisons entre la pyriméthamine et P218.	97
Figure 37. Structure du hit (à gauche) amenant à des candidats pré-cliniques dont ACT-450840.....	99
Figure 38. Structures chimiques de composés au stade préclinique contre le paludisme. ..	102
Figure 39. Structure chimique du composé M1.	104
Figure 40. Données RSA à la suite des premiers travaux de pharmacomodulations. ²⁶¹	108
Figure 41. Résultats du test QSA sur le composé M1 (A) et de la chloroquine (B). La légende indique le détail de chaque condition : molécules et temps d'exposition. ART : dihydroartémisinine ; Mock : milieu sans composé ; CQ : chloroquine.	109
Figure 42. Résultats du test RSA sur le composé M1 à 2,5 et 10 μ M.	109
Figure 43. Effets du composé M1 sur l'invasion des hépatocytes, par des sporozoïtes, pré-incubés avec M1 à différentes concentrations pendant 1 heure. Trois heures après l'invasion des hépatocytes, la culture est rincée puis incubée avec un milieu de culture sans (A) ou avec M1 (B). La référence est la primaquine pour laquelle le pourcentage d'inhibition est de 100 % à toutes les concentrations testées. EEF : forme exo-erythrocytaire.....	110
Figure 44. Effets du composé M1 sur la formation de gamétocytes (A) ainsi que sur leur développement (B). Pour les trois tests : *, <i>p-value</i> < 0,05.	111
Figure 45. Effets du composé M1 sur l'exflagellation des gamétocytes mâles en gamètes mâles, après 2 heures (A) et 24 heures (B) de traitement. **, <i>p-value</i> = 0,065.....	111
Figure 46. Effets du composé M1 sur l'infection de moustiques après un repas sanguin (à J3) sur des souris infectées et traitées par M1. M1 D0-D3 : les souris sont traitées pendant 3 jours (50 mg/kg (1 fois par jour) ; M1 D3-2h : les souris sont traitées à J3 (50 mg/kg), 2 heures avant le repas des moustiques. ***, <i>p-value</i> < 0,0001. **, <i>p-value</i> < 0,0265.	112
Figure 47. Effets du composé M1 sur la parasitémie <i>in vivo</i> sur modèle murin après infection par des sporozoïtes de <i>P. berghei</i> (à J0). Les souris ont été traitées de J-1 à J1. ***, <i>p-value</i> < 0,0056. PQ : primaquine ; ABT : 1-aminobenzotriazole ; p/s : photons par seconde.....	112

Figure 48. Structures chimiques d'inhibiteurs de kinases plasmodiales ayant un profil d'activité similaire à celui de M1	115
Figure 49. Profil biologique du composé M1.....	115
Figure 50. Structures chimiques et valeurs biologiques des 2,4-diaminothiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidines développées par González Cabrera <i>et al.</i> ^{269, 270} a) posologie : 50 mg/kg/j pendant 4 jours. b) TMS : Temps moyen de survie (en jours)	117
Figure 51. Composés comportant un cycle thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidine et ayant atteint le stade des essais cliniques.....	121
Figure 52. Résumé des différents couplages pallado-catalysés. D'après Feringa, C. X = Cl, Br, I, triflate, etc...	127
Figure 53. Dérivés non-obtenus après couplage de Suzuki-Miyaura.	138
Figure 54. Structure chimique du composé 79	141
Figure 55. Structure chimique du SYBR green I.	143
Figure 56. Exemple de plaque 96 puits ayant servi à réaliser un test de cytotoxicité au MTT-formazan. Les puits les plus violets contiennent le plus de cellules vivantes.	144
Figure 57. Exemple de deutération avec celui de la tétrabénazine en deutétrabénazine....	215
Figure 58. Cycles aromatiques à 5 chaînons répondant aux critères requis pour notre approche de « <i>scaffold hopping</i> » du composé M1.	217
Figure 59. Séries retenues pour la synthèse d'analogue du composé M1.	218
Figure 60. Structure chimique du regulolix.....	219
Figure 61. Structures chimiques de thiéno[2,3- <i>d</i>]pyrimidines ayant atteint le stade des essais cliniques.....	219
Figure 62. Thiazolo[4,5- <i>d</i>]pyrimidines ayant atteint le stade des essais cliniques.....	225
Figure 63. Thiazolo[5,4- <i>d</i>]pyrimidines décrites récemment dans la littérature.....	226
Figure 64. Structure chimique du poseltinib.	232
Figure 65. Furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidines récemment décrites dans la littérature.....	233
Figure 66. Fonctions chimiques incluant un atome de sélénium.	236
Figure 67. Structure chimique de l'ebesen.	236
Figure 68. Structures chimiques de composés ayant montré une activité biologique et incluant un sélénophène.....	237
Figure 69. Dérivés séléniés testés sur <i>P. falciparum</i> . ³⁷⁹	237
Figure 70. Principaux carbocycles isostères du phényle.....	272
Figure 71. Evolution de la concentration du composé testé incubé en présence de microsomes hépatiques de souris femelles.	286

Schémas :

Schéma 1. Schéma représentant de manière simplifiée les différentes familles de parasites retrouvées au sein de l'ordre des <i>Apicomplexa</i> . D'après Ren <i>et al.</i> ⁷	22
Schéma 2. Cycle de vie d'un moustique (la larve d'anophèle se développe parallèlement à la surface de l'eau contrairement à ce qui figure sur l'image).	25
Schéma 3. Cycle de développement de <i>Plasmodium</i> . D'après Maier <i>et al.</i>	30
Schéma 4. Logigramme du diagnostic biologique du paludisme. D'après le CNR. ⁴¹	37
Schéma 5. Diagramme décisionnel concernant les traitements antipaludiques. D'après les recommandations de l'OMS. ³⁶	39
Schéma 6. Voie de dégradation de l'hémoglobine humaine utilisée par <i>Plasmodium</i> pour son développement.	47
Schéma 7. Voie métabolique de la primaquine.....	49
Schéma 8. Schéma résumant TCPs, TPPs et indications possibles pour ces derniers. D'après MMV.....	85
Schéma 9. Evolution de la structure des hits menant au ganaplacide (à droite).....	89
Schéma 10. Evolution de la structure des hits menant à la cipargamine (à droite).....	90
Schéma 11. Structures chimiques de la chloroquine (à gauche) et du ferrocène (au centre) aboutissant à la ferroquine (à droite).	91
Schéma 12. Evolution de la structure des hits menant au DSM265.....	95
Schéma 13. Evolution de la structure des hits menant à ZY19489 (à droite).	98
Schéma 14. Evolution de la structure des hits menant à M5717 (à droite).....	100
Schéma 15. Constituants et structure du cycle thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3H)-one.....	104
Schéma 16. Résumé des pharmacomodulations effectuées et stratégie de screening utilisée pour les tests biologiques et pharmaco-chimiques. LPP : Liaison aux Protéines Plasmatiques.	123
Schéma 17. Réaction de Grignard entre un carbonyle et un réactif de Grignard.	125
Schéma 18. Réaction entre un halogénure d'alkyle et un organolithien.	125
Schéma 19. Couplage de Heck. ²⁹⁸	126
Schéma 20. Voie de synthèse des aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5 par un phényle.....	127
Schéma 21. Voie de synthèse des aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5. GP = groupement comportant un atome métallique ou métalloïde (cf. Figure 52).....	128
Schéma 22. Voie de synthèse du composé 3	129

Schéma 23. Voie de synthèse du composé 3 avec protection de l'amine par un groupement trifluoroacétatyle.	129
Schéma 24. Premier couplage de Suzuki-Miyaura entre un benzodioxaborole et l'iodobenzène. ³⁰³	130
Schéma 25. Premier couplage de Suzuki-Miyaura employant un dérivé d'acide boronique. ³⁰⁵	130
Schéma 26. Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura, en reprenant la réaction du Schéma 25	131
Schéma 27. Réaction de cyclisation permettant d'obtenir le cycle thiéno[3,2- <i>d</i>]-pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one à partir de 3	132
Schéma 28. Conditions de couplage de Suzuki-Miyaura sur le dérivé 7	132
Schéma 29. Mécanisme aboutissant à l'hydrodésalogénéation d'un bromoaryle dans un couplage de Suzuki-Miyaura réalisé dans l'éthanol.	133
Schéma 30. Résultat des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura du Tableau 22 sur le composé 6	134
Schéma 31. Synthèse du composé 31	137
Schéma 32. Synthèse des composés 37 et 38 à partir du composé 29	137
Schéma 33. Détails de la réaction de cyclisation permettant d'obtenir le cycle thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.	139
Schéma 34. Réduction des composés 54 et 55	141
Schéma 35. Synthèse du composé 80	142
Schéma 36. Modification structurale du MTT aboutissant au formazan par réduction en milieu cellulaire.	144
Schéma 37. Premier couplage de Sonogashira entre l'iodobenzène et le phénylacétylène. ³¹³	151
Schéma 38. Cycles catalytiques du couplage de Sonogashira.	152
Schéma 39. Couplage de Sonogashira sur le composé 3	153
Schéma 40. Protodésilylation du composé 88	154
Schéma 41. Essai de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre sur le composé 89	154
Schéma 42. En haut, amination pallado-catalysée décrite par Migita. ³¹⁹ En bas, amination pallado-catalysée de Buchwald basée sur la réaction précédente. ³²⁰	156
Schéma 43. Premières conditions décrites du couplage de Buchwald-Hartwig.	157
Schéma 44. Evolution des ligands du palladium utilisés dans le couplage de Buchwald-Hartwig.	158

Schéma 45. Cycle catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig.....	158
Schéma 46. Essais de couplage d'Ullman sur les composés 3 et 6	161
Schéma 47. Récapitulatif des dérivés synthétisés par réactions couplages pallado-catalysés.	165
Schéma 48. Exemple de remplacement de noyau du cycle phényle par une pyridine sur la tétrabénazine.	216
Schéma 49. A gauche, molécule transposée sous forme de structure CATS (L = lipophile, D = donneur de liaison hydrogène, A = accepteur de liaison hydrogène, P = positivement ionisable, N = négativement ionisable). A droite, exemple de pharmacophore représentant en 3D les éléments clés structuraux d'une (série de) molécule(s).	216
Schéma 50. Stratégie de synthèse des analogues du composé M1.	217
Schéma 51. Synthèse du composé 97	220
Schéma 52. Réaction de Gewald.....	221
Schéma 53. Schéma rétrosynthétique de la série thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.....	221
Schéma 54. Synthèse du composé 98 en utilisant l'IBX.	221
Schéma 55. Synthèse des composés 98 à 100 utilisant le DMP.	222
Schéma 56. Réaction de Gewald aboutissant aux composés 101 à 103	222
Schéma 57. Synthèse des composés 104 à 106	223
Schéma 58. Schéma rétrosynthétique de la série thiazolo[4,5- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-one.	226
Schéma 59. Exemple de couplage de Liebeskind-Srogl. TFP : tris-2-furylphosphine	227
Schéma 60. Cycle catalytique du couplage de Liebeskind-Srogl.	227
Schéma 61. Voie de synthèse aboutissant au thiazole 117	230
Schéma 62. Voie de synthèse aboutissant au thiazole 119	231
Schéma 63. Voie de synthèse des furanes substitués 123 à 125	233
Schéma 64. Voie de synthèse du sélénophène 131	238
Schéma 65. Synthèse des sélénophèno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-ones 132 et 133	239
Schéma 66. Schéma récapitulatif des séries réalisées par stratégie de « <i>scaffold hopping</i> ».	240
Schéma 67. Passage de la série thiénopyrimidinone classique à celle méthylée en position 7.	259
Schéma 68. Exemple de composé pour lequel l'introduction d'un méthyle a permis l'amélioration de son affinité pour sa cible par modification de l'angle dièdre. ³⁸⁴	260
Schéma 69. Schéma rétrosynthétique de la série 7-méthylthieno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.	261

Schéma 70. C-H arylation du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle.	261
Schéma 71. Résultat de la C-H arylation du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle en présence de 1-bromo-4-isopropoxybenzène.	262
Schéma 72. Cyclisation aboutissant aux 7-méthylthiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-ones.....	262
Schéma 73. Passage de la série thiénoypyrimidinone classique à celle comportant un groupement alcyne en position 4.	264
Schéma 74. Voie de synthèse des dérivés comportant une fonction alcyne en position 4. .	265
Schéma 75. Voie de synthèse utilisée pour essayer d’obtenir un dérivé avec un alcyne vrai en position 4.....	266
Schéma 76. Schéma rétrosynthétique des composés 2-aminométhyles.....	269
Schéma 77. Synthèse du composé 148	269
Schéma 78. Tentative de synthèse d’un dérivé 2- <i>tert</i> butylaminométhyl.	270
Schéma 79. Voie de synthèse envisagée pour obtenir des composés avec un hétéroatome (X = O ou S) autre que l’azote en position 2.....	271
Schéma 80. Tentative de synthèse d’une thiénoypyrimidine-di-ol.....	271
Schéma 81. Tentative de synthèse de β -chloroacrylonitrile sur des carbocycles.	272
Schéma 82. Tentative de synthèse du 3-cyclohexyl-3-oxopropanenitrile.....	272
Schéma 83. Positions et éléments explorés durant les travaux de pharmacochimie précédemment décrits.....	288
Schéma 84. Données RSA de la série thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one basées sur ces travaux et les précédents. ^{261, 263}	296
Schéma 85. Meilleurs composés obtenus durant ces travaux de pharmacomodulation.	298

Tableaux :

Tableau 1. Objectifs établis par l’OMS pour lutter contre le paludisme. ²¹	29
Tableau 2. Comparaison entre l’année de commercialisation d’un antipaludique et l’année où une résistance à celui-ci a été décrite pour la première fois.	64
Tableau 3. Gènes impliqués dans les résistances aux antipaludiques sur le marché.	65
Tableau 4. Liste des mutations validées comme étant responsables de résistances aux ACTs ou en cours d’évaluation.....	72
Tableau 5. Efficacité du vaccin RTS,S/AS01E. D’après RTS,S Clinical Trials Partnership. ¹⁷¹	77
Tableau 6. Critères à remplir pour avoir un bon hit puis lead antipaludique.	80
Tableau 7. Résumé des différentes phases des essais cliniques.	80

Tableau 8. Critères communs retrouvés chez les différents TCP. D'après Burrows <i>et al.</i> ¹⁸⁴ ..	82
Tableau 9. Critères d'efficacité requis selon chaque TCP. D'après Burrows <i>et al.</i> ¹⁸⁴	82
Tableau 10. Critères requis pour un médicament TPP-1. D'après Burrows <i>et al.</i> ¹⁸⁴	83
Tableau 11. Critères requis pour un médicament TPP-2. D'après Burrows <i>et al.</i> ¹⁸⁴	84
Tableau 12. Tests à effectuer pour déterminer la propension d'un composé à sélectionner des résistances chez <i>Plasmodium</i> . D'après Duffey <i>et al.</i> ¹⁹⁰	86
Tableau 13. Liste des cibles moléculaires selon leur intérêt pour développer de nouveaux candidats médicaments. D'après Forte <i>et al.</i> ²⁶⁰	103
Tableau 14. Valeurs biologiques du hit A	104
Tableau 15. Valeurs biologiques des composés modulés en position 2.	105
Tableau 16. Valeurs biologiques des composés modulés en position 6.	106
Tableau 17. Valeurs biologiques des composés modulés en position 7.	107
Tableau 18. Valeurs biologiques en série quinazolin-4(3 <i>H</i>)-one.	107
Tableau 19. Influence de la salification sur les valeurs biologiques des composés.	108
Tableau 20. Structures et valeurs biologiques associées des métabolites du M1.	113
Tableau 21. Structures chimiques des thiéno[3,2- <i>d</i>]-pyrimidines antiplasmodiales dérivant de GW837016X. ^{272, 273}	118
Tableau 22. Impact de la quantité de solvant sur le couplage de Suzuki-Miyaura sur le composé 3	134
Tableau 23. Conditions et résultats des couplages de Suzuki-Miyaura effectués sur le composé 3	135
Tableau 24. Conditions et rendements des réactions de cyclisation sur aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5.	139
Tableau 25. Résultats biologiques des thiéno[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-ones obtenus après fonctionnalisation par couplage de Suzuki-Miyaura. En vert, les composés ayant une CE ₅₀ inférieure à 1 μM. En rouge, les composés fortement cytotoxiques.	145
Tableau 26. Résultats biologiques des premiers chlorhydrates réalisés par comparaison à ceux de leur base libre.	149
Tableau 27. Résultats biologiques des chlorhydrates des composés 57 et 59	150
Tableau 28. Conditions et rendements du couplage de Sonogashira sur les composés 6 et 7	153
Tableau 29. Résultats biologiques des dérivés obtenus par couplage de Sonogashira.	155
Tableau 30. Conditions testées pour la synthèse du composé 90 à partir du composé 6	159

Tableau 31. Rendements ou résultats des couplages de Buchwald-Hartwig sur le composé 6	161
Tableau 32. Essais de couplage de Buchwald-Hartwig sur le composé 3	163
Tableau 33. Résultats biologiques des composés obtenus par couplage de Buchwald-Hartwig.	163
Tableau 34. Données biologiques de la série thién[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.	224
Tableau 35. Couplage de Liebeskind-Srogl aboutissant aux composés 107 à 110	228
Tableau 36. Synthèse des thiazolo[4,5- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-ones 111 à 114	229
Tableau 37. Résultats biologiques de la série thiazolo[4,5- <i>d</i>]pyrimidin-7(6 <i>H</i>)-one.	229
Tableau 38. Synthèse des furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-ones 126 à 129	234
Tableau 39. Résultats biologiques de la série furo[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.	234
Tableau 40. Résultats biologiques de la série sélénohène[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one.	239
Tableau 41. Résumé des résultats biologiques de la série 7-méthylthién[3,2- <i>d</i>]pyrimidin-4(3 <i>H</i>)-one par rapport à leurs analogues non-méthylés	263
Tableau 42. Résultats biologiques des composés comportant un alcyne en position 4	266
Tableau 43. Réaction de cyclisation aboutissant aux dérivés cyclobutylamines.	267
Tableau 44. Résultats biologiques des dérivés cyclobutylamines.	268
Tableau 45. Récapitulatif des molécules possédant une activité antiplasmodiale inférieure à 1 μ M. Les composés en vert ont été testés sur le stade hépatique.	282
Tableau 46. Activité plasmodiale sur hépatocytes simiens infectés par <i>P. berghei</i>	285
Tableau 47. Récapitulatif des valeurs de demi-vie et de clairance intrinsèque pour les composés testés.	287
Tableau 48. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec un substituant <i>para</i> du cycle phényle modifié par rapport au composé M1.	289
Tableau 49. Activités antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec des substituants de type éther ou hétérocycle saturé.	290
Tableau 50. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec des cycles en position 6 de nature variée.	292
Tableau 51. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés comportant un linker alcyne ou <i>trans</i> -alcène.	293
Tableau 52. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec ou sans un linker -NH-.	294
Tableau 53. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés issus de la stratégie de « <i>scaffold hopping</i> ».	295

Tableau 54. Log $D_{7,4}$ et solubilité aqueuse calculés pour divers composés comportant un azahétérocycle aromatique en position 6.....	299
---	-----

Liste de publications et communications dans des congrès scientifiques

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

- **Mustière, R.**; Vanelle, P.; Primas, N. Plasmodial Kinase Inhibitors Targeting Malaria: Recent Developments. *Molecules* **2020**, 25, 5949, doi:[10.3390/molecules25245949](https://doi.org/10.3390/molecules25245949).
- **Mustière, R.**; Vanelle, P.; Primas, N. 2-Cyclopropyl-6-phenyl-2,3-dihydrothieno[3,2-*d*][1,3,2]diazaborinin-4(1*H*)-one. *Molbank* **2021**, 2021, M1221, doi:[10.3390/m1221](https://doi.org/10.3390/m1221).
- Bosson-Vanga, H.; Primas, N.; Franetich, J.-F.; Lavazec, C.; Gomez, L.; Ashraf, K.; Tefit, M.; Soulard, V.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Grand, R.; Donnette, M.; **Mustière, R.**; Amanzougaghene, N.; Tajeri, S.; Suzanne, P.; Malzert-Fréon, A.; Rault, S.; Vanelle, P.; Hutter, S.; Cohen, A.; Snounou, G.; Roques, P.; Azas, N.; Lagardère, P.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Nguyen, M.; Paloque, L.; Benoit-Vical, F.; Verhaeghe, P.; Mazier, D. A New Thienopyrimidinone Chemotype Shows Multistage Activity against Plasmodium Falciparum, Including Artemisinin-Resistant Parasites. *Microbiol. Spectr.* **2021**, e00274-21, doi: [10.1128/spectrum.00274-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.00274-21).
- **Mustière, R.** Synthesis of novel antiplasmodial 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones via palladium-catalyzed cross-couplings reactions. *En préparation*.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

- 28th Young Research Fellows Meeting (YRFM) – 11 et 12 février 2021 – Congrès en ligne – Communication par poster
- 56^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT) – 7 au 9 juillet 2021 – Congrès en ligne – Communication par poster
- 29th annual GP2A (Group for the Promotion of Pharmaceutical chemistry in Academia) conference – 25 au 27 août 2021 – Congrès en ligne – Communication orale

Introduction générale

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par des parasites du genre *Plasmodium* et transmise par la piqûre infectieuse d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Cette maladie, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a touché 241 millions de personnes et tué 627 000 d'entre elles en 2020, majoritairement des enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne.

Durant le XX^{ème} siècle, le développement des premières thérapies médicamenteuses dérivant de la quinine, molécule d'origine naturelle issue de l'écorce des quinquinas, a permis d'éliminer cette maladie de l'Europe et de l'Amérique du Nord. L'introduction de ces traitements dans les pays de l'hémisphère sud a permis un recul de la maladie mais pour une courte durée. En effet, le parasite a su développer, en Asie du Sud-Est, et disséminer dans le reste des pays des résistances aux traitements médicamenteux. La lutte antipaludique n'a repris de l'élan qu'au début des années 2000 grâce à deux facteurs majeurs : le développement de l'utilisation des mesures antivectorielles comme les moustiquaires imprégnées d'insecticides et l'arrivée des thérapies combinées à base d'artémisinine (ACT), molécule d'origine naturelle issue d'*Artemisia annua* et découverte dans les années 1970 par l'équipe du Pr Youyou Tu.

Ces traitements, aujourd'hui utilisés en première intention, combinent des molécules dérivant de l'artémisinine et des antipaludiques de classes thérapeutiques différentes. Leur impact a poussé l'OMS, en 2015, à formuler un objectif ambitieux de réduction de la mortalité et de la prévalence du paludisme de 90 % d'ici à 2030. Malheureusement, l'apparition d'une résistance aux dérivés d'artémisinine en Asie du Sud-Est depuis le début des années 2010 remet en cause cet objectif qui apparaît aujourd'hui inatteignable.

Le développement de nouvelles molécules antipaludiques est donc une nécessité pour poursuivre la lutte contre cette maladie. C'est dans ce cadre que le composé M1, en série thiényrimidinone, a été découvert au sein du laboratoire en 2015. Ce composé prometteur est capable d'agir sur tous les stades parasitaires du paludisme avec un mécanisme d'action inconnu. Malheureusement, celui-ci souffre d'une sensibilité vis-à-vis du métabolisme hépatique le rendant inefficace *in vivo* et d'un manque de solubilité aqueuse. C'est donc dans le but d'améliorer ce composé par le biais d'un travail de pharmacochimie que s'inscrit les travaux de cette thèse qui se divise en 6 chapitres :

- Le chapitre 1 est consacré dans un premier temps aux généralités sur le paludisme en abordant le parasite, le vecteur, l'épidémiologie mais surtout le cycle parasitaire et la physiopathologie et la sémiologie de la maladie. Une fois ces éléments évoqués, les différents traitements médicamenteux disponibles sur le marché sont présentés avant d'aborder les méthodes de lutttes antivectorielles
- Le chapitre 2 évoque d'abord les difficultés dans la lutte antipaludique, aussi bien les différentes résistances acquises par *Plasmodium*, que les autres difficultés touchant notamment la lutte antivectorielle. Contre ces difficultés, sont successivement évoqués la vaccination, les thérapies médicamenteuses en cours de développement ayant atteint le stade des essais cliniques ainsi que le cahier des charges qu'elles doivent suivre. Enfin, les travaux aboutissant au composé M1 ainsi que la description de son profil d'activité biologique et son profil pharmacocinétique seront abordés.
- Le chapitre 3 se concentre sur les modulations de la position 6 en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Ces modulations ont été réalisées par le biais de réactions de couplage pallado-catalysé : Suzuki-Miyaura, Sonogashira et Buchwald-Hartwig. Ces trois couplages ont permis d'obtenir 67 composés qui ont ensuite été testés biologiquement pour déterminer, *in vitro*, leur activité antiplasmodiale sur la souche K1 de *P. falciparum* et leur cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2 (ciblage primaire).
- Le chapitre 4 concerne les travaux de « *scaffold hopping* » (variation de cycle) sur le noyau thiophène du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Ce travail a permis la synthèse de 17 composés, testés biologiquement, sur 4 séries chimiques différentes : thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et [1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one ; eux aussi testés biologiquement.
- Le chapitre 5 rassemble les modifications ou tentatives de modifications n'entrant pas dans les deux précédents chapitres. Ainsi, 10 composés ont pu être obtenus et testés biologiquement.
- Le chapitre 6 détaille dans un premier temps les tests supplémentaires effectués sur les meilleurs composés obtenus précédemment : activité antiplasmodiale sur hépatocytes simiens infectés par *P. berghei*, stabilité métabolique sur microsomes hépatiques de souris femelle et liaison aux protéines plasmatiques. Dans un second temps, les données de relation structure-activité apportées par les travaux de pharmacochimie sont discutés.

Ce travail de thèse est le fruit de collaborations entre différentes équipes.

Les travaux de synthèse organique ont été réalisés au sein de l'équipe « Pharmacochimie Radicalaire » de l'Institut de Chimie Radicalaire (ICR) de Marseille, sous la direction du Pr Patrice Vanelle et du Dr Nicolas Primas. Les analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées avec l'aide du Dr Vincent Remusat. Les analyses par spectrométrie de masse haute performance (HRMS) et les microanalyses élémentaires ont été effectuées, au sein du service commun « Spectropole » de la Fédération Sciences Chimiques Marseille, par le Dr Valérie Monnier et Mme Gaëlle Hisler (HRMS) et Mr Grégory Excoffier (microanalyses).

Les tests *in vitro* pour déterminer l'activité antiplasmodiale sur le stade sanguin de *P. falciparum* et la cytotoxicité sur lignée cellulaire HepG2 ont été réalisés par Mr Sébastien Hutter, sous la direction du Pr Nadine Azas, au sein de l'équipe « Eucaryotes Pathogènes Tropicaux » de l'UMR VITROME « Vecteurs - Infections Tropicales et Méditerranéennes » (IHU – Méditerranée infection et Aix-Marseille Université).

Les tests *in vitro* sur les différents modèles de stade hépatique de *Plasmodium* ont été effectués par les Dr Nadia Amanzougaghene et Shahin Tajeri, sous la direction du Pr Dominique Mazier, du Dr Valérie Soulard et du Dr Jean-François Franetich au sein de l'équipe « Paludisme : identification et validation pré-clinique de nouvelles cibles thérapeutiques » du Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Sorbonne Université) à Paris.

Les tests de stabilité métabolique et de liaison aux protéines plasmatiques ont été réalisés par Mme Catherine Piveteau et Mr Alexandre Biela au sein de la plateforme ADME de l'institut Pasteur de Lille.

Les futures mesures de solubilité et de perméabilité de nos meilleurs composés seront réalisées au sein de la plateforme « Screening et drugabilité » dirigé par le Pr Aurélie Malzert-Fréon, avec l'aide du Dr Marc Since dans le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) à Caen.

Ces travaux ont été financés par la Fondation pour la Recherche Médicale, code projet DCM20181039565.

A des fins de clarté, les composés issus de ces travaux seront notés de **1** à **148** et les composés issus de travaux antérieurs, de **A** à **V**.

Chapitre 1 : Le paludisme, première parasitose mondiale

1. Généralités sur le paludisme

Paludisme est un mot dérivant du latin *paludis* signifiant « marais ». Le terme malaria est celui principalement utilisé dans le monde anglo-saxon pour parler du paludisme. Ce mot dérive de l'italien *mal'aria* qui signifie « mauvais air ».

Une parasitose se définit comme étant une « infection ou infestation par un parasite, qui peut être cliniquement symptomatique (maladie parasitaire) ou inapparente (parasitose latente) ».¹ Dans le cas du paludisme, on retrouve trois acteurs : le parasite, le vecteur et l'hôte.

1.1. Le parasite : *Plasmodium* spp.

Les parasites responsables du paludisme sont du genre *Plasmodium*. Leur responsabilité dans la maladie a été découverte par le Dr Alphonse Laveran en 1880.² Cette découverte et d'autres concernant plusieurs parasitoses lui vaudront le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1907.³

1.1.1. Phylogénie de *Plasmodium*

Plasmodium est un protozoaire (organisme unicellulaire) appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*. Cet embranchement rassemble uniquement des protozoaires qui sont des parasites intracellulaires, c'est-à-dire dont le développement au sein de l'hôte a lieu à l'intérieur des cellules de celui-ci. En rapport à cela, ces parasites possèdent un complexe apical : un ensemble de plusieurs organelles (micronèmes, rhoptries et granules denses) impliquées dans l'invasion d'une cellule par le parasite.⁴ Une autre organelle retrouvée dans la grande majorité des *Apicomplexa* est l'apicoplaste.⁵ L'apicoplaste, qui aurait pour origine une microalgue endocytée, est impliqué dans diverses voies métaboliques notamment la synthèse d'acides gras.⁶

¹ Larousse. <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/parasitose/58031> (consulté le 12/09/21).

² Laveran, A. A new parasite found in the blood of malarial patients. Parasitic origin of malarial attacks. *Bull. Mem. Soc. Med. Hosp. Paris* **1880**, 17, 158–164.

³ The Nobel prize. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1907/summary/> (consulté le 26/08/11)

⁴ Dubremetz, J.F.; Garcia-Réguet, N.; Conseil, V.; Fourmaux, M.N. Apical Organelles and Host-Cell Invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* **1998**, 28, 1007–1013, doi:[10/cg5v3b](https://doi.org/10.1016/S0950-2688(98)00330-3).

⁵ Kohler, S.; Delwiche, C.F.; Denny, P.W.; Tilney, L.G.; Webster, P.; Wilson, R.J.M.; Palmer, J.D.; Roos, D.S. A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites. *Science* **1997**, 275, 1485–1489, doi:[10/ds9ndg](https://doi.org/10.1126/science.1229222).

⁶ Lim, L.; McFadden, G.I. The Evolution, Metabolism and Functions of the Apicoplast. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2010**, 365, 749–763, doi:[10/dzxs9w](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0274).

De manière simplifiée, au sein des *Apicomplexa*, on retrouve trois groupes différents (Schéma 1) :⁷

- Un groupe rassemblant les grégaires, parasites des invertébrés, et les cryptosporidies (*Cryptosporidium spp.*), responsables d'infections pulmonaires et gastrointestinales chez l'Homme ;
- Les coccidies parmi lesquelles on retrouve les genres *Eimeria*, responsables des coccidioses chez de nombreux animaux d'élevage ou domestiques, et *Toxoplasma*, responsables de la toxoplasmose (parasitose dangereuse pour le fœtus chez la femme enceinte) ;
- Les hématozoaires, parasites du sang, où l'on retrouve le genre *Plasmodium* mais aussi le genre *Babesia*, transmis par les tiques et responsable de la babésiose.

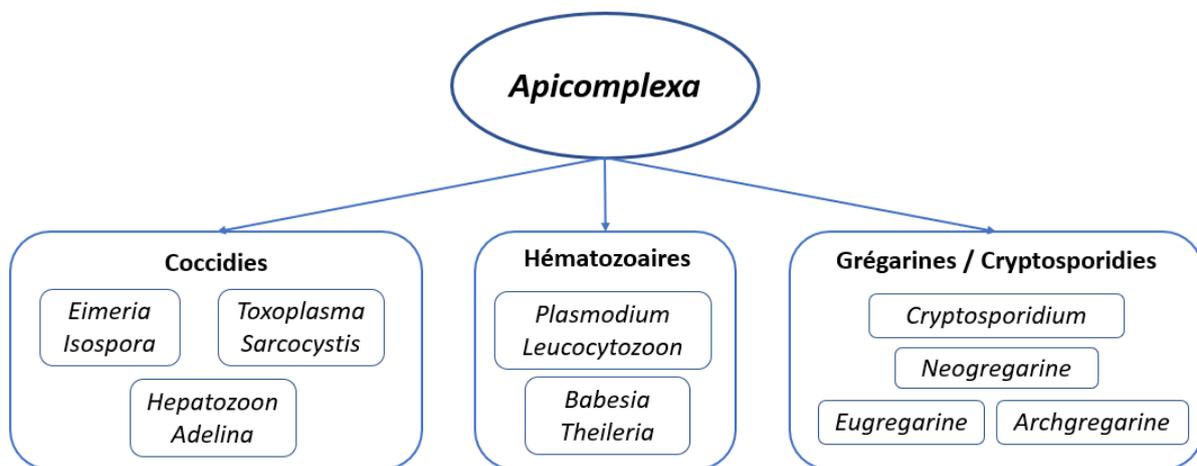


Schéma 1. Schéma représentant de manière simplifiée les différentes familles de parasites retrouvées au sein de l'ordre des *Apicomplexa*. D'après Ren *et al.*⁷

1.1.2. Les différentes espèces de *Plasmodium*

Environ 156 espèces différentes de *Plasmodium* ont été identifiées à l'heure actuelle,⁸ dont 5 espèces sont responsables du paludisme chez l'Homme :⁹

- *P. falciparum* : quasi-majoritaire sur le continent africain mais retrouvée dans d'autres régions du monde, cette espèce est responsable de la majorité des cas et des décès dus au paludisme ;

⁷ Ren, B.; Gupta, N. Taming Parasites by Tailoring Them. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 292, doi:[10/gmkwm6](https://doi.org/10/gmkwm6).

⁸ Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html> (consulté le 25/08/21)

⁹ Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> (consulté le 30/08/21)

- *P. vivax* : retrouvée principalement en Amérique Latine et en Asie, cette espèce est capable de ressurgir plusieurs mois et jusqu'à plusieurs années après la première infection ;
- *P. malariae* : similaire à *P. vivax* au regard de sa capacité de résurgence après la primo-infection ;
- *P. ovale* : retrouvée majoritairement en Afrique de l'Ouest à cause de sa capacité à pouvoir infecter des personnes Duffy négative (phénotype sanguin largement retrouvée dans cette région, rendant ces personnes résistantes à *P. vivax*), cette espèce est divisée en deux sous-espèces :¹⁰ *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* ;
- *P. knowlesi* : retrouvé en Asie du Sud-Est, ce parasite est avant tout retrouvé chez les macaques à longue queue mais est aussi capable d'infecter l'Homme.

Parmi les espèces de *Plasmodium* infectant les animaux, trois sont particulièrement retrouvées du fait de leur utilisation à des fins de recherches :

- Sur modèle murin : *P. berghei* et *P. yoelii* ;
- Sur modèle simien : *P. cynomolgi*.

1.2. Le vecteur : *Anopheles* spp.

Le vecteur désigne le responsable de la transmission du parasite qui pour le paludisme est un moustique femelle du genre *Anopheles*. Ce genre rassemble plus de 450 espèces de moustiques mais, pour différentes raisons (compatibilités parasite-vecteur, longévité du vecteur, etc...), environ 70 de ces espèces sont capables de transmettre le paludisme¹¹ et 41 sont considérées comme des vecteurs importants.¹² Ces moustiques sont retrouvés sur la totalité du globe (à l'exception de l'Antarctique) et la répartition des espèces sur les différents continents est suivie régulièrement par les scientifiques (**Figure 1**).^{12, 13} Parmi les espèces

¹⁰ Sutherland, C.J.; Tanomsing, N.; Nolder, D.; Oguike, M.; Jennison, C.; Pukrittayakamee, S.; Dolecek, C.; Hien, T.T.; do Rosário, V.E.; Arez, A.P.; Pinto, J.; Michon, P.; Escalante, A.A.; Nosten, F.; Burke, M.; Lee, R.; Blaze, M.; Dan Otto, T.; Barnwell, J.W.; Pain, A.; Williams, J.; White, N.J.; Day, N.P.J.; Snounou, G.; Lockhart, P.J.; Chiodini, P.L.; Imwong, M.; Polley, S.D. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Ovale* Occur Globally. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 1544–1550, doi:[10.1086/652240](https://doi.org/10.1086/652240).

¹¹ Rossati, A.; Bargiacchi, O.; Kroumova, V.; Zaramella, M.; Caputo, A.; Garavelli, P.L. Climate, Environment and Transmission of Malaria. *Infez. Med.* **2016**, *24*, 93-104.

¹² Sinka, M.E.; Bangs, M.J.; Manguin, S.; Rubio-Palis, Y.; Chareonviriyaphap, T.; Coetzee, M.; Mbogo, C.M.; Hemingway, J.; Patil, A.P.; Temperley, W.H.; Gething, P.W.; Kabaria, C.W.; Burkot, T.R.; Harbach, R.E.; Hay, S.I. A Global Map of Dominant Malaria Vectors. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 69, doi:[10/gmdj7k](https://doi.org/10/gmdj7k).

¹³ Sachs, S.E.; Mellinger, A.; Malaney, P.; Sachs, J.; Kiszewski, A.; Spielman, A. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *70*, 486–498, doi:[10/gmk8rw](https://doi.org/10/gmk8rw).

importantes dans la transmission du paludisme, on peut citer *A. gambiae* et *A. funestus* en Afrique, *A. darlingi* en Amérique du Sud et *A. dirus* et *A. minimus* en Asie du Sud-Est.

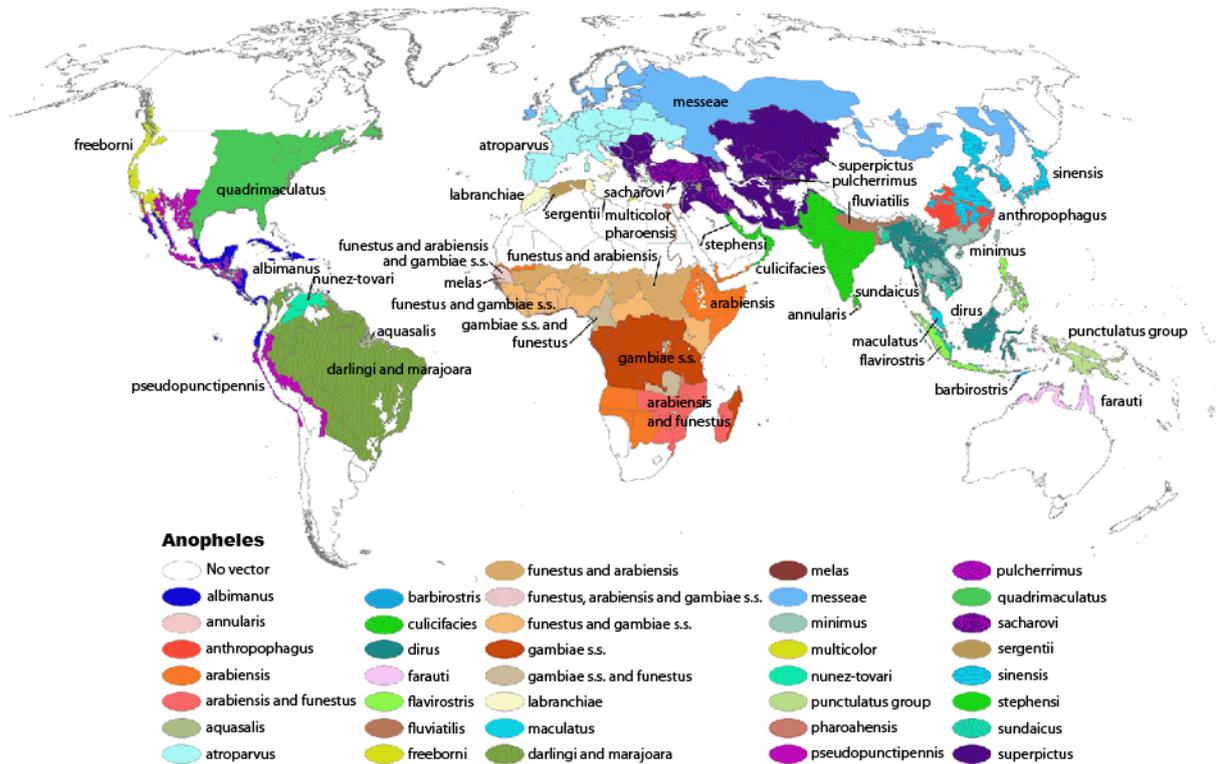


Figure 1. Répartition des principales espèces d'anophèles dans le monde. D'après Sachs *et al.*¹³

Le cycle de vie des anophèles (et des moustiques en général) possède quatre stades (Schéma 2) :

- Stade zygote : une fois pondus dans l'eau, les œufs (pouvant aller jusqu'à 200 par ponte) mettent quelques jours avant d'éclore et donner des larves ;
- Stade larvaire : la larve vit et s'alimente sous la surface de l'eau pendant au minimum 5 jours. Elle respire au travers de celle-ci à l'aide de stigmates ;
- Stade nymphal : enfermée au sein d'une puppe, la larve (ou nymphe) va se transformer pendant quelques jours ;
- Stade imagal : stade adulte.

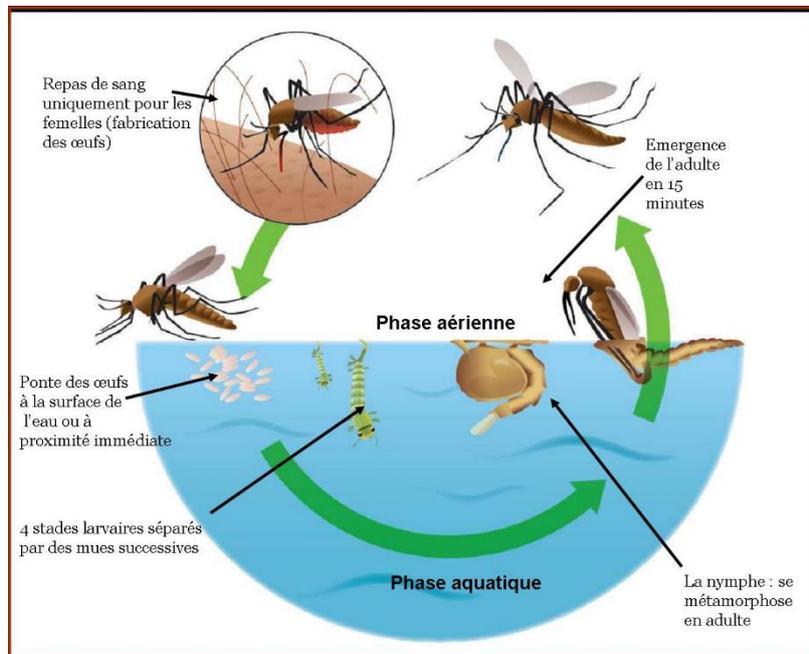


Schéma 2. Cycle de vie d'un moustique (la larve d'anophèle se développe parallèlement à la surface de l'eau contrairement à ce qui figure sur l'image).

1.3.Épidémiologie du paludisme

La référence majeure concernant les données épidémiologiques sur le paludisme est l'OMS. Celle-ci publie chaque année (en novembre ou décembre) un rapport présentant un bilan détaillé des chiffres concernant le paludisme dans le monde et au sein de chaque « région OMS ». Les chiffres présentés ci-après sont ceux du rapport mondial sur le paludisme 2021, portant sur les données de l'année 2020.¹⁴ Deux choses sont importantes à considérer dans ce rapport.¹⁵ Tout d'abord, l'impact de l'épidémie de covid-19 sur les différents indicateurs de l'épidémie de paludisme (cas, décès, incidence, mortalité etc...). Cette tendance a été anticipée par l'OMS, évoquant tout de même que les pires estimations ont été évitées, durant l'année 2021 mais les chiffres obtenus pour les cas et les décès sont, en 2020, à des niveaux d'il y a 10 ans. Ensuite, une nouvelle méthodologie de calcul des données a entraîné une augmentation significative des chiffres des années précédentes (2000 à 2019) entre les rapports de l'année de 2019 et celui de 2020.

¹⁴ World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

¹⁵ Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/news/item/06-12-2021-more-malaria-cases-and-deaths-in-2020-linked-to-covid-19-disruptions> (consulté le 06/12/2021).

1.3.1. Répartition du paludisme dans le monde

L'OMS considère que le paludisme était endémique dans 85 pays en 2020 (108 en 2000), ces derniers se localisant en très grande majorité au niveau de la zone équatoriale (**Figure 2**). En revanche, cette répartition est hétérogène car 27 de ces pays présentent moins de 100 cas de paludisme endémique par an. Parmi ces pays où on ne retrouve pas de cas de paludisme en 2020, certains ont été déclarés « *malaria free* » par l'OMS du fait de l'absence prolongée de cas endémique de paludisme sur leur sol (Chine et El Salvador) et d'autres pays avec 2 ou 3 ans sans cas endémiques sont en voie pour les rejoindre (Iran et Malaisie). En France métropolitaine, le paludisme endémique a disparu depuis les années 60. Cependant, il est encore présent en Guyane et a quasiment disparu de l'île de Mayotte.¹⁶

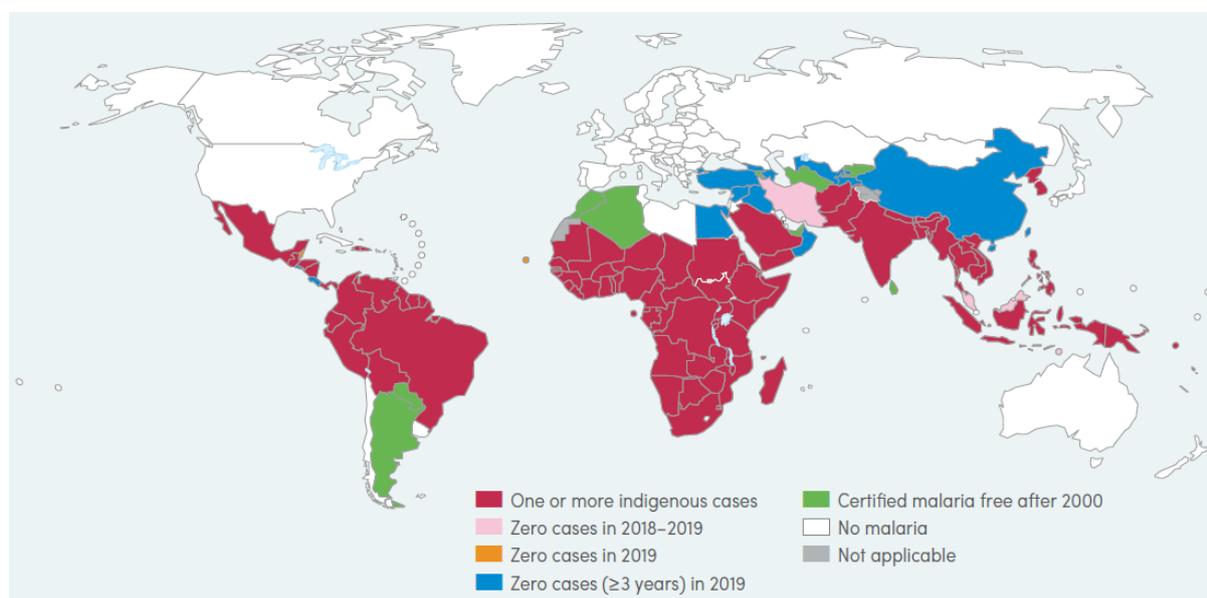


Figure 2. Carte, datant de 2020, indiquant les pays où le paludisme est endémique (en rouge), où aucun cas de paludisme endémique n'a été détecté en 2019 (en orange), depuis 2018 (en rose) ou depuis au moins 2016 (en bleu) ainsi que les pays considérés sans paludisme après 2000 (en vert). D'après l'OMS.¹⁷

1.3.2. Evolution du nombre de cas et de décès dûs au paludisme depuis 2000

Concernant le nombre de cas de paludisme entre 2000 et 2020, on distingue deux périodes différentes : la première décennie avec des chiffres fluctuants entre 238 et 247 millions de cas par an, et la deuxième décennie marquée par une diminution de 20 millions de cas par an entre 2010 et 2015 puis un retour vers 230 millions de cas depuis 2017 (**Figure 3**).

¹⁶ Thellier, M.; Simard, F.; Musset, L.; Cot, M.; Velut, G.; Kendjo, E.; Pradines, B. Changes in Malaria Epidemiology in France and Worldwide, 2000–2015. *Méd. Mal. Infect.* **2020**, *50*, 99–112, doi:[10/gmmf64](https://doi.org/10/gmmf64).

¹⁷ World Health Organization. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337660>. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

95 % des cas en 2020 se trouvaient en Afrique. L'incidence du paludisme (nombre de cas pour 1000 habitants à risque de contracter la maladie) est en constante diminution depuis 2000 passant de 81,1 à 59,0 en 2020 (-27 %, 56,3 en 2019) pour le monde entier et de 368 à 232,8 (-37 %, 222,9 en 2019) en Afrique. Le fonds mondial contre le sida, la tuberculose et le paludisme estime que, pour 2020, la détection des cas a diminué de 56 % en Asie et de 17 % en Afrique.¹⁸

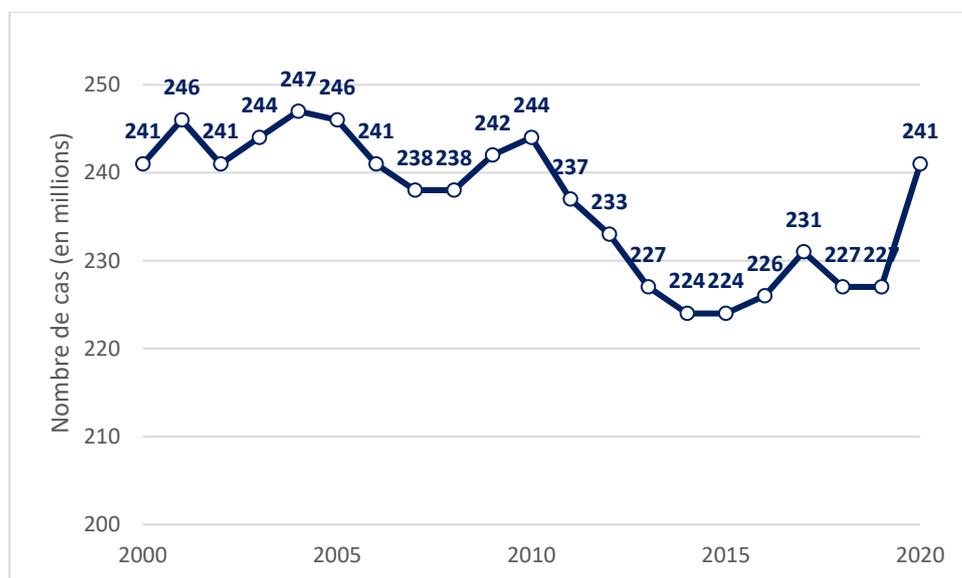


Figure 3. Graphique représentant l'évolution du nombre de cas de paludisme par an entre 2000 et 2019 dans le monde. Chiffres de l'OMS.¹⁴

Le nombre de décès imputables au paludisme est, quant à lui, en constante diminution depuis 2000, passant de 896 000 cette année-là à 558 000 en 2019 (**Figure 4**). On peut cependant noter un ralentissement de cette diminution depuis 2015. Entre 2000 et 2019, l'OMS estime à 7,6 millions le nombre de morts évités sur cette période.¹⁷ Rassemblant la majorité des cas, l'Afrique concentre la quasi-totalité des décès avec 96 % des morts dûs au paludisme ayant lieu sur le continent africain : 80 % des décès en 2020 sont des enfants de moins de 5 ans. Enfin, le taux de mortalité (morts pour 100.000 habitants à risque) est passé de 30,1 en 2000, à 15,3 en 2019 (-49 %, 13,8 en 2019) dans le monde et de 149,6 à 61,5 (-59 %, 56,0 en 2019) en Afrique.

¹⁸ The global funds to fight HIV, tuberculosis and malaria. *The impact of COVID-19 on HIV, TB and malaria services and systems for health*, 2021. https://www.theglobalfund.org/media/10776/covid-19_2020-disruption-impact_report_en.pdf (consulté le 20/09/21).

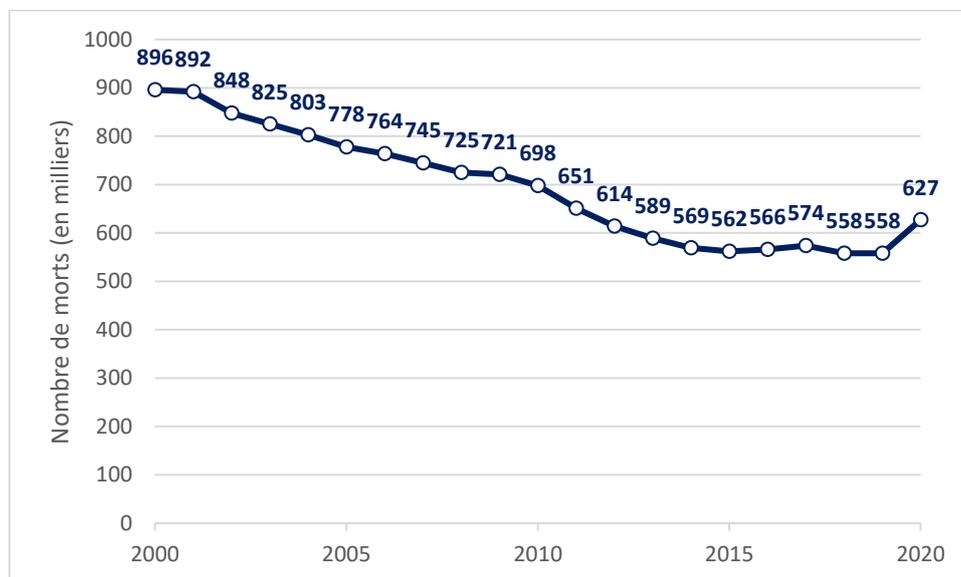


Figure 4. Graphique représentant l'évolution du nombre de décès dûs au paludisme entre 2000 et 2019 dans le monde. Chiffres de l'OMS.¹⁴

1.3.3. Le paludisme en France

Comme évoqué précédemment, le paludisme endémique est uniquement encore présent en Guyane et à Mayotte (cf. Chapitre 1 : 1.3.1. Répartition du paludisme dans le monde). Le paludisme figure parmi la liste des 36 maladies à déclaration obligatoire mais pour deux cas précis : le paludisme endémique et le paludisme d'importation dans les départements d'outre-mer.¹⁹ Dans les recommandations pour les voyageurs 2020 (celles de 2021 portent sur les chiffres de 2020 touchés par le covid-19),²⁰ le nombre de cas de paludisme en France métropolitaine en 2019 est estimé à 5570 cas : 406 ont donné des formes graves (15,1 % des cas) et 10 personnes sont décédées.

1.3.4. Objectifs de l'OMS dans la lutte contre le paludisme

Afin de guider efficacement la lutte antipaludique, l'OMS, en 2015, a établi des objectifs précis concernant la réduction des taux de mortalité et d'incidence ainsi que l'élimination du paludisme dans des pays endémiques. Ce document nommé « Stratégie technique mondiale

¹⁹ Santé Publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-a-declaration-obligatoire/liste-des-maladies-a-declaration-obligatoire> (consulté le 06/09/21)

²⁰ Haut conseil de la santé publique. *Recommandations sanitaires 2020 pour les voyageurs (à l'attention des professionnels de santé)*, 2020. https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspa20200313_recommasanitaipourlesvoyageu.pdf (consulté le 12/09/21)

de lutte contre le paludisme 2016-2030 » (acronyme GTS en anglais) fixe les objectifs pour 2030 avec des objectifs intermédiaires en 2020 et 2025 (**Tableau 1**).²¹

Tableau 1. Objectifs établis par l’OMS pour lutter contre le paludisme.²¹

Objectifs	2020	2025	2030
1. Réduire le taux de mortalité global du paludisme par rapport à 2015	D’au moins 40%	D’au moins 75%	D’au moins 90%
2. Réduire l’incidence globale du paludisme par rapport à 2015			
3. Éliminer le paludisme dans des pays où celui-ci était endémique en 2015	Dans au moins 10 pays	Dans au moins 20 pays	Dans au moins 35 pays
4. Prévenir le retour du paludisme dans des pays où celui-ci a disparu		Retour évité	

Pour atteindre ces objectifs, l’OMS s’appuie sur trois piliers :

- Un accès universel aux moyens préventifs, diagnostics et curatifs ;
- Accélérer les efforts d’élimination du paludisme dans les pays endémiques ;
- Faire de la surveillance du paludisme un acteur majeur.

L’OMS a récemment mis à jour (juillet 2021) les GTS avec ses premières conclusions sur les objectifs intermédiaires de 2020.²² L’OMS considère que seuls les objectifs 3 et 4 sont accomplis à l’heure actuelle et émet une inquiétude sur la faisabilité des objectifs finaux 1 et 2 (**Tableau 1**).

1.3.5. Moyens engagés dans la lutte antipaludique

Pour atteindre les objectifs des GTS, l’OMS estimait en 2016 que les fonds nécessaires pour la lutte antipaludique (hors R&D) seraient de 6,4 milliards de dollars en 2020, 7,7 en 2025 et 8,7 en 2030.²¹ Mais, ces dépenses ne sont passées que de 2,7 milliards de dollars en 2016 à 3 milliards en 2019. De plus, l’OMS considère désormais les sommes nécessaires à 9,3 milliards de dollars en 2025 et 10,3 en 2030.²² L’impact du covid-19 sur ce financement est

²¹ Organisation Mondiale de la Santé. *Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030*, 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176720/9789242564990_fre.pdf?sequence=1 (consulté le 12/09/21)

²² Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

encore flou : le premier financeur de la lutte antipaludique, le fonds mondial de lutte contre le sida, la tuberculose et le paludisme a un budget qui était déjà prévu jusqu'en 2023. La baisse de financement immédiate viendra sans doute des pays endémiques qui auront redirigé leurs fonds vers la lutte contre le covid-19.²³

La R&D a elle dépensé 7,3 milliards de dollars entre 2007 et 2018 principalement dans la recherche de nouveaux antipaludiques, le développement de vaccins et la recherche fondamentale.

1.4. Le cycle de développement de *Plasmodium*

Plasmodium est un parasite qualifié de dixène : son cycle de développement passe par deux hôtes (monoxène = 1 hôte). Au sein de l'Homme, le parasite se développe d'abord au sein du foie puis dans les érythrocytes avant de finir son développement au sein d'un anophèle femelle (**Schéma 3**).^{9, 24} Il existe des différences entre espèces, la principale étant un stade de développement annexe pour *P. vivax* et *P. ovale*, les autres concernant des différences dans la durée de passage d'un stade à un autre.

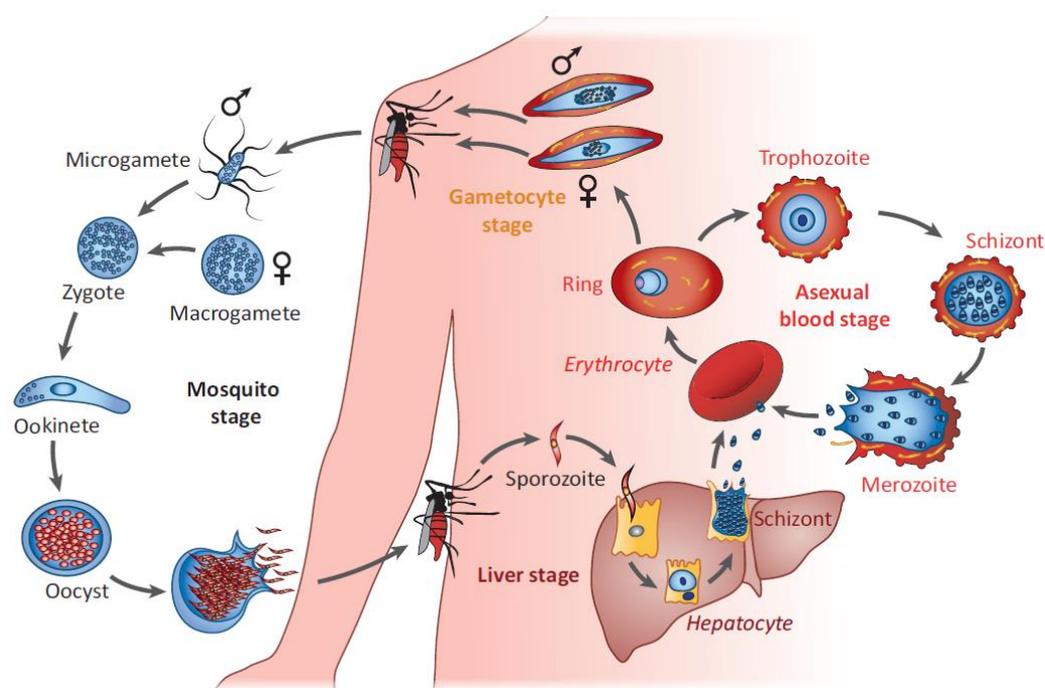


Schéma 3. Cycle de développement de *Plasmodium*. D'après Maier *et al.*²⁵

²³ Chebil, M. La lutte contre le paludisme souffre aussi du Covid-19. *France 24*, 25 avril, 2021. <https://www.france24.com/fr/afrique/20210425-la-lutte-contre-le-paludisme-souffre-aussi-du-covid-19> (consulté le 20/09/21).

²⁴ Cowman, A.F.; Healer, J.; Marapana, D.; Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **2016**, *167*, 610–624, doi:[10/f88q22](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.048).

²⁵ Maier, A.G.; Matuschewski, K.; Zhang, M.; Rug, M. *Plasmodium Falciparum*. *Trends Parasitol.* **2019**, *35*, 481–482, doi:[10/ggk9j9](https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.009).

1.4.1. Phase hépatocytaire

A la suite de la piqûre d'un anophèle femelle sur un être humain, le parasite est libéré par le biais de la salive du moustique sous la forme de sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine afin de rejoindre le foie. Une fois dans les capillaires sinusoidaux, les sporozoïtes envahissent les hépatocytes en traversant les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer.²⁶ Le sporozoïte va alors se développer en mérozoïte donnant lieu à l'apparition d'un schizonte (« élément polynucléé présent dans les cellules siège d'une division asexuée »²⁷, **Figure 5**) via une réplication asexuée (schizogonie) durant 10 jours (*P. falciparum*) ou 12 jours (*P. vivax*). Les mérozoïtes sont alors libérés dans le sang par le biais de mérosomes, expansion de la vacuole parasitophore où se situe le schizonte et qui traverse l'endothélium pour rejoindre le sang.²⁸

Chez deux espèces, *P. vivax* et *P. ovale*, on retrouve aussi des hypnozoïtes.²⁹ Lors du développement, les sporozoïtes peuvent potentiellement rentrer dans ce stade. Une fois dans celui-ci, les parasites stoppent leur développement et rentrent en dormance pour une durée pouvant aller jusqu'à plusieurs années. L'entrée et la sortie des parasites dans ce stade est encore méconnue aujourd'hui mais il s'agit de la cause de la résurgence du paludisme chez des personnes infectées par *P. vivax* ou *P. ovale*.

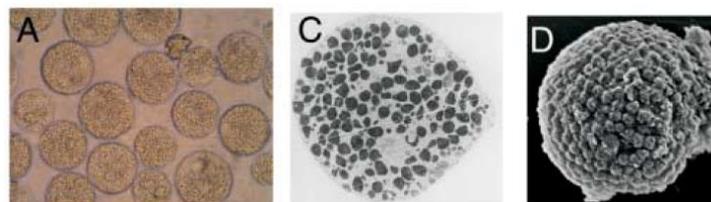


Figure 5. Cellule(s) HepG2 infectée(s) par *P. berghei* observées au microscope classique (à gauche), au microscope électronique en transmission (au centre) et au microscope électronique à balayage (à droite). D'après Sturm *et al.*²⁸

²⁶ Tavares, J.; Formaglio, P.; Thiberge, S.; Mordelet, E.; Van Rooijen, N.; Medvinsky, A.; Ménard, R.; Amino, R. Role of Host Cell Traversal by the Malaria Sporozoite during Liver Infection. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 905–915, doi:[10/f4vf29](https://doi.org/10.1083/jem.20121011).

²⁷ Académie nationale de pharmacie. <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Schizonte> (consulté le 30/08/21)

²⁸ Sturm, A.; Amino, R.; Van de Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J-M.; Menard, R.; Heussler, V.T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science* **2006**, *313*, 1287–1290, doi:[10/cprgrj](https://doi.org/10.1126/science.1128700).

²⁹ Adams, J.H.; Mueller, I. The Biology of *Plasmodium Vivax*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, a025585, doi:[10/gf3mjg](https://doi.org/10.1101/131111).

1.4.2. Phase érythrocytaire

Dans la circulation sanguine, les mérozoïtes vont rapidement infecter les érythrocytes. Le processus d'invasion est complexe et fait intervenir les différents éléments du complexe apical.^{4, 24} Une fois à l'intérieur des érythrocytes, le parasite entre de nouveau dans un cycle de développement schizogonique. Il se développe en trophozoïte (dont le stade jeune est aussi qualifié de « stade anneau » à cause de sa forme sous microscope) puis en un schizonte contenant des mérozoïtes (**Figure 6**). Une fois suffisamment développés, les mérozoïtes vont se libérer de l'érythrocyte, provoquant son éclatement et vont aller infecter de nouveaux érythrocytes. Ce cycle dure en général 48 heures, hormis pour *P. malariae* avec 72 heures et *P. knowlesi* qui dure 24 heures.

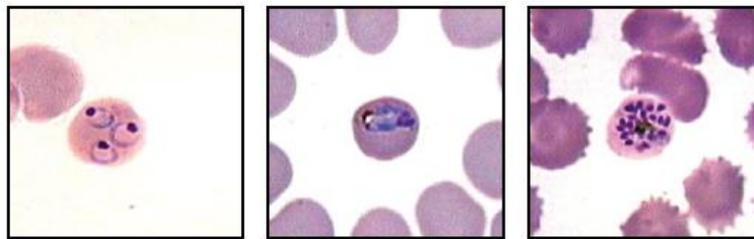


Figure 6. Images au microscope d'hématies infectées par des trophozoïtes jeunes (stade anneau, à gauche), des trophozoïtes matures (au centre) et des schizontes (à droite). Photos d'Ashley *et al.*³⁰

Lors du développement dans l'érythrocyte, le jeune trophozoïte peut aussi entrer dans une autre voie de développement, amenant au stade de gamétocyte.³¹ Les stades de développement du gamétocyte sont notés de I à V (**Figure 7**). Au stade V, on peut distinguer un gamétocyte mâle d'un gamétocyte femelle. Contrairement au développement asexué qui se déroule dans le sang, le développement des gamétocytes se déroule au sein de la moelle osseuse. Une fois arrivés au stade V, les gamétocytes retournent dans le sang dans l'attente de pouvoir infecter un anophèle à l'occasion d'un repas sanguin.

La compréhension de la gamétocytogénèse et des mécanismes associés reste un domaine d'études important pour la lutte antipaludique. On sait cependant que celle-ci est dépendante de nombreux facteurs tels que l'immunité de l'hôte contre le paludisme, taux d'érythropoïétine, etc.... Les gamétocytes semblent aussi avoir un impact sur le comportement des anophèles. Une expérience par Lacroix *et al.*³² a montré que des enfants

³⁰ Milner, D.A. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a025569, doi:[10/gmnnfd](https://doi.org/10/gmnnfd).

³¹ Meibalan, E.; Marti, M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, a025452, doi:[10/gmnc35](https://doi.org/10/gmnc35).

³² Lacroix, R.; Mukabana, W.R.; Gouagna, L.C.; Koella, J.C. Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e298, doi:[10/d6qc33](https://doi.org/10/d6qc33).

possédant des gamétocytes stade V dans leur sang étaient piqués deux fois plus que ceux n'en ayant aucun ou n'en ayant plus après traitement antipaludéen.

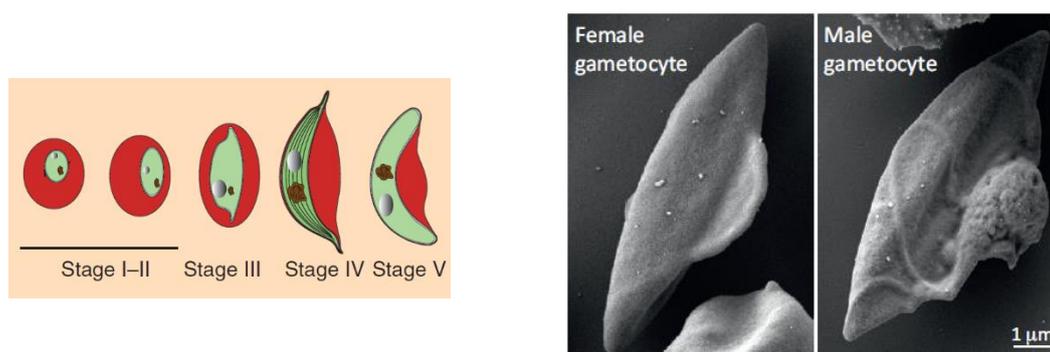


Figure 7. A gauche, représentation des différents stades d'un gamétocyte. D'après Meibalan *et al.*³¹ A droite, érythrocytes infectés par un gamétocyte femelle (à gauche) et un gamétocyte mâle (à droite) observés au microscope électronique à balayage. D'après Maier *et al.*²⁵

1.4.3. Phase sporogonique

Au cours d'un repas sanguin sur un être humain infecté, un anophèle va ingérer des érythrocytes parasités par des gamétocytes. Les gamétocytes vont alors subir un changement d'environnement avec la diminution de la température, le passage d'un pH 7,4 à 8,0 - 8,2 ainsi que l'exposition à une molécule présente dans le moustique, l'acide xanthurénique.³³ Ces trois paramètres provoquent la libération du gamétocyte V de l'érythrocyte et l'initiation de la sporogonie (phase de réplication sexuée). Les gamétocytes mâles se transforment en microgamètes et les femelles en macrogamètes. Un microgamète féconde une macrogamète pour former un zygote qui se transforme ensuite en ookinète. Cette cellule mobile va sortir du système digestif en traversant l'épithélium et se développer en oocyste, au sein duquel les sporozoïtes vont se développer jusqu'à s'en libérer et rejoindre les glandes salivaires du moustique. Ce développement au sein du moustique dure un peu plus de deux semaines.

1.5. Physiopathologie du paludisme

Le déroulement du cycle parasitaire au sein de l'Homme va entraîner des répercussions sur l'expression des symptômes pendant l'infection. La phase hépatocytaire est complètement asymptomatique pour l'hôte. L'apparition des premiers symptômes survient lors de la libération des mérozoïtes hépatiques dans le sang et l'infestation des premiers

³³ Billker, O.; Lindo, V.; Panico, M.; Etienne, A.E.; Paxton, T.; Dell, A.; Rogers, M.; Sinden, R.E.; Morris, H.R. Identification of Xanthurenic Acid as the Putative Inducer of Malaria Development in the Mosquito. *Nature* **1998**, *392*, 289–292, doi:[10/cvmb9q](https://doi.org/10/cvmb9q).

érythrocytes.³⁰ Les symptômes sont, à ce moment, peu spécifiques avec principalement de la fièvre.

La suite varie selon l'espèce de *Plasmodium* impliquée. Les 5 espèces peuvent provoquer un accès palustre simple et c'est essentiellement *P. falciparum* qui est responsable de l'accès palustre grave, susceptible d'être mortel. *P. vivax* peut aussi être concerné et *P. knowlesi*, en l'absence d'un traitement rapide, peut aussi être mortel à cause de son cycle répliatif rapide de 24 heures.

1.5.1. L'accès palustre simple

Les premiers phénomènes hémolytiques accompagnant la libération de nouveaux mérozoïtes sont initialement asynchrones pendant plusieurs jours. Un isolat finit par prendre le dessus aboutissant à des hémolyses synchrones. Ces hémolyses s'accompagnent :

- D'une anémie hémolytique régénérative et possiblement d'une thrombopénie ;
- D'une splénomégalie due à la présence de débris cellulaires dans le sang ;
- D'un possible ictère à cause de la bilirubine libérée dans le sang ;
- D'un épisode fiévreux qui a pour origine la libération de substances pyrogènes et principalement l'hémozoïne (produit de dégradation de l'hémoglobine par *Plasmodium*).

Ces épisodes fiévreux revenant à la suite de chaque épisode hémolytique sont caractéristiques du paludisme et appelés fièvres palustres. Ils durent entre 6 et 10 heures et se déroulent en trois étapes :³⁴

- L'apparition d'une sensation de froid avec des frissons ;
- L'apparition d'une fièvre associée à des maux de têtes et des vomissements ;
- Une fatigue générale accompagnée de sueurs.

Comme le cycle de réplication asexuée est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, on parle dans ce cas de fièvres tierces. Pour *P. malariae* avec son cycle de 72 heures, on parle de fièvres quartes. Enfin pour *P. knowlesi*, les fièvres sont quotidiennes. Avec le temps, le système immunitaire devient pleinement capable de réagir contre le parasite et la

³⁴ Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> (consulté le 31/08/21)

réponse immunitaire permet une atténuation voire la disparition de ces épisodes fiévreux. Cet état est qualifié de prémuniton.³⁵

1.5.2. L'accès palustre grave

Trois espèces peuvent être responsables d'un accès palustre grave : *P. vivax*, *P. knowlesi* et surtout *P. falciparum*. L'OMS a défini de manière précise les critères permettant d'orienter le diagnostic vers un accès palustre grave.³⁶ En effet, le traitement sera différent entre un accès simple et un accès grave, en considérant l'urgence vitale pour le patient. Un patient possédant un ou plusieurs signes de gravités suivants est considéré comme faisant un accès palustre grave à *P. falciparum* :

- Altération de la conscience avec score de Glasgow < 11 (adulte) ou score de Blantyre < 3 (enfant) ;
- Impossibilité de s'asseoir, marcher ou tenir debout sans assistance ;
- Plus de deux épisodes convulsifs par 24 heures ;
- Acidose métabolique ;
- Hypoglycémie < 2.2 mmol.L⁻¹ ;
- Anémie sévère < 5 g.dL⁻¹ ;
- Insuffisance rénale avec créatininémie > 265 µmol.L⁻¹ ou urémie 20 mmol.L⁻¹ ;
- Jaunisse avec bilirubinémie > 50 µmol.L⁻¹ ;
- Œdème pulmonaire ;
- Hémorragies importantes (nasales, gingivales mais aussi hématémèse ou méléna) ;
- Choc volémique ;
- Hyperparasitémie > 10%.

Ces critères sont quasiment les mêmes, utilisés en pratique dans les hôpitaux français et définis par la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF).³⁷

L'accès palustre grave est majoritairement retrouvé chez *P. falciparum* à cause des changements que le parasite provoque sur l'érythrocyte après l'infestation. Le parasite va alors exporter à la surface un facteur de virulence, la protéine PfEMP1 (*Erythrocyte Membrane Protein 1*) qui modifie la surface de l'érythrocyte et rend celui-ci capable d'adhérer à la surface

³⁵ Ashley, E.A.; Pyae Phyo, A.; Woodrow, C.J. Malaria. *Lancet* **2018**, *391*, 1608–1621, doi:[10/ghhkhg](https://doi.org/10/ghhkhg).

³⁶ WHO Guidelines for malaria. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

³⁷ Bouchaud, O.; Bruneel, F.; Caumes, E.; Houzé, S.; Imbert, P.; Pradines, B.; Rapp, C.; Strady, C. Management and Prevention of Imported Malaria. 2018 Update of the 2007 French Clinical Guidelines. *Méd. Mal. Infect.* **2020**, *50*, 161–193, doi:[10/gmn3zh](https://doi.org/10/gmn3zh).

des vaisseaux sanguins (**Figure 8**).³⁸ L'accumulation de ces érythrocytes dans des capillaires va alors provoquer une réponse inflammatoire pouvant s'emballer et engager les mécanismes de coagulation. L'obstruction des capillaires et l'emballement immunitaire peuvent alors provoquer des défaillances multiviscérales :³⁹

- Le cerveau avec coma et convulsions ;
- Chez les enfants, des hémorragies rétinienne ;
- Le rein avec une insuffisance rénale aigüe ;
- Les poumons entraînant œdème pulmonaire (par perméabilité des capillaires) et syndrome de détresse respiratoire aigüe ;
- Une anémie palustre sévère multifactorielle (hémolyse d'ue aux parasites, au système immunitaire, cytoadhésion des érythrocytes, etc...) amplifiant l'hypoxie des tissus et retrouvée majoritairement chez les enfants.

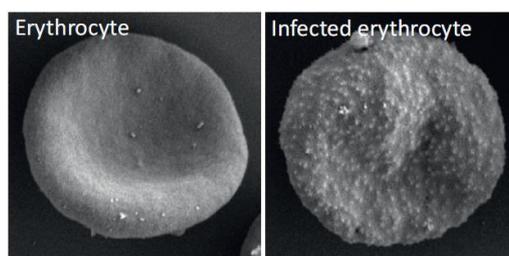


Figure 8. Surface d'un érythrocyte sain (à gauche) et d'un érythrocyte infecté par *Plasmodium* (à droite) obtenue par microscopie électronique. D'après Maier *et al.*²⁵

Le paludisme est aussi problématique chez la femme enceinte puisque l'adhésion des érythrocytes sur la paroi des capillaires sanguins peut avoir lieu dans le placenta. Cette adhésion entraîne une limitation des échanges au travers du placenta, menant à une restriction de croissance intra-utérine.⁴⁰

1.6.Méthodes pour le diagnostic du paludisme

Pour une prise en charge la meilleure possible, le diagnostic doit rapidement être établi afin de confirmer ou non l'existence d'un paludisme et l'espèce de *Plasmodium* impliquée dans l'infection.

³⁸ Fairhurst, R.M.; Wellem, T.E. Modulation of Malaria Virulence by Determinants of Plasmodium Falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1 Display: *Curr. Opin. Hematol.* **2006**, *13*, 124–130, doi:[10/cgsvkb](https://doi.org/10/cgsvkb).

³⁹ Moxon, C.A.; Gibbins, M.P.; McGuinness, D.; Milner, D.A.; Marti, M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **2020**, *15*, 315–343, doi:[10/gmnp57](https://doi.org/10/gmnp57).

⁴⁰ Sharma, L.; Shukla, G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. *Front. Med.* **2017**, *4*, 117, doi:[10/gbqxqc](https://doi.org/10/gbqxqc).

Dans le cas d'une suspicion de paludisme dit d'importation (après un séjour dans un pays endémique), en France, le diagnostic repose sur plusieurs méthodes (**Schéma 4**).^{37, 41} Un interrogatoire du patient peut déjà permettre d'orienter le clinicien vers des espèces suspectes selon le pays visité.

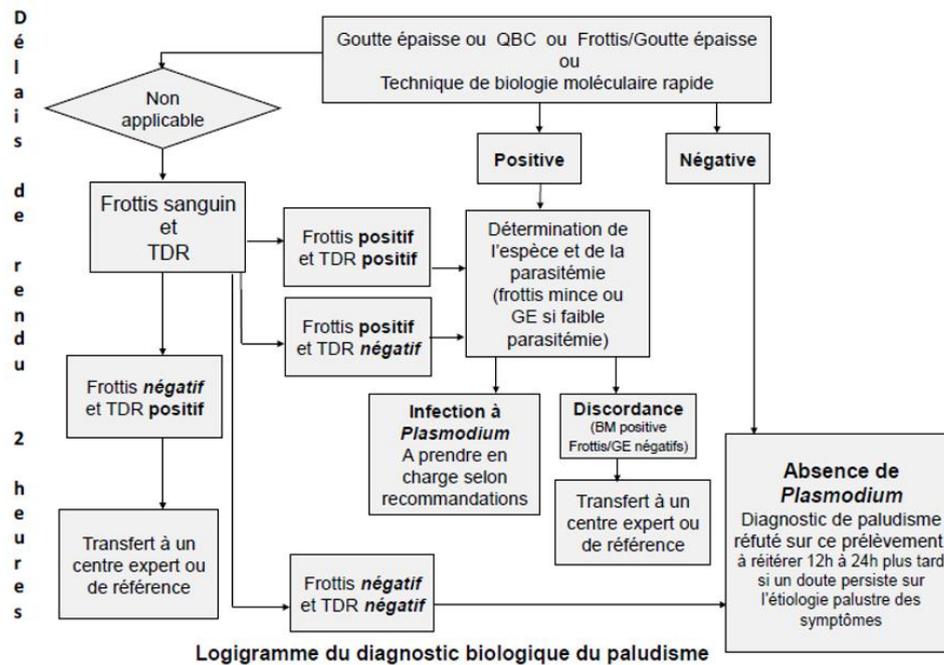


Schéma 4. Logigramme du diagnostic biologique du paludisme. D'après le CNR.⁴¹

Devant l'urgence potentielle d'un cas de paludisme, le diagnostic microscopique est à privilégier puisque celui-ci permet à la fois de mesurer la parasitémie ainsi que potentiellement déterminer l'espèce du parasite. Deux méthodes complémentaires existent : le frottis sanguin et la goutte épaisse (**Figure 9**).⁴² Le premier consiste à étaler une goutte de sang (2-3 µL) tandis que la deuxième consiste juste à déposer 6 µL de sang sur la lame. Les deux étant réalisés normalement sur la même lame, ils sont mis à sécher avant de réaliser une coloration de Giemsa sur les deux échantillons. Cependant, ces méthodes reposent sur la qualité de préparation des lames et l'expérience de la personne les examinant.

⁴¹ Centre national de référence du paludisme. <https://cnr-paludisme.fr/diagnostic-traitement/> (consulté le 31/08/21)

⁴² Microscopie pour la détection, l'identification et la quantification des parasites du paludisme sur frottis sanguins ou gouttes épaisses colorés dans les environnements de recherche : procédures - guide méthodologique. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

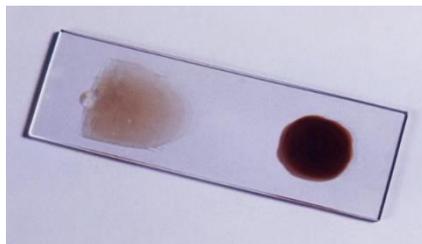


Figure 9. A gauche, un frotti sanguin et à droite, une goutte épaisse.

Pour détecter la présence de parasites, on peut aussi utiliser des techniques de marquage par fluorescence des parasites. Mais, la méthode de détection la plus rapide est l'utilisation d'un test de diagnostic rapide (TDR). Ces tests se basent majoritairement sur la détection d'antigènes parasitaires et donnent des résultats en moins de 30 minutes. Selon le test utilisé, il est possible d'identifier l'espèce de *Plasmodium*. Mais, ces deux techniques ont des limitations : la fluorescence ne permet pas de connaître l'espèce tandis que les TDR ne permettent pas de mesurer la parasitémie.

Enfin, il est possible d'utiliser des méthodes de biologie moléculaire via la *Polymerase Chain Reaction* (méthode PCR). Le principal avantage de la PCR est l'identification certaine de l'espèce de *Plasmodium*. C'est aussi la méthode la plus sensible pour détecter la présence de parasites ou non. Mais, l'accès aux matériels est limité ce qui restreint son utilisation.

Etant donné le niveau de développement des pays où le paludisme est endémique, l'accès aux techniques telles que le marquage par fluorescence ou la PCR est extrêmement limité. L'utilisation des TDR est donc la méthode majeure pour confirmer un cas de paludisme dans ces pays.

2. La chimiothérapie antiparasitaire

Les médicaments disposant d'une autorisation de mise sur le marché contre le paludisme sont nombreux. On classe ces médicaments généralement dans les catégories suivantes : les dérivés de la quinoléine, les arylaminoalcools, les antifolates, les antibiotiques à activité antipaludique et l'artémisinine et ses dérivés. Mais, des souches résistantes à un ou plusieurs médicaments existent rendant l'utilisation d'association de médicaments la norme pour traiter le paludisme.

Le **Schéma 5** résume la conduite à tenir pour le traitement d'un cas de paludisme selon les recommandations de l'OMS.³⁶ Les recommandations françaises, émanant de la société de

parasitologie et d'infectiologie de langue française, sont relativement similaires.³⁷ Cette prise en charge a comme premier critère la sévérité de l'accès de palustre. Pour un accès palustre grave, un traitement par voie IV d'au minimum 24 heures doit rapidement être initié puis suivi par un traitement *per os* pendant 3 jours. Dans le cas de l'accès palustre simple, l'espèce est un autre critère important puisque toutes les souches de *P. falciparum* sont résistantes à la chloroquine aujourd'hui. Un traitement de 3 jours est alors mis en place suivi de l'utilisation de primaquine pour soit limiter la transmission du paludisme dû à *P. falciparum* (une dose) ou bien pour éliminer les hypnozoïtes (traitement dit radical) retrouvés avec *P. vivax* et *P. ovale* (traitement pendant 14 jours).

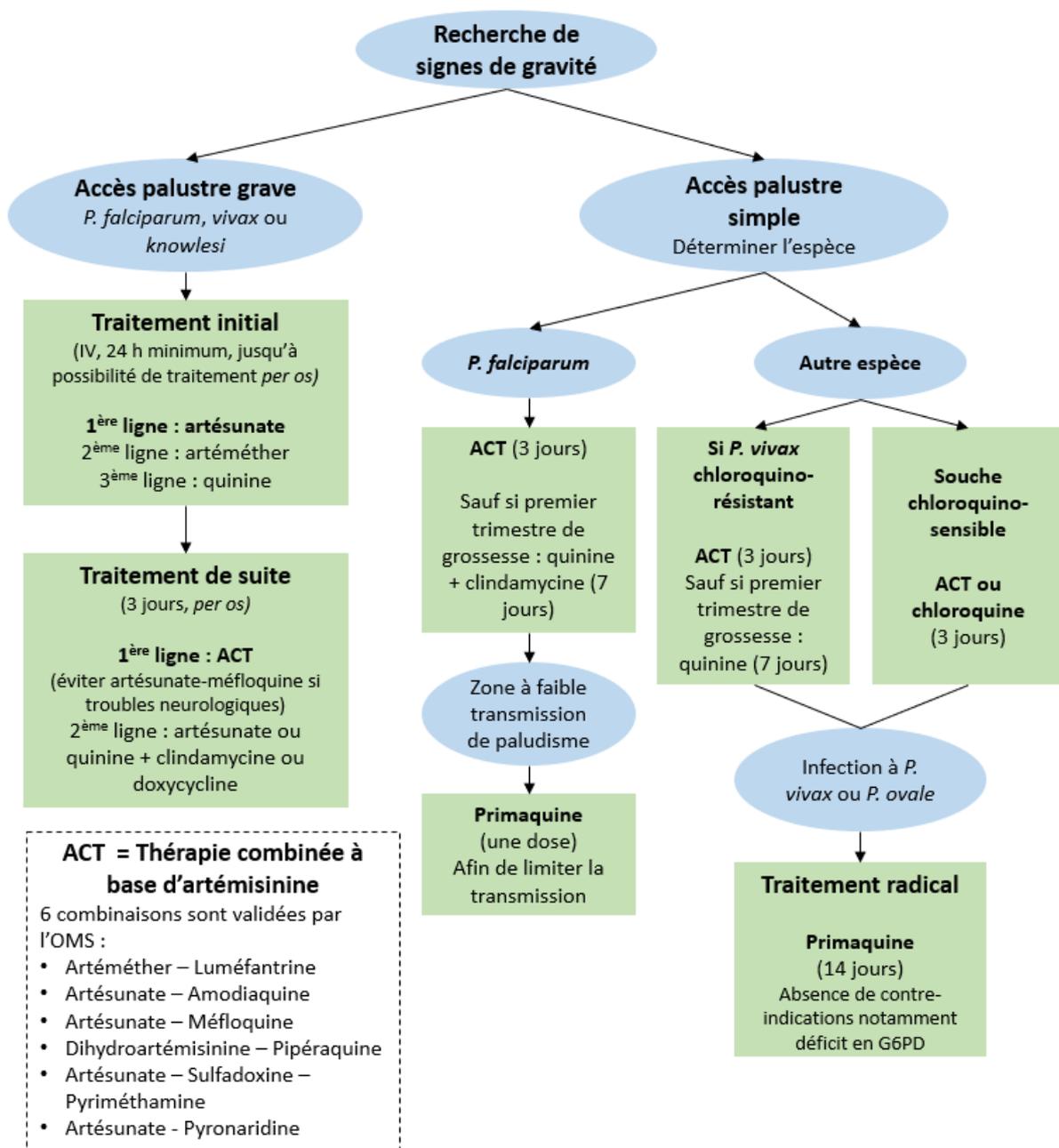


Schéma 5. Diagramme décisionnel concernant les traitements antipaludiques. D'après les recommandations de l'OMS.³⁶

2.1. Les dérivés de la quinoléine

Ces dérivés comportent un noyau de type quinoléine dans leur structure (**Figure 10**). On retrouve, dans cette catégorie, la quinine, premier médicament utilisé contre le paludisme, ainsi que les dérivés de type 4-aminoquinoléine et 8-aminoquinoléine.

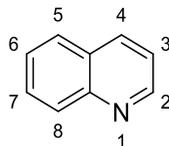


Figure 10. Structure chimique et numérotation du noyau quinoléine.

2.1.1. La quinine

La quinine est une molécule possédant un noyau quinoléine substitué en position 4 par un carbone substitué par une fonction alcool et un noyau azoté quinuclidine, et en position 6 un groupement méthoxy (**Figure 11**). Il s'agit d'un alcaloïde d'origine naturelle, extrait de l'écorce du quinquina. Les quinquinas (genre *Cinchona*) sont des arbres d'Amérique du Sud de la famille des *Rubiaceae* que l'on retrouve du côté est de la cordillère des Andes.

L'activité de l'écorce de quinquina contre la fièvre palustre est connue depuis longtemps par les Incas lorsque les conquistadors débarquèrent en Amérique du Sud. Les Jésuites en font l'observation et ramènent l'écorce, utilisée sous forme de poudre, en Europe (« poudre des Jésuites »).⁴³ Cette poudre contient un mélange de plusieurs alcaloïdes ; certains sont encore présents dans le médicament actuel à base de quinine (Quinimax®) : la quinine (96%), la quinidine (2,64%), la cinchonine (0,68%) et la cinchonidine (0,68%) (**Figure 11**). En 1821, deux pharmaciens français, Joseph Pelletier et Joseph Cavantou, publient leurs travaux sur les différentes espèces de quinquinas y compris l'isolation de la quinine.⁴⁴ Isolant le principe actif majeur de cette écorce, la quinine sera alors employée au cours du XIX^{ème} siècle comme médicament contre le paludisme. La difficulté de produire la quinine en quantité suffisante, notamment via l'abattage massif d'arbres, va pousser à rechercher des méthodes de synthèse organique. Mais, la présence de 4 carbones asymétriques sur la molécule rend cette synthèse très compliquée. Ces limitations entraineront la recherche à s'orienter vers la

⁴³ Achan, J.; Talisuna, A.O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J.K.; Baliraine, F.N.; Rosenthal, P.J.; D'Alessandro, U. Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria. *Malar. J.* **2011**, *10*, 144, doi:[10/fq59fy](https://doi.org/10/fq59fy).

⁴⁴ Pelletier, J. et Caventou, J. Recherches chimiques sur les quinquinas. *J. Pharm. Sci. Access.* **1821**, *7*, 49-96

synthèse de dérivés similaires à la quinine. La synthèse énantiosélective de la quinine ne sera réalisée qu'en 2001.⁴⁵

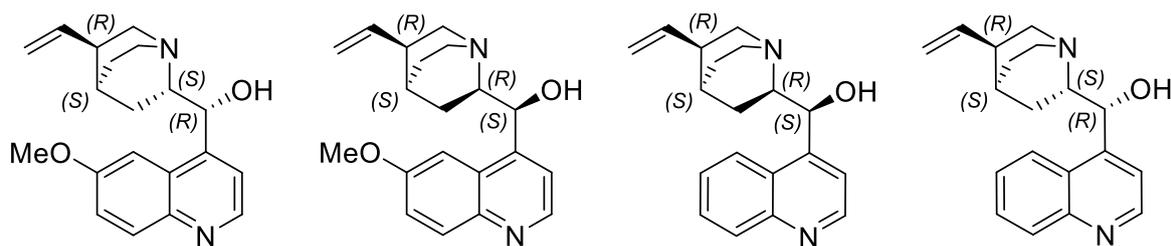


Figure 11. Structure chimique, de gauche à droite, de la quinine, de la quinidine, de la cinchonine et de la cinchonidine.

La quinine doit être utilisée avec précaution à cause de son index thérapeutique étroit. A hautes doses, elle provoque le cinchonisme. Ce syndrome, de mécanisme inconnu, est caractérisé par des accouphènes, une baisse de l'acuité auditive, des vertiges et des céphalées principalement.⁴⁶

2.1.2. Les 4-aminoquinoléines

Cette classe regroupe les dérivés de la quinine comportant un noyau quinoléine substitué en position 4 par une amine secondaire ou tertiaire (**Figure 12**) : la chloroquine, l'amodiaquine, la pipéraquine et la pyronaridine.

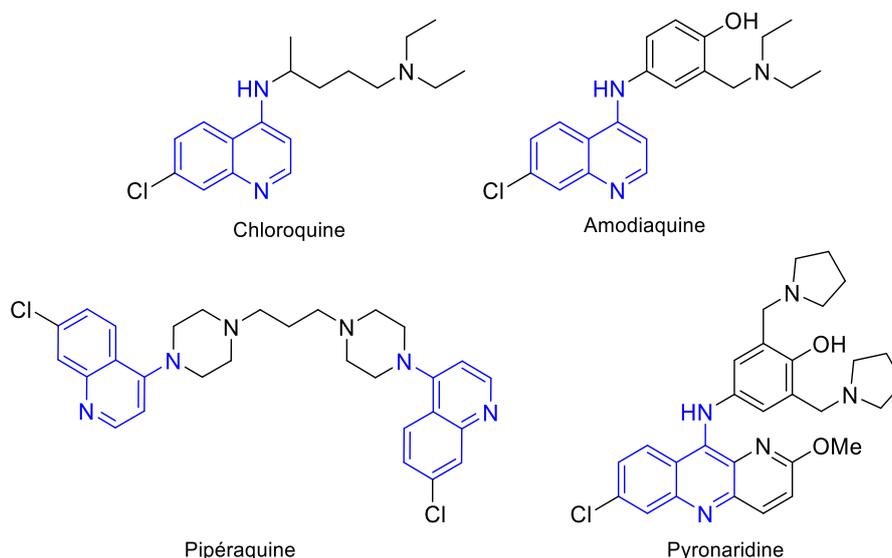


Figure 12. Structures chimiques des 4-aminoquinoléines antipaludiques (avec leur noyau en bleu).

⁴⁵ Stork, G.; Niu, D.; Fujimoto, A.; Koft, E.R.; Balkovec, J.M.; Tata, J.R.; Dake, G.R. The First Stereoselective Total Synthesis of Quinine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 14, 3239-3242.

⁴⁶ Agence nationale de sécurité du médicament. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0231295.htm> (consulté le 19/09/21)

La chloroquine est le premier médicament de synthèse majeur contre le paludisme. Elle est découverte en 1934 puis brevetée en 1937⁴⁷ par le chimiste Dr Hans Andersag chez l'entreprise allemande Bayer. Mise à l'écart ensuite pendant 7 ans car jugée trop toxique, la molécule et son efficacité inédite sont redécouvertes dans des essais cliniques américains (les USA recherchant un médicament antipaludique pour appuyer leurs troupes dans la guerre du Pacifique face au Japon).⁴⁸ Elle est mise sur le marché en 1946 et sera un outil majeur dans l'éradication du paludisme en Amérique du Nord et en Europe grâce à son faible coût. Par rapport à la quinine, le cycle quinoléine est substitué par un chlore en position 7 et la chaîne latérale en position 4 est une amine secondaire substituée par une chaîne aliphatique se terminant par une amine tertiaire substituée par deux groupements éthyles. Son usage massif dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle a rendu la quasi-totalité des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine.

L'amodiaquine a été développée en 1948. Elle diffère de la chloroquine au niveau de la chaîne latérale en position 4 où un noyau phénol remplace la chaîne aliphatique de la chloroquine. Elle est utilisée seulement dans les pays endémiques en association avec l'artésunate (Coarsucam[®]).³⁶

La pipéraquine est une bisquinoléine. Les deux noyaux sont substitués en position 4 par une pipérazine, les deux étant reliées par une chaîne propyle. Elle est uniquement utilisée en association avec la dihydroartémisinine, ou artémimol (Euratersim[®]).

La pyronaridine, une benzo[*b*][1,5]naphthyridine, est un antipaludique développé par la Chine à la fin des années 70 et dont l'usage clinique remonte au début des années 90.⁴⁹ Sa structure est un compromis structural entre la mépacrine (dérivé proche de la chloroquine mais avec un noyau acridine à la place de la quinoléine) et la chaîne latérale de l'amodiaquine. Son usage en monothérapie a été stoppé par l'apparition rapide de résistance.⁴⁹ A partir de 2012, elle est combinée avec l'artésunate (Pyramax[®]) dans le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* ou *P. vivax*.⁵⁰

⁴⁷ Andersag, H.; Breitner, S.; Jung, H. Process for the preparation of quinoline compounds containing amino groups with basic substituents in the 4-position. DE683692C, 1937.

⁴⁸ Jensen, M.; Mehlhorn, H. Seventy-Five Years of Resochin[®] in the Fight against Malaria. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 609–627, doi:[10/fccj6t](https://doi.org/10/fccj6t).

⁴⁹ Fu, S.; Xiao, S.-H. Pyronaridine: A New Antimalarial Drug. *Parasitol. Today* **1991**, *7*, 310–313, doi:[10/bgvdk9](https://doi.org/10/bgvdk9).

⁵⁰ *Medecines for malaria venture*. <https://www.mmv.org/access/products-projects/pyramax-pyronaridine-artesunate-treatment-acute-uncomplicated-malaria> (consulté le 06/09/21)

2.1.3. Les 8-aminoquinoléines

Pendant longtemps, cette classe avait pour unique représentante la primaquine. Elle a été synthétisée en 1946, dans un contexte similaire à celui de la chloroquine, à la recherche de dérivés synthétiques de la quinine (**Figure 13**).⁵¹ Son noyau quinoléine est substitué par un groupement méthoxy en position 6. La chaîne aminocarbonée en position 8 est identique à celle de la chloroquine. Approuvée en 1952 par la *Food and Drug Administration* (FDA), l'OMS la recommande pour deux indications :³⁶

- Le traitement dit « radical » des infections à *P. vivax* ou *P. ovale* en association avec un autre antipaludique : la primaquine est active contre les hypnozoïtes, forme latente du parasite retrouvée chez ces deux espèces (cf. 1.4.1.Phase hépatocytaire) ;
- En association avec un autre traitement antipaludique pour limiter la transmission de l'infection dans les zones endémiques : la primaquine est aussi active sur les gamétocytes.

Cependant, la primaquine (comme les autres 8-aminoquinoléines) possède plusieurs effets indésirables potentiellement dangereux.⁵² Elle est responsable d'anémies hémolytiques chez les personnes déficientes en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) appelé aussi favisme. Cette enzyme est la première dans la voie des pentoses phosphates, voie aboutissant notamment à la synthèse du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), métabolite intervenant dans la lutte contre le stress oxydant. Il est donc requis de réaliser un dépistage de ce déficit en G6PD avant de démarrer un traitement par primaquine. La primaquine est aussi responsable de la formation de méthémoglobine.⁵³ En France, la primaquine est disponible par le biais d'une autorisation temporaire d'utilisation.⁵⁴

Depuis 2018, une autre 8-aminoquinoléine a été approuvée par la FDA : la tafénoquine (**Figure 13**). Initialement développée par l'US Army,⁵⁵ elle reprend la structure de la primaquine avec en plus des groupements méthoxy en position 2, méthyl en position 4 et un

⁵¹ Elderfield, R.C.; Gensler, W.J.; Head, J.D.; Hageman, H.A.; Kremer, C.B.; Wright, J.B.; Holley, A.D.; Williamson, B.; Galbreath, J.; Wiederhold, L.; Frohardt, R.; Kupchan, S.M.; Williamson, T.A.; Birstein, O. Alkylaminoalkyl Derivatives of 8-Aminoquinoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1524–1529, doi:[10/fqfzh8](https://doi.org/10/fqfzh8).

⁵² Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. Primaquine Revisited Six Decades after Its Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 937–953, doi:[10/cni4d2](https://doi.org/10/cni4d2).

⁵³ Srivastava, P.; Singh, S.; Jain, G.K.; Puri, S.K.; Pandey, V.C. A Simple and Rapid Evaluation of Methemoglobin Toxicity of 8-Aminoquinolines and Related Compounds. *Ecotox. Environ. Safe.* **2000**, *45*, 236–239, doi:[10/fhpiq7](https://doi.org/10/fhpiq7).

⁵⁴ Agence nationale de sécurité du médicament. <https://ansm.sante.fr/tableau-atu-rtu/primaquine-sanofi-15-mg-comprime-pellicule> (consulté le 03/09/21)

⁵⁵ Blumbergs, P.; LaMontagne, M.P. 4-methyl-5-(unsubstituted and substituted phenoxy)-2,6-dimethoxy-8-(aminoalkylamino) quinolones. US4617394A, 1985.

trifluorométhylphényl'éther en position 5. A la différence de la primaquine qui nécessite une dose quotidienne pendant 14 jours pour le traitement radical,³⁶ la tafénoquine nécessite une unique dose et donne des résultats comparables à la primaquine.^{56, 57} Son utilisation dans les pays endémiques paraît limitée à cause des difficultés d'accès aux tests de déficience à la G6PD couplés à la longue demi-vie du médicament et sa prise unique.⁵⁸ La primaquine conserve l'avantage que le traitement peut être stoppé dès les premiers signes d'anémie hémolytique.

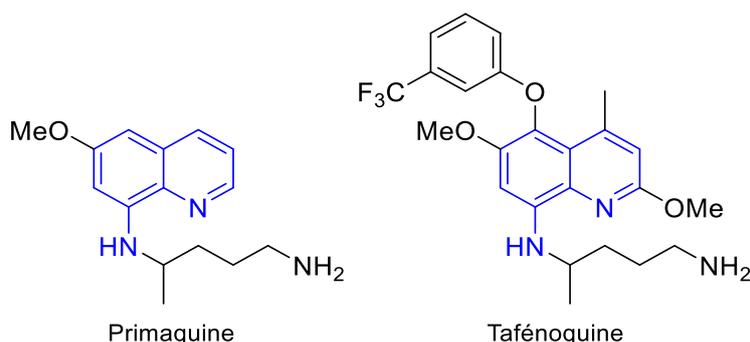


Figure 13. Structures chimiques des 8-aminoquinoléines antipaludiques (avec leur noyau en bleu).

2.2. Les arylaminoalcools

Les arylaminoalcools sont des molécules comportant un noyau aromatique (quinoléine ou non) substitué par une chaîne comportant une fonction alcool et amine. Trois molécules répondent à cette description (**Figure 14**) : la méfloquine et la luméfántrine ainsi que la quinine (cf. Chapitre 1 : 2.1.1. La quinine).

⁵⁶ Lacerda, M.V.G.; Llanos-Cuentas, A.; Krudsood, S.; Lon, C.; Saunders, D.L.; Mohammed, R.; Yilma, D.; Batista Pereira, D.; Espino, F.E.J.; Mia, R.Z.; Chuquiyauri, R.; Val, F.; Casapia, M.; Monteiro, W.M.; Brito, M.A.M.; Costa, M.R.F.; Buathong, N.; Noedl, H.; Diro, E.; Getie, S.; Wubie, K.M.; Abdissa, A.; Zeynudin, A.; Abebe, C.; Tada, M.S.; Brand, F.; Beck, H.P.; Angus, B.; Duparc, S.; Kleim, J.P.; Kellam, L.M.; Rousell, V.M.; Jones, S.W.; Hardaker, E.; Mohamed, K.; Clover, D.D.; Fletcher, K.; Breton, J.J.; Ugwuegbulam, C.O.; Green, J.A.; Koh, G.C.K.W. Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of *Plasmodium Vivax* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 215–228, doi:[10/gfwxc3](https://doi.org/10/gfwxc3).

⁵⁷ Llanos-Cuentas, A.; Lacerda, M.V.G.; Hien, T.T.; Vélez, I.D.; Namaik-larp, C.; Chu, C.S.; Villegas, M.F.; Val, F.; Monteiro, W.M.; Brito, M.A.M.; Costa, M.R.F.; Chuquiyauri, R.; Casapia, M.; Nguyen, C.H.; Aruachan, S.; Papwijitsil, R.; Nosten, F.H.; Bancone, G.; Angus, B.; Duparc, S.; Craig, G.; Rousell, V.M.; Jones, S.W.; Hardaker, E.; Clover, D.D.; Kendall, L.; Mohamed, K.; Koh, G.C.K.W.; Wilches, V.M.; Breton, J.J.; Green, J.A. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of *Plasmodium Vivax* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 229–241, doi:[10/gfwxgs](https://doi.org/10/gfwxgs).

⁵⁸ White, N.J. Tafenoquine — A Radical Improvement? *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 285–286, doi:[10/gmpcgp](https://doi.org/10/gmpcgp).

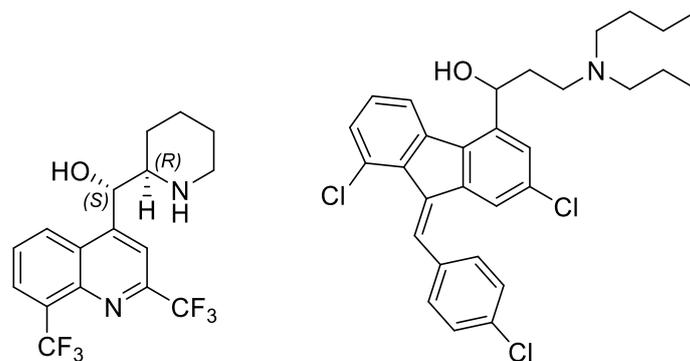


Figure 14. Structures chimiques de l'énantiomère (+) de la méfloquine (à gauche) et de la luméfantrine (à droite).

La méfloquine (Lariam[®]) possède un noyau quinoléine substitué par deux groupements trifluorométhyle en position 2 et 8 et la chaîne aminocarbonée est cyclique (pipéridine) contrairement aux précédentes molécules. Son principal effet secondaire est l'apparition de troubles neurologiques (anxiété, dépression, tendances suicidaires etc...) qui sont capables de durer longtemps après l'arrêt du traitement (la demi-vie d'élimination de la méfloquine étant autour de 20 jours).^{59, 60} La méfloquine retrouvée dans le médicament est un mélange de deux énantiomères : l'énantiomère (+)-(11S-12R) et l'énantiomère (-)-(11R-12S).^{61, 62} Selon la souche de *P. falciparum* étudiée *in vitro*, l'énantiomère (+) est plus actif que le (-) sur les souches W2 et D6,⁶³ tandis qu'aucune différence n'est observée chez les souches FCM29 et L3.⁶⁴ Plusieurs études montrent la capacité d'interaction de l'énantiomère (-) avec des cibles présentes au sein du système nerveux central : cholinestérases,⁶⁵ tyrosine kinase non-réceptrice 2⁶⁶ et récepteurs à l'adénosine A(2A).⁶⁷ Bien que son mécanisme d'action reste flou,

⁵⁹ Grabias, B.; Kumar, S. Adverse Neuropsychiatric Effects of Antimalarial Drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2016**, *15*, 903–910, doi:[10/gmpfh9](https://doi.org/10/gmpfh9).

⁶⁰ Karbwang, J.; White, N.J. Clinical Pharmacokinetics of Mefloquine: *Clinical Pharmacokinetics* **1990**, *19*, 264–279, doi:[10/dpd3zx](https://doi.org/10/dpd3zx).

⁶¹ Schmidt, M.; Sun, H.; Rogne, P.; Scriba, G.K.E.; Griesinger, C.; Kuhn, L.T.; Reinscheid, U.M. Determining the Absolute Configuration of (+)-Mefloquine HCl, the Side-Effect-Reducing Enantiomer of the Antimalaria Drug Lariam. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3080–3083, doi:[10/b4jpkb](https://doi.org/10/b4jpkb).

⁶² Dassonville-Klimpt, A.; Cézard, C.; Mullié, C.; Agnamey, P.; Jonet, A.; Da Nascimento, S.; Marchivie, M.; Guillon, J.; Sonnet, P. Absolute Configuration and Antimalarial Activity of Erythro -Mefloquine Enantiomers. *ChemPlusChem* **2013**, *78*, 642–646, doi:[10/f2dd6j](https://doi.org/10/f2dd6j).

⁶³ Karle, J.M.; Olmeda, R.; Gerena, L.; Milhous, W.K. Plasmodium Falciparum: Role of Absolute Stereochemistry in the Antimalarial Activity of Synthetic Amino Alcohol Antimalarial Agents. *Exp. Parasitol.* **1993**, *76*, 345–351, doi:[10/fmbxq5](https://doi.org/10/fmbxq5).

⁶⁴ Basco, L.; Gillotin, C.; Gimenez, F.; Farinotti, R.; Bras, J. In Vitro Activity of the Enantiomers of Mefloquine, Halofantrine and Epiroline against *Plasmodium Falciparum*. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *33*, 517–520, doi:[10/gmwqx3](https://doi.org/10/gmwqx3).

⁶⁵ McArdle, J.J.; Sellin, L.C.; Coakley, K.M.; Potian, J.G.; Quinones-Lopez, M.C.; Rosenfeld, C.A.; Sultatos, L.G.; Hognason, K. Mefloquine Inhibits Cholinesterases at the Mouse Neuromuscular Junction. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 1132–1139, doi:[10/fndd3r](https://doi.org/10/fndd3r).

⁶⁶ Milatovic, D.; Jenkins, J.W.; Hood, J.E.; Yu, Y.; Rongzhu, L.; Aschner, M. Mefloquine Neurotoxicity Is Mediated by Non-Receptor Tyrosine Kinase. *NeuroToxicology* **2011**, *32*, 578–585, doi:[10/bq65bw](https://doi.org/10/bq65bw).

⁶⁷ Weiss, S.M.; Benwell, K.; Cliffe, I.A.; Gillespie, R.J.; Knight, A.R.; Lerpiniere, J.; Misra, A.; Pratt, R.M.; Revell, D.; Upton, R.; Dourish, C.T. Discovery of Nonxanthine Adenosine A2A Receptor Antagonists for the Treatment of Parkinson's Disease. *Neurology* **2003**, *61*, S101–S106, doi:[10/gn6rfv](https://doi.org/10/gn6rfv).

cet énantiomère serait donc le responsable des effets secondaires neurologiques de la méfloquine. Cependant, un essai clinique a montré que l'utilisation de l'énantiomère (+) seul par rapport au racémique n'aboutit pas à une meilleure tolérance chez le sujet sain.⁶⁸

La luméfántrine possède un noyau de type fluorène substitué par un motif *para*-chlorobenzylidène et une chaîne aminocarbonée. La luméfántrine est uniquement utilisée en association avec l'artéméther (Coartem® et Riamet®) de la même façon que la combinaison arténimol/pipéraquline (en première intention dans le traitement de l'accès palustre simple mais aussi en relais du traitement initial contre l'accès palustre grave³⁷).

2.3. Dérivés quinoléiques et arylaminoalcools : un mécanisme d'action encore flou

Bien que les dérivés quinoléiques et les arylaminoalcools soient très utilisés, leur mécanisme d'action précis n'a pas, à l'heure actuelle, été clairement établi.⁶⁹

Le mécanisme le mieux connu est celui de la chloroquine et par extension celui des autres 4-aminoquinoléines. Lorsque le parasite est au sein des érythrocytes, il dégrade l'hémoglobine pour pouvoir synthétiser ensuite ses propres protéines. Au sein de la vacuole parasitaire (**Schéma 6**), l'hémoglobine est dégradée d'un côté en acides aminés et de l'autre en hème : une porphyrine comportant un atome de fer. Cet hème est transformé en ferroprotoporphyrine IX puis ferriprotoporphyrine IX, toxique en l'état pour le parasite. Ces porphyrines vont ensuite être cristallisées sous forme de cristaux d'hémozoïne,⁷⁰ non toxique pour le parasite. Il a d'abord été pensé que cette polymérisation était causée par une hème polymérase.⁷¹ En 1996, l'implication de la protéine HRP 2 (*Histidine-rich protein*) dans la polymérisation de l'hème est démontrée.⁷² Vers la fin des années 2000, divers travaux ont montrés que la formation de l'hémozoïne se déroule au sein de nanosphères lipidiques.^{73, 74}

⁶⁸ Tansley, R.; Lotharius, J.; Priestley, A.; Bull, F.; Duparc, S.; Möhrle, J. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Investigate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single Enantiomer (+)-Mefloquine Compared with Racemic Mefloquine in Healthy Persons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 6, 1195-1201, doi:[10/bb66fn](https://doi.org/10/bb66fn).

⁶⁹ Wicht, K.J.; Mok, S.; Fidock, D.A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2020**, *74*, 431–454, doi:[10/gmpdbs](https://doi.org/10/gmpdbs).

⁷⁰ Pagola, S.; Stephens, P.W.; Bohle, D.S.; Kosar, A.D.; Madsen, S.K. The Structure of Malaria Pigment β -haematin. *Nature* **2000**, *404*, 307-310, doi:[10/d3ntzr](https://doi.org/10/d3ntzr).

⁷¹ Slater, A.F.G.; Cerami, A. Inhibition by Chloroquine of a Novel Haem Polymerase Enzyme Activity in Malaria Trophozoites. *Nature* **1992**, *355*, 167–169, doi:[10/dk585z](https://doi.org/10/dk585z).

⁷² Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Goldberg, D.E. Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science* **1996**, *271*, 219–222, doi:[10/c6ggdw](https://doi.org/10/c6ggdw).

⁷³ Pisciotta, J.M.; Coppens, I.; Tripathi, A.K.; Scholl, P.F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev, V.; Sullivan, D.J. The Role of Neutral Lipid Nanospheres in *Plasmodium Falciparum* Haem Crystallization. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 197–204, doi:[10/ccjwit](https://doi.org/10/ccjwit).

⁷⁴ Hoang, A.N.; Sandlin, R.D.; Omar, A.; Egan, T.J.; Wright, D.W. The Neutral Lipid Composition Present in the Digestive Vacuole of *Plasmodium Falciparum* Concentrates Heme and Mediates β -Hematin Formation with an Unusually Low Activation Energy. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10107–10116, doi:[10/fstz6d](https://doi.org/10/fstz6d).

Le milieu au sein de ces sphères (neutre et lipophile) est favorable à la formation des cristaux d'hémozoïnes.

On sait que les 4-aminoquinoléines sont capables d'interagir avec la ferriprotoporphyrine IX, et cela dès 1964,⁷⁵ finissant par empêcher la formation d'hémozoïne et entraînant la mort du parasite par formation d'espèces oxydantes.^{76, 77} Herraiz *et al.*⁷⁸ ont démontré que ces espèces réactives endommageaient ensuite les protéines responsables de la dégradation de l'hémoglobine. De plus, l'addition d'inhibiteurs de l'hémoglobine protéase (enzyme parasitaire dégradant l'hémoglobine) abolit l'effet des 4-aminoquinoléines puisqu'il n'y a plus de libération d'hème.⁷⁹

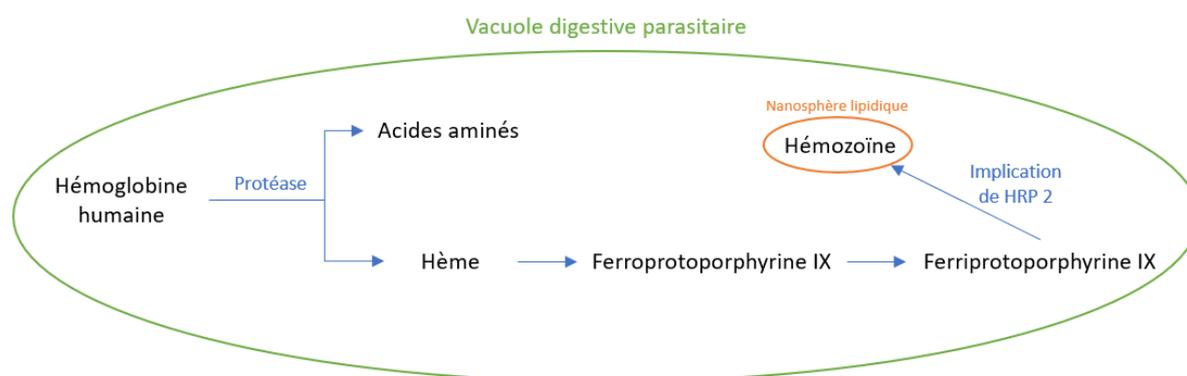


Schéma 6. Voie de dégradation de l'hémoglobine humaine utilisée par *Plasmodium* pour son développement.

Le mécanisme pour la quinine et les arylaminoalcools est moins bien connu que celui des 4-aminoquinoléines. Il est certain que ces composés agissent aussi sur la formation de l'hémozoïne comme les 4-aminoquinoléines mais ils se lient moins à la ferriprotoporphyrine IX que celles-ci.⁸⁰ Cependant, les parasites résistants à la chloroquine sont sensibles aux arylaminoalcools et à la quinine. Cela suggère que la cible principale de ces composés n'est

⁷⁵ Cohen, S.N.; Phifer, K.O.; Yielding, K.L. Complex Formation between Chloroquine and Ferrihaemic Acid in Vitro, and Its Effect on the Antimalarial Action of Chloroquine. *Nature* **1964**, *202*, 805–806, doi:[10/brp99s](https://doi.org/10/brp99s).

⁷⁶ Gorka, A.P.; de Dios, A.; Roepe, P.D. Quinoline Drug–Heme Interactions and Implications for Antimalarial Cytostatic versus Cytocidal Activities. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5231–5246, doi:[10/f475c3](https://doi.org/10/f475c3).

⁷⁷ Tilley, L.; Loria, P.; Foley, M. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem. J.* **1999**, *339*, 363–370.

⁷⁸ Herraiz, T.; Guillén, H.; González-Peña, D.; Arán, V.J. Antimalarial Quinoline Drugs Inhibit β -Hematin and Increase Free Hemin Catalyzing Peroxidative Reactions and Inhibition of Cysteine Proteases. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15398, doi:[10/ggrm92](https://doi.org/10/ggrm92).

⁷⁹ Sullivan, D.J.; Matile, H.; Ridley, R.G.; Goldberg, D.E. A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31103–31107, doi:[10/fif57z](https://doi.org/10/fif57z).

⁸⁰ Dorn, A.; Vippagunta, S.R.; Matile, H.; Jaquet, C.; Vennerstrom, J.L.; Ridley, R.G. An Assessment of Drug-Haematin Binding as a Mechanism for Inhibition of Haematin Polymerisation by Quinoline Antimalarials. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 6, 727–736, doi:[10/bz97qk](https://doi.org/10/bz97qk).

pas dans la vacuole digestive parasitaire. En 2017, Wong *et al.*⁸¹ ont montré que la méfloquine agit sur la sous-unité 80S du ribosome et ainsi diminue la synthèse protéique. En 2019, Dziekan *et al.*⁸² ont découvert via une méthode thermique d'analyse des interactions molécule-protéine que la quinine, et dans une moindre mesure la méfloquine, a pour cible la purine nucléoside phosphorylase (*PfPNP*), une protéine impliquée dans le recyclage des bases puriques. Bien qu'il s'agisse de la première cible protéique clairement identifiée pour la quinine, les auteurs précisent qu'il s'agit d'une des voies métaboliques touchées parmi les nombreuses perturbées par cette molécule. Enfin, en 2019, Kumar *et al.*⁸³ ont démontré *in vitro*, après un screening *in silico*, que la méfloquine est un inhibiteur compétitif des *PfACBPs* (*Acyl-CoA-Binding Proteins*), protéines intervenant dans le métabolisme des lipides.

Comme les 8-aminoquinoléines ne possèdent pas d'activité sur le stade sanguin asexué du parasite, il est probable que leur mécanisme d'action diffère des composés détaillés précédemment. Ce mécanisme a pendant longtemps été inconnu mais, des indices laissent penser que la primaquine, une fois métabolisée, est capable de produire des espèces réactives de l'oxygène.⁵² Cette hypothèse a été confirmée en 2019 par Camarda *et al.*⁸⁴ qui ont montré que la primaquine est métabolisée au niveau hépatique en 5-hydroxyprimaquine par le cytochrome 2D6 puis rentre dans un cycle catalytique où l'oxydation de la 5-hydroxyprimaquine génère des espèces réactives de l'oxygène et une quinoneimine réduite ensuite par la cytochrome P450 réductase (CPR) (**Schéma 7**). Ce métabolite va induire la production d'espèces réactives de l'oxygène tuant les formes intra-hépatocytaires du parasite mais les auteurs ont rapporté aussi que ces espèces se formaient dans la moelle osseuse, réservoir des gamétocytes.

A l'heure actuelle, le mécanisme d'action de la tafénoquine n'est pas connu.

⁸¹ Wong, W.; Bai, X.-C.; Sleeb, B.E.; Triglia, T.; Brown, A.; Thompson, J.K.; Jackson, K.E.; Hanssen, E.; Marapana, D.S.; Fernandez, I.S.; Ralph, S.A.; Cowman, A.F.; Scheres, S.H.W.; Baum, J. Mefloquine Targets the Plasmodium Falciparum 80S Ribosome to Inhibit Protein Synthesis. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, doi:[10/f9tv7x](https://doi.org/10/f9tv7x).

⁸² Dziekan, J.M.; Yu, H.; Chen, D.; Dai, L.; Wirjanata, G.; Larsson, A.; Prabhu, N.; Sobota, R.M.; Bozdech, Z.; Nordlund, P. Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, 473, doi:[10/gh9hfk](https://doi.org/10/gh9hfk).

⁸³ Kumar, A.; Ghosh, D.K.; Ali, J.; Ranjan, A. Characterization of Lipid Binding Properties of *Plasmodium Falciparum* Acyl-Coenzyme A Binding Proteins and Their Competitive Inhibition by Mefloquine. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 901–915, doi:[10/gn6rjd](https://doi.org/10/gn6rjd).

⁸⁴ Camarda, G.; Jirawatcharadech, P.; Priestley, R.S.; Saif, A.; March, S.; Wong, M.H.L.; Leung, S.; Miller, A.B.; Baker, D.A.; Alano, P.; Paine, M.J.I.; Bhatia, S.N.; O'Neill, P.M.; Ward, S.A.; Biagini, G.A. Antimalarial Activity of Primaquine Operates via a Two-Step Biochemical Relay. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3226, doi:[10/ggr6dh](https://doi.org/10/ggr6dh).

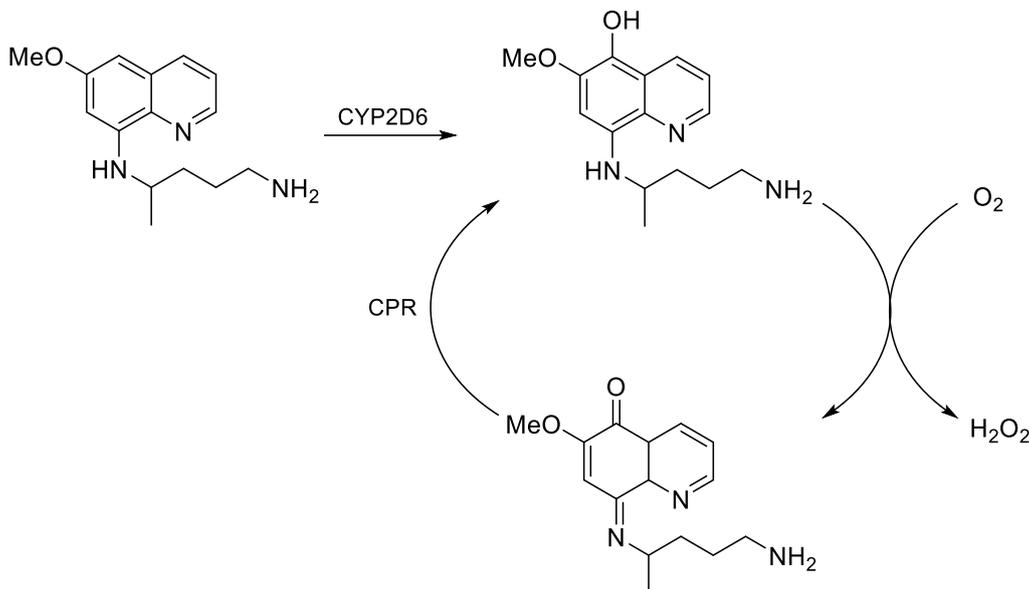


Schéma 7. Voie métabolique de la primaquine.

2.4. L'atovaquone

L'atovaquone est une hydroxy-1,4-napthoquinone possédant une analogie structurale avec les ubiquinones (**Figure 15**). Ce sont des co-facteurs des enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire, au sein des mitochondries, où elles assurent le transport des électrons. Chez *Plasmodium*, l'atovaquone inhibe ce transport d'électrons en se fixant au niveau du site de fixation des ubiquinones du cytochrome bc₁. Cette inhibition provoque une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie entraînant une inhibition de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et par conséquent des acides nucléiques. L'atovaquone est utilisée en monothérapie dans le traitement de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (Wellvone®).

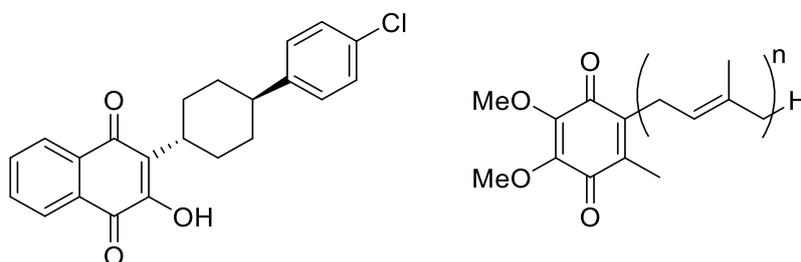


Figure 15. Structures chimiques de l'atovaquone et d'une ubiquinone.

Dans le traitement du paludisme, l'atovaquone est utilisée en association avec le proguanil. L'atovaquone permet une chute rapide de la parasitémie mais il y a un fort risque de rechute ainsi que la sélection de souches résistantes rendant la molécule non utilisable en

monothérapie.⁸⁵ Son utilisation est limitée dans les pays endémiques. L'association atovaquone-proguanil (Malarone®) est singulière parmi les traitements disponibles contre le paludisme puisque l'on assiste à un effet synergique en associant ces deux composés :

- Le taux de guérison approche les 100% avec bien moins de rechutes que l'atovaquone seule ;⁸⁶
- La dose d'atovaquone requise pour perturber la membrane mitochondriale est réduite.⁸⁷

2.5. Les antifolates

Le proguanil, développé en 1945 en Angleterre,⁸⁸ est un biguanide substitué d'un côté par un groupement parachlorophényl et de l'autre par un groupement isopropyle (**Figure 16**). Le proguanil est une prodrogue métabolisée au niveau hépatique en cycloguanil. Bien que retrouvé en combinaison avec l'atovaquone grâce à son action synergique, le cycloguanil n'est pas dénué d'activité : il est structuralement proche de la partie aromatique de l'acide folique (**Figure 16**). Il va inhiber le passage de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique en se liant à la dihydrofolate réductase (DHFR). L'acide tétrahydrofolique est un coenzyme primordial dans la synthèse *de novo* des bases puriques ce qui provoque un arrêt de la croissance du parasite.

⁸⁵ Chiodini, P.L.; Conlon, C.P.; Hutchinson, D.B.A.; Farquhar, J.A.; Hall, A.P.; Peto, T.E.A.; Birley, H.; Warrell, D.A. Evaluation of Atovaquone in the Treatment of Patients with Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 1073–1078, doi:[10/csd3mf](https://doi.org/10/csd3mf).

⁸⁶ Radloff, P.D.; Philipps, J.; Nkeyi, M.; Hutchinson, D.; Kremser, PG. Atovaquone and Proguanil for *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Lancet*, **1996**, *347*, 1511-1514, doi:[10/ftptqs](https://doi.org/10/ftptqs).

⁸⁷ Srivastava IK, Vaidya AB. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 6, 1334-1339 doi:[10/gmpfsn](https://doi.org/10/gmpfsn).

⁸⁸ Curd, F.H.S.; Davey, D.G.; Rose, F.L. Studies on Synthetic Antimalarial Drugs. *Ann. Trop. Med. Parasit*, **1945**, *39*, 208-216, doi:[10/gmsbzt](https://doi.org/10/gmsbzt).

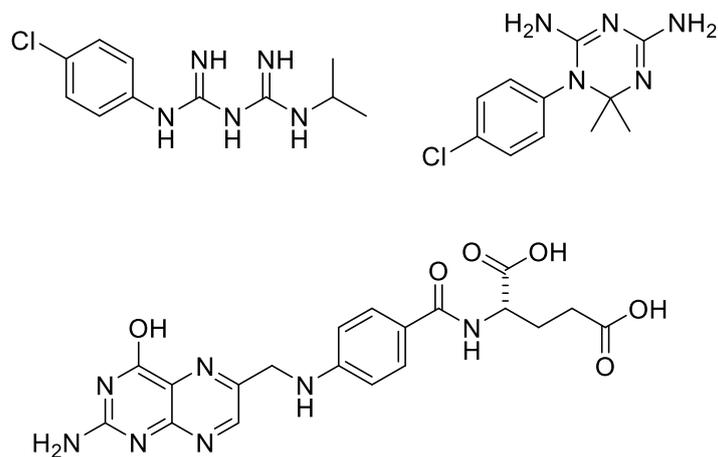


Figure 16. Structures chimiques, en haut, du proguanil (à gauche) et du cycloguanil (à droite) et en bas, de l'acide folique.

La sulfadoxine est une molécule de la classe des sulfamides (**Figure 17**). Elle dérive des sulfamides anti-bactériens, premiers antibiotiques de synthèse à avoir été développés. Comme les sulfamides anti-bactériens, c'est un analogue de l'acide para-aminobenzoïque (**Figure 17**) inhibant la dihydroptéroate synthase (DHPS) et par conséquent bloquant la synthèse de l'acide dihydrofolique. Les conséquences vont être l'arrêt de la synthèse *de novo* des bases puriques et donc l'arrêt du développement parasitaire. L'apparition de troubles dermatologiques doit entraîner un arrêt immédiat du traitement car les sulfamides peuvent provoquer des syndromes de nécrolyse épidermique toxique de Stevens-Johnson et de Lyell.

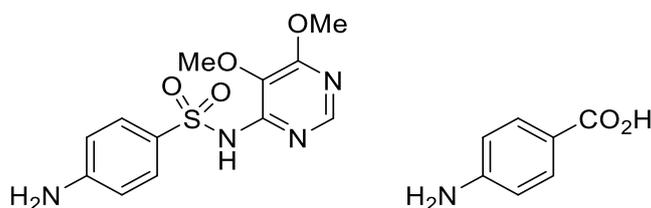


Figure 17. Structures chimiques de la sulfadoxine (à gauche) et de l'acide *para*-aminobenzoïque (à droite).

La pyriméthamine est une 2,4-diaminopyrimidine substituée par un groupement éthyle et un groupement *para*-chlorophényl (**Figure 18**). Sa structure proche du cycloguanil incita les chercheurs à évaluer son action contre *Plasmodium*.⁸⁹ Elle possède le même mécanisme d'action que le proguanil : l'inhibition de la DHFR. La molécule seule (Malocide®) est employée dans le traitement de la toxoplasmosse.

⁸⁹ Falco, E.A.; Goodwin, L.G.; Hitchings, G.H.; Rollo, I.M.; Russell, P.B. 2,4-diaminopyrimidines-a new series of antimalarials. *Brit. J. Pharm. Chemoth.* **1951**, *6*, 185–200, doi:[10/gmptg9](https://doi.org/10/gmptg9).

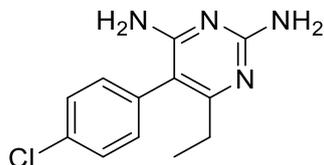


Figure 18. Structure chimique de la pyriméthamine

L'association de la sulfadoxine et de la pyriméthamine (Fansidar®) a été utilisée dans le traitement de l'accès palustre simple notamment en relais de la chloroquine sur les souches chloroquino-résistantes. Mais, des résistances à la combinaison sont finalement apparues durant les années 90. Aujourd'hui, la sulfadoxine et la pyriméthamine sont associées avec l'artésunate pour cette même indication. L'association seule reste cependant un outil important dans la chimioprophylaxie (cf. Chapitre 1 : 3.1.La chimioprophylaxie).

2.6. Les antibiotiques à activité antipaludique

On retrouve trois antibiotiques dans les recommandations de l'OMS pour le traitement du paludisme :³⁶ la clindamycine, la doxycycline et la tétracycline (**Figure 19**). La clindamycine est un antibiotique de la classe des lincosamides. Elle agit par inhibition de la sous-unité ribosomale 50S provoquant une inhibition de la synthèse de peptides. La doxycycline et la tétracycline sont des antibiotiques de la classe des tétracyclines. Chez les bactéries, elles inhibent la synthèse protéique en inhibant la sous-unité ribosomale 30S. Cependant, chez *Plasmodium*, leur mécanisme d'action n'est pas clairement établi mais il semblerait que ces molécules agissent sur les ribosomes mitochondriaux ainsi que l'apicoplaste.⁹⁰ Ces trois molécules ne font que ralentir la croissance parasitaire, et possèdent un effet retardé, c'est pourquoi elles ne sont pas utilisées seules dans le traitement du paludisme mais en association avec la quinine ou l'artésunate. Les tétracyclines ont le désavantage d'être photosensibilisantes et sont contre-indiquées chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 8 ans (coloration des dents en formation et fixation sur les os par chélation du Ca²⁺).

⁹⁰ Gaillard, T.; Madamet, M.; Pradines, B. Tetracyclines in Malaria. *Malar. J.* **2015**, *14*, 445, doi:[10/f73fn6](https://doi.org/10.1186/s12875-015-0366-6).

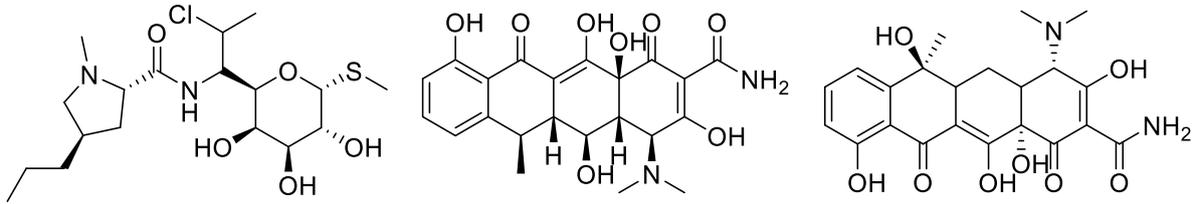


Figure 19. Structures chimiques (de gauche à droite) de la clindamycine, de la doxycycline et de la tétracycline.

2.7. L'artémisinine et ses dérivés

La (re)découverte de l'artémisinine (**Figure 20**) durant les années 1990, aboutissant à la mise sur le marché de plusieurs dérivés hémi-synthétiques, a été un levier majeur de la lutte antipaludique pour le début du XXI^{ème} siècle.

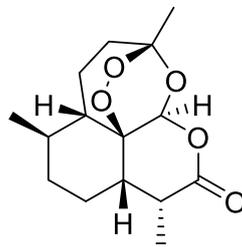


Figure 20. Structure chimique de l'artémisinine.

L'artémisinine est une molécule antipaludique d'origine naturelle découverte dans les années 1970 par le Pr Youyou Tu. Elle est extraite à partir de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*, *qinghao* en mandarin). Cette plante de la famille des *Asteraceae* est une plante herbacée retrouvée en Chine mais aussi en Europe et Amérique du Nord. A la fin des années 1960, la Chine décide de mettre en place un programme de recherche pour découvrir de nouveaux antipaludiques. L'équipe du Pr Youyou Tu basa ses recherches sur des milliers d'herbes utilisées en médecine traditionnelle chinoise. Ainsi, 640 recettes furent retenues pour avoir potentiellement des effets antipaludiques parmi lesquelles, un extrait d'*Artemisia annua*. La molécule active a ensuite été caractérisée et le résultat publié en 1979.⁹¹

Peu employée une fois découverte, des dérivés de la molécule furent développés. La molécule et ses dérivés commencent à gagner en intérêt à partir du début des années 2000 à cause de :

⁹¹ Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. *Chin. Med. J.* **1979**, *12*, 811–816.

- L'aggravation des résistances aux autres thérapies dans les zones endémiques (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine) ;
- Une très grande efficacité, y compris sur les parasites résistants à d'autres antipaludiques ;
- Le développement par le laboratoire Novartis de la combinaison artéméther-luméfantrine.

L'OMS engage alors un processus d'utilisation massive de l'artémisinine et de ses dérivés ainsi que leur association avec d'autres antipaludiques : les thérapies combinées à base d'artémisinine (*Artemisinin based Combined Therapies* en anglais ou ACT). Lors de la 60^{ème} assemblée générale de la santé (Mai 2007), l'OMS a voté une résolution (WHA60.18) appelant à bannir l'utilisation de monothérapies à base d'artémisinine ou de ses dérivés afin de ralentir l'apparition de résistances.⁹² L'impact de l'introduction de cette nouvelle classe de molécules a été immense. Bhatt *et al.*⁹³ estiment que les ACT ont contribué à hauteur de 20% pour la réduction de la prévalence du paludisme en Afrique entre 2000 et 2015. Cette découverte valut au Pr Youyou Tu de recevoir le Prix Nobel de médecine 2015⁹⁴ au côté de William Campbell et Satoshi Omura, ces derniers ayant découvert une thérapie contre les nématodes.

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique possédant un pont endoperoxyde. La rupture homolytique du pont peroxyde conduit à la formation de radicaux libres. Cette rupture est réalisée à l'aide du fer ferreux de l'hème de l'hémoglobine dégradée par le parasite. Ces radicaux vont interférer avec de nombreuses cibles au sein du parasite.⁹⁵ Le métabolite actif de l'artémisinine est la dihydroartémisinine. La molécule garde encore un vif intérêt en chimie thérapeutique où elle est notamment étudiée à des fins anticancéreuses.^{96,97}

⁹² Soixantième assemblée mondiale de la santé : Résolutions et décisions annexes. Organisation mondiale de la santé, 2007. https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHASSA_WHA60-Rec1/F/WHASS1_WHA60REC1-fr.pdf (consulté le 06/09/21)

⁹³ Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.E.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; Wenger, E.A.; Briët, O.; Penny, M.A.; Smith, T.A.; Bennett, A.; Yukich, J.; Eisele, T.P.; Griffin, J.T.; Fergus, C.A.; Lynch, M.; Lindgren, F.; Cohen, J.M.; Murray, C.L.J.; Smith, D.L.; Hay, S.I.; Cibulskis, R.E.; Gething, P.W. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**, *526*, 207-211, doi:[10/784](https://doi.org/10.1038/nature13759).

⁹⁴ Mazier, D.; Thellier, M. Youyou Tu, de Mao Zedong Au Prix Nobel: Prix Nobel de Médecine 2015 : William C. Campbell, Satoshi Ōmura et Youyou Tu. *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32*, 106–109, doi:[10/gmvjrd](https://doi.org/10.1016/j.msc.2016.03.001).

⁹⁵ Wang, J.; Zhang, C.J.; Chia, W.N.; Loh, C.C.Y.; Li, Z.; Lee, Y.M.; He, Y.; Yuan, L.X.; Lim, T.K.; Liu, M.; Liew, C.X.; Lee, Y.Q.; Zhang, J.; Lu, N.; Lim, C.T.; Hua, Z.C.; Liu, B.; Shen, H.M.; Tan, K.S.W.; Lin, Q. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10111, doi:[10/f76jdn](https://doi.org/10.1038/ncomms10111).

⁹⁶ Wong, Y.K.; Xu, C.; Kalesh, K.A.; He, Y.; Lin, Q.; Wong, W.S.F.; Shen, H.M.; Wang, J. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 1492–1517, doi:[10/gb4nbv](https://doi.org/10.1002/mr.21487).

⁹⁷ Abba, M.L.; Patil, N.; Leupold, J.H.; Saeed, M.E.M.; Efferth, T.; Allgayer, H. Prevention of carcinogenesis and metastasis by Artemisinin-type drugs. *Cancer Lett.* **2018**, *429*, 11–18, doi:[10/gmsbz9](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.011).

Trois molécules sur le marché dérivent de l'artémisinine (**Figure 21**) : l'artésunate, l'artéméther et la dihydroartémisinine (appelé aussi arténimol). Ces trois dérivés possèdent le même mécanisme d'action que l'artémisinine.

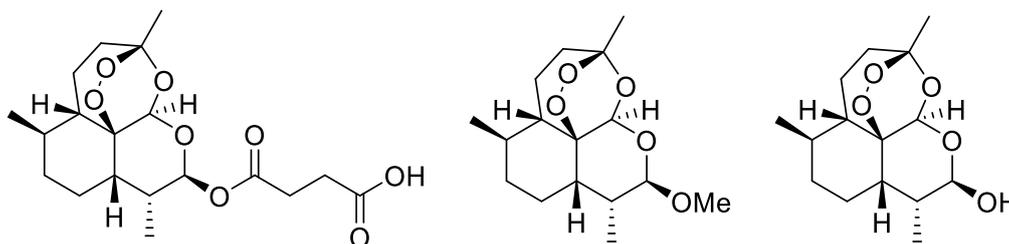


Figure 21. Structures chimiques (de gauche à droite) de l'artésunate, de l'artéméther et de la dihydroartémisinine.

Les ACT constituent aujourd'hui les traitements les plus efficaces dans la lutte contre le paludisme. A ce jour, 6 combinaisons sont aujourd'hui recommandées par l'OMS (listées dans le **Schéma 5**). Dans ces combinaisons, les dérivés d'artémisines, qui sont des molécules à action antipaludique rapide (en 48 heures), sont associées avec des molécules possédant des durées d'action plus importantes. Cette utilisation combinée permet :

- De limiter l'apparition de résistances aux dérivés d'artémisinine ;
- De diminuer l'impact des résistances existantes aux molécules partenaires ;
- De proposer une forme galénique limitant les problèmes de compliances par rapport aux traitements (1 comprimé contenant deux principes actifs plutôt que 2 comprimés différents).

3. La prévention antipaludique

Les traitements médicamenteux ne constituent qu'un des aspects de la lutte contre le paludisme, principalement centrés sur la réduction du nombre de décès. Les méthodes de lutte préventive visent à limiter le nombre de cas de paludisme. Ces méthodes rassemblent les approches de chimioprophylaxie et les techniques ciblant les anophèles.

3.1. La chimioprophylaxie

La chimioprophylaxie s'appuie sur les traitements médicamenteux. Elle vise à donner des doses de médicaments ciblant les formes hépatocytaires ou érythrocytaires du parasite. L'OMS a défini clairement les pratiques pour la prévention dans les pays endémiques.³⁶ Dans

les pays développés, les agences de santé gouvernementales ont défini des traitements à prendre pour les personnes souhaitant se rendre dans les pays endémiques.

3.1.1. Dans les pays endémiques

A l'heure actuelle, l'OMS recommande trois méthodes de chimioprophylaxie visant les populations sensibles, jeunes enfants et femmes enceintes :

- La chimioprophylaxie du paludisme saisonnier : cette méthode est retrouvée dans le Sahel durant la saison des pluies ou à chaque mois de celle-ci. Ainsi, des doses d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine sont administrées aux enfants de moins de 6 ans. La méthode est très efficace, permettant la réduction de 75% des cas de paludisme et du nombre de formes graves.⁹⁸
- Le traitement préventif intermittent chez les nourrissons : Cette méthode retrouvée sur le continent africain consiste à administrer de deux doses de sulfadoxine-pyriméthamine chez les nourrissons (durant leur première année de vie) de manière concomitante à l'administration des vaccins contre la Diphtérie-Tétanos-Poliomyélite et la rougeole. Elle permet une réduction de 30% du nombre d'accès palustre simple et de 38% le nombre d'hospitalisations dues au paludisme.⁹⁹
- Le traitement préventif intermittent du paludisme pour les femmes enceintes : en Afrique, les femmes enceintes reçoivent une dose de sulfadoxine-pyriméthamine à partir du début du deuxième trimestre de grossesse. Avec plus de trois doses (espacées au minimum d'un mois), ce traitement a montré une réduction de nombre de naissances avec un poids inférieur à 2,5 kg et un poids de naissance légèrement plus important.¹⁰⁰

L'OMS a défini une quatrième méthode : l'administration massive de médicaments.¹⁰¹ Elle consiste à administrer un traitement médicamenteux complet à toutes les personnes dans

⁹⁸ Meremikwu, M.M.; Donegan, S.; Sinclair, D.; Esu, E.; Oringanje, C. Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Children Living in Areas with Seasonal Transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, doi:[10/gmp46c](https://doi.org/10/gmp46c).

⁹⁹ Aponte, J.J.; Schellenberg, D.; Egan, A.; Breckenridge, A.; Carneiro, I.; Critchley, J.; Danquah, I.; Doodoo, A.; Kobbe, R.; Lell, B.; May, J.; Premji, Z.; Sanz, S.; Sevene, E.; Soulaymani-Becheikh, R.; Winstanley, P.; Adjei, S.; Anemana, S.; Chandramohan, D.; Issifou, S.; Mockenhaupt, F.; Owusu-Agyei, S.; Greenwood, B.; Grobusch, M.P.; Kremsner, P.G.; Mecete, E.; Mshinda, H.; Newman, R.D.; Slutsker, L.; Tanner, M.; Alonso, P.; Menendez, C. Efficacy and Safety of Intermittent Preventive Treatment with Sulfadoxine-Pyrimethamine for Malaria in African Infants: A Pooled Analysis of Six Randomised, Placebo-Controlled Trials. *Lancet* **2009**, *374*, 1533–1542, doi:[10/bj25vp](https://doi.org/10/bj25vp).

¹⁰⁰ Kayentao, K.; Garner, P.; Maria van Eijk, A.; Naidoo, I.; Roper, C.; Mulokozi, A.; MacArthur, J.R.; Luntamo, M.; Ashorn, P.; Doumbo, O.K.; ter Kuile, F.O. Intermittent Preventive Therapy for Malaria During Pregnancy Using 2 vs 3 or More Doses of Sulfadoxine-Pyrimethamine and Risk of Low Birth Weight in Africa: Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA* **2013**, *309*, 594, doi:[10/gmp6p3](https://doi.org/10/gmp6p3).

¹⁰¹ Mass drug administration for *falciparum* malaria: a practical field manual. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

une zone géographique ou une population définie où des cas de paludisme ont été détectés. Le traitement utilisé préférentiellement est l'association dihydroartémisinine-pipéraquline (3 jours par mois pendant trois mois). Mais, l'OMS manque de données pour établir une stratégie optimale avec ce protocole et limite donc cette méthode aux pays avec un faible nombre de cas endémiques.³⁶

3.1.2. Pour les voyageurs

Afin d'éviter des cas de paludisme d'importation, il est nécessaire de réaliser un traitement préventif avant le voyage dans la zone endémique. En France, les recommandations émanent chaque année du Haut Conseil pour la Santé Publique et concernent de multiples pathologies.¹⁰² Les experts prennent en compte de multiples paramètres pour définir la nécessité d'un traitement ou non (en plus de mesures de protection contre les anophèles) : le lieu (pays/région mais aussi si le séjour a lieu en zone urbaine ou rurale), la saison, l'altitude (au-delà d'une certaine altitude, les anophèles ne sont plus retrouvés) et la durée du séjour. Cela donne des recommandations précises par pays de séjour (et même par région/municipalités). Ces recommandations sont à mettre au regard des thérapies utilisables (et de leurs potentiels effets indésirables) ainsi que du patient lui-même (adulte, enfant ou femme enceinte). En première intention, on retrouve l'association atovaquone-proguanil (Malarone[®]) ou la doxycycline (Doxypalu[®]). Pour une zone sans souche de paludisme chloroquino-résistant, la chloroquine peut être aussi utilisée. La méfloquine (Lariam[®]) peut aussi être utilisée mais, en dernière intention à cause de ses effets secondaires neurologiques potentiellement graves.

3.2. La lutte antivectorielle

Sous ce terme, sont rassemblés tous les moyens permettant de lutter contre le vecteur du paludisme, l'anophèle, et ainsi diminuer la propagation du paludisme auprès des populations. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides et la pulvérisation résiduelle intérieure sont des méthodes approuvées et fortement promues par l'OMS. On estime qu'à elles seules, elles ont contribué à hauteur de 81% dans la réduction des cas entre 2000 et 2015 en Afrique (68% pour les moustiquaires et 13% pour la pulvérisation, soit 537 millions de cas de paludisme évités sur cette période).⁹³

¹⁰² Haut conseil de la santé publique. *Recommandations sanitaires 2021 pour les voyageurs (à l'attention des professionnels de santé)*, 2021. https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspta20210416_recommasanitaipourlesvoyageu.pdf (consulté le 12/09/21)

3.2.1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide

C'est une moustiquaire destinée à être placée au-dessus du lit afin de protéger la personne des anophèles qui ont tendance à piquer à partir de la fin de journée (**Figure 22**). La moustiquaire bloque l'anophèle qui sera ensuite tué sous l'effet de l'insecticide. Un effet répulsif est aussi observé lorsque, dans une communauté, la majorité des lits sont équipés de ces moustiquaires.¹⁰³ L'installation d'une moustiquaire imprégnée permet de réduire de 17% la prévalence de *P. falciparum* par rapport à l'absence de celle-ci.¹⁰⁴



Figure 22. Moustiquaires imprégnées d'insecticides au-dessus de lits.

Les insecticides utilisés sur ces moustiquaires sont de la classe des pyréthrinoïdes. 6 composés sont majoritairement utilisés (**Figure 23**) : l' α -cyperméthrine, la deltaméthrine, la cyhalothrine, l'étofenprox, la bifenthrine et la cyfluthrine. Ces composés de synthèse dérivent des pyréthrines retrouvées dans de nombreuses plantes.¹⁰⁵ Ils possèdent de nombreux avantages : non toxiques pour les humains ainsi que la plupart des autres mammifères (mais sont cependant très toxiques pour les abeilles¹⁰⁶), efficaces à partir de faibles doses et des coûts de fabrication faibles.¹⁰⁷ Ces composés sont assez stables dans la durée à condition de ne pas trop les exposer à la lumière ainsi que d'éviter le lavage répété des moustiquaires. Ils agissent en paralysant le système nerveux de la cible par inhibition des canaux sodiques neuronaux.

¹⁰³ Russell, T.L.; Lwetoijera, D.W.; Maliti, D.; Chipwaza, B.; Kihonda, J.; Charlwood, D.; Smith, T.A.; Lengeler, C.; Mwanyangala, M.A.; Nathan, R.; Knols, B.G.J.; Takken, W.; Killeen, G.F. Impact of Promoting Longer-Lasting Insecticide Treatment of Bed Nets upon Malaria Transmission in a Rural Tanzanian Setting with Pre-Existing High Coverage of Untreated Nets. *Malar.J.* **2010**, *9*, doi:[10/fb2k3z](https://doi.org/10.1186/14752875923z).

¹⁰⁴ Pryce, J.; Richardson, M.; Lengeler, C. Insecticide-Treated Nets for Preventing Malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, doi:[10/gmqgrs](https://doi.org/10.1002/gmqr.201801001).

¹⁰⁵ Casida, J.E. Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticides. *Environ. Health Persp.* **1980**, *14*, doi:[10/bdc9pj](https://doi.org/10.1289/ehp.1980.14.10).

¹⁰⁶ Department of agriculture. <https://www.mda.state.mn.us/protecting/bmps/pollinators/beetotoxicity> (consulté le 20/09/21)

¹⁰⁷ Centers for disease control and prevention. https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/itn.html (consulté le 08/09/21)

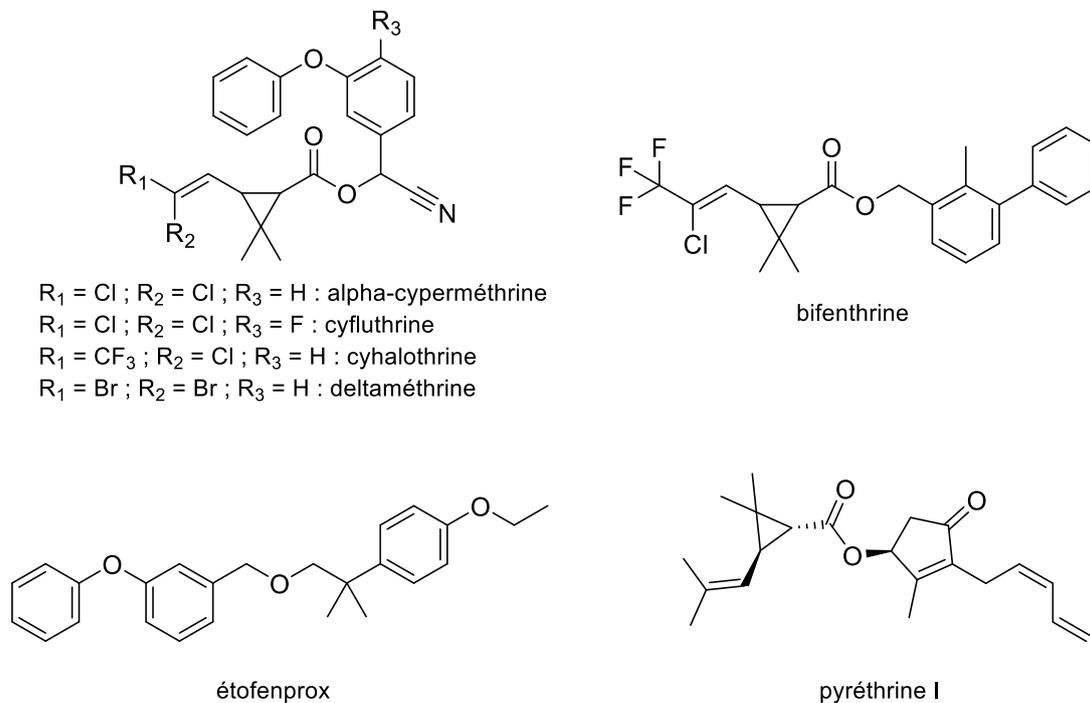


Figure 23. Structures chimiques des pyréthrinoïdes utilisés sur les moustiquaires imprégnées d'insecticides ainsi que de la pyréthrine I, molécule d'origine naturelle appartenant aux pyréthrines desquelles dérivent les pyréthrinoïdes.

Les premières moustiquaires mises à disposition nécessitaient un retraitement tous les 6 à 12 mois à cause des lavages. Désormais, les populations ont à disposition des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action pouvant être utilisées jusqu'à trois ans avec une efficacité constante, même avec des lavages répétés. L'OMS estime que 68% de la population à risque d'Afrique sub-saharienne dort sous une moustiquaire imprégnée et que sur la période 2004-2019, 2,2 milliards de moustiquaires ont été délivrées.³⁶

3.2.2. La pulvérisation résiduelle intérieure

Cette technique est définie par l'OMS comme étant « l'application d'un insecticide résiduel à longue durée sur les potentielles surfaces de repos du vecteur du paludisme comme les murs intérieurs, les corniches et les plafonds de toutes les maisons ou structures (y compris les abris pour les animaux domestiques) où le vecteur pourra venir en contact avec l'insecticide ». ¹⁰⁸ Ces insecticides peuvent être répulsifs, irritants ou mortels pour le vecteur. Ils doivent répondre à plusieurs critères évidents comme l'efficacité, la stabilité, une faible

¹⁰⁸ *Indoor residual spraying.* Organisation mondiale de la santé, 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177242/9789241508940_eng.pdf;jsessionid=D4D6382710FA6AEFE37B43CEB0FD70C9?sequence=1 (consultée le 08/09/21).

toxicité, un coût acceptable et enfin ils doivent être acceptés par les populations (potentielles odeurs, traces sur les surfaces aspergées).

L'OMS recommande 5 classes d'insecticides pour la pulvérisation. Parmi celles-ci, on retrouve les pyréthrinoïdes précédemment évoqués. Les 4 autres classes (**Figure 24**) sont :

- Les carbamates (bendiocarbe et propoxur) : ce sont des inhibiteurs réversibles de l'acétylcholinestérase ;
- Les organochlorés (dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT) : le DDT possède un mécanisme d'action similaire aux pyréthrinoïdes ;
- Les organophosphorés (malathion, fénitrothion et pyrimiphos-méthyl) : ce sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholine estérase ;
- Les néonicotinoïdes (clothianidine) : ce sont des modulateurs compétitifs des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine.

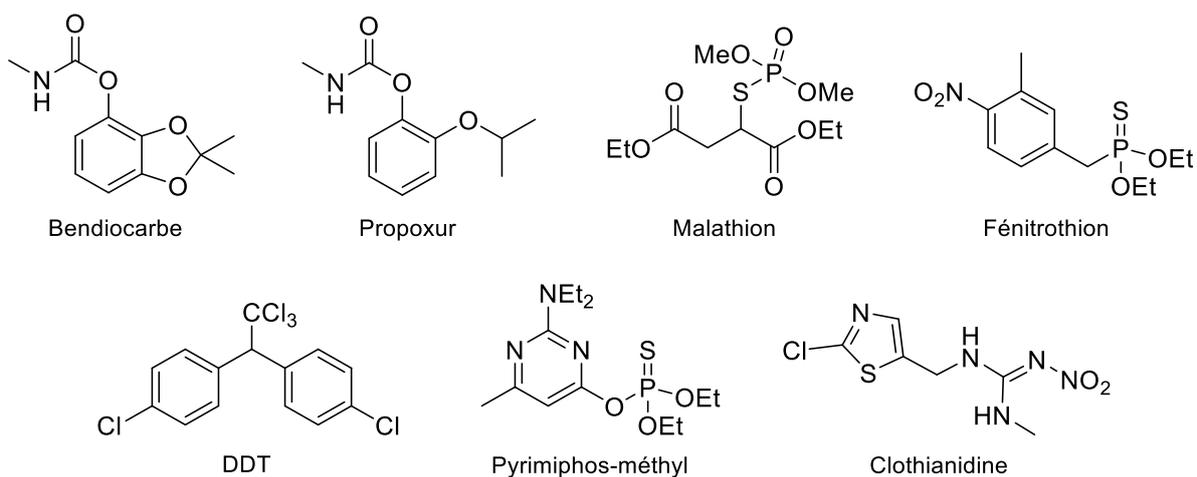


Figure 24. Structures chimiques des insecticides utilisés pour la pulvérisation résiduelle intérieure.

Mais, l'utilisation de plusieurs de ces pesticides est controversée principalement à cause des effets potentiellement cancérigènes de ceux-ci ou bien leur impact important pour le reste de la biodiversité.

Le DDT a été très largement utilisé à partir du milieu du XX^{ème} siècle contribuant avec la chloroquine à l'éradication du paludisme en Amérique du Nord et en Europe. Même si ses effets sur l'environnement ont été décriés dès les années 60, son interdiction en usage agricole ne démarre qu'en 1970. Aujourd'hui, son usage est limité pour la lutte contre plusieurs maladies parasitaires dans les zones tropicales. En 2011, l'OMS a statué qu'elle suspendrait l'utilisation du DDT lorsqu'une alternative similaire en termes d'efficacité et de

coût sera proposée.¹⁰⁹ En 2015, le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé le DDT comme cancérigène probable pour l'Homme (catégorie 2A).^{110, 111} On peut aussi évoquer le malathion qui est interdit dans l'Union Européenne depuis décembre 2008. Le CIRC l'a classé en 2015 comme cancérigène probable pour l'Homme (catégorie 2A).^{112, 113}

Les données environnementales, écotoxicologiques et toxicologiques pour les différents pesticides employés peuvent être retrouvées sur la *Pesticide Properties Database*,^{114, 115} où ils possèdent tous une alerte élevée concernant la toxicité humaine et l'écotoxicité. De plus le propoxur, DDT et la clothianidine sont des pesticides hautement persistants dans l'environnement. Ainsi, l'OMS ne recommande pas la pulvérisation résiduelle intérieure quand il y a déjà suffisamment de moustiquaires imprégnées d'insecticides dans la maison/village/quartier. L'emploi de cette technique est en constante diminution depuis ces dernières années.³⁶

3.2.3. Autres moyens de lutte antivectorielle

D'autres méthodes qui n'ont pas encore reçu l'aval de l'OMS existent. Par exemple, l'utilisation de composés larvicides : ces molécules, répandues dans les étendues d'eau stagnante vont pouvoir éliminer les larves de moustiques afin de réduire la prévalence du paludisme aux alentours. Mais, les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas de conclure de manière satisfaisante sur cette méthode.¹¹⁶

Les répulsifs à insectes ainsi que les vêtements traités aux insecticides ne font pas non plus partie des méthodes recommandées par l'OMS, là encore à cause du manque de preuves concernant la baisse de la prévalence du paludisme grâce à celles-ci.¹¹⁷ Cependant, ces deux

¹⁰⁹ *The use of DDT in malaria vector control.* Organisation Mondiale de la Santé. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69945/WHO_HTM_GMP_2011_eng.pdf?sequence=1 (consulté le 12/09/21).

¹¹⁰ DDT, Lindane, and 2,4-D / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France)

¹¹¹ Loomis, D.; Guyton, K.; Grosse, Y.; El Ghissasi, F.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 891–892, doi:[10/f3hvk5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00345-9).

¹¹² Some organophosphate insecticides and herbicides/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France)

¹¹³ Guyton, K.Z.; Loomis, D.; Grosse, Y.; El Ghissasi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Scoccianti, C.; Mattock, H.; Straif, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 490–491, doi:[10/f27ttw](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00345-9).

¹¹⁴ Lewis, K.A.; Tzilivakis, J.; Warner, D.J.; Green, A. An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2016**, *22*, 1050–1064, doi:[10/gh27xr](https://doi.org/10.1080/10807039.2016.1188888).

¹¹⁵ *Pesticide properties database.* <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (consulté le 08/09/21)

¹¹⁶ Choi, L.; Majambere, S.; Wilson, A.L. Larviciding to Prevent Malaria Transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, doi:[10/ggr439](https://doi.org/10.1002/ggr439).

¹¹⁷ Maia, M.F.; Kliner, M.; Richardson, M.; Lengeler, C.; Moore, S.J. Mosquito Repellents for Malaria Prevention. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, doi:[10/gmgn8](https://doi.org/10.1002/gmgn8).

méthodes sont à envisager pour les touristes visitant des zones endémiques avec aussi l'utilisation concomitante d'une moustiquaire imprégnée d'insecticides.³⁷

Chapitre 2 : Evolutions de la lutte antipaludique face à un parasite multi- résistant et un vecteur tenace

1. Les dangers face au progrès de la lutte antipaludique

Plusieurs problèmes, les résistances notamment, mettent en danger l'évolution favorable du contrôle de l'épidémie de paludisme. Il s'agit autant de l'apparition de résistances aux médicaments chez le parasite que de résistances aux insecticides chez les anophèles. Des souches de *Plasmodium* sont aussi capables de passer au travers des TDR. Enfin, les changements environnementaux font évoluer le comportement des anophèles.

1.1. *Plasmodium*, un parasite résistant à tous les médicaments sur le marché

Depuis l'exploitation de la quinine comme médicament antipaludique à partir du milieu du XIX^{ème} siècle, *Plasmodium* (majoritairement *P. falciparum* et *P. vivax* dans une moindre mesure) a toujours réussi à s'adapter et à développer des résistances aux nouvelles thérapies développées au fur et à mesure des années (**Tableau 2**).

Tableau 2. Comparaison entre l'année de commercialisation d'un antipaludique et l'année où une résistance à celui-ci a été décrite pour la première fois.

Molécule	Année de d'introduction	Première résistance rapportée ^{118, 119}
Quinine	1632	1910
Chloroquine	1945	1957
Proguanil	1948	1949
Pyriméthamine	1953	1982
Méfloquine	1977	1982
Atovaquone	1996	1996
Dérivés d'artémisinine	2001	2009

L'OMS a défini que le parasite est résistant quand il a « la capacité à survivre et / ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption d'un médicament administré à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées mais dans les limites de tolérance du patient. Le médicament doit avoir accès au parasite ou au globule rouge infecté pendant la durée nécessaire à son action normale ».¹²⁰ Cliniquement, cette résistance se traduit par une clairance parasitaire (taux auquel le parasite est éliminé de l'hôte) plus faible

¹¹⁸ Paloque, L.; Ramadani, A.P.; Mercereau-Puijalon, O.; Augereau, J.-M.; Benoit-Vical, F. *Plasmodium Falciparum*: Multifaceted Resistance to Artemisinins. *Malar. J.* **2016**, *15*, 149, doi:[10/f8c6wr](https://doi.org/10/f8c6wr).

¹¹⁹ Dondorp, A.M.; Yeung, S.; White, L.; Nguon, C.; Day, N.P.J.; Socheat, D.; von Seidlein, L. Artemisinin Resistance: Current Status and Scenarios for Containment. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 272–280, doi:[10/df45tf](https://doi.org/10/df45tf).

¹²⁰ Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010–2019). Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

qu'en temps normal. Elle peut aboutir à un échec thérapeutique du traitement, cependant tout échec d'un traitement ne doit pas être interprété comme une résistance. Une souche parasitaire peut être multi-résistante : résistante à plus de deux médicaments de classes thérapeutiques différentes. Ces résistances ont pour origine des mutations sur des gènes parasites. Ces gènes ont clairement été identifiés pour les antipaludiques sur le marché et certains gènes mutés peuvent provoquer des résistances croisées à plusieurs molécules d'une même famille chimique (**Tableau 3**).

Tableau 3. Gènes impliqués dans les résistances aux antipaludiques sur le marché.

Médicament	Gène(s) responsable(s) de la résistance ^{120, 121}
Chloroquine	<i>Pfcr</i> t (+ <i>Pfmdr</i> 1) <i>Pvmdr</i> 1
Amodiaquine	<i>Pfcr</i> t – <i>Pfmdr</i> 1
Pipéraquine	<i>Pfcr</i> t – <i>Pfpm</i> 2-3
Pyronaridine	<i>Pfcr</i> t
Pyriméthamine	<i>Pfdhfr</i> <i>Pvdhfr</i>
Sulfadoxine	<i>Pfdhfr</i> <i>Pvdhps</i>
Proguanil	<i>Pfdhfr</i>
Luméfantine	<i>Pfcr</i> t <i>Pfmdr</i> 1
Méfloquine	<i>Pfmdr</i> 1 <i>Pvmdr</i> 1
Atovaquone	<i>Pfctb</i>
Artémisinine et dérivés	<i>Pfkelch</i> 13

Géographiquement, la majorité des résistances sont apparues en Asie du Sud-Est, au niveau du Cambodge/Laos/Thaïlande, avant ensuite de se répandre en Afrique comme cela fut le cas avec les résistances à la chloroquine et à l'association de la sulfadoxine-pyriméthamine (**Figure 25**).

¹²¹ Haldar, K.; Bhattacharjee, S.; Safeukui, I. Drug Resistance in *Plasmodium*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 156–170, doi:[10/gcvpmp](https://doi.org/10/gcvpmp).

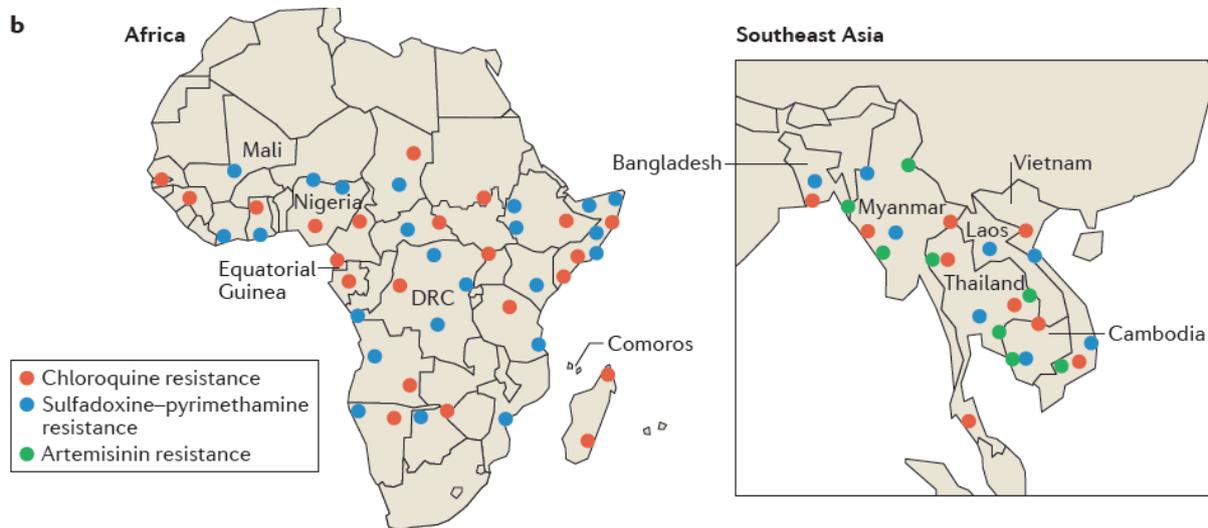


Figure 25. Répartition géographique de la résistance à la chloroquine (orange), à la sulfadoxine-pyriméthamine (bleu) et à l'artémisinine (vert) en Afrique et en Asie du Sud-Est (2018). D'après Haldar *et al.*¹²¹

1.1.1. *Pfcr*t et chloroquino-résistance

Bien que les premiers indices d'une résistance à la chloroquine remonte à la fin des années 1950, il faudra attendre quasiment un demi-siècle pour que la protéine et le gène associés responsables soient découverts : *Pfcr*t (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter).^{122, 123} La protéine que ce gène encode est une protéine transmembranaire située sur la membrane de la vacuole digestive parasitaire.¹²⁴ C'est dans cette vacuole que le parasite dégrade l'hémoglobine et détoxifie l'hème sous forme d'hémozoïne cristalline (cf. Chapitre 1 : 2.3. Dérivés quinoléiques et arylaminoalcools : un mécanisme d'action encore flou), mécanisme dérégulé par la chloroquine en se fixant à l'hème. Pour pénétrer dans la vacuole, la chloroquine diffuse de manière passive à travers la membrane. Au sein de cette vacuole qui possède un environnement acide, la chloroquine se protone et n'est plus capable de traverser la membrane. A terme, la chloroquine s'accumule passivement dans la vacuole digestive.

Sous sa forme sauvage, la protéine *PfCRT* n'interagit pas avec la chloroquine. Cependant lorsque le gène est muté, particulièrement quand la mutation sur la protéine transforme la lysine en position 76 en thréonine, *PfCRT* va alors agir comme une pompe d'efflux et faire

¹²² Fidock, D.A.; Nomura, T.; Talley, A.K.; Cooper, R.A.; Dzekunov, S.M.; Ferdig, M.T.; Ursos, L.M.B.; bir Singh Sidhu, A.; Naudé, B.; Deitsch, K.W.; Su, X.; Wootton, J.C.; Roepe, P.D.; Wellem, T.E. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein *PfCRT* and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 861–871, doi:[10/b35z89](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(00)00289-9).

¹²³ Sidhu, A.B.S.; Verdier-Pinard, D.; Fidock, D.A. Chloroquine Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria Parasites Conferred by *Pfcr*t Mutations. *Science* **2002**, *298*, 210–213, doi:[10/fhrf4s](https://doi.org/10.1126/science.1074444).

¹²⁴ Menard, D.; Dondorp, A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *CSH Perspect. Med.* **2017**, *7*, a025619, doi:[10/f9tv3k](https://doi.org/10.1101/123456).

ressortir la chloroquine de la vacuole digestive.¹²⁵ La structure tridimensionnelle de *PfCRT* mutée a récemment été décrite.¹²⁶ La mutation de ce gène peut aussi provoquer une résistance à la quinine et à l'amodiaquine.^{127, 128} Plus récemment, un allèle du gène *Pfcr*, différent de celui lié à la chloroquino-résistance, a été relié à une résistance à la pipéraquline.^{129, 130}

La chloroquino-résistance est aujourd'hui répandue quasiment dans tous les pays où le paludisme est endémique. Apparue en Asie du Sud-Est, elle a su profiter de la campagne d'éradication du paludisme de l'OMS par administration massive de chloroquine dans les années 60 pour se répandre (**Figure 26**). Même si la campagne permit sur le moment d'éliminer le paludisme d'une vingtaine de pays, le manque de suivi entraîna cette transmission et 90% des cas de paludisme étaient résistants à la chloroquine en 1973.¹³¹

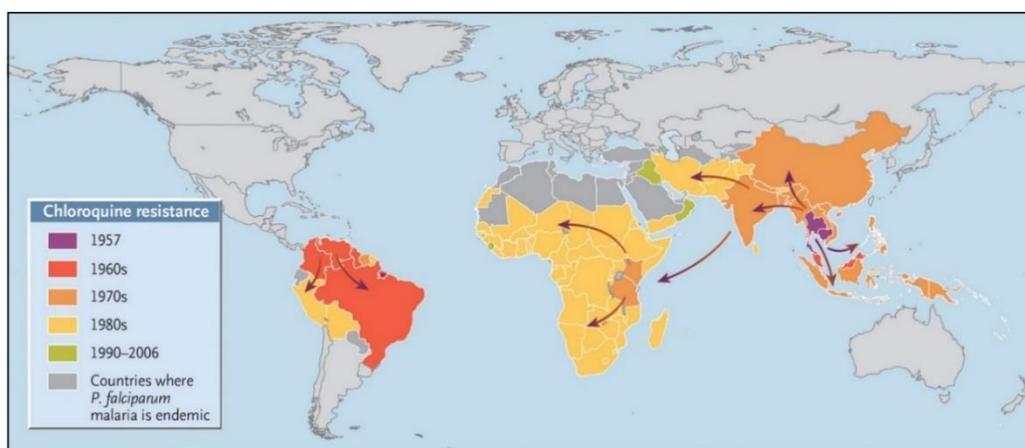


Figure 26. Evolution de la répartition géographique de la résistance à la chloroquine. D'après Packard.¹³¹

¹²⁵ Martin, R.E.; Marchetti, R.V.; Cowan, A.I.; Howitt, S.M.; Broer, S.; Kirk, K. Chloroquine Transport via the Malaria Parasite's Chloroquine Resistance Transporter. *Science* **2009**, *325*, 1680–1682, doi:[10/cc8dzv](https://doi.org/10/cc8dzv).

¹²⁶ Kim, J.; Tan, Y.Z.; Wicht, K.J.; Erramilli, S.K.; Dhingra, S.K.; Okombo, J.; Vendome, J.; Hagenah, L.M.; Giacometti, S.I.; Warren, A.L.; Nosol, K.; Roepe, P.D.; Potter, C.S.; Carragher, B.; Kosiakoff, A.A.; Quick, M.; Fidock, D.A.; Mancina, F. Structure and Drug Resistance of the *Plasmodium Falciparum* Transporter *PfCRT*. *Nature* **2019**, *576*, 315–320, doi:[10/gmq69h](https://doi.org/10/gmq69h).

¹²⁷ Cooper, R.A.; Lane, K.D.; Deng, B.; Mu, J.; Patel, J.J.; Wellems, T.E.; Su, X.; Ferdig, M.T. Mutations in Transmembrane Domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium Falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Alter Susceptibility to Chloroquine, Quinine and Quinidine. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 270–282, doi:[10/dvx2wx](https://doi.org/10/dvx2wx).

¹²⁸ Tinto, H.; Guekoun, L.; Zongo, I.; Guiguemé, R.T.; D'Alessandro, U.; Ouédraogo, J.B. Chloroquine-Resistance Molecular Markers (*Pfcr*T76 and *Pfmdr*-1 Y86) and Amodiaquine Resistance in Burkina Faso: Amodiaquine-Resistance in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* **2008**, *13*, 238–240, doi:[10/d3m443](https://doi.org/10/d3m443).

¹²⁹ Agrawal, S.; Moser, K.A.; Morton, L.; Cummings, M.P.; Parihar, A.; Dwivedi, A.; Shetty, A.C.; Drabek, E.F.; Jacob, C.G.; Henrich, P.P.; Parobek, C.M.; Jongsakul, K.; Huy, R.; Spring, M.D.; Lanteri, C.A.; Chaorattanakawee, S.; Lon, C.; Fukuda, M.M.; Saunders, D.L.; Fidock, D.A.; Lin, J.T.; Juliano, J.J.; Plowe, C.V.; Silva, J.C.; Takala-Harrison, S. Association of a Novel Mutation in the *Plasmodium Falciparum* Chloroquine Resistance Transporter With Decreased Piperaquine Sensitivity. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 468–476, doi:[10/gbw677](https://doi.org/10/gbw677).

¹³⁰ Ross, L.S.; Dhingra, S.K.; Mok, S.; Yeo, T.; Wicht, K.J.; Kumpornsin, K.; Takala-Harrison, S.; Witkowski, B.; Fairhurst, R.M.; Arley, F.; Menard, D.; Fidock, D.A. Emerging Southeast Asian *PfCRT* Mutations Confer *Plasmodium Falciparum* Resistance to the First-Line Antimalarial Piperaquine. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3314, doi:[10/gd46tm](https://doi.org/10/gd46tm).

¹³¹ Packard, R.M. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 397–399, doi:[10/gmw8rp](https://doi.org/10/gmw8rp).

1.1.2. *Pfmdr1* et résistance aux dérivés quinoléiques

Le gène *Pfmdr1* (pour *multidrug resistant transporter*) code pour une protéine de la famille des ABCs (pour *ATP binding cassette*). Les ABCs sont des protéines transmembranaires servant de transporteurs métabolisant l'ATP en adénosine di-phosphate (ADP) pour effectuer un transport actif sur des molécules définies. Chez *Plasmodium*, cette protéine est située sur la paroi de la vacuole digestive. La version sauvage du gène est impliquée dans le transport de multiples molécules du cytosol parasite vers la vacuole digestive.¹³²

L'implication du gène *Pfmdr1* dans la résistance à plusieurs dérivés quinoléiques a été étudiée pendant les années 90 par son orthologie avec un gène mammifère rendant des cellules cancéreuses résistantes à des molécules.^{133, 134} Son rôle dans la résistance à la méfloquine, l'halofantrine (arylaminoalcool n'étant plus commercialisé) et la quinine a fini par être confirmé en 2000.¹³⁵ On sait aujourd'hui que selon le polymorphisme du gène *Pfmdr1* mais aussi son niveau d'expression, la protéine résultante peut à la fois augmenter ou diminuer la sensibilité à divers antipaludiques : méfloquine, quinine, chloroquine, pipéraquline ou encore luméfántrine.^{124, 136}

1.1.3. *Pfpm* et résistance à la pipéraquline

Pfpm2 et 3 codent pour les plasmepsines 2 et 3. Les plasmepsines sont des protéases retrouvées tout le long du cycle de vie du *Plasmodium*. Les plasmepsines 2 et 3 sont situées dans la vacuole digestive du parasite.¹³⁷ La surexpression de ces deux protéines a été découverte chez des parasites résistants à la pipéraquline en Asie du Sud-Est.¹³⁸ Son lien avec

¹³² Duraisingh, M.T.; Cowman, A.F. Contribution of the *Pfmdr1* Gene to Antimalarial Drug-Resistance. *Acta Trop.* **2005**, *94*, 181–190, doi:[10/fb595f](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.05.005).

¹³³ Foote, S.J.; Kyle, D.E.; Martin, R.K.; Oduola, A.M.J.; Forsyth, K.; Kemp, D.J.; Cowman, A.F. Several Alleles of the Multidrug-Resistance Gene Are Closely Linked to Chloroquine Resistance in *Plasmodium Falciparum*. *Nature* **1990**, *345*, 255–258, doi:[10/bjwxpr](https://doi.org/10.1038/345255a0).

¹³⁴ Cowman, A.F.; Galatis, D.; Thompson, J.K. Selection for Mefloquine Resistance in *Plasmodium Falciparum* Is Linked to Amplification of the *Pfmdr1* Gene and Cross-Resistance to Halofantrine and Quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1143–1147, doi:[10/cgww4n](https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1143).

¹³⁵ Reed, M.B.; Saliba, K.J.; Caruana, S.R.; Kirk, K.; Cowman, A.F. Pgh1 Modulates Sensitivity and Resistance to Multiple Antimalarials in *Plasmodium Falciparum*. *Nature* **2000**, *403*, 906–909, doi:[10/fcnrt3](https://doi.org/10.1038/35043).

¹³⁶ Roepe, P.D. Molecular and Physiologic Basis of Quinoline Drug Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 441–455, doi:[10/bvmzxi](https://doi.org/10.1080/17445010802287441).

¹³⁷ Nasamu, A.S.; Polino, A.J.; Istvan, E.S.; Goldberg, D.E. Malaria Parasite Plasmepsins: More than Just Plain Old Degradative Pepsins. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 8425–8441, doi:[10/gmsq7k](https://doi.org/10.1074/jbc.R119.012345).

¹³⁸ Witkowski, B.; Duru, V.; Khim, N.; Ross, L.S.; Saintpierre, B.; Beghain, J.; Chy, S.; Kim, S.; Ke, S.; Kloeung, N.; Eam, R.; Khean, C.; Ken, M.; Loch, K.; Bouillon, A.; Domergue, A.; Ma, L.; Bouchier, C.; Leang, R.; Huy, R.; Nuel, G.; Barale, J.-C.; Legrand, E.; Ringwald, P.; Fidock, D.A.; Mercereau-Puijalon, O.; Ariey, F.; Ménard, D. A Surrogate Marker of Piperaquine-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria: A Phenotype–Genotype Association Study. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 174–183, doi:[10/f9qqkm](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30444-1).

la résistance à la pipéraquline a été confirmée aussi bien en surexprimant ces protéines chez des souches sauvages ou en les désactivant chez des souches résistantes.^{139, 140}

1.1.4. Mutations dans la voie des folates et sur le cytochrome bc₁

Deux enzymes clés dans la voie des folates sont la cible de médicaments contre le paludisme : *PfDHPS* (cible de la sulfadoxine) et *PfDHFR* (cible de la pyriméthamine et du proguanil). Des mutations précises sur les gènes codant pour ces protéines rendent ces médicaments très peu efficaces sur les souches mutantes.¹⁴¹ La résistance à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine est apparue à la fin des années 1980 et se retrouve dans toutes les zones endémiques de *P. falciparum* (**Figure 2**).

Le gène *PfcytB* code la séquence protéique du cytochrome bc₁, protéine de la chaîne respiratoire au sein de la mitochondrie, ciblé par l'atovaquone. Une mutation du codon 268 diminuant fortement l'activité de la combinaison atovaquone/proguanil a été retrouvée sur des souches parasitaires.¹⁴² Des mutations sur ce codon ne sont quasiment pas retrouvées sur le terrain,¹²⁴ cependant, des études montrent que ces mutations sont rapidement sélectionnées chez des souches exposées à l'atovaquone/proguanil.^{143, 144}

1.1.5. La résistance à l'artémisinine

À la fin des années 1990, *P. falciparum* est donc devenu résistant à la majorité des thérapies médicamenteuses à disposition. L'arrivée de l'artémisinine et de ses dérivés a permis de nouveau d'avoir un traitement efficace à disposition. Afin d'anticiper l'apparition de résistances à ces nouvelles molécules, l'OMS appela à bannir l'utilisation des dérivés d'artémisinine en monothérapie et d'utiliser les ACTs en priorité.¹⁴⁵ Mais dès 2009, il a été décrit dans la littérature des signes de résistances cliniques (décalage du temps de clairance

¹³⁹ Bopp, S.; Magistrado, P.; Wong, W.; Schaffner, S.F.; Mukherjee, A.; Lim, P.; Dhorda, M.; Amaratunga, C.; Woodrow, C.J.; Ashley, E.A.; White, N.J.; Dondorp, A.M.; Fairhurst, R.M.; Ariey, F.; Menard, D.; Wirth, D.F.; Volkman, S.K. Plasmepsin II–III Copy Number Accounts for Bimodal Piperaquine Resistance among Cambodian *Plasmodium Falciparum*. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1769, doi:[10/gdk5wc](https://doi.org/10/gdk5wc).

¹⁴⁰ Mukherjee, A.; Gagnon, D.; Wirth, D.F.; Richard, D. Inactivation of Plasmepsins 2 and 3 Sensitizes *Plasmodium Falciparum* to the Antimalarial Drug Piperaquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, doi:[10/gdbrp6](https://doi.org/10/gdbrp6).

¹⁴¹ Gregson, A.; Plowe, C.V. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 117–145, doi:[10/bbmf89](https://doi.org/10/bbmf89).

¹⁴² Korsinczky, M.; Chen, N.; Kotecka, B.; Saul, A.; Rieckmann, K.; Cheng, Q. Mutations in *Plasmodium Falciparum* Cytochrome *b* That Are Associated with Atovaquone Resistance Are Located at a Putative Drug-Binding Site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2100–2108, doi:[10/c55s5s](https://doi.org/10/c55s5s).

¹⁴³ Musset, L.; Le Bras, J.; Clain, J. Parallel Evolution of Adaptive Mutations in *Plasmodium Falciparum* Mitochondrial DNA During Atovaquone-Proguanil Treatment. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 1582–1585, doi:[10/d4x62d](https://doi.org/10/d4x62d).

¹⁴⁴ Nuralitha, S.; Siregar, J.E.; Syafruddin, D.; Roelands, J.; Verhoef, J.; Hoepelman, A.I.M.; Marzuki, S. Within-Host Selection of Drug Resistance in a Mouse Model of Repeated Incomplete Malaria Treatment: Comparison between Atovaquone and Pyrimethamine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 258–263, doi:[10/f78j79](https://doi.org/10/f78j79).

¹⁴⁵ Organisation Mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr23/fr/index.html> (consulté le 27/09/21)

parasitaire).¹⁴⁶ De plus, cette résistance observée n'était pas associée à des gènes connus tels que *Pfcr* ou *Pfmdr1*. Ces résultats portaient sur des données remontant à 2007. Aujourd'hui, l'analyse à posteriori de différents isolats a montré que les premiers marqueurs moléculaires de résistance à l'artémisinine sont apparus au Cambodge dès 2001, c'est-à-dire avant le début de l'utilisation massive des ACTs.¹⁴⁷

Afin de déterminer l'origine de cette résistance, une souche de *P. falciparum* a été soumise à des cycles d'exposition à l'artémisinine.¹⁴⁸ Ce travail a permis de montrer que les parasites résistants à l'artémisinine rentrent dans un état de quiescence leur permettant d'ignorer les effets de la molécule. Une fois la pression médicamenteuse éliminée, les parasites reprennent leur développement. Ces observations furent confirmées sur des isolats parasitaires de patients d'Asie du Sud-Est.¹⁴⁹ Ces premiers travaux sur le mécanisme de la résistance à l'artémisinine a aussi montré que les souches résistantes ne pouvaient pas être détectées par des tests de chimiosensibilité classique mais par un test RSA (pour *ring-stage survival assay*).¹⁵⁰ Ce test permet de mesurer et comparer par rapport à un témoin le temps de retour à la parasitémie initiale après un traitement par un dérivé d'artémisinine.

Le séquençage du génome de la souche résistante à l'artémisinine obtenu *in vitro* a, par la suite, permis de découvrir le gène impliqué : *Pfkelch13*.¹⁵¹ Ce gène code pour une protéine, de la superfamille des protéines kelch, de 726 acides aminés comportant trois domaines : un domaine spécifique à *Plasmodium*, un domaine BTB (*Broad-complex, Tramtrack and Bric a Brac*) et le domaine kelch (**Figure 27**).¹⁵² D'autres travaux ont cependant montré qu'une

¹⁴⁶ Dondorp, A.M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A.P.; Tarning, J.; Lwin, K.M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S.J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S.S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N.P.J.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N.J. Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455–467, doi:[10/df3nqb](https://doi.org/10/df3nqb).

¹⁴⁷ Organisation Mondiale de la Santé. *Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance*, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255213/WHO-HTM-GMP-2017.9-eng.pdf?sequence=1> (consulté le 27/09/21).

¹⁴⁸ Witkowski, B.; Lelièvre, J.; López Barragán, M.J.; Laurent, V.; Su, X.; Berry, A.; Benoit-Vical, F. Increased Tolerance to Artemisinin in *Plasmodium Falciparum* Is Mediated by a Quiescence Mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1872–1877, doi:[10/fbm3jq](https://doi.org/10/fbm3jq).

¹⁴⁹ Witkowski, B.; Khim, N.; Chim, P.; Kim, S.; Ke, S.; Kloeung, N.; Chy, S.; Duong, S.; Leang, R.; Ringwald, P.; Dondorp, A.M.; Tripura, R.; Benoit-Vical, F.; Berry, A.; Gorgette, O.; Arley, F.; Barale, J.-C.; Mercereau-Puijalon, O.; Menard, D. Reduced Artemisinin Susceptibility of *Plasmodium Falciparum* Ring Stages in Western Cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 914–923, doi:[10/f4jrvj](https://doi.org/10/f4jrvj).

¹⁵⁰ Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Khim, N.; Sreng, S.; Chim, P.; Kim, S.; Lim, P.; Mao, S.; Sopha, C.; Sam, B.; Anderson, J.M.; Duong, S.; Chuor, C.M.; Taylor, W.R.J.; Suon, S.; Mercereau-Puijalon, O.; Fairhurst, R.M.; Menard, D. Novel Phenotypic Assays for the Detection of Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria in Cambodia: In-Vitro and Ex-Vivo Drug-Response Studies. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1043–1049, doi:[10/f2nvw6](https://doi.org/10/f2nvw6).

¹⁵¹ Ariey, F.; Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Beghain, J.; Langlois, A.-C.; Khim, N.; Kim, S.; Duru, V.; Bouchier, C.; Ma, L.; Lim, P.; Leang, R.; Duong, S.; Sreng, S.; Suon, S.; Chuor, C.M.; Bout, D.M.; Ménard, S.; Rogers, W.O.; Genton, B.; Fandeur, T.; Miotto, O.; Ringwald, P.; Le Bras, J.; Berry, A.; Barale, J.-C.; Fairhurst, R.M.; Benoit-Vical, F.; Mercereau-Puijalon, O.; Ménard, D. A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Nature* **2014**, *505*, 50–55, doi:[10/gmd734](https://doi.org/10/gmd734).

¹⁵² Oujii, M.; Augereau, J.-M.; Paloque, L.; Benoit-Vical, F. *Plasmodium Falciparum* Resistance to Artemisinin-Based Combination Therapies: A Sword of Damocles in the Path toward Malaria Elimination. *Parasite* **2018**, *25*, 24, doi:[10/gdf5zk](https://doi.org/10/gdf5zk).

résistance *in vitro* à l'artémisinine pouvait ne pas être liée à une mutation du gène *kelch13*.^{153, 154}

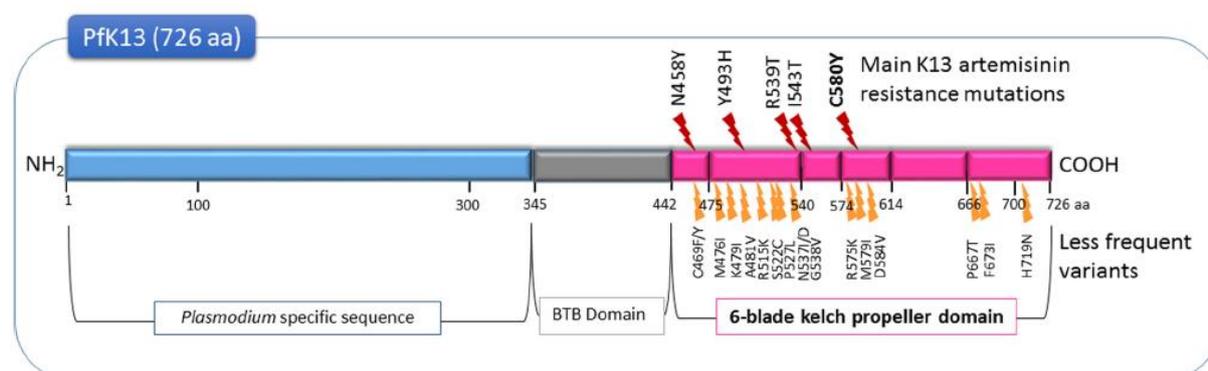


Figure 27. Régions de la protéine *Pfk13* et localisation des principales mutations. D'après Oujii *et al.*¹⁵²

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance à l'artémisinine n'ont été déterminés qu'en 2020.¹⁵⁵ La protéine *kelch13* est impliquée dans les mécanismes d'endocytose permettant au parasite d'absorber l'hémoglobine nécessaire à son développement. Lorsque la protéine *kelch13* est mutée, l'endocytose est beaucoup moins importante ayant pour conséquence une quantité d'hémoglobine beaucoup moins conséquente dans le parasite. Or, c'est cette hémoglobine et ses produits de dégradation qui sont nécessaires à l'activation de l'artémisinine et ses dérivés. Le parasite voit donc son développement fortement ralenti par manque d'hémoglobine et une résistance à l'artémisinine par absence d'activation de celle-ci. Outre l'artémisinine et ses dérivés, les mutations de *Pfkelch13* diminuent aussi la sensibilité à l'amodiaquine, la méfloquine et la pyriméthamine.¹⁵⁶ Aujourd'hui, de multiples mutations du gène *kelch13* sont suivies par l'OMS, la principale étant la mutation C580Y (**Tableau 4**).¹⁵⁷

¹⁵³ Mukherjee, A.; Bopp, S.; Magistrado, P.; Wong, W.; Daniels, R.; Demas, A.; Schaffner, S.; Amaratunga, C.; Lim, P.; Dhorda, M.; Miotto, O.; Woodrow, C.; Ashley, E.A.; Dondorp, A.M.; White, N.J.; Wirth, D.; Fairhurst, R.; Volkman, S.K. Artemisinin Resistance without *Pfkelch13* Mutations in *Plasmodium Falciparum* Isolates from Cambodia. *Malar. J.* **2017**, *16*, 195, doi:[10/gbg3gc](https://doi.org/10/gbg3gc).

¹⁵⁴ Das, S.; Kar, A.; Manna, S.; Mandal, S.; Mandal, S.; Das, S.; Saha, B.; Hati, A.K. Artemisinin Combination Therapy Fails Even in the Absence of *Plasmodium Falciparum* *Kelch13* Gene Polymorphism in Central India. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9946, doi:[10/gmsqhm](https://doi.org/10/gmsqhm).

¹⁵⁵ Birnbaum, J.; Scharf, S.; Schmidt, S.; Jonscher, E.; Hoeijmakers, W.A.M.; Flemming, S.; Toenhake, C.G.; Schmitt, M.; Sabitzki, R.; Bergmann, B.; Fröhlke, U.; Mesén-Ramirez, P.; Soares, A.B.; Herrmann, H.; Bartfai, R.; Spielmann, T. A *Kelch13*-Defined Endocytosis Pathway Mediates Artemisinin Resistance in Malaria Parasites. *Science* **2020**, *367*, 51–59, doi:[10/gghvzp](https://doi.org/10/gghvzp).

¹⁵⁶ Ménard, S.; Ben Haddou, T.; Ramadani, A.P.; Ariey, F.; Iriart, X.; Beghain, J.; Bouchier, C.; Witkowski, B.; Berry, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Benoit-Vical, F. Induction of Multidrug Tolerance in *Plasmodium Falciparum* by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1733–1741, doi:[10/f7sz8p](https://doi.org/10/f7sz8p).

¹⁵⁷ Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010–2019). Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Tableau 4. Liste des mutations validées comme étant responsables de résistances aux ACTs ou en cours d'évaluation.

Mutations validées	Mutations candidates ou associées
F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, P574L, C580Y	P441L, G449A, C469F/Y, A481V, R515K, P527H, N537I/D, G538V, V568G, R622I, A675V

Les mutations conférant à *P. falciparum* une résistance à l'artémisinine et ses dérivés a émergé en Asie du Sud-Est.¹⁴⁶ Pour l'instant, les manifestations cliniques de celles-ci restent cantonnées dans cette zone géographique et dans certaines zones, la mutation C580Y étant désormais le seul allèle présent.¹⁵⁸ La sélection des résistances aux dérivés d'artémisinine s'est accompagnée aussi de sélections de résistances aux molécules partenaires dans les ACT, comme la pipéraquine qui a été avec la dihydroartémisinine, le traitement majeur en Asie du Sud-Est pendant de nombreuses années (**Figure 28**).

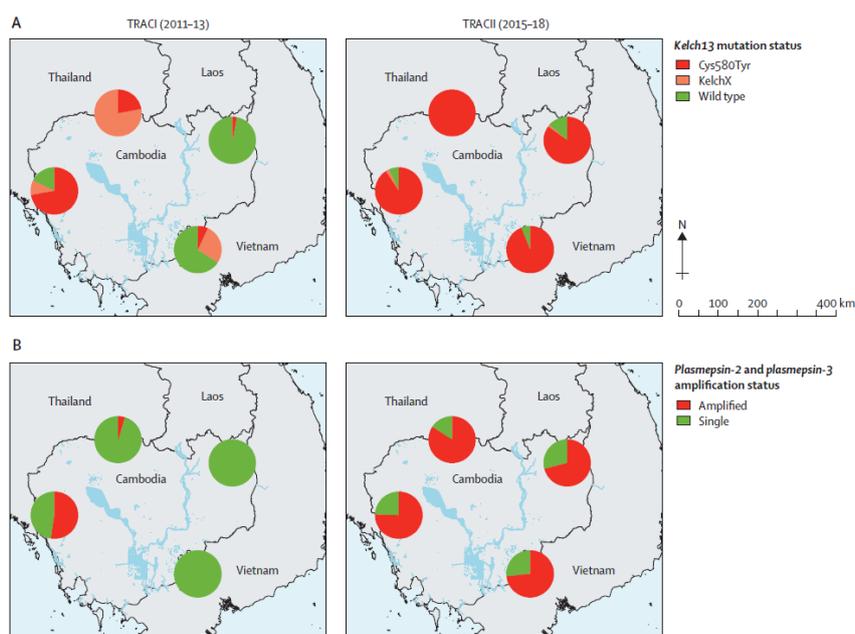


Figure 28. Répartition géographique et proportions de mutations du gène k13 (A, KelchX = autres mutations que C580Y) et de l'amplification des plasmepsines 2 et 3 (B) entre 2011 et 2018. D'après van der Pluijm *et al.*¹⁵⁸

¹⁵⁸ van der Pluijm, R.W.; Imwong, M.; Chau, N.H.; Hoa, N.T.; Thuy-Nhien, N.T.; Thanh, N.V.; Jittamala, P.; Hanboonkunupakarn, B.; Chutasmit, K.; Saelow, C.; Runjarern, R.; Kaewmok, W.; Tripura, R.; Peto, T.J.; Yok, S.; Suon, S.; Sreng, S.; Mao, S.; Oun, S.; Yen, S.; Amaratunga, C.; Lek, D.; Huy, R.; Dhorda, M.; Chotivanich, K.; Ashley, E.A.; Mukaka, M.; Waithira, N.; Cheah, P.Y.; Maude, R.J.; Amato, R.; Pearson, R.D.; Gonçalves, S.; Jacob, C.G.; Hamilton, W.L.; Fairhurst, R.M.; Tarning, J.; Winterberg, M.; Kwiatkowski, D.P.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T.T.; Day, N.P.; Miotto, O.; White, N.J.; Dondorp, A.M. Determinants of Dihydroartemisinin-Piperaquine Treatment Failure in *Plasmodium Falciparum* Malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: A Prospective Clinical, Pharmacological, and Genetic Study. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 952–961, doi:[10/ggbt4r](https://doi.org/10/ggbt4r).

En Afrique, les mutations confirmées par l'OMS ont été retrouvées de manière très limitée sur le continent entre 2014 et 2018.¹⁵⁹ Mais, une étude récente, portant sur des isolats parasites au Rwanda entre 2013 et 2015, a montré un début d'apparition de la mutation R561H, associée à une résistance *in vitro* aux dérivés d'artémisinine.¹⁶⁰ Ces souches ne sont pas originaires d'Asie du Sud-Est mais seraient apparues d'elles-mêmes au Rwanda. Le danger immédiat serait donc plus la sélection puis la propagation d'une souche résistante africaine plutôt que l'importation d'une souche résistante originaire d'Asie du Sud-Est.

1.2. Des anophèles résistants aux insecticides

Outre le parasite devenant résistant aux différents médicaments disponibles, les anophèles deviennent, de leur côté, progressivement résistants aux différents insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle avec les moustiquaires imprégnées d'insecticides et la pulvérisation résiduelle intérieure (cf. Chapitre 1 : 3.2. La lutte antivectorielle). Ces résistances sont retrouvées aujourd'hui dans une grande majorité des pays endémiques (**Figure 29**).

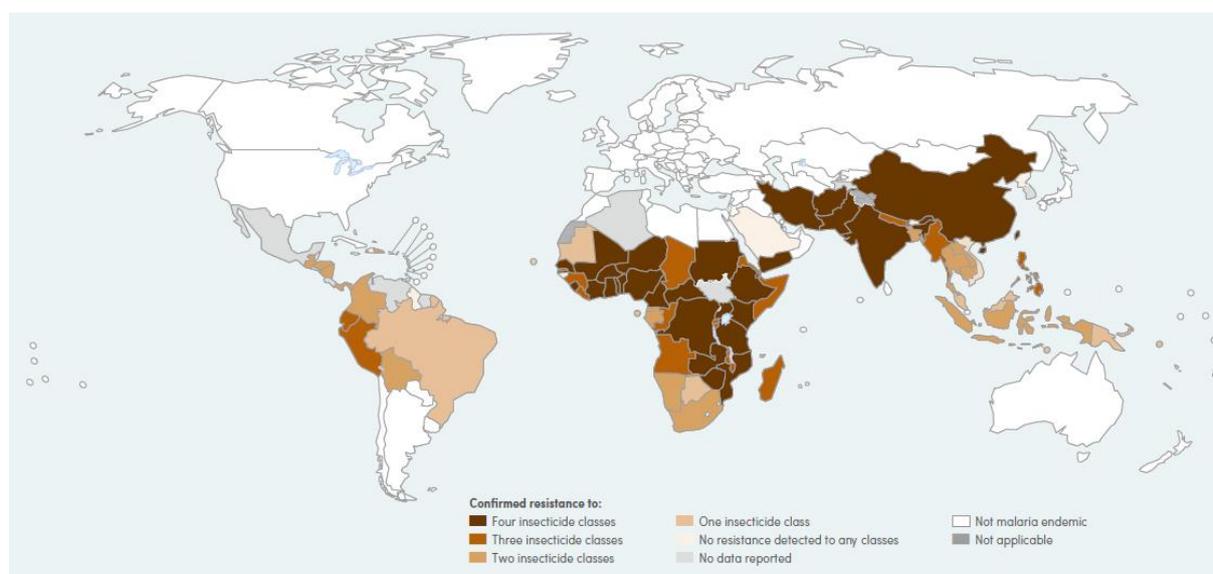


Figure 29. Nombre de catégories d'insecticides dans chaque pays endémique pour lesquelles les anophèles sont confirmés comme résistants.¹⁷

¹⁵⁹ Kayiba, N.K.; Yobi, D.M.; Tshibangu-Kabamba, E.; Tuan, V.P.; Yamaoka, Y.; Devleeschauwer, B.; Mvumbi, D.M.; Okitolonda Wemakoy, E.; De Mol, P.; Mvumbi, G.L.; Hayette, M.-P.; Rosas-Aguirre, A.; Speybroeck, N. Spatial and Molecular Mapping of Pfk13 Gene Polymorphism in Africa in the Era of Emerging *Plasmodium Falciparum* Resistance to Artemisinin: A Systematic Review. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, e82–e92, doi:[10/gmssr2](https://doi.org/10/gmssr2).

¹⁶⁰ Uwimana, A.; Legrand, E.; Stokes, B.H.; Ndikumana, J.-L.M.; Warsame, M.; Umulisa, N.; Ngamije, D.; Munyaneza, T.; Mazarati, J.-B.; Munguti, K.; Campagne, P.; Criscuolo, A.; Ariey, F.; Murindahabi, M.; Ringwald, P.; Fidock, D.A.; Mbituyumuremyi, A.; Menard, D. Emergence and Clonal Expansion of in Vitro Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Kelch13 R561H Mutant Parasites in Rwanda. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1602–1608, doi:[10/d55q](https://doi.org/10/d55q).

Ces résistances sont dues à des mutations sur les cytochromes P450 (majoritairement les CYP6) des anophèles qui vont permettre à ceux-ci de mieux métaboliser les insecticides.¹⁶¹
¹⁶² Les pyréthrinoïdes, insecticides utilisés dans les moustiquaires, ont connu une baisse d'efficacité au cours des dernières années (**Figure 30**). Ces résistances mettent logiquement en danger les progrès réalisés durant les 10 dernières années. Il est difficile d'évaluer précisément leur impact réel sur l'efficacité des méthodes de lutte antivectorielle car de multiples facteurs entrent en jeu (variabilités des tests réalisés chez les moustiques, prise en compte de l'efficacité de la moustiquaire sans insecticide, comparaison entre conditions des tests et conditions réelles, etc...).¹⁶³

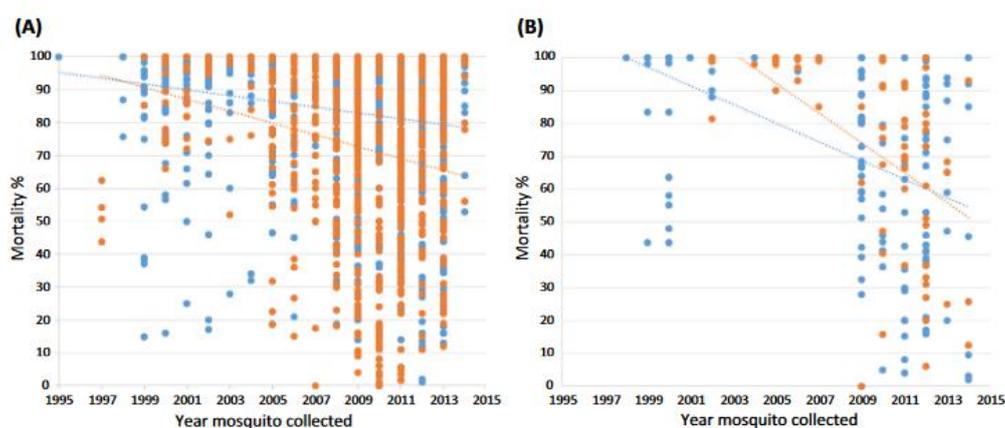


Figure 30. Evolution de la mortalité observée chez *A. gambiae* (A) et *A. funestus* (B). Données provenant de tests effectués avec de la deltaméthrine (bleu) ou de la cyperméthrine (orange). D'après Ransson et Lissenden.¹⁶³

Cependant, l'OMS réagit contre ces résistances de différentes manières.¹⁷ D'une part, elle propose le développement de nouvelles moustiquaires qui combinent pyréthrinoïdes et butoxyde de pipéronyle, un composé inhibiteur du cytochrome P450 du vecteur permettant une synergie d'action avec l'insecticide (**Figure 31**). Les études montrent l'efficacité de cette combinaison par rapport aux moustiquaires imprégnées classiques (malgré le questionnement sur la stabilité du butoxyde de pipéronyle dans le temps).¹⁶⁴ L'OMS qui, avait progressivement développé l'emploi de ces moustiquaires, devrait prendre position pour leur

¹⁶¹ Vontas, J. Cytochrome P450-Based Metabolic Insecticide Resistance in *Anopheles* and *Aedes* Mosquito Vectors: Muddying the Waters. *Pestic. Biochem. Phys.* **2020**, *9*, doi:[10/gmsvpc](https://doi.org/10/gmsvpc).

¹⁶² Organisation Mondiale de la Santé. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575-eng.pdf?sequence=1> (consulté le 27/09/21).

¹⁶³ Ranson, H.; Lissenden, N. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation That Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 187–196, doi:[10/f87s5x](https://doi.org/10/f87s5x).

¹⁶⁴ Gleave, K.; Lissenden, N.; Chaplin, M.; Choi, L.; Ranson, H. Piperonyl Butoxide (PBO) Combined with Pyrethroids in Insecticide-Treated Nets to Prevent Malaria in Africa. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2021**, 2021, doi:[10/gj6hbx](https://doi.org/10/gj6hbx).

utilisation massive.³⁶ D'autre part, il est envisagé d'utiliser les néonicotinoïdes dans les moustiquaires imprégnées d'insecticides qui, pour l'instant, utilisent uniquement des pyréthrinoïdes (cf. Chapitre 1 : 3.2.1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide).

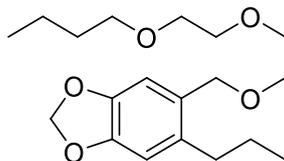


Figure 31. Structure chimique du butoxyde de pipéronyle.

1.3. Autres dangers menaçant la lutte antipaludique

Les tests de diagnostic rapide du paludisme sont majoritairement basés sur la détection de deux protéines : PfHRP2 et 3 (*Histidine-Rich Protein*). Des souches de *P. falciparum* possèdent des mutations d'un ou des deux gènes entraînant la disparition de la(des) protéine(s) codée(s). Lorsqu'une souche est doublement négative, elle devient non détectable par les tests de diagnostic rapide.¹⁷ Ces mutations sont retrouvées principalement en Amérique du Sud mais également en Afrique Sub-Saharienne.¹⁶⁵ L'OMS cherche, à l'heure actuelle, à déterminer l'impact sur le nombre de faux négatifs dûs à ces mutations et propose le développement de tests de diagnostic rapide basés sur d'autres protéines.

En Afrique, le paludisme est principalement présent dans les zones rurales.¹⁶⁶ Cette répartition géographique est due à la plus forte présence de flaques et de mares, lieux de ponte pour les anophèles. Mais, une espèce d'anophèle asiatique, *Anopheles stephensi*, est désormais présente sur le continent africain, en Ethiopie et au Soudan principalement.^{167, 168} Cette espèce est capable de se développer dans les centres urbains et met potentiellement en danger 126 millions de personnes sur le continent africain.¹⁶⁹

¹⁶⁵ Molina-de la Fuente, I.; Pastor, A.; Herrador, Z.; Benito, A.; Berzosa, P. Impact of *Plasmodium Falciparum* Pfhpr2 and Pfhpr3 Gene Deletions on Malaria Control Worldwide: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Malar. J.* **2021**, *20*, 276, doi:[10/gmsxtj](https://doi.org/10/gmsxtj).

¹⁶⁶ Duchemin, J.-B.; Macintyre, K.; Warren, M.; Keating, J.; Robert, V.; Beier, J.C.; Trape, J.-F. Malaria transmission in urban sub-saharan africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *68*, 169–176, doi:[10/gmw83n](https://doi.org/10/gmw83n).

¹⁶⁷ Balkew, M.; Mumba, P.; Dengela, D.; Yohannes, G.; Getachew, D.; Yared, S.; Chibsa, S.; Murphy, M.; George, K.; Lopez, K.; Janies, D.; Choi, S.H.; Spear, J.; Irish, S.R.; Carter, T.E. Geographical Distribution of *Anopheles Stephensi* in Eastern Ethiopia. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 35, doi:[10/gmsx44](https://doi.org/10/gmsx44).

¹⁶⁸ Seyfarth, M.; Khaireh, B.A.; Abdi, A.A.; Bouh, S.M.; Faulde, M.K. Five Years Following First Detection of *Anopheles Stephensi* (*Diptera: Culicidae*) in Djibouti, Horn of Africa: Populations Established—Malaria Emerging. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 725–732, doi:[10/gmsx5s](https://doi.org/10/gmsx5s).

¹⁶⁹ Sinka, M.E.; Pironon, S.; Massey, N.C.; Longbottom, J.; Hemingway, J.; Moyes, C.L.; Willis, K.J. A New Malaria Vector in Africa: Predicting the Expansion Range of *Anopheles Stephensi* and Identifying the Urban Populations at Risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 24900–24908, doi:[10/ghbmqt](https://doi.org/10/ghbmqt).

2. La vaccination

Un espoir de longue date dans la lutte antipaludique serait la découverte d'un vaccin contre le paludisme. Mais, le développement d'un vaccin pour un parasite est bien plus compliqué que pour un pathogène comme une bactérie ou un virus. A la complexité du cycle parasitaire s'ajoute la nécessité de trouver une cible capable d'induire une réponse immunitaire constante et capable de réagir aux différentes souches. De plus, la réponse immunitaire au paludisme est encore mal comprise et les études immunologiques lors du développement de candidat-vaccins n'ont fait que renforcer cette confusion.¹⁷⁰

Plusieurs stratégies vaccinales sont explorées par les chercheurs :

- Cibler les sporozoïtes libérés lors de la piqûre infectieuse afin d'empêcher l'invasion des hépatocytes ;
- Cibler les mérozoïtes afin d'empêcher l'invasion des érythrocytes ;
- Cibler les formes du parasite retrouvées dans l'anophèle afin de stopper le développement du parasite chez le moustique et limiter la transmission à d'autres personnes.

Une vingtaine de vaccins différents sont en cours de développement, allant du stade préclinique à un vaccin pilote en cours de distribution en passant par de multiples vaccins en cours d'essais cliniques.¹⁷⁰ Récemment, deux vaccins ont connu des avancées majeures.

Le vaccin RTS,S/AS01E (Mosquirix[®]) est le plus avancé dans le processus de mise sur le marché. Ce vaccin, en développement par les laboratoires GSK depuis la fin des années 1980, cible les sporozoïtes en inoculant un antigène de surface majeur retrouvé chez ce stade parasitaire : la protéine circumsporozoïte. Un antigène de surface du virus de l'hépatite B est aussi combiné à l'antigène parasitaire. L'étude de phase III terminée en 2015 a montré des résultats modérés, sur une période de 4 ans, chez des enfants recevant 4 doses en intramusculaire (1 dose par mois pendant 3 mois puis une quatrième dose 20 mois après la première injection) (**Tableau 5**).¹⁷¹ Ces résultats ont été jugés suffisants pour que l'EMA autorise son utilisation pour les nourrissons âgés de 6 semaines à 17 mois à des fins

¹⁷⁰ Laurens, M.B. The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? *Annu. Rev. Microbiol.* **2018**, *72*, 273–292, doi:[10/gmsz66](https://doi.org/10/gmsz66).

¹⁷¹ RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial. *Lancet* **2015**, *386*, 31–45, doi:[10/34s](https://doi.org/10/34s).

d'immunisation contre le paludisme (et l'hépatite B) dans les pays endémiques du paludisme.¹⁷²

Tableau 5. Efficacité du vaccin RTS,S/AS01E. D'après RTS,S Clinical Trials Partnership.¹⁷¹

Population vaccinée	Accès palustre	Proportion de l'événement (vs groupe contrôle)
Enfant (5-17 mois)	Simple	-36,3%
	Grave	-32%
Nourrisson (6-12 semaines)	Simple	-25,9%
	Grave	-17,3%

Une version pilote du vaccin a été déployée dans trois pays africains (Ghana, Kenya et Malawi) depuis avril 2019 afin de démarrer des études de phase IV, nécessaires pour une mise sur le marché.¹⁷³ Les effets du vaccin peuvent paraître limités mais il s'agit d'un nouvel outil capable d'agir en complémentarité avec des pratiques comme la chimioprophylaxie. Combiner la vaccination à la chimioprophylaxie saisonnière du paludisme permet de réduire de 63% le nombre d'accès palustres simples par rapport à la prophylaxie seule et de 60% par rapport au vaccin seul.¹⁷⁴ Suite au programme pilote, l'OMS a annoncé, le 6 Octobre 2021, qu'elle recommandait désormais l'utilisation du RTS,S dans les régions avec un risque de transmission moyen ou important du paludisme, selon le schéma vaccinal à 4 doses décrit précédemment à partir du 5^{ème} mois.¹⁷⁵

¹⁷² Agence Européenne du Médicament. <https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/mosquirix> (consulté le 27/09/21).

¹⁷³ Adepoju, P. RTS,S Malaria Vaccine Pilots in Three African Countries. *Lancet* **2019**, 393, 1685, doi:[10/gms52k](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31111-1).

¹⁷⁴ Chandramohan, D.; Zongo, I.; Sagara, I.; Cairns, M.; Yerbanga, R.-S.; Diarra, M.; Nikièma, F.; Tapily, A.; Sompoudou, F.; Issiaka, D.; Zoungrana, C.; Sanogo, K.; Haro, A.; Kaya, M.; Sienou, A.-A.; Traore, S.; Mahamar, A.; Thera, I.; Diarra, K.; Dolo, A.; Kuepfer, I.; Snell, P.; Milligan, P.; Ockenhouse, C.; Ofori-Anyinam, O.; Tinto, H.; Djimde, A.; Ouédraogo, J.-B.; Dicko, A.; Greenwood, B. Seasonal Malaria Vaccination with or without Seasonal Malaria Chemoprevention. *N. Engl. J. Med.* **2021**, 385, 1005–1017, doi:[10/gms57w](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020111).

¹⁷⁵ Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk> (consulté le 30/11/21).

Un second vaccin, le R21 développé par l'Université d'Oxford, a montré des résultats prometteurs sur son essai de phase II.¹⁷⁶ Ce vaccin utilise le même antigène que le RTS,S. Le R21 montre une meilleure efficacité, estimée à 77%, que le RTS,S qui a une efficacité à 1 an de 56% d'après les essais de phase III.¹⁷¹

3. Le développement de nouvelles thérapies antipaludiques

La recherche de nouvelles molécules antipaludiques est principalement pilotée par un organisme : *Medicines for Malaria Venture* (MMV).¹⁷⁷ Cette organisation à but non lucratif, fondée en 1999 sous l'impulsion de l'OMS, est un partenariat pour le développement de produits. Elle met en relation plusieurs acteurs afin de faciliter et guider le développement de nouveaux médicaments antipaludiques (**Figure 32**).¹⁷⁸

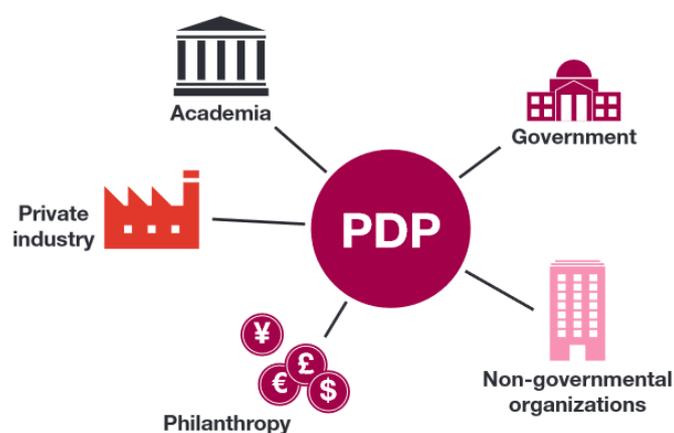


Figure 32. Organismes mis en relation via un partenariat pour développement de produits (PDP).

MMV a déjà participé à nombreux projets ayant abouti à la mise sur le marché de nouveaux médicaments comme les combinaisons dihydroartémisinine/pipéraquine, artésunate/pyronaridine ou artésunate/méfloquine ou bien la tafénoquine. Cependant, les industries pharmaceutiques peuvent tout à fait se passer de MMV pour développer leurs molécules antipaludiques mais peuvent aussi finir par céder leurs projets à celle-ci.

¹⁷⁶ Dattoo, M.S.; Natama, M.H.; Somé, A.; Traoré, O.; Rouamba, T.; Bellamy, D.; Yameogo, P.; Valia, D.; Tegneri, M.; Ouedraogo, F.; Soma, R.; Sawadogo, S.; Sorgho, F.; Derra, K.; Rouamba, E.; Orindi, B.; Ramos Lopez, F.; Flaxman, A.; Cappuccini, F.; Kailath, R.; Elias, S.; Mukhopadhyay, E.; Noe, A.; Cairns, M.; Lawrie, A.; Roberts, R.; Valéa, I.; Sorgho, H.; Williams, N.; Glenn, G.; Fries, L.; Reimer, J.; Ewer, K.J.; Shaligram, U.; Hill, A.V.S.; Tinto, H. Efficacy of a Low-Dose Candidate Malaria Vaccine, R21 in Adjuvant Matrix-M, with Seasonal Administration to Children in Burkina Faso: A Randomised Controlled Trial. *Lancet* **2021**, *397*, 1809–1818, doi:[10/gms6t7](https://doi.org/10/gms6t7).

¹⁷⁷ *Medicines for Malaria Venture*. <https://www.mmv.org/> (consulté le 27/09/21).

¹⁷⁸ *Medicines for Malaria Venture*. <https://www.mmv.org/newsroom/infographics/product-development-partnership> (consulté le 27/09/21).

3.1. Processus de développement d'un médicament antipaludique

Le processus nécessaire pour arriver à la mise sur le marché d'un nouveau médicament antipaludique ne diffère pas de celui d'un médicament classique dans son déroulement. Cependant, des paramètres et considérations sont à prendre en compte durant ses étapes, en lien avec l'évolution actuelle de l'épidémie de paludisme.

3.1.1. « *Hit to lead chemistry* » antipaludique

Lorsque l'on découvre une molécule possédant une activité intéressante sur une cible donnée, on parle de hit. Sur ce hit, vont ensuite être effectuées des modifications structurales, des pharmacomodulations, afin d'obtenir une molécule avec des paramètres optimisés : un lead. Dans la recherche antipaludique, les hits sont principalement découverts par criblage phénotypique : une molécule est mise en contact avec le parasite et on observe l'impact de celle-ci sur son développement afin de déterminer son activité (CE₅₀ : concentration de molécule nécessaire pour diminuer le développement du parasite de 50%). Des études d'interactions sur des protéines plasmodiales peuvent aussi aboutir à la découverte de hits.¹⁷⁹ Dès ces premières étapes, des critères doivent être remplis afin d'assurer sereinement la poursuite du développement (**Tableau 6**).^{180, 181}

¹⁷⁹ Raphemot, R.; Eubanks, A.L.; Toro-Moreno, M.; Geiger, R.A.; Hughes, P.F.; Lu, K.-Y.; Haystead, T.A.J.; Derbyshire, E.R. Plasmodium PK9 Inhibitors Promote Growth of Liver-Stage Parasites. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 411-419.e7, doi:[10/gmtf52](https://doi.org/10/gmtf52).

¹⁸⁰ Katsuno, K.; Burrows, J.N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R.H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C.E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B.T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 751-758, doi:[10/f7w2j9](https://doi.org/10/f7w2j9).

¹⁸¹ Samby, K.; Willis, P.A.; Burrows, J.N.; Laleu, B.; Webborn, P.J.H. Actives from MMV Open Access Boxes? A Suggested Way Forward. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009384, doi:[10/gmtgrw](https://doi.org/10/gmtgrw).

Tableau 6. Critères à remplir pour avoir un bon hit puis lead antipaludique.

Critères à remplir pour	
Un hit antipaludique	Un lead antipaludique
<ul style="list-style-type: none"> • CE₅₀ < 1 µM sur plusieurs souches (multi)-résistantes • Indice de sélectivité > 10 • Premières données de Relation Structure-Activité (RSA) • Respect des règles de Lipinski si possible et absence d’alerte PAINS (<i>Pan Assay Interference Compounds</i>)¹⁸² • Si cible connue : sélectivité par rapport à une protéine humaine similaire • Synthèse ≤ 5 étapes • Bonne solubilité • Structure et mécanisme d’action originaux 	<ul style="list-style-type: none"> • CE₅₀ < 100 nM sur plusieurs souches (multi)-résistantes • Indice de sélectivité > 100 • Efficacité <i>in vivo per os</i> (modèle murin, DE₉₀ < 50 mg/kg, 1 dose jour pendant 4 jours) • logP < 5, mieux si < 3 • Solubilité > 10 µM (tampon phosphate) • Bonne stabilité métabolique et si possible, faible liaison aux protéines plasmatiques • Absence de mutagénicité et de génotoxicité ainsi que d’activité sur les canaux hERG (<i>in vitro</i>) • Voie de synthèse facilitant la synthèse d’analogues
Détermination de l’activité sur les hypnozoïtes, les schizontes hépatiques et les gamétocytes (bien si < 1 µM)	

3.1.2. Etudes pré-cliniques et cliniques : TCP et TPP

Les études pré-cliniques sont des études effectuées *in vivo* chez l’animal afin d’étudier les paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques d’un composé. Les études cliniques sont les études chez l’Homme et sont divisées en 3 phases principales (**Tableau 7**).¹⁸³

Tableau 7. Résumé des différentes phases des essais cliniques.

Phase	But	Nombre de patients	Durée
I	Sécurité de la molécule / Détermination de la posologie	20 – 100 patients sains	Plusieurs mois
II	Efficacité et effets secondaires	Jusqu’à plusieurs centaines de malades	Plusieurs mois à 2 ans
III	Efficacité et effets secondaires	Jusqu’à plusieurs milliers de patients	1 à 4 ans

¹⁸² Baell, J.B.; Holloway, G.A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740, doi:[10/cz4krq](https://doi.org/10.1021/jm100448a021).

¹⁸³ Food and Drugs Administration. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research> (consulté le 27/09/21).

Ces études demandant à la fois beaucoup de temps et d'argent, des critères détaillés ont été définis pour faciliter et prioriser cette recherche sur les meilleurs composés possibles. MMV a rassemblé ces critères sous les acronymes TCP et TPP : *Target Candidate Profile* et *Target Product Profile*.^{184, 185} Les TCP sont un ensemble de critères destinés aux molécules actives (à définir durant les études précliniques et cliniques de phase I) tandis que les TPP concernent le médicament sous sa forme finale : formulation d'une ou plusieurs molécules actives (essais cliniques de phase II et plus).

Les TCP sont divisés en cinq catégories ; chaque catégorie se rapportant à une action pharmacologique précise : activité sur les stades sanguins asexués, activité sur les hypnozoïtes, activité sur les schizontes hépatiques, activité sur les gamétocytes et activité sur l'anophèle (endectocide). Cette dernière catégorie est encore très peu développée et concerne des molécules pouvant être administrées à l'Homme qui ensuite seront capables de tuer le moustique.¹⁸⁶ Une molécule est à l'heure actuelle envisagée pour cette utilisation : l'ivermectine. L'OMS étudie actuellement sa possible utilisation et a défini des données à obtenir prioritairement.^{187, 188}

Dans ces TCP, on retrouve une multitude de critères : posologie, efficacité, toxicité évaluée sur modèle animal mais aussi des considérations, importantes pour les pays endémiques, sur le coût, la stabilité ou encore l'absence d'interactions avec des médicaments comme les anti-VIH ou antituberculeux ou des phénotypes comme le déficit en G6PD (**Tableau 8** et **Tableau 9**).

¹⁸⁴ Burrows, J.N.; Duparc, S.; Gutteridge, W.E.; Hooft van Huijsduijnen, R.; Kaszubska, W.; Macintyre, F.; Mazzuri, S.; Möhrle, J.J.; Wells, T.N.C. New Developments in Anti-Malarial Target Candidate and Product Profiles. *Malar. J.* **2017**, *16*, 26, doi:[10/f9mtns](https://doi.org/10/f9mtns).

¹⁸⁵ *Medicines for Malaria Venture*. <https://www.mmv.org/research-development/information-scientists/target-product-profiles-target-candidate-profiles> (consulté le 27/09/21).

¹⁸⁶ Burrows, J.; Slater, H.; Macintyre, F.; Rees, S.; Thomas, A.; Okumu, F.; Hooft van Huijsduijnen, R.; Duparc, S.; Wells, T.N.C. A Discovery and Development Roadmap for New Endectocidal Transmission-Blocking Agents in Malaria. *Malar. J.* **2018**, *17*, 462, doi:[10/gmxvrg](https://doi.org/10/gmxvrg).

¹⁸⁷ Organisation Mondiale de la Santé. *Ivermectin for malaria transmission control*, 2016. <https://www.who.int/malaria/mpac/mpac-sept2016-ivermectin-session9.pdf?ua=1> (consulté le 27/09/21).

¹⁸⁸ *Cochrane*. https://www.cochrane.org/CD013117/INFECTN_malaria-control-using-ivermectin (consulté le 27/09/21).

Tableau 8. Critères communs retrouvés chez les différents TCP. D'après Burrows *et al.*¹⁸⁴

Critères	Essentiel	Idéal
Posologie (adulte/enfant)	<p>TCP-1, 3 et 5 <i>Per os</i> < 1000 mg / < 250 mg (une dose) En zone de résistance : < 400 mg / < 100 mg (trois doses)</p>	<p>TCP-1, 3 et 5 <i>Per os</i> < 100 mg / 25 mg</p>
	<p>TCP-4 <i>Per os</i> : < 500 mg / < 100 mg (une dose) En zone de résistance : < 400 mg / < 100 mg (trois doses)</p> <p>Injectable : Sous-cutanée ou intra-musculaire (une fois par mois)</p>	<p>TCP-4 <i>Per os</i> < 100 mg</p> <p>Injectable : Sous-cutanée ou intra- musculaire (tous les 6 mois)</p>
Coût du principe actif par dose	≤ 0,5 USD	< 0,25 USD

Tableau 9. Critères d'efficacité requis selon chaque TCP. D'après Burrows *et al.*¹⁸⁴

TCP	Critère	Essentiel	Idéal
TCP-1	Rapidité d'action	Clairance parasitaire au moins aussi rapide qu'avec la méfloquine (≤ 72 h pour les parasitémiés les plus fortes)	Clairance parasitaire au moins aussi rapide qu'avec l'artésunate
	Efficacité clinique chez des patients avec des résistances aux traitements de première ligne	Efficace sur toutes les résistances (en 3 doses)	Efficace sur toutes les résistances (en 1 dose)
TCP-3	Efficacité	Prévention de 80% des rechutes sur 6 mois	Prévention de 80% des rechutes sur 1 an
TCP-4	Protection contre l'infection	> 95% d'efficacité	
TCP-5	Efficacité	Prévient > 90% la transmission au moustique	Prévient > 90% la transmission au moustique 15 jours après la dose

Une molécule peut tout à fait appartenir à plusieurs TCP selon son activité et les TCP auxquels appartient une molécule vont ensuite définir à quel TPP le médicament final appartient (**Schéma 8**). Il existe deux TPP : traitement de l'accès palustre chez l'adulte et l'enfant (**Tableau 10**) et chimioprophylaxie (**Tableau 11**). Selon la combinaison de molécules, le médicament final peut appartenir à un ou deux TPP. Depuis l'apparition des ACTs et le retrait des antipaludiques en monothérapie comme traitement de première ligne contre *P. falciparum*, le développement s'oriente maintenant vers la recherche de nouvelles combinaisons, en évitant de combiner deux nouvelles molécules ensemble. Une molécule peut rester, des années, bloquée au stade des essais cliniques afin de trouver la meilleure combinaison possible. Le paramètre majeur pour évaluer les formulations TPP-1 est l'ACPR (*Adequate Clinical and Parasitic Response*) défini par l'OMS comme étant « l'absence de parasitémie au jour 28 (ou plus), quelle que soit la température axillaire, chez les patients qui ne répondaient auparavant à aucun des critères d'échec précoce du traitement, d'échec clinique tardif ou d'échec parasitologique tardif ».¹⁸⁹

Tableau 10. Critères requis pour un médicament TPP-1. D'après Burrows *et al.*¹⁸⁴

Critères	Essentiel	Idéal
Rapidité d'action	Au moins un principe actif agit immédiatement Disparition de la fièvre en 24 h.	Les deux principes actifs agissent immédiatement Disparition de la fièvre en 24 h.
Réduction de la parasitémie	100 % (7 jours après le traitement y compris dans les zones de résistances aux traitements de première ligne)	
ACPR	> 95% corrigé par PCR à J28	> 95% corrigé par PCR à J42-63
Blocage de la transmission	Non requis Pas d'interactions avec la primaquine à faible dose	Capable de stopper la transmission 15 jours après le traitement sans utilisation de primaquine
Prévention des rechutes (hypnozoïtes)	Non requis Pas d'interactions avec les 8-aminoquinoléines	Confirmée par les études cliniques
Biodisponibilité	> 30% pour chaque molécule	> 50% pour chaque molécule
Posologie	<i>Per os</i> : 2 ou 3 doses	<i>Per os</i> : 1 dose
Sécurité et tolérance	Effets indésirables graves : peu et gérables	Pas d'effets indésirables graves Peu d'effets indésirables

¹⁸⁹ Organisation Mondiale de la Santé. *Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy*, 2009. https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/methods-for-surveillance-of-antimalarial-drug-efficacy.pdf?sfvrsn=29076702_2 (consulté le 27/09/21).

Grossesse	Pas de contre-indication au 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre	Pas de contre-indication au 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre Pas de toxicité embryo-fœtale au 1 ^{er} semestre chez l'animal
Coût du traitement	< 3\$ (adulte) et < 1\$ (enfants de moins de 2 ans)	≤ 1\$ (adulte) et 0.25\$ (enfants de moins de 2 ans)
Perte d'efficacité due aux résistances	Probabilité faible Pas d'indices montrant une résistance transmissible	

Tableau 11. Critères requis pour un médicament TPP-2. D'après Burrows *et al.*¹⁸⁴

Critères	Essentiel	Idéal
Composition	Au moins une molécule TCP-4	Les deux molécules TCP-4
Posologie	<i>Per os</i> : une fois par semaine Injectable : une fois par trimestre	<i>Per os</i> : une fois par mois Injectable : moins qu'une fois par trimestre
Efficacité	Réduction de l'incidence ≥ 80%	Réduction de l'incidence ≥ 95%
Biodisponibilité	> 30% pour chaque molécule	> 50% pour chaque molécule
Sécurité et tolérance	Effets indésirables graves : peu et gérables	Pas d'effets indésirables graves Peu d'effets indésirables
Grossesse	Pas de contre-indication au 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre	Pas de contre-indication au 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre Pas de toxicité embryo-fœtale au 1 ^{er} semestre chez l'animal
Coût du traitement	≤ 1\$ (adulte) et 0.25\$ (enfants de moins de 2 ans)	
Perte d'efficacité due aux résistances	Probabilité très faible Pas de résistance croisée avec la molécule partenaire	

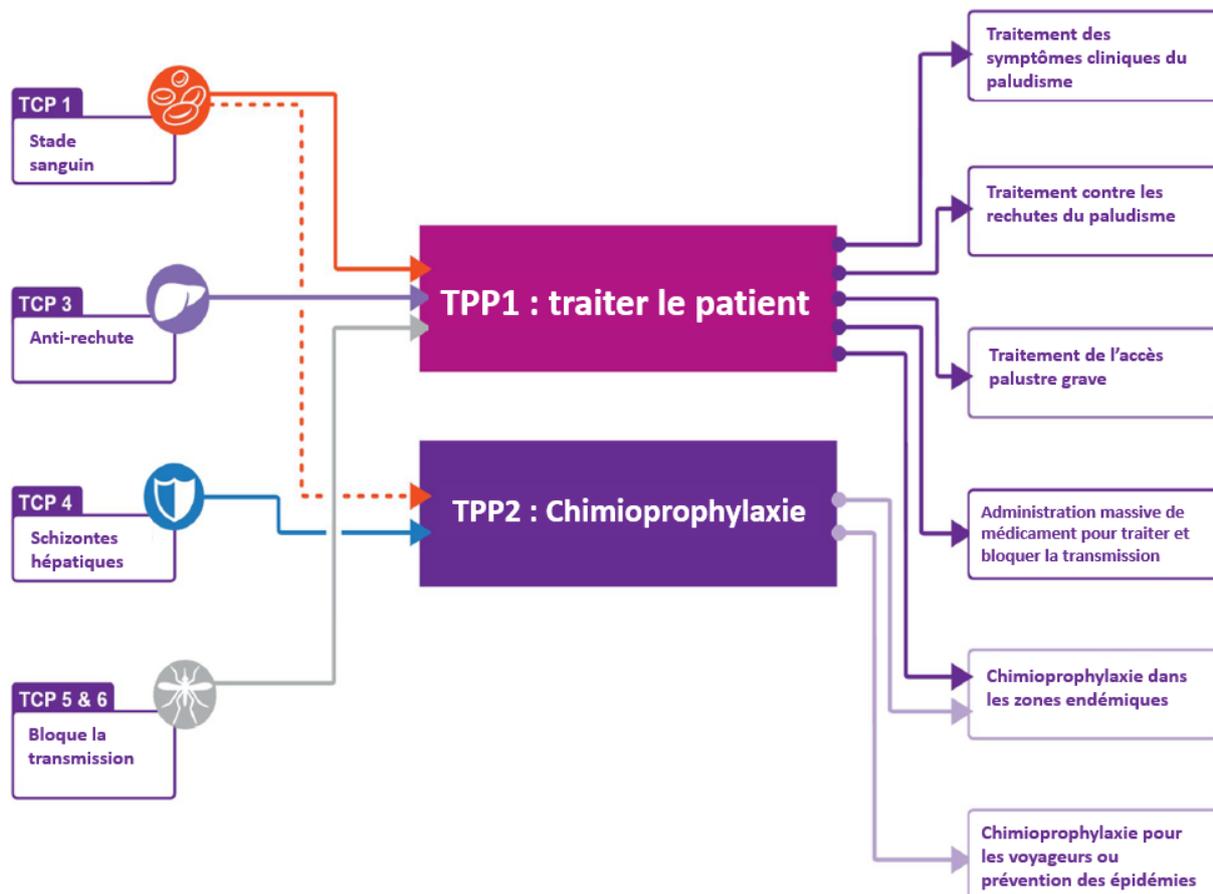


Schéma 8. Schéma résumant TCPs, TPPs et indications possibles pour ces derniers. D'après MMV.

3.2. Anticiper l'apparition de résistances

Le problème majeur dans le développement de nouveaux antipaludiques est l'apparition de résistances. Le risque zéro n'existe pas, mais MMV est désormais très attentif sur les possibles résistances pouvant émerger chez des molécules en cours de développement. Durant le processus « *hit to lead chemistry* », des tests *in vitro* sont à effectuer pour observer l'apparition de résistances plus ou moins facilement (**Tableau 12**).¹⁹⁰ Lors du développement préclinique, de nouvelles données vont permettre d'établir une carte du risque concernant le composé évalué (**Figure 33** et **Annexe 1**).

¹⁹⁰ Duffey, M.; Blasco, B.; Burrows, J.N.; Wells, T.N.C.; Fidock, D.A.; Leroy, D. Assessing Risks of *Plasmodium Falciparum* Resistance to Select Next-Generation Antimalarials. *Trends Parasitol.* **2021**, *37*, 709–721, doi:[10/gmtvx9](https://doi.org/10/gmtvx9).

Tableau 12. Tests à effectuer pour déterminer la propension d'un composé à sélectionner des résistances chez *Plasmodium*. D'après Duffey *et al.*¹⁹⁰

Etape	Test à effectuer	Mauvais résultats si
Pharmacomodulations d'un hit	Sélection de résistance <i>in vitro</i> (Entre 10 ⁵ et 10 ⁷ parasites exposés 3 x CE ₉₀)	MIR ^a ≤ 6 Décalage > x10 de la CE ₅₀
Lead (Un des trois tests au choix)	Sélection de résistance <i>in vitro</i> (Entre 10 ⁶ et 10 ⁷ parasites exposés 3 x CE ₉₀)	MIR ^a ≤ 6 Décalage > x10 de la CE ₅₀ Provoqué par le changement d'un nucléotide
	Tests de résistances croisées <i>in vitro</i> à d'autres antipaludiques (commercialisés ou catalogue MMV)	Décalage > x5 de la CE ₅₀ Survie > 2% durant un test RSA
	Tests de résistances croisées sur <i>P. falciparum ex vivo</i>	Décalage > x5 de la CE ₅₀

^a MIR : Minimum Inoculum pour une Résistance, nombre de parasites minimal requis pour sélectionner une résistance après exposition des doses de molécules (3 x CE₉₀ ici). Un MIR à 6 signifie qu'il faut 10⁶ parasites au minimum pour sélectionner une résistance.

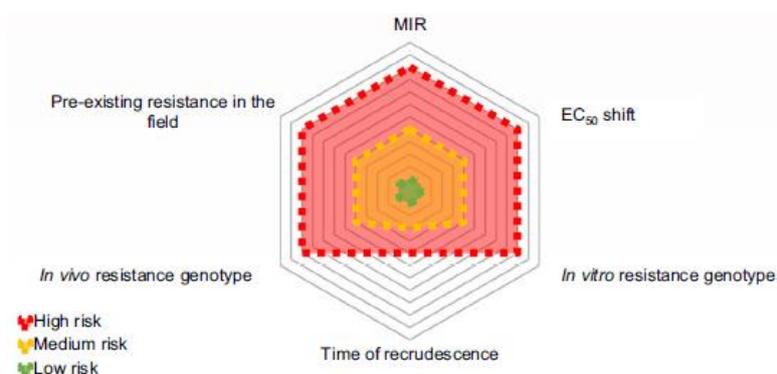


Figure 33. Représentation du risque de résistance pour un composé antipaludique, défini selon 6 paramètres différents. D'après Duffey *et al.*¹⁹⁰

Cette anticipation est due à un retour d'expérience concernant deux molécules développées par MMV. DSM265 a montré l'apparition importante de résistances *in vitro* (après exposition 3 x CE₅₀) et lors des essais cliniques, des parasites étaient retrouvés chez les patients jusqu'à 25 jours après le traitement par cette molécule. Cette découverte a mis en difficulté la progression de cette molécule dans les essais cliniques (cf. Chapitre 2 : 4.1.7.DSM265). ZY19489 n'a pas montré de sélection de résistances *in vitro* et les essais de

phase I semblent confirmer que *in vivo* aucune recrudescence de parasites résistants n'est pour l'instant observée (cf. Chapitre 2 : 4.2.2.ZY19489).¹⁹⁰

4. Molécules antipaludiques en cours de développement

En février 2021, MMV dénombrait 11 nouvelles molécules en cours de développement au sein de son portfolio, entre les essais précliniques et les essais cliniques de phase II.¹⁹¹ Aucune nouvelle molécule n'est à l'heure actuelle en essai clinique de phase III. D'autres molécules, hors portfolio du MMV, ont aussi atteint ce niveau de développement. On peut enfin évoquer le développement d'une nouvelle association de deux antipaludiques connus, l'atoguanil, combinant, sous forme de sel, l'atovaquone et le proguanil actuellement en essai clinique de phase I.

4.1. Molécules en phase II des essais cliniques

Cinq molécules sont actuellement en phase II (**Figure 34**) : le ganaplacide, la cipargamine, la ferroquine, SJ733 et l'artéfénoméle (OZ439). Le composé MMV048 a récemment vu son développement être arrêté durant cette phase II tandis que le devenir du composé DSM265 est encore incertain.

¹⁹¹ Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects> (consulté le 25/09/21)

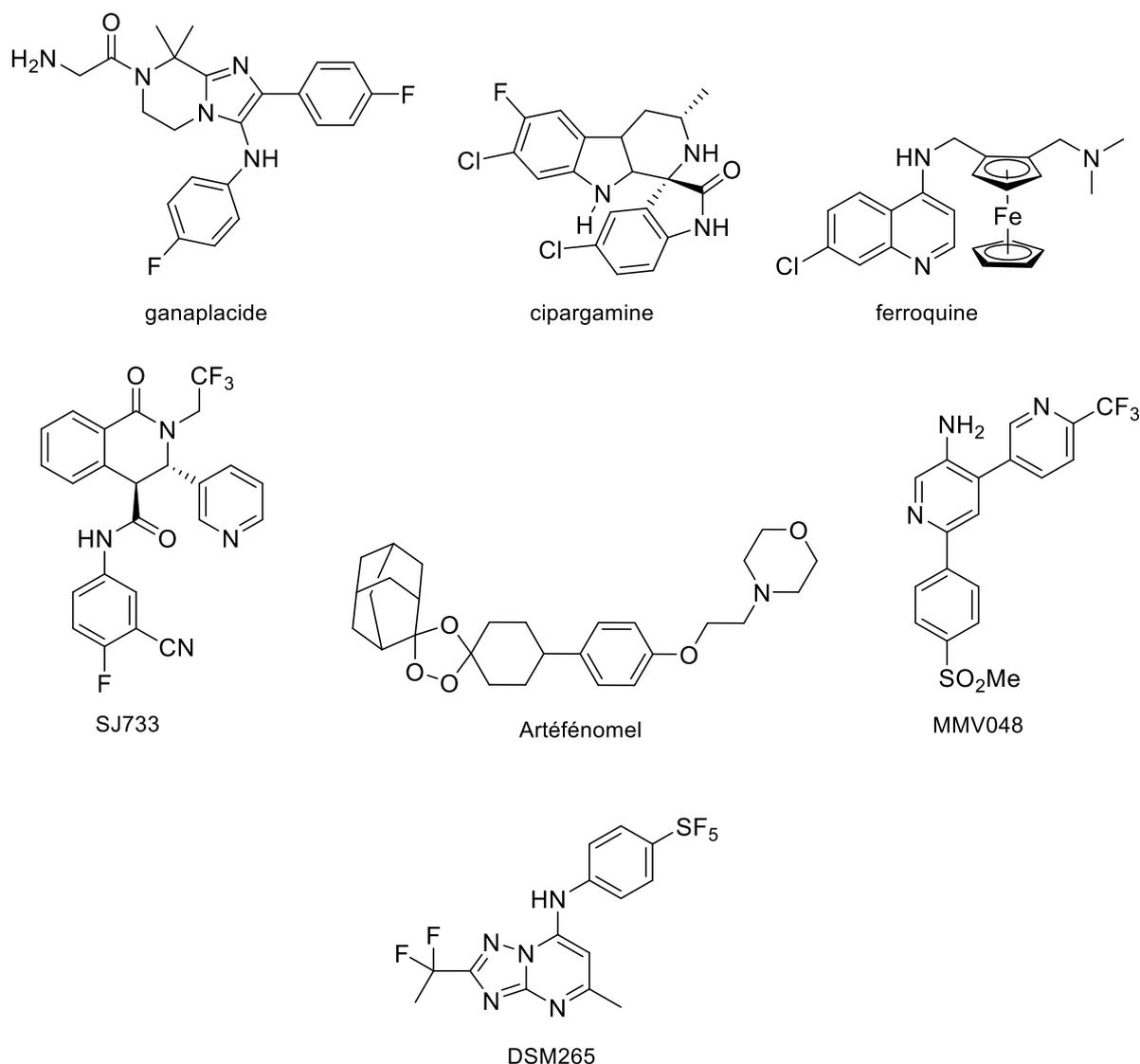


Figure 34. Composés ayant atteint la phase II des essais cliniques contre le paludisme

4.1.1. Le ganaplacide

Le ganaplacide (anciennement KAF156) est une imidazolo-pipérazine développée conjointement entre le MMV et le laboratoire Novartis. Les premiers travaux sur cette série remontent à 2011.¹⁹² Un hit initial comportant le noyau imidazolo-pipérazine a été retenu, après un screening de plus de 2 millions de composés sur *P. falciparum*.¹⁹³ La position 8 non substituée du cycle central s'est révélée sensible au métabolisme hépatique conduisant à une

¹⁹² Wu, T.; Nagle, A.; Kuhen, K.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Francek, C.; Chen, Z.; Plouffe, D.; Goh, A.; Lakshminarayana, S.B.; Wu, J.; Ang, H.Q.; Zeng, P.; Kang, M.L.; Tan, W.; Tan, M.; Ye, N.; Lin, X.; Caldwell, C.; Ek, J.; Skolnik, S.; Liu, F.; Wang, J.; Chang, J.; Li, C.; Hollenbeck, T.; Tuntland, T.; Isbell, J.; Fischli, C.; Brun, R.; Rottmann, M.; Dartois, V.; Keller, T.; Diagana, T.; Winzeler, E.; Glynn, R.; Tully, D.C.; Chatterjee, A.K. Imidazolo-piperazines: Hit to Lead Optimization of New Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5116–5130, doi:[10/bd9r6z](https://doi.org/10/bd9r6z).

¹⁹³ Plouffe, D.; Brinker, A.; McNamara, C.; Henson, K.; Kato, N.; Kuhen, K.; Nagle, A.; Adrián, F.; Matzen, J.T.; Anderson, P.; Nam, T.; Gray, N.S.; Chatterjee, A.; Janes, J.; Yan, S.F.; Trager, R.; Caldwell, J.S.; Schultz, P.G.; Zhou, Y.; Winzeler, E.A. *In Silico* Activity Profiling Reveals the Mechanism of Action of Antimalarials Discovered in a High-Throughput Screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9059–9064, doi:[10/brijtmg](https://doi.org/10/brijtmg).

faible activité *in vivo* sur modèle murin ; de nouvelles pharmacomodulations ont fini par aboutir au ganaplacide (Schéma 9).¹⁹⁴

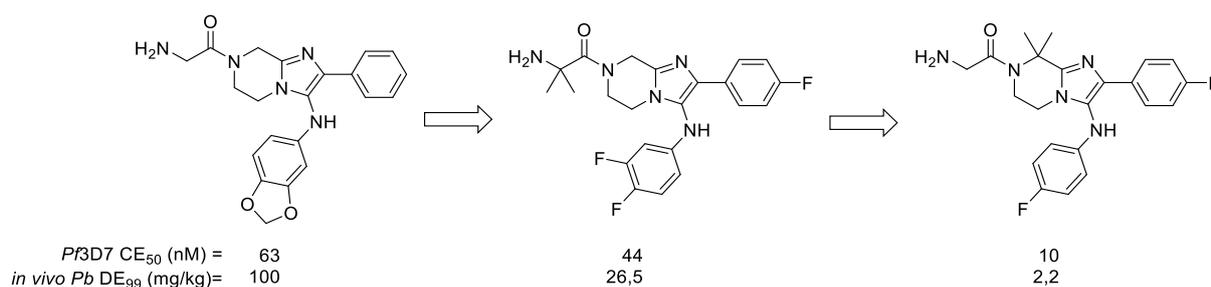


Schéma 9. Evolution de la structure des hits menant au ganaplacide (à droite).

Etonnamment, le ganaplacide a passé le stade préclinique¹⁹⁵ puis les essais de phase I¹⁹⁶ pour arriver à ceux de phase II sans connaître sa cible moléculaire.¹⁹⁷ Cependant, des clones résistants ont pu être sélectionnés et trois gènes responsables ont été identifiés : *Pfcarl*, *Pfugt* et *Pfact*.¹⁹⁵ Ces trois protéines se situent au niveau du réticulum endoplasmique. Récemment, des travaux ont mis en évidence l'action du ganaplacide sur cet organite soit par blocage de l'export des protéines au sein de celui-ci ou bien en inhibant directement le repliement des protéines.¹⁹⁸ Un premier essai de phase II associant le ganaplacide à la luméfántrine (adultes et enfants) s'est récemment achevé et un autre vient de démarrer (formulation pédiatrique).^{199, 200}

¹⁹⁴ Nagle, A.; Wu, T.; Kuhen, K.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Francek, C.; Chen, Z.; Plouffe, D.; Lin, X.; Caldwell, C.; Ek, J.; Skolnik, S.; Liu, F.; Wang, J.; Chang, J.; Li, C.; Liu, B.; Hollenbeck, T.; Tuntland, T.; Isbell, J.; Chuan, T.; Alper, P.B.; Fischli, C.; Brun, R.; Lakshminarayana, S.B.; Rottmann, M.; Diagana, T.T.; Winzeler, E.A.; Glynne, R.; Tully, D.C.; Chatterjee, A.K. Imidazolopiperazines: Lead Optimization of the Second-Generation Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4244–4273, doi:[10/f3xwjg](https://doi.org/10/f3xwjg).

¹⁹⁵ Kuhen, K.L.; Chatterjee, A.K.; Rottmann, M.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Buenviaje, J.; Chen, Z.; Francek, C.; Wu, T.; Nagle, A.; Barnes, S.W.; Plouffe, D.; Lee, M.C.S.; Fidock, D.A.; Graumans, W.; van de Vegte-Bolmer, M.; van Gemert, G.J.; Wirjanata, G.; Sebayang, B.; Marfurt, J.; Russell, B.; Suwanarusk, R.; Price, R.N.; Nosten, F.; Tungtaeng, A.; Gettayacamin, M.; Sattabongkot, J.; Taylor, J.; Walker, J.R.; Tully, D.; Patra, K.P.; Flannery, E.L.; Vinetz, J.M.; Renia, L.; Sauerwein, R.W.; Winzeler, E.A.; Glynne, R.J.; Diagana, T.T. KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate with Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5060–5067, doi:[10/f6grw7](https://doi.org/10/f6grw7).

¹⁹⁶ Leong, F.J.; Zhao, R.; Zeng, S.; Magnusson, B.; Diagana, T.T.; Pertel, P. A First-in-Human Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single- and Multiple-Ascending Oral Dose Study of Novel Imidazolopiperazine KAF156 To Assess Its Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics in Healthy Adult Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6437–6443, doi:[10/gcbjkb](https://doi.org/10/gcbjkb).

¹⁹⁷ White, N.J.; Duong, T.T.; Uthaisin, C.; Nosten, F.; Phyo, A.P.; Hanboonkunupakarn, B.; Pukrittayakamee, S.; Jittamala, P.; Chuthasmit, K.; Cheung, M.S.; Feng, Y.; Li, R.; Magnusson, B.; Sultan, M.; Wieser, D.; Xun, X.; Zhao, R.; Diagana, T.T.; Pertel, P.; Leong, F.J. Antimalarial Activity of KAF156 in *Falciparum* and *Vivax* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1152–1160, doi:[10/gk9zpx](https://doi.org/10/gk9zpx).

¹⁹⁸ LaMonte, G.M.; Rocamora, F.; Marapana, D.S.; Gnädig, N.F.; Otilie, S.; Luth, M.R.; Worgall, T.S.; Goldgof, G.M.; Mohunlal, R.; Santha Kumar, T.R.; Thompson, J.K.; Vigil, E.; Yang, J.; Hutson, D.; Johnson, T.; Huang, J.; Williams, R.M.; Zou, B.Y.; Cheung, A.L.; Kumar, P.; Egan, T.J.; Lee, M.C.S.; Siegel, D.; Cowman, A.F.; Fidock, D.A.; Winzeler, E.A. Pan-Active Imidazolopiperazine Antimalarials Target the *Plasmodium Falciparum* Intracellular Secretory Pathway. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1780, doi:[10/gmtx53](https://doi.org/10/gmtx53).

¹⁹⁹ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03167242> (consulté le 27/09/21)

²⁰⁰ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04546633> (consulté le 27/09/21)

4.1.2. La cipargamine

La cipargamine (anciennement KAE609) est une spiro tétrahydro- β -carboline développée aussi conjointement entre Novartis et le MMV. Cette série est issue d'un screening de composés d'origine naturelle ou semi-synthétique et, quelques modifications structurales furent nécessaires pour aboutir à la cipargamine (**Schéma 10**).²⁰¹

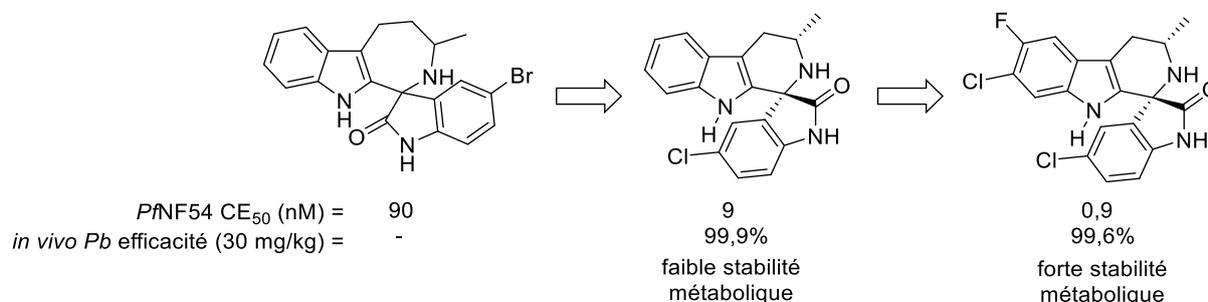


Schéma 10. Evolution de la structure des hits menant à la cipargamine (à droite).

La cipargamine est un inhibiteur de *Pf*ATP4 (*P-type cation translocating ATPase*) : c'est un transporteur primaire utilisant l'ATP pour réguler le taux intraparasitaire de Na^+ .²⁰² L'inhibition d'ATP4 entraîne donc une augmentation du Na^+ intraparasitaire qui provoque un arrêt du développement parasitaire puis des changements phénotypiques de l'érythrocyte infecté. Ces modifications conduisent l'érythrocyte en éryptose (forme d'apoptose chez l'érythrocyte) qui conduit soit à son élimination par le système immunitaire, soit à son éclatement.²⁰³ Durant les essais de phase I, il a été envisagé d'associer la cipargamine avec la pipéraquline, combinaison qui n'a pas montré d'effets indésirables majeurs.²⁰⁴ Deux essais de phase II en monothérapie ont été réalisés :

²⁰¹ Yeung, B.K.S.; Zou, B.; Rottmann, M.; Lakshminarayana, S.B.; Ang, S.H.; Leong, S.Y.; Tan, J.; Wong, J.; Keller-Maerki, S.; Fischli, C.; Goh, A.; Schmitt, E.K.; Krastel, P.; Francotte, E.; Kuhlen, K.; Plouffe, D.; Henson, K.; Wagner, T.; Winzeler, E.A.; Petersen, F.; Brun, R.; Dartois, V.; Diagana, T.T.; Keller, T.H. Spirotetrahydro β -Carbolines (Spiroindolones): A New Class of Potent and Orally Efficacious Compounds for the Treatment of Malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5155–5164, doi:[10/bpdb67](https://doi.org/10/bpdb67).

²⁰² Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B.K.S.; Lee, M.C.S.; Zou, B.; Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D.M.; Dharia, N.V.; Tan, J.; Cohen, S.B.; Spencer, K.R.; Gonzalez-Paez, G.E.; Lakshminarayana, S.B.; Goh, A.; Suwanarusk, R.; Jegla, T.; Schmitt, E.K.; Beck, H.-P.; Brun, R.; Nosten, F.; Renia, L.; Dartois, V.; Keller, T.H.; Fidock, D.A.; Winzeler, E.A.; Diagana, T.T. Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. *Science* **2010**, *329*, 1175–1180, doi:[10/c4jm4v](https://doi.org/10/c4jm4v).

²⁰³ Jiménez-Díaz, M.B.; Ebert, D.; Salinas, Y.; Pradhan, A.; Lehane, A.M.; Myrand-Lapierre, M.-E.; O'Loughlin, K.G.; Shackleford, D.M.; Justino de Almeida, M.; Carrillo, A.K.; Clark, J.A.; Dennis, A.S.M.; Diep, J.; Deng, X.; Duffy, S.; Endsley, A.N.; Fedewa, G.; Guiguemde, W.A.; Gómez, M.G.; Holbrook, G.; Horst, J.; Kim, C.C.; Liu, J.; Lee, M.C.S.; Matheny, A.; Martínez, M.S.; Miller, G.; Rodríguez-Alejandre, A.; Sanz, L.; Sigal, M.; Spillman, N.J.; Stein, P.D.; Wang, Z.; Zhu, F.; Waterson, D.; Knapp, S.; Shelat, A.; Avery, V.M.; Fidock, D.A.; Gamo, F.-J.; Charman, S.A.; Mirsalis, J.C.; Ma, H.; Ferrer, S.; Kirk, K.; Angulo-Barturen, I.; Kyle, D.E.; DeRisi, J.L.; Floyd, D.M.; Guy, R.K. (+)-SJ733, a Clinical Candidate for Malaria That Acts through ATP4 to Induce Rapid Host-Mediated Clearance of *Plasmodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E5455–E5462, doi:[10/f8k9p3](https://doi.org/10/f8k9p3).

²⁰⁴ Stein, D.S.; Jain, J.P.; Kangas, M.; Lefèvre, G.; Machineni, S.; Griffin, P.; Lickliter, J. Open-Label, Single-Dose, Parallel-Group Study in Healthy Volunteers To Determine the Drug-Drug Interaction Potential between KAE609 (Cipargamin) and Piperaquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 3493–3500, doi:[10/f7k9gg](https://doi.org/10/f7k9gg).

- La cipargamine est efficace sur *P. falciparum* et *P. vivax* (30 mg/kg 1 fois par jour pendant 3 jours) ;²⁰⁵
- La cipargamine provoque une clairance parasitaire jusqu'à 3 fois plus rapide que la combinaison arthéméther/luméfantrine.²⁰⁶

L'objectif est désormais de trouver une molécule partenaire pour la cipargamine.

4.1.3. La ferroquine

La ferroquine est une molécule issue d'un compromis structural entre la chloroquine et le ferrocène (**Schéma 11**). Elle a été développée en 1997 à Lille par le Laboratoire de Catalyse Hétérogène et Homogène²⁰⁷ avant que les droits ne soient ensuite transférés à Sanofi puis à MMV. L'intérêt de la ferroquine est lié à son action sur les souches résistantes à la chloroquine (mutations de *Pfcr*t) et au fait qu'elle sélectionne plus difficilement des résistances bien qu'elle possède un mécanisme d'action identique.²⁰⁸ De plus, le ferrocène est capable de générer des espèces réactives de l'oxygène provoquant un stress oxydant supplémentaire pour le parasite.²⁰⁹

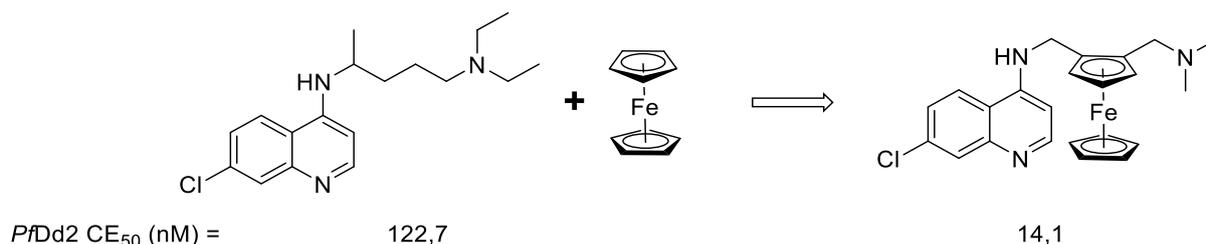


Schéma 11. Structures chimiques de la chloroquine (à gauche) et du ferrocène (au centre) aboutissant à la ferroquine (à droite).

²⁰⁵ White, N.J.; Pukrittayakamee, S.; Phyto, A.P.; Rueangweerayut, R.; Nosten, F.; Jittamala, P.; Jeeyapant, A.; Jain, J.P.; Lefèvre, G.; Li, R.; Magnusson, B.; Diagona, T.T.; Leong, F.J. Spiroindolone KAE609 for Falciparum and Vivax Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 403–410, doi:[10/gmt44j](https://doi.org/10/gmt44j).

²⁰⁶ Schmitt, E.K.; Ndayisaba, G.; Yeka, A.; Asante, K.P.; Grobusch, M.P.; Karita, E.; Mugerwa, H.; Asimwe, S.; Oduro, A.; Fofana, B.; Doumbia, S.; Su, G.; Csermak Renner, K.; Venishetty, V.K.; Sayyed, S.; Straimer, J.; Demin, I.; Barsainya, S.; Boulton, C.; Gandhi, P. Efficacy of Cipargamin (KAE609) in a Randomized, Phase II Dose-Escalation Study in Adults in Sub-Saharan Africa with Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, ciab716, doi:[10/gmt44n](https://doi.org/10/gmt44n).

²⁰⁷ Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L.A.; Brocard, J.S.; Domarle, O.; Blampain, G.; Millet, P.; Georges, A.J.; Abessolo, H.; Dive, D.; Lebib, J. Synthesis and Antimalarial Activity in Vitro and in Vivo of a New Ferrocene-Chloroquine Analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715–3718, doi:[10/cwk99p](https://doi.org/10/cwk99p).

²⁰⁸ Daher, W.; Biot, C.; Fandeur, T.; Jouin, H.; Pelinski, L.; Viscogliosi, E.; Fraisse, L.; Pradines, B.; Brocard, J.; Khalife, J.; Dive, D. Assessment of Plasmodium Falciparum Resistance to Ferroquine (SSR97193) in Field Isolates and in W2 Strain under Pressure. *Malar. J.* **2006**, *5*, 11, doi:[10/cr45zw](https://doi.org/10/cr45zw).

²⁰⁹ Dive, D.; Biot, C. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and Other Antimalarials: The Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 383–391, doi:[10/c5sh9s](https://doi.org/10/c5sh9s).

Considérant ses bonnes propriétés pharmacocinétiques,²¹⁰ la ferroquine a progressé vers le stade des essais cliniques. Elle a été testée en combinaison avec deux autres antipaludiques : l'artésunate^{211, 212} puis l'artéfénomel (cf. Chapitre 2 : 4.1.5. L'artéfénomel).²¹³ Mais dans ces deux cas, l'efficacité n'a pas atteint les niveaux requis (avec une ACPR aux alentours de 90%) et actuellement la ferroquine attend une nouvelle molécule avec laquelle être associée. La ferroquine a stimulé la recherche autour des hybrides ferrocène-antipaludique comme le montrent les très nombreuses molécules synthétisées.²¹⁴

4.1.4. SJ733

Le composé (+)-SJ733 est une dihydroisoquinoléinone développée conjointement entre le Global Health Innovative Found, les laboratoires Eisai et l'université du Kentucky. Révélé en 2014, ce composé est, comme la cipargamine, un inhibiteur de *Pf*ATP4. Les tests ont démontré l'activité supérieure de l'isomère (+) par rapport au mélange racémique avec des DE₉₀ sur modèle murin infecté par *P. berghei* de 1,9 et 3,8 mg/kg respectivement.²⁰³ Le profil pharmacologique et l'absence d'effets secondaires de SJ733 durant l'essai de phase I²¹⁵ font qu'actuellement, un essai de phase II est ouvert.²¹⁶

²¹⁰ Delhaes, L.; Abessolo, H.; Berry, L.; Delcourt, P.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Camus, D.; Dive, D.; Biot, C. In Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of Ferrochloroquine, a Ferrocenyl Analogue of Chloroquine against Chloroquine-Resistant Malaria Parasites. *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 239–244, doi:[10/df377d](https://doi.org/10/df377d).

²¹¹ Walsh, D.S.; Lell, B.; Kombila, M.; Polhemus, M.E.; Ospina Salazar, C.L.; Kremsner, P.G.; Cantalloube, C.; Otsula, N.; Djeriou, E.; Apollo, D.; Supan, C.; Waitumbi, J.; Ogutu, B.; Mombo-Ngoma, G.; Held, J. Phase 2a, Open-Label, 4-Escalating-Dose, Randomized Multicenter Study Evaluating the Safety and Activity of Ferroquine (SSR97193) Plus Artesunate, versus Amodiaquine Plus Artesunate, in African Adult Men with Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 514–525, doi:[10/gmt5tr](https://doi.org/10/gmt5tr).

²¹² Held, J.; Supan, C.; Salazar, C.L.O.; Tinto, H.; Bonkian, L.N.; Nahum, A.; Moulero, B.; Sié, A.; Coulibaly, B.; Sirima, S.B.; Siribie, M.; Otsyula, N.; Otieno, L.; Abdallah, A.M.; Kimutai, R.; Bouyou-Akotet, M.; Kombila, M.; Koiwai, K.; Cantalloube, C.; Din-Bell, C.; Djeriou, E.; Waitumbi, J.; Mordmüller, B.; Ter-Minassian, D.; Lell, B.; Kremsner, P.G. Ferroquine and Artesunate in African Adults and Children with *Plasmodium Falciparum* Malaria: A Phase 2, Multicentre, Randomised, Double-Blind, Dose-Ranging, Non-Inferiority Study. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 1409–1419, doi:[10/gmt5tx](https://doi.org/10/gmt5tx).

²¹³ Adoke, Y.; Zoleko-Manego, R.; Ouoba, S.; Tiono, A.B.; Kaguthi, G.; Bonzela, J.E.; Duong, T.T.; Nahum, A.; Bouyou-Akotet, M.; Ogutu, B.; Ouedraogo, A.; Macintyre, F.; Jessel, A.; Laurijssens, B.; Cherkaoui-Rbati, M.H.; Cantalloube, C.; Marrast, A.C.; Bejuit, R.; White, D.; Wells, T.N.C.; Wartha, F.; Leroy, D.; Kibuuka, A.; Mombo-Ngoma, G.; Ouattara, D.; Mugenyi, I.; Phuc, B.Q.; Bohissou, F.; Mawili-Mboumba, D.P.; Olewe, F.; Soulama, I.; Tinto, H.; the FALCI Study Group; Ramharter, M.; Nahum, D.; Zohou, H.; Nzwili, I.; Ongecha, J.M.; Thompson, R.; Kiwalabye, J.; Diarra, A.; Coulibaly, A.S.; Bougouma, E.C.; Kargougou, D.G.; Tegneri, M.; Castin Vuillerme, C.; Djeriou, E.; Ansary, A.F. A Randomized, Double-Blind, Phase 2b Study to Investigate the Efficacy, Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of a Single-Dose Regimen of Ferroquine with Artefenomel in Adults and Children with Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Malar. J.* **2021**, *20*, 222, doi:[10/gmt5t6](https://doi.org/10/gmt5t6).

²¹⁴ Xiao, J.; Sun, Z.; Kong, F.; Gao, F. Current Scenario of Ferrocene-Containing Hybrids for Antimalarial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111791, doi:[10/gkzhqh](https://doi.org/10/gkzhqh).

²¹⁵ Gaur, A.H.; McCarthy, J.S.; Panetta, J.C.; Dallas, R.H.; Woodford, J.; Tang, L.; Smith, A.M.; Stewart, T.B.; Branum, K.C.; Freeman, B.B.; Patel, N.D.; John, E.; Chalon, S.; Ost, S.; Heine, R.N.; Richardson, J.L.; Christensen, R.; Flynn, P.M.; Van Gessel, Y.; Mitasev, B.; Möhrle, J.J.; Gusovsky, F.; Bebrevska, L.; Guy, R.K. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Antimalarial Efficacy of a Novel *Plasmodium Falciparum* ATP4 Inhibitor SJ733: A First-in-Human and Induced Blood-Stage Malaria Phase 1a/b Trial. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 964–975, doi:[10/gmt5xk](https://doi.org/10/gmt5xk).

²¹⁶ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04709692> (consulté le 27/09/21).

4.1.5. L'artéfénomel

L'artéfénomel (ou OZ439) est un trioxolane développé en partenariat entre MMV et l'université de Melbourne. Les composés possédant un noyau trioxolane ont un mécanisme d'action similaire à celui de l'artémisinine et ses dérivés (cf. Chapitre 1 : 2.7. L'artémisinine et ses dérivés). OZ439 est lui-même un dérivé de l'artérolane (OZ277),²¹⁷ utilisé en association avec la pipéraquline (Synriam®) uniquement en Inde. L'artéfénomel a l'avantage de posséder un meilleur profil pharmacologique par rapport à l'artérolane qui lui est rapidement métabolisé. L'artéfénomel est capable d'éliminer complètement la parasitémie sur modèle murin infecté par *P. berghei* durant 30 jours après une dose à 30 mg/kg, ce dont est incapable OZ277.²¹⁸ Ces résultats prometteurs ont été confirmés en essai clinique de phase I.²¹⁹ L'artéfénomel a, par la suite, été testé en phase II en association avec la ferroquine,²¹³ la pipéraquline²²⁰ et avec le composé DSM265 (cf. Chapitre 2 : 4.1.7. DSM265).²²¹ Dans les deux premiers cas, l'efficacité de la combinaison n'était pas suffisante.

4.1.6. MMV048

Le composé MMV048 est une phénylbipyridine dont le développement était conduit entre l'université du Cap et MMV. Découvert en 2011 après des pharmacomodulations portant sur un hit issu d'un criblage de 37 000 composés,²²² il a montré une activité sur les trois stades de *Plasmodium* couplé à un bon profil pharmacologique.²²³ MMV048 agit sur la

²¹⁷ Vennerstrom, J.L.; Arbe-Barnes, S.; Brun, R.; Charman, S.A.; Chiu, F.C.K.; Chollet, J.; Dong, Y.; Dorn, A.; Hunziker, D.; Matile, H.; McIntosh, K.; Padmanilayam, M.; Santo Tomas, J.; Scheurer, C.; Scorneaux, B.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wittlin, S.; Charman, W.N. Identification of an Antimalarial Synthetic Trioxolane Drug Development Candidate. *Nature* **2004**, *430*, 900–904, doi:[10/fqfdbb](https://doi.org/10/fqfdbb).

²¹⁸ Charman, S.A.; Arbe-Barnes, S.; Bathurst, I.C.; Brun, R.; Campbell, M.; Charman, W.N.; Chiu, F.C.K.; Chollet, J.; Craft, J.C.; Creek, D.J.; Dong, Y.; Matile, H.; Maurer, M.; Morizzi, J.; Nguyen, T.; Papastogiannidis, P.; Scheurer, C.; Shackleford, D.M.; Sriraghavan, K.; Stingelin, L.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wang, X.; White, K.L.; Wittlin, S.; Zhou, L.; Vennerstrom, J.L. Synthetic Ozonide Drug Candidate OZ439 Offers New Hope for a Single-Dose Cure of Uncomplicated Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 4400–4405, doi:[10/dqjhhj](https://doi.org/10/dqjhhj).

²¹⁹ Moehrle, J.J.; Duparc, S.; Siethoff, C.; Giersbergen, P.L.M.; Craft, J.C.; Arbe-Barnes, S.; Charman, S.A.; Gutierrez, M.; Wittlin, S.; Vennerstrom, J.L. First-in-man Safety and Pharmacokinetics of Synthetic Ozonide OZ439 Demonstrates an Improved Exposure Profile Relative to Other Peroxide Antimalarials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 535–548, doi:[10/gb9q43](https://doi.org/10/gb9q43).

²²⁰ on behalf of the OZ-Piperaquine Study Group; Macintyre, F.; Adoke, Y.; Tiono, A.B.; Duong, T.T.; Mombo-Ngoma, G.; Bouyou-Akotet, M.; Tinto, H.; Bassat, Q.; Issifou, S.; Adamy, M.; Demarest, H.; Duparc, S.; Leroy, D.; Laurijsens, B.E.; Biguenet, S.; Kibuuka, A.; Tshetu, A.K.; Smith, M.; Foster, C.; Leipoldt, I.; Kremsner, P.G.; Phuc, B.Q.; Ouedraogo, A.; Ramharter, M. A Randomised, Double-Blind Clinical Phase II Trial of the Efficacy, Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of a Single Dose Combination Treatment with Artefenomel and Piperaquine in Adults and Children with Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria. *BMC Med.* **2017**, *15*, 181, doi:[10/gmt569](https://doi.org/10/gmt569).

²²¹ Dini, S.; Zaloumis, S.G.; Price, D.J.; Gobeau, N.; Kümmel, A.; Cherkaoui, M.; Moehrle, J.J.; McCarthy, J.S.; Simpson, J.A. Seeking an Optimal Dosing Regimen for OZ439/DSM265 Combination Therapy for Treating Uncomplicated Falciparum Malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 2325–2334, doi:[10/gmt57j](https://doi.org/10/gmt57j).

²²² Younis, Y.; Douelle, F.; Feng, T.-S.; Cabrera, D.G.; Manach, C.L.; Nchinda, A.T.; Duffy, S.; White, K.L.; Shackleford, D.M.; Morizzi, J.; Manila, J.; Katneni, K.; Bhamidipati, R.; Zabiulla, K.M.; Joseph, J.T.; Bashyam, S.; Waterson, D.; Witty, M.J.; Hardick, D.; Wittlin, S.; Avery, V.; Charman, S.A.; Chibale, K. 3,5-Diaryl-2-Aminopyridines as a Novel Class of Orally Active Antimalarials Demonstrating Single Dose Cure in Mice and Clinical Candidate Potential. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3479–3487, doi:[10/f3wtww](https://doi.org/10/f3wtww).

²²³ Paquet, T.; Le Manach, C.; Cabrera, D.G.; Younis, Y.; Henrich, P.P.; Abraham, T.S.; Lee, M.C.S.; Basak, R.; Ghidelli-Disse, S.; Lafuente-Monasterio, M.J.; Bantscheff, M.; Ruecker, A.; Blagborough, A.M.; Zakutansky, S.E.; Zeeman, A.-M.; White, K.L.;

protéine PfPI4K (Phosphatidyl-inositol 4-kinase) qui catalyse la transformation du phosphatidyl-inositol en phosphatidyl-inositol-4-phosphate (PI4P). Le PI4P est un important second messenger cellulaire impliqué dans de nombreuses voies cellulaires. Cette protéine étant exprimée à tous les stades parasitaires retrouvés chez l'Homme, les inhibiteurs de PfPI4K sont capables d'agir sur tous les stades parasitaires.²²⁴ Bien que ce composé soit arrivé à la phase II des essais cliniques,²²⁵ son développement fut stoppé à cause de la tératogénicité observée sur modèle animal.²²⁶

4.1.7. DSM265

Le composé DSM265 est une triazolopyrimidine développée par les laboratoires Takeda avec le MMV. Le screening d'une chimiothèque de 220 000 composés, en 2008, sur la dihydroorotate deshydrogénase plasmodiale (PfdHODH) a permis d'isoler le noyau triazolopyrimidine comme structure d'intérêt.²²⁷ PfdHODH est une protéine intervenant dans la biosynthèse des pyrimidines, plus particulièrement sur l'oxydation du dihydroorotate en orotate, voie métabolique essentielle pour le parasite. Bien que le hit initial possède des valeurs biologiques *in vitro* très intéressantes, celui-ci est inactif *in vivo* sur modèle murin infecté par *P. berghei*.²²⁸ Les différentes pharmacomodulations, guidées par des études *in silico* sur PfdHODH ainsi que HsDHODH,²²⁹ ont abouti au DSM265 (**Schéma 12**).^{228, 230} Celui-ci

Shackleford, D.M.; Mannila, J.; Morizzi, J.; Scheurer, C.; Angulo-Barturen, I.; Martínez, M.S.; Ferrer, S.; Sanz, L.M.; Gamo, F.J.; Reader, J.; Botha, M.; Dechering, K.J.; Sauerwein, R.W.; Tungtaeng, A.; Vanachayangkul, P.; Lim, C.S.; Burrows, J.; Witty, M.J.; Marsh, K.C.; Bodenreider, C.; Rochford, R.; Solapure, S.M.; Jiménez-Díaz, M.B.; Wittlin, S.; Charman, S.A.; Donini, C.; Campo, B.; Birkholtz, L.-M.; Hanson, K.K.; Drewes, G.; Kocken, C.H.M.; Delves, M.J.; Leroy, D.; Fidock, D.A.; Waterson, D.; Street, L.J.; Chibale, K. Antimalarial Efficacy of MMV390048, an Inhibitor of *Plasmodium* Phosphatidylinositol 4-Kinase. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaad9735, doi:[10/gmt59v](https://doi.org/10.1093/gmt/59v).

²²⁴ McNamara, C.W.; Lee, M.C.S.; Lim, C.S.; Lim, S.H.; Roland, J.; Nagle, A.; Simon, O.; Yeung, B.K.S.; Chatterjee, A.K.; McCormack, S.L.; Manary, M.J.; Zeeman, A.-M.; Dechering, K.J.; Kumar, T.R.S.; Henrich, P.P.; Gagaring, K.; Ibanez, M.; Kato, N.; Kuhen, K.L.; Fischli, C.; Rottmann, M.; Plouffe, D.M.; Bursulaya, B.; Meister, S.; Rameh, L.; Trappe, J.; Haasen, D.; Timmerman, M.; Sauerwein, R.W.; Suwanarusk, R.; Russell, B.; Renia, L.; Nosten, F.; Tully, D.C.; Kocken, C.H.M.; Glynn, R.J.; Bodenreider, C.; Fidock, D.A.; Diagana, T.T.; Winzeler, E.A. Targeting *Plasmodium* PI(4)K to Eliminate Malaria. *Nature* **2013**, *504*, 248–253, doi:[10/f5jc7m](https://doi.org/10.1038/nature12101).

²²⁵ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02880241> (consulté le 27/09/21)

²²⁶ Medicines for Malaria Venture. *Annual report 2020*, 2021. <https://www.mmv.org/newsroom/publications/annual-report-2020> (consulté le 27/09/21)

²²⁷ Phillips, M.A.; Gujjar, R.; Malmquist, N.A.; White, J.; El Mazouni, F.; Baldwin, J.; Rathod, P.K. Triazolopyrimidine-Based Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Potent and Selective Activity against the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3649–3653, doi:[10/cp09g9j](https://doi.org/10.1021/cp09g9j).

²²⁸ Gujjar, R.; Marwaha, A.; El Mazouni, F.; White, J.; White, K.L.; Creason, S.; Shackleford, D.M.; Baldwin, J.; Charman, W.N.; Buckner, F.S.; Charman, S.; Rathod, P.K.; Phillips, M.A. Identification of a Metabolically Stable Triazolopyrimidine-Based Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor with Antimalarial Activity in Mice. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1864–1872, doi:[10/bz034s](https://doi.org/10.1021/bz034s).

²²⁹ Deng, X.; Kokkonda, S.; El Mazouni, F.; White, J.; Burrows, J.N.; Kaminsky, W.; Charman, S.A.; Matthews, D.; Rathod, P.K.; Phillips, M.A. Fluorine Modulates Species Selectivity in the Triazolopyrimidine Class of *Plasmodium Falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5381–5394, doi:[10/f58q95](https://doi.org/10.1021/f58q95).

²³⁰ Gujjar, R.; El Mazouni, F.; White, K.L.; White, J.; Creason, S.; Shackleford, D.M.; Deng, X.; Charman, W.N.; Bathurst, I.; Burrows, J.; Floyd, D.M.; Matthews, D.; Buckner, F.S.; Charman, S.A.; Phillips, M.A.; Rathod, P.K. Lead Optimization of Aryl and Aralkyl Amine-Based Triazolopyrimidine Inhibitors of *Plasmodium Falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase with Antimalarial Activity in Mice. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3935–3949, doi:[10/c93cf2](https://doi.org/10.1021/c93cf2).

est actif sur les stades sanguins et hépatiques du paludisme (ainsi que faiblement sur les stades sexués), sélectif de la protéine plasmodiale, non mutagène, non génotoxique et stable métaboliquement.²³¹

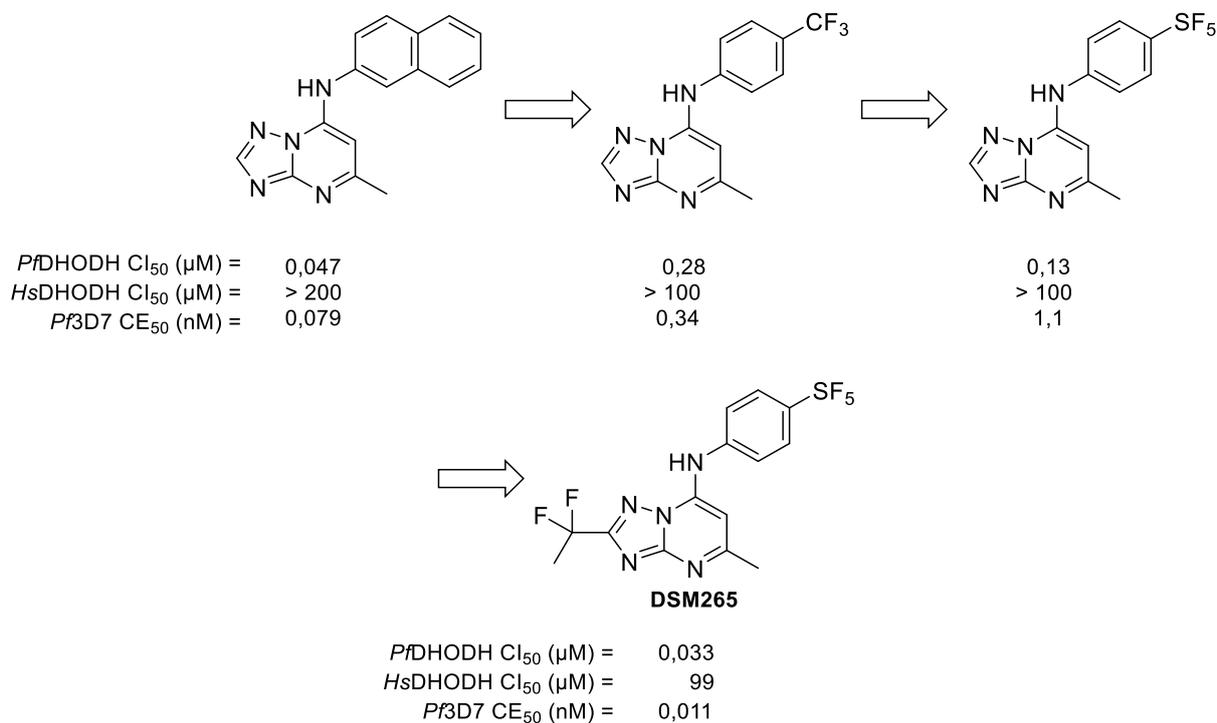


Schéma 12. Evolution de la structure des hits menant au DSM265.

Après plusieurs essais cliniques de phase I,²³² notamment pour étudier son potentiel en chimioprophylaxie,²³³ les essais cliniques de phase II ont commencé à montrer la limite de ce composé : il permet trop facilement l'apparition de résistances avec des parasites encore présents chez des patients 25 jours après le traitement.²³⁴ Le devenir de ce composé est donc incertain puisqu'il ne figure plus sur le portfolio de composés du MMV¹⁹¹ mais un récent essai

²³¹ Phillips, M.A.; Lotharius, J.; Marsh, K.; White, J.; Dayan, A.; White, K.L.; Njoroge, J.W.; El Mazouni, F.; Lao, Y.; Kokkonda, S.; Tomchick, D.R.; Deng, X.; Laird, T.; Bhatia, S.N.; March, S.; Ng, C.L.; Fidock, D.A.; Wittlin, S.; Lafuente-Monasterio, M.; Benito, F.J.G.; Alonso, L.M.S.; Martinez, M.S.; Jimenez-Diaz, M.B.; Bazaga, S.F.; Angulo-Barturen, I.; Haselden, J.N.; Louttit, J.; Cui, Y.; Sridhar, A.; Zeeman, A.-M.; Kocken, C.; Sauerwein, R.; Decherig, K.; Avery, V.M.; Duffy, S.; Delves, M.; Sinden, R.; Ruecker, A.; Wickham, K.S.; Rochford, R.; Gahagen, J.; Iyer, L.; Riccio, E.; Mirsalis, J.; Bathhurst, I.; Rueckle, T.; Ding, X.; Campo, B.; Leroy, D.; Rogers, M.J.; Rathod, P.K.; Burrows, J.N.; Charman, S.A. A Long-Duration Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor (DSM265) for Prevention and Treatment of Malaria. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 296ra111-296ra111, doi:[10/gmvksp](https://doi.org/10/gmvksp).

²³² *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=DSM265&phase=0> (consulté le 27/09/21).

²³³ Sulyok, M.; Rückle, T.; Roth, A.; Mürbeth, R.E.; Chalon, S.; Kerr, N.; Samec, S.S.; Gobeau, N.; Calle, C.L.; Ibáñez, J.; Sulyok, Z.; Held, J.; Gebru, T.; Granados, P.; Brückner, S.; Nguetse, C.; Mengue, J.; Lalremruata, A.; Sim, B.K.L.; Hoffman, S.L.; Möhrle, J.J.; Kreamer, P.G.; Mordmüller, B. DSM265 for Plasmodium Falciparum Chemoprophylaxis: A Randomised, Double Blinded, Phase 1 Trial with Controlled Human Malaria Infection. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 636–644, doi:[10/gbgnpq](https://doi.org/10/gbgnpq).

²³⁴ Llanos-Cuentas, A.; Casapia, M.; Chuquiyaury, R.; Hinojosa, J.-C.; Kerr, N.; Rosario, M.; Toovey, S.; Arch, R.H.; Phillips, M.A.; Rozenberg, F.D.; Bath, J.; Ng, C.L.; Cowell, A.N.; Winzeler, E.A.; Fidock, D.A.; Baker, M.; Möhrle, J.J.; Hooft van Huijsdijnen, R.; Gobeau, N.; Araeipour, N.; Andenmatten, N.; Rückle, T.; Duparc, S. Antimalarial Activity of Single-Dose DSM265, a Novel Plasmodium Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor, in Patients with Uncomplicated Plasmodium Falciparum or Plasmodium Vivax Malaria Infection: A Proof-of-Concept, Open-Label, Phase 2a Study. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 874–883, doi:[10/gdwn83](https://doi.org/10/gdwn83).

clinique de phase II combinant DSM265 et artéfénomel a montré des résultats encourageants.²²¹

4.2. Molécules en phase I des essais cliniques

On retrouve 5 molécules en essais cliniques de phase I (**Figure 35**) : P218, ZY19489, ACT-451840, M5717 et MMV533. Concernant cette dernière molécule, les seules données disponibles sur ce projet piloté par Sanofi et le MMV sont les quelques informations données par le MMV sur son portfolio et la structure n'a pas été dévoilée.²³⁵

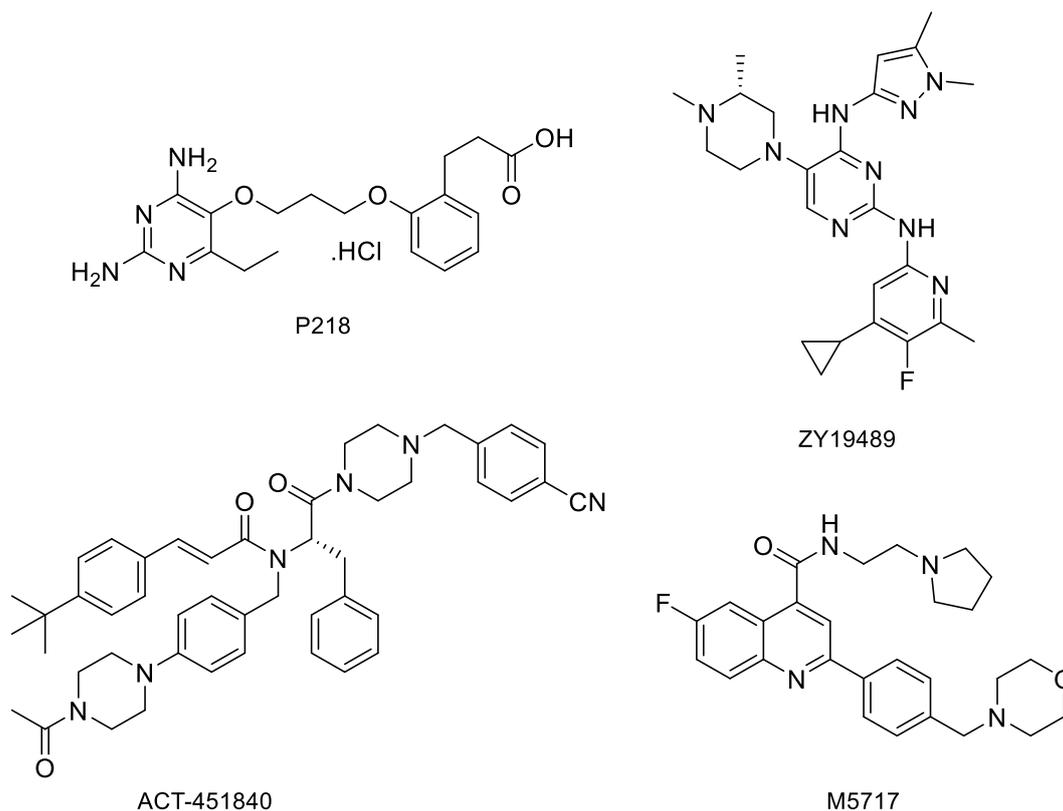


Figure 35. Composés en phase I des essais cliniques contre le paludisme.

4.2.1. P218

Le composé P218 est un chlorhydrate d'une 2,4-diaminopyrimidine (comme la pyriméthamine) développée par BIOTEC (Thaïlande) et le MMV. Ce composé décrit en 2012 diffère de la pyriméthamine par sa chaîne latérale qui donne à P218 une structure plus proche de l'acide tétrahydrofolique (substrat de la DHFR) que la pyriméthamine. Cette modification structurale rend le composé P218 actif sur les souches de *Plasmodium* résistantes à la

²³⁵ Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/node/13853/overlay> (consulté le 27/09/21)

pyriméthamine (*Pf*DHFR multiplement mutée),²³⁶ ce qui a été confirmé par la suite sur des tests ex-vivo d'isolats parasitaires (**Figure 36**).²³⁷

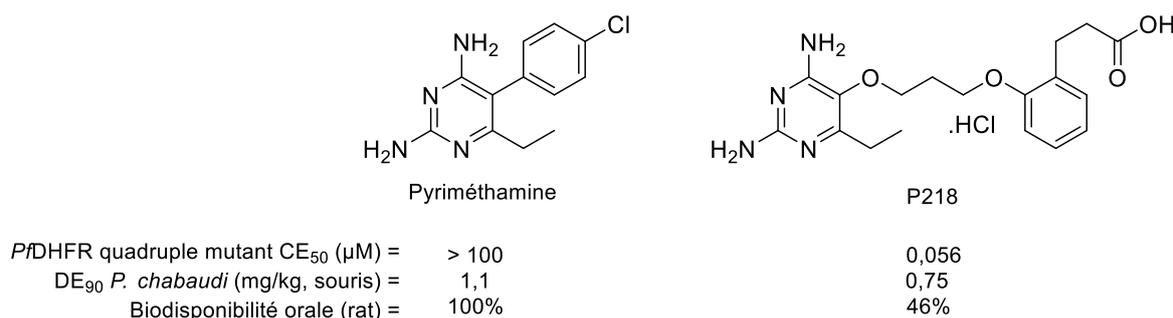


Figure 36. Comparaisons entre la pyriméthamine et P218.

Bien que les premiers essais cliniques de phase I aient démontré la sécurité de la molécule chez les patients²³⁸ ainsi qu'une excellente efficacité,²³⁹ la demi-vie de P218 est apparue trop faible (11 heures) pour pouvoir être utilisée pour la chimioprophylaxie dans les pays endémiques. Aucune formulation longue-durée n'a pu être développée ce qui a conduit à l'arrêt du développement de la molécule.²²⁶

4.2.2. ZY19489

Le composé ZY19489 est une triaminopyrimidine développée par AstraZeneca et le MMV depuis 2015.²⁴⁰ Les pharmacomodulations du hit issu d'un screening ont abouti à une molécule capable de tuer rapidement les parasites au stade sanguin et active *in vivo* sur modèle murin (**Schéma 13**). Une demi-vie de 36 heures et une dose requise de 260 mg ont

²³⁶ Yuthavong, Y.; Tarnchompoo, B.; Vilaivan, T.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Charman, S.A.; McLennan, D.N.; White, K.L.; Vivas, L.; Bongard, E.; Thongphanchang, C.; Taweetchai, S.; Vanichthanankul, J.; Rattanajak, R.; Arwon, U.; Fantauzzi, P.; Yuvaniyama, J.; Charman, W.N.; Matthews, D. Malarial Dihydrofolate Reductase as a Paradigm for Drug Development against a Resistance-Compromised Target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 16823–16828, doi:[10/f39gm3](https://doi.org/10/f39gm3).

²³⁷ Kreuzfeld, O.; Tumwebaze, P.K.; Byaruhanga, O.; Katairo, T.; Okitwi, M.; Orena, S.; Rasmussen, S.A.; Legac, J.; Conrad, M.D.; Nsobya, S.L.; Aydemir, O.; Bailey, J.A.; Duffey, M.; Cooper, R.A.; Rosenthal, P.J. Decreased Susceptibility to Dihydrofolate Reductase Inhibitors Associated with Genetic Polymorphisms in Ugandan *Plasmodium Falciparum* Isolates. *J. Infect. Dis.* **2021**, *jjab435*, doi:[10/gmvwfk](https://doi.org/10/gmvwfk).

²³⁸ Chughlay, M.F.; Rossignol, E.; Donini, C.; El Gaaloul, M.; Lorch, U.; Coates, S.; Langdon, G.; Hammond, T.; Möhrle, J.; Chalon, S. First-in-human Clinical Trial to Assess the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of P218, a Novel Candidate for Malaria Chemoprotection. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *86*, 1113–1124, doi:[10/gmvwfr](https://doi.org/10/gmvwfr).

²³⁹ Chughlay, M.F.; El Gaaloul, M.; Donini, C.; Campo, B.; Berghmans, P.-J.; Lucardie, A.; Marx, M.W.; Cherkaoui-Rbati, M.H.; Langdon, G.; Angulo-Barturen, I.; Viera, S.; Rosanas-Urgell, A.; Van Geertruyden, J.-P.; Chalon, S. Chemoprotective Antimalarial Activity of P218 against *Plasmodium Falciparum*: A Randomized, Placebo-Controlled Volunteer Infection Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2021**, *104*, 1348–1358, doi:[10/gmvwfw](https://doi.org/10/gmvwfw).

²⁴⁰ Hameed P., S.; Solapure, S.; Patil, V.; Henrich, P.P.; Magistrado, P.A.; Bharath, S.; Murugan, K.; Viswanath, P.; Puttur, J.; Srivastava, A.; Bellale, E.; Panduga, V.; Shanbag, G.; Awasthy, D.; Landge, S.; Morayya, S.; Koushik, K.; Saralaya, R.; Raichurkar, A.; Rautela, N.; Roy Choudhury, N.; Ambady, A.; Nandishaiyah, R.; Reddy, J.; Prabhakar, K.R.; Menasinakai, S.; Rudrapatna, S.; Chatterji, M.; Jiménez-Díaz, M.B.; Martínez, M.S.; Sanz, L.M.; Coburn-Flynn, O.; Fidock, D.A.; Lukens, A.K.; Wirth, D.F.; Bandodkar, B.; Mukherjee, K.; McLaughlin, R.E.; Waterson, D.; Rosenbrier-Ribeiro, L.; Hickling, K.; Balasubramanian, V.; Warner, P.; Hosagrahara, V.; Dudley, A.; Iyer, P.S.; Narayanan, S.; Kavanagh, S.; Sambandamurthy, V.K. Triaminopyrimidine Is a Fast-Killing and Long-Acting Antimalarial Clinical Candidate. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6715, doi:[10/f68r7c](https://doi.org/10/f68r7c).

aussi été prédites chez l'Homme. La sélection de clones résistants (par cycles d'exposition) puis le séquençage du génome de ces clones montrent que la résistance est médiée par une protéine régulant le pH du parasite. Le mécanisme d'action complet reste lui inconnu à l'heure actuelle. L'essai clinique de phase I est en cours.²²⁶

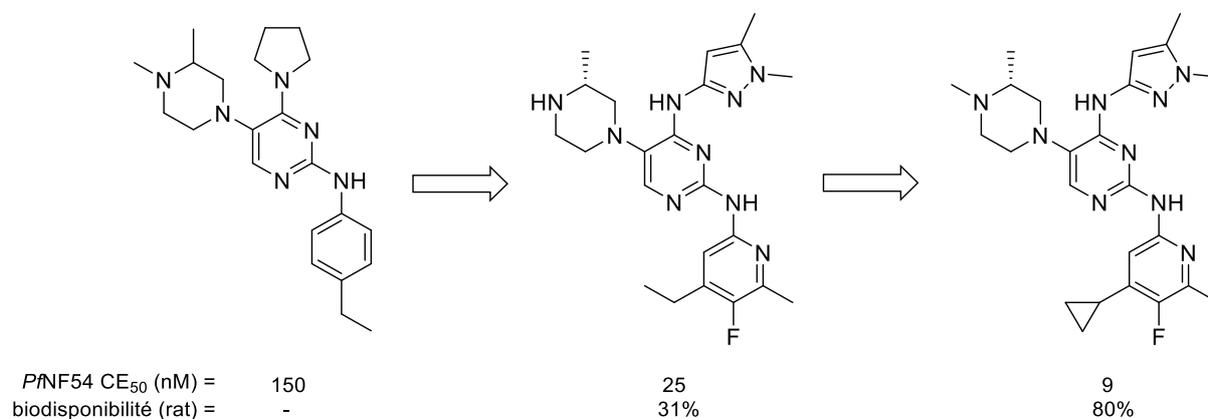


Schéma 13. Evolution de la structure des hits menant à ZY19489 (à droite).

4.2.3. ACT-451840

Le composé ACT-451840 est une molécule développée par Actelion (Suisse). Le premier composé de cette série de molécules, ACT-213615, a été décrit en 2012.²⁴¹ Ce composé possède une excellente activité sur le stade sanguin avec un mécanisme d'action, aujourd'hui toujours inconnu, et une activité *in vivo* sur modèle murin. Cette molécule est elle-même issue d'un vaste travail de pharmacomodulations sur un hit offrant de larges possibilités en termes d'exploration de la relation structure-activité.²⁴² Les travaux se sont progressivement orientés sur le composé ACT-450840 qui possède de meilleurs paramètres *in vitro* et *in vivo*.²⁴³ Ce composé a passé un essai clinique de phase I en démontrant sa tolérance et sécurité aux doses testées.²⁴⁴ Son développement clinique est en pause de par l'absence de nouveaux travaux le

²⁴¹ Brunner, R.; Aissaoui, H.; Boss, C.; Bozdech, Z.; Brun, R.; Corminboeuf, O.; Delahaye, S.; Fischli, C.; Heidmann, B.; Kaiser, M.; Kamber, J.; Meyer, S.; Papastogiannidis, P.; Siegrist, R.; Voss, T.; Welford, R.; Wittlin, S.; Binkert, C. Identification of a New Chemical Class of Antimalarials. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 735–743, doi:[10/f36wh5](https://doi.org/10/f36wh5).

²⁴² Boss, C.; Aissaoui, H.; Amaral, N.; Bauer, A.; Bazire, S.; Binkert, C.; Brun, R.; Bürki, C.; Ciana, C.-L.; Corminboeuf, O.; Delahaye, S.; Dollinger, C.; Fischli, C.; Fischli, W.; Flock, A.; Frantz, M.-C.; Girault, M.; Grisostomi, C.; Friedli, A.; Heidmann, B.; Hinder, C.; Jacob, G.; Bihan, A.L.; Malrieu, S.; Mamzed, S.; Merot, A.; Meyer, S.; Peixoto, S.; Petit, N.; Siegrist, R.; Trollux, J.; Weller, T.; Wittlin, S. Discovery and Characterization of ACT-451840: An Antimalarial Drug with a Novel Mechanism of Action. *ChemMedChem* **2016**, *21*, doi:[10/f3qs3g](https://doi.org/10/f3qs3g).

²⁴³ Le Bihan, A.; de Kanter, R.; Angulo-Barturen, I.; Binkert, C.; Boss, C.; Brun, R.; Brunner, R.; Buchmann, S.; Burrows, J.; Dechering, K.J.; Delves, M.; Ewerling, S.; Ferrer, S.; Fischli, C.; Gamo-Benito, F.J.; Gnädig, N.F.; Heidmann, B.; Jiménez-Díaz, M.B.; Leroy, D.; Martínez, M.S.; Meyer, S.; Moehrle, J.J.; Ng, C.L.; Noviyanti, R.; Ruecker, A.; Sanz, L.M.; Sauerwein, R.W.; Scheurer, C.; Schleiferboeck, S.; Sinden, R.; Snyder, C.; Straimer, J.; Wirjanata, G.; Marfurt, J.; Price, R.N.; Weller, T.; Fischli, W.; Fidock, D.A.; Clozel, M.; Wittlin, S. Characterization of Novel Antimalarial Compound ACT-451840: Preclinical Assessment of Activity and Dose–Efficacy Modeling. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002138, doi:[10/f9b56t](https://doi.org/10/f9b56t).

²⁴⁴ Bruderer, S.; Hurst, N. First-in-Humans Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of ACT-451840, a New Chemical Entity with Antimalarial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 8, doi:[10/f6x5xw](https://doi.org/10/f6x5xw).

concernant, peut-être en lien avec le rachat d'Actelion par les laboratoires Johnson & Johnson en 2017.

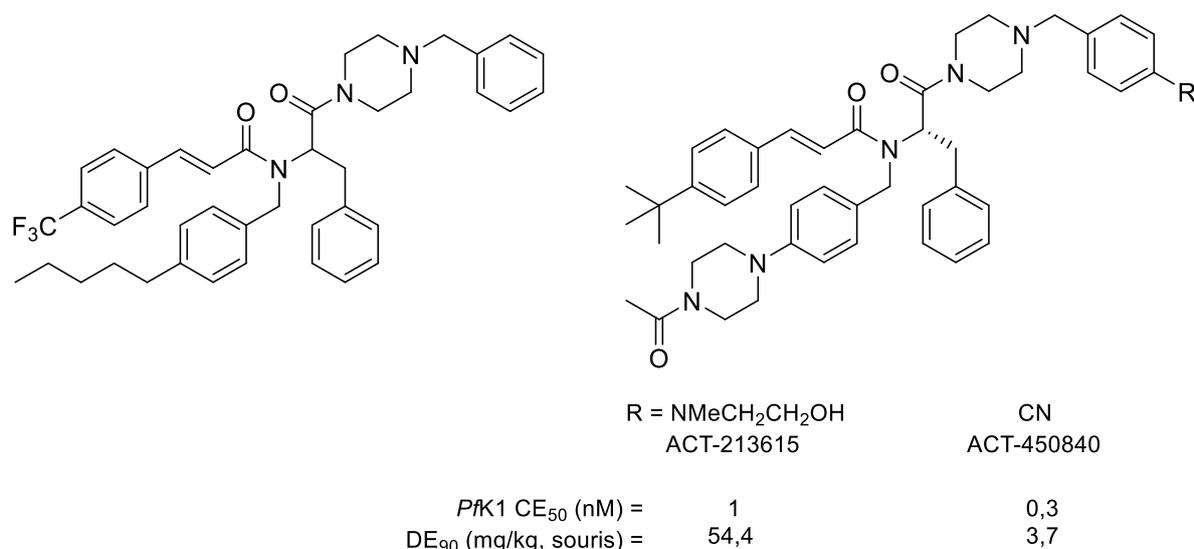


Figure 37. Structure du hit (à gauche) amenant à des candidats pré-cliniques dont ACT-450840.

4.2.4. M5717

Le composé M5717 est une 8-fluoroquinoléine initialement découverte par la *Drug Discovery Unit* de l'université de Dundee (Ecosse) et le MMV et dont le développement est aujourd'hui une collaboration entre les laboratoires Merck et le MMV. A partir d'un hit en série 8-bromoquinoléine découvert après un screening de 4 700 composés, les pharmacomodulations ont abouti au composé M5717 qui possède une activité sur tous les stades parasitaires (hépatocyttaire, érythrocytaire et gamétocytes) ainsi que la capacité de bloquer la transmission.²⁴⁵ Le mécanisme d'action de ce composé est inédit car il cible la protéine *PfeEF2*. Cette protéine joue un rôle dans la synthèse protéique puisqu'elle permet la progression du ribosome sur l'ARN messager. M5717 a été testé en préclinique en association avec la pyronaridine. Deux essais cliniques de phase I en monothérapie ont pour l'instant été

²⁴⁵ Baragaña, B.; Hallyburton, I.; Lee, M.C.S.; Norcross, N.R.; Grimaldi, R.; Otto, T.D.; Proto, W.R.; Blagborough, A.M.; Meister, S.; Wirjanata, G.; Ruecker, A.; Upton, L.M.; Abraham, T.S.; Almeida, M.J.; Pradhan, A.; Porzelle, A.; Martinez, M.S.; Bolscher, J.M.; Woodland, A.; Luksch, T.; Norval, S.; Zuccotto, F.; Thomas, J.; Simeons, F.; Stojanovski, L.; Osuna-Cabello, M.; Brock, P.M.; Churcher, T.S.; Sala, K.A.; Zakutansky, S.E.; Jiménez-Díaz, M.B.; Sanz, L.M.; Riley, J.; Basak, R.; Campbell, M.; Avery, V.M.; Sauerwein, R.W.; Decherig, K.J.; Noviyanti, R.; Campo, B.; Frearson, J.A.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer-Bazaga, S.; Gamo, F.J.; Wyatt, P.G.; Leroy, D.; Siegl, P.; Delves, M.J.; Kyle, D.E.; Wittlin, S.; Marfurt, J.; Price, R.N.; Sinden, R.E.; Winzeler, E.A.; Charman, S.A.; Bebrevska, L.; Gray, D.W.; Campbell, S.; Fairlamb, A.H.; Willis, P.A.; Rayner, J.C.; Fidock, D.A.; Read, K.D.; Gilbert, I.H. A Novel Multiple-Stage Antimalarial Agent That Inhibits Protein Synthesis. *Nature* **2015**, *522*, 315–320, doi:[10/f7gstk](https://doi.org/10/f7gstk).

réalisés et leurs résultats sont attendus avant d'envisager des essais de phase II en combinaison avec d'autres molécules.²⁴⁶

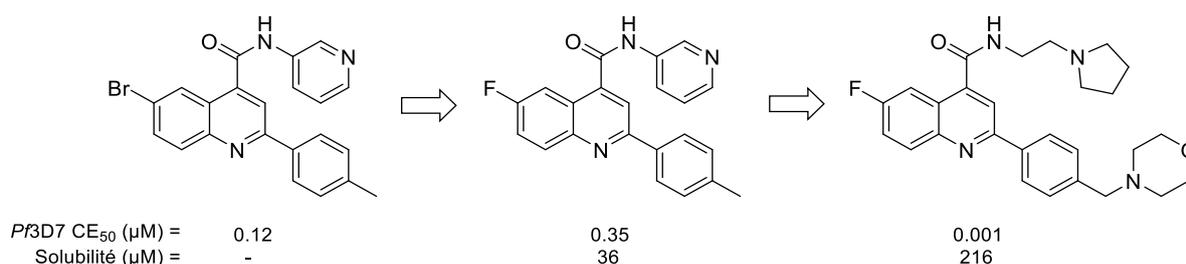


Schéma 14. Evolution de la structure des hits menant à M5717 (à droite).

4.3. Molécules au stade préclinique

De multiples composés sont actuellement au stade préclinique (**Figure 38**) parmi lesquels on peut citer :

- UCT493 : dérivé du composé MMV048 avec une activité améliorée sur tous les stades parasites par rapport à celui-ci et de meilleurs paramètres pharmacologiques.²⁴⁷ Il reste cependant à déterminer si ce composé possède lui aussi un risque de tératogénicité.
- BRD7929 : ce diazabicyclodécane est actif sur tous les stades parasites *in vivo* sur modèle murin mais une cytotoxicité hépatique a été relevée.²⁴⁸ Ce composé agit sur une nouvelle cible : *Pf*PheRS (phénylalanine-tRNA transférase). Cette protéine fait partie des aminoacyl-tARN transférases, protéines greffant par estérification un acide aminé à l'extrémité d'un ARN de transfert. Cet ARN de transfert sert à transporter un acide aminé (la phénylalanine dans le cas de *Pf*PheRS) jusqu'aux ribosomes où il servira durant la synthèse peptidique.

²⁴⁶ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=M5717> (consulté le 27/09/21)

²⁴⁷ Brunshwig, C.; Lawrence, N.; Taylor, D.; Abay, E.; Njoroge, M.; Basarab, G.S.; Le Manach, C.; Paquet, T.; Cabrera, D.G.; Nchinda, A.T.; de Kock, C.; Wiesner, L.; Denti, P.; Waterson, D.; Blasco, B.; Leroy, D.; Witty, M.J.; Donini, C.; Duffy, J.; Wittlin, S.; White, K.L.; Charman, S.A.; Jiménez-Díaz, M.B.; Angulo-Barturen, I.; Herreros, E.; Gamo, F.J.; Rochford, R.; Mancama, D.; Coetzer, T.L.; van der Watt, M.E.; Reader, J.; Birkholtz, L.-M.; Marsh, K.C.; Solapure, S.M.; Burke, J.E.; McPhail, J.A.; Vanaerschot, M.; Fidock, D.A.; Fish, P.V.; Siegl, P.; Smith, D.A.; Wirjanata, G.; Noviyanti, R.; Price, R.N.; Marfurt, J.; Silue, K.D.; Street, L.J.; Chibale, K. UCT943, a Next-Generation Plasmodium Falciparum PI4K Inhibitor Preclinical Candidate for the Treatment of Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, doi:[10/gd7knv](https://doi.org/10/gd7knv).

²⁴⁸ Kato, N.; Comer, E.; Sakata-Kato, T.; Sharma, A.; Sharma, M.; Maetani, M.; Bastien, J.; Brancucci, N.M.; Bittker, J.A.; Corey, V.; Clarke, D.; Derbyshire, E.R.; Dornan, G.L.; Duffy, S.; Eckley, S.; Itoe, M.A.; Koolen, K.M.J.; Lewis, T.A.; Lui, P.S.; Lukens, A.K.; Lund, E.; March, S.; Meibalan, E.; Meier, B.C.; McPhail, J.A.; Mitasev, B.; Moss, E.L.; Sayes, M.; Van Gessel, Y.; Wawer, M.J.; Yoshinaga, T.; Zeeman, A.-M.; Avery, V.M.; Bhatia, S.N.; Burke, J.E.; Catteruccia, F.; Clardy, J.C.; Clemons, P.A.; Dechering, K.J.; Duvall, J.R.; Foley, M.A.; Gusovsky, F.; Kocken, C.H.M.; Marti, M.; Morningstar, M.L.; Munoz, B.; Neafsey, D.E.; Sharma, A.; Winzeler, E.A.; Wirth, D.F.; Scherer, C.A.; Schreiber, S.L. Diversity-Oriented Synthesis Yields Novel Multistage Antimalarial Inhibitors. *Nature* **2016**, *538*, 344–349, doi:[10/f89mdn](https://doi.org/10/f89mdn).

- MMV646 (JPC-3210) : ce 2-aminométhylphénol est actif contre le stade érythrocytaire avec un profil pharmacocinétique favorable et une faible sélection de résistances.^{249,250} Une étude protéomique a permis de déterminer que ce composé possède un mécanisme d'action similaire à la méfloquine mais est cependant actif sur les souches résistantes à celle-ci.²⁵¹
- ELQ-300 : pour *Endochin-Like Quinolone*, est un analogue de l'endochine, molécule antipaludique développée dans les années 40. Ce composé est actif sur tous les stades du paludisme et possède la même cible que l'atovaquone, le cytochrome bc₁.²⁵² Le développement s'oriente actuellement sur une prodrogue, ELQ-331, à des fins de chimioprophylaxie de longue durée.²⁵³ Un composé de la même famille, ELQ-400, est, quant à lui, étudié pour traiter la toxoplasmose.²⁵⁴
- E209 : ce composé est issu d'un compromis structural entre l'artéfénomel et le tétraoxane RKA182²⁵⁵ mais le composé obtenu a montré des paramètres inférieurs à l'artéfénomel. Des pharmacomodulations ont abouti au composé E209 avec des paramètres biologiques et pharmacocinétiques comparables à l'artéfénomel ainsi qu'une activité conservée sur une souche kelch13 mutante (C580Y).²⁵⁶

²⁴⁹ Chavchich, M.; Birrell, G.W.; Ager, A.L.; MacKenzie, D.O.; Heffernan, G.D.; Schiehser, G.A.; Jacobus, L.R.; Shanks, G.D.; Jacobus, D.P.; Edstein, M.D. Lead Selection of a New Aminomethylphenol, JPC-3210, for Malaria Treatment and Prevention. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 3115–3118, doi:[10/gmwrjn](https://doi.org/10/gmwrjn).

²⁵⁰ Birrell, G.W.; Heffernan, G.D.; Schiehser, G.A.; Anderson, J.; Ager, A.L.; Morales, P.; MacKenzie, D.; van Breda, K.; Chavchich, M.; Jacobus, L.R.; Shanks, G.D.; Jacobus, D.P.; Edstein, M.D. Characterization of the Preclinical Pharmacology of the New 2-Aminomethylphenol, JPC-3210, for Malaria Treatment and Prevention. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, doi:[10/gdbrf2](https://doi.org/10/gdbrf2).

²⁵¹ Birrell, G.W.; Challis, M.P.; De Paoli, A.; Anderson, D.; Devine, S.M.; Heffernan, G.D.; Jacobus, D.P.; Edstein, M.D.; Siddiqui, G.; Creek, D.J. Multi-Omic Characterization of the Mode of Action of a Potent New Antimalarial Compound, JPC-3210, Against Plasmodium Falciparum. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, *19*, 308–325, doi:[10/gmwrjs](https://doi.org/10/gmwrjs).

²⁵² Nilsen, A.; LaCrue, A.N.; White, K.L.; Forquer, I.P.; Cross, R.M.; Marfurt, J.; Mather, M.W.; Delves, M.J.; Shackleford, D.M.; Saenz, F.E.; Morrisey, J.M.; Steuten, J.; Mutka, T.; Li, Y.; Wirjanata, G.; Ryan, E.; Duffy, S.; Kelly, J.X.; Sebayang, B.F.; Zeeman, A.-M.; Noviyanti, R.; Sinden, R.E.; Kocken, C.H.M.; Price, R.N.; Avery, V.M.; Angulo-Barturen, I.; Jimenez-Díaz, M.B.; Ferrer, S.; Herreros, E.; Sanz, L.M.; Gamo, F.-J.; Bathurst, I.; Burrows, J.N.; Siegl, P.; Guy, R.K.; Winter, R.W.; Vaidya, A.B.; Charman, S.A.; Kyle, D.E.; Manetsch, R.; Riscoe, M.K. Quinolone-3-Diarylethers: A New Class of Antimalarial Drug. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 177ra37-177ra37, doi:[10/kwk](https://doi.org/10/kwk).

²⁵³ Smilkstein, M.J.; Pou, S.; Krollenbrock, A.; Bleyle, L.A.; Dodean, R.A.; Frueh, L.; Hinrichs, D.J.; Li, Y.; Martinson, T.; Munar, M.Y.; Winter, R.W.; Bruzual, I.; Whiteside, S.; Nilsen, A.; Koop, D.R.; Kelly, J.X.; Kappe, S.H.I.; Wilder, B.K.; Riscoe, M.K. ELQ-331 as a Prototype for Extremely Durable Chemoprotection against Malaria. *Malar. J.* **2019**, *18*, 291, doi:[10/gmwp47](https://doi.org/10/gmwp47).

²⁵⁴ McConnell, E.V.; Bruzual, I.; Pou, S.; Winter, R.; Dodean, R.A.; Smilkstein, M.J.; Krollenbrock, A.; Nilsen, A.; Zakharov, L.N.; Riscoe, M.K.; Doggett, J.S. Targeted Structure–Activity Analysis of Endochin-like Quinolones Reveals Potent Qi and Qo Site Inhibitors of *Toxoplasma Gondii* and *Plasmodium Falciparum* Cytochrome Bc₁ and Identifies ELQ-400 as a Remarkably Effective Compound against Acute Experimental Toxoplasmosis. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 1574–1584, doi:[10/gmwp5c](https://doi.org/10/gmwp5c).

²⁵⁵ O'Neill, P.M.; Amewu, R.K.; Nixon, G.L.; Bousejra ElGarah, F.; Mungthin, M.; Chadwick, J.; Shone, A.E.; Vivas, L.; Lander, H.; Barton, V.; Muangnoicharoen, S.; Bray, P.G.; Davies, J.; Park, B.K.; Wittlin, S.; Brun, R.; Preschel, M.; Zhang, K.; Ward, S.A. Identification of a 1,2,4,5-Tetraoxane Antimalarial Drug-Development Candidate (RKA 182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 5693–5697, doi:[10/c5fpwx](https://doi.org/10/c5fpwx).

²⁵⁶ O'Neill, P.M.; Amewu, R.K.; Charman, S.A.; Sabbani, S.; Gnädig, N.F.; Straimer, J.; Fidock, D.A.; Shore, E.R.; Roberts, N.L.; Wong, M.H.-L.; Hong, W.D.; Pidathala, C.; Riley, C.; Murphy, B.; Aljayyousi, G.; Gamo, F.J.; Sanz, L.; Rodrigues, J.; Cortes, C.G.; Herreros, E.; Angulo-Barturen, I.; Jiménez-Díaz, M.B.; Bazaga, S.F.; Martínez-Martínez, M.S.; Campo, B.; Sharma, R.; Ryan, E.; Shackleford, D.M.; Campbell, S.; Smith, D.A.; Wirjanata, G.; Noviyanti, R.; Price, R.N.; Marfurt, J.; Palmer, M.J.; Copple, I.M.; Mercer, A.E.; Ruecker, A.; Delves, M.J.; Sinden, R.E.; Siegl, P.; Davies, J.; Rochford, R.; Kocken, C.H.M.; Zeeman, A.-M.; Nixon, G.L.; Biagini, G.A.; Ward, S.A. A Tetraoxane-Based Antimalarial Drug Candidate That Overcomes Pfk13-C580Y Dependent Artemisinin Resistance. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15159, doi:[10/f9739d](https://doi.org/10/f9739d).

- SC83288 : Actif sur le stade sanguin et les premiers stades gamétocytaires, ce composé possède un mécanisme d'action inconnu malgré l'identification de gènes mutés sur des clones sélectionnés *in vitro*.²⁵⁷
- GSK701 : ce composé actif sur les stades sanguin et hépatique possède une nouvelle cible protéique : *PfAcAS* (Acétyl-CoenzymeA synthétase), qui catalyse l'acétylation du coenzyme A avec l'aide d'ATP. Seuls un brevet et les données du MMV sont disponibles pour ce composé.^{258, 259}

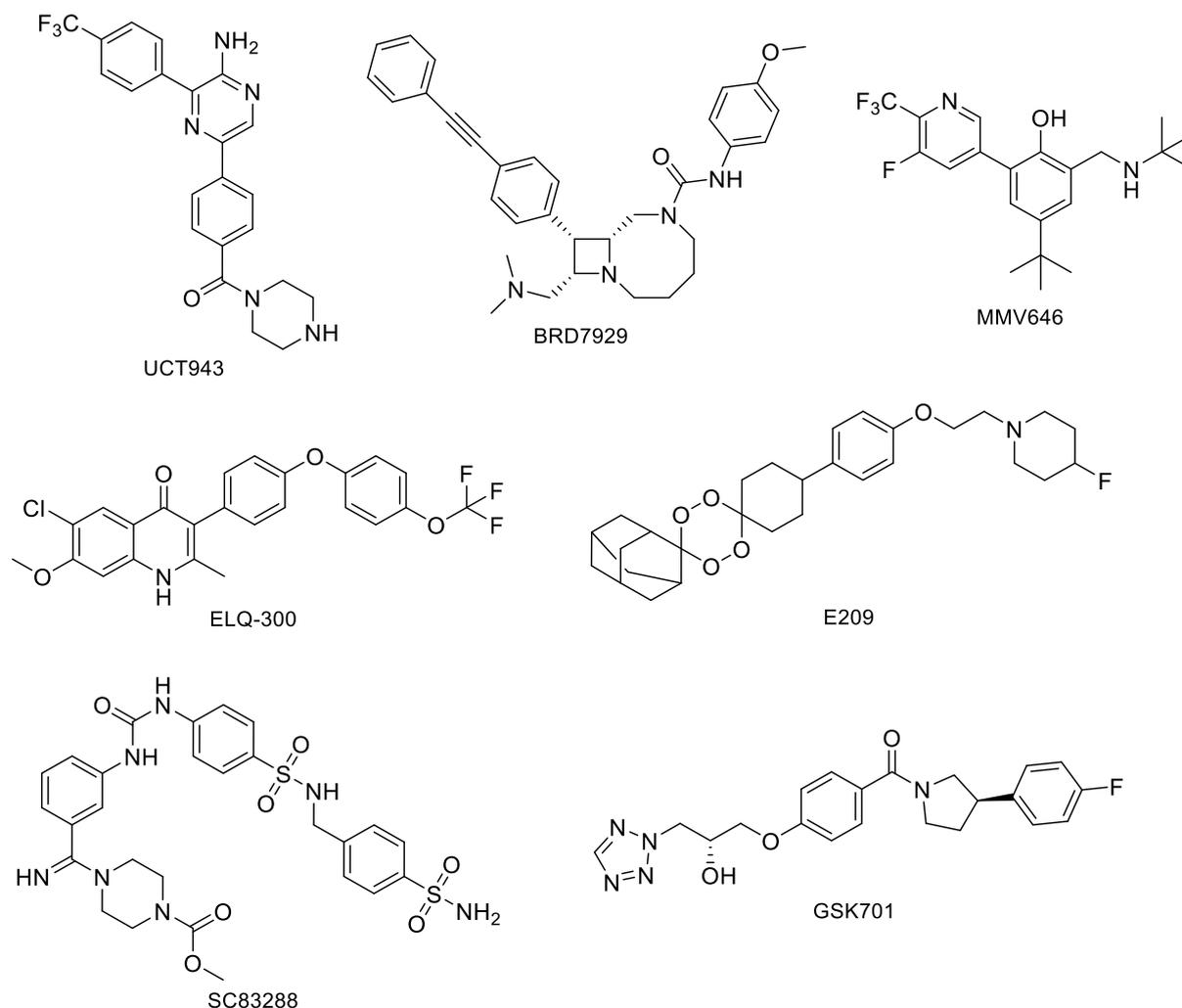


Figure 38. Structures chimiques de composés au stade préclinique contre le paludisme.

²⁵⁷ Pegoraro, S.; Duffey, M.; Otto, T.D.; Wang, Y.; Rösemann, R.; Baumgartner, R.; Fehler, S.K.; Lucantoni, L.; Avery, V.M.; Moreno-Sabater, A.; Mazier, D.; Vial, H.J.; Strobl, S.; Sanchez, C.P.; Lanzer, M. SC83288 Is a Clinical Development Candidate for the Treatment of Severe Malaria. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14193, doi:[10/f9n489](https://doi.org/10/f9n489).

²⁵⁸ Castellote Alvaro, M.I.; Leon Diaz, M.L.; Martin Hernando, J.I. Novel compounds for the treatment of parasitic infections. WO2019145360A1, 2019.

²⁵⁹ Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/node/14221/overlay> (consulté le 29/09/21).

4.4. Cibles plasmodiales d'intérêt

L'identification de nouvelles cibles d'intérêt est un élément clé dans la découverte de nouveaux composés antipaludiques. Cependant, au fur et à mesure du développement des composés, des cibles prometteuses peuvent perdre de leur intérêt soit parce qu'un composé est proche d'arriver sur le marché ou soit la cible ne se révèle pas si intéressante une fois les essais précliniques ou cliniques effectués. Le **Tableau 13** rassemble les différentes cibles antiplasmodiales actuellement explorées ainsi que leur niveau d'intérêt actuel. Cette classification se base sur les données issues du *Malaria Drug Accelerator* (MaIDA).²⁶⁰

Tableau 13. Liste des cibles moléculaires selon leur intérêt pour développer de nouveaux candidats médicaments. D'après Forte *et al.*²⁶⁰

Cibles d'intérêt limité	Cibles dont l'intérêt est à évaluer	Cibles d'intérêt majeur
NMT, ATP4, plasmepsine X, NCR1, DHFR, DHODH, PI4K	SerRS, V-Type H ⁺ ATPase, HSP90, Ac β , GCN5, PDE β , APP, CysRS, HT	CLK3, PKG, F/GGPPS, PheRS, ProRS, AcAS, cIRS

Afin de découvrir de nouvelles séries chimiques avec des activités antiplasmodiales, il est impératif de réaliser des screenings de chimiothèques, soit dans un premier temps sur les différentes cibles protéiques du **Tableau 13**, ou bien directement sur une souche de *Plasmodium*.

5. Série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et activité antiplasmodiale

Le noyau thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one correspond à la fusion entre un cycle thiophène et un cycle pyrimidine possédant en position 4 une fonction carbonyle (**Schéma 15**).

²⁶⁰ Forte, B.; Otilie, S.; Plater, A.; Campo, B.; Dechering, K.J.; Gamo, F.J.; Goldberg, D.E.; Istvan, E.S.; Lee, M.; Lukens, A.K.; McNamara, C.W.; Niles, J.C.; Okombo, J.; Pasaje, C.F.A.; Siegel, M.G.; Wirth, D.; Wyllie, S.; Fidock, D.A.; Baragaña, B.; Winzeler, E.A.; Gilbert, I.H. Prioritization of Molecular Targets for Antimalarial Drug Discovery. *ACS Infect. Dis.* **2021**, acsinfecdis.1c00322, doi:[10/gmwrp8](https://doi.org/10/gmwrp8).

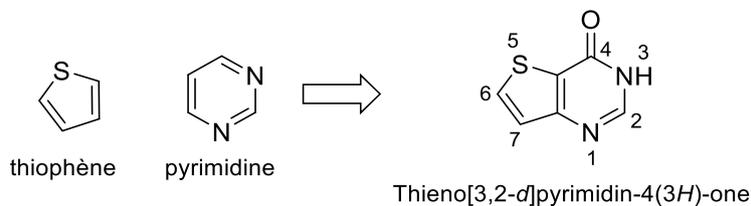


Schéma 15. Constituants et structure du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Les travaux effectués dans le cadre cette thèse se base sur le composé M1 ou chlorhydrate de 2-(*tert*-butylamino)-6-(4-méthylphényl)thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Figure 39**).

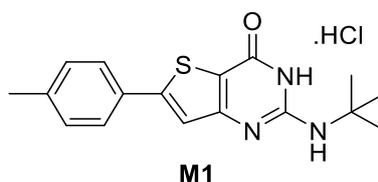
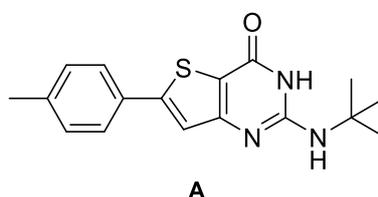


Figure 39. Structure chimique du composé M1.

5.1. Travaux aboutissants au composé M1

A l'issue du criblage de la chimiothèque du CERMN (Centre d'études et de recherche du médicament de Normandie, Caen), un composé en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4 (3*H*)-one a été identifié comme hit sur *P. falciparum*.²⁶¹ Ce hit possède une activité submicromolaire sur la souche K1 de *P. falciparum* associée à une faible cytotoxicité sur lignée cellulaire HepG2 et CHO (**Tableau 14**).

Tableau 14. Valeurs biologiques du hit A.



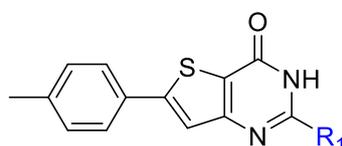
Molécule	<i>Pf</i> K1 CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)	CHO CC ₅₀ (μM)	IS (HepG2)
Hit A	0,20 ± 0,02	25,6 ± 3,1	27,5 ± 2,8	128

²⁶¹ Cohen, A.; Suzanne, P.; Lancelot, J.-C.; Verhaeghe, P.; Lesnard, A.; Basmacıyan, L.; Hutter, S.; Laget, M.; Dumètre, A.; Paloque, L.; Deharo, E.; Crozet, M.D.; Rathelot, P.; Dallemagne, P.; Lorthiois, A.; Sibley, C.H.; Vanelle, P.; Valentin, A.; Mazier, D.; Rault, S.; Azas, N. Discovery of New Thienopyrimidinone Derivatives Displaying Antimalarial Properties toward Both Erythrocytic and Hepatic Stages of *Plasmodium*. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 16–28, doi:[10/gm2n9g](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.019).

Chloroquine	0,5	30,0	155,0	60
Atovaquone	0,0013	> 15,6	-	> 12 000
Doxorubicine	-	0,2	0,6	

Trois zones susceptibles d'être modifiées ont été alors identifiées, conduisant à de nouveaux dérivés²⁶² pour réaliser une étude des relations structure-activité sur ce hit : la fonction amine en position 2, le substituant phényle en position 6 et enfin le cycle thiophène du noyau thiénoypyrimidine. 17 nouveaux composés comportant diverses amines en position 2 ont été synthétisés (**Tableau 15**). Les composés avec une fonction amine tertiaire en position 2, à l'image du composé **C** avec une *N,N*-diéthylamine, se sont montrés insoluble et donc n'ont pas été testés. L'introduction d'une amine plus longue ou plus encombrante que la *tert*-butylamine, comme la 3-pentylamine (**D**), la *n*-pentylamine (**E**) ou la phényléthylamine (**F**), a engendré une perte de l'activité sur *P. falciparum* et, dans de nombreux cas, une augmentation de la cytotoxicité. Seul le composé **C** comportant une isopropylamine sur la position 2 a montré une activité antiplasmodiale submicromolaire associée à une amélioration de la cytotoxicité par rapport au hit **A**.

Tableau 15. Valeurs biologiques des composés modulés en position 2.



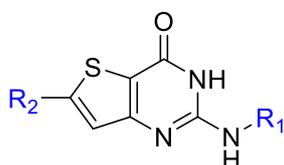
Entrée	R ₁	<i>Pfk1</i> CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)	IS
A		0,20 ± 0,02	25,6 ± 3,1	128
B		0,8 ± 0,5	49,4 ± 1,0	62
C		_a	_a	_a
D		> 5	101,3 ± 10,1	< 20
E		> 5	6,0 ± 1,1	< 1,2
F		> 5	9,2 ± 2,8	< 1,8

²⁶² Verhaeghe, P.; Cohen, A.; Rault, S.; Lesnard, A.; Lancelot, J-C.; Suzanne, P.; Azas, N. Dérivés de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, leur préparation et utilisations thérapeutiques. WO2014111666A1, 2014.

a) Composé non-testé par manque de solubilité

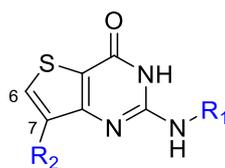
20 composés avec des modifications du cycle phényle en position 6 ont aussi été synthétisés (**Tableau 16**). Le groupement *para*-méthyle du substituant 6-phényl a été remplacé par divers atomes ou groupements : Cl, F, Br, H ou méthoxy. Ces modifications sur le cycle phényle ont été faites avec une *tert*-butylamine ou une isopropylamine en position 2 du cycle thiénopyrimidinone. Les dérivés en série isopropylamine possède en majorité une activité submicromolaire associée à une faible cytotoxicité. La position *para* du substituant est requise pour avoir la meilleure activité antiplasmodiale. L'absence du cycle phényle en position 6 entraîne la perte de l'activité antiplasmodiale.

Tableau 16. Valeurs biologiques des composés modulés en position 6.



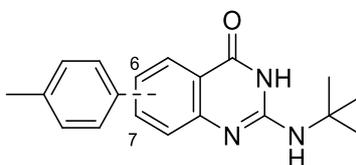
Entrée	R ₁	R ₂	<i>PfK1</i> CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)	IS
G	<i>t</i> Bu		0,8	15,0 ± 2,7	19
H	<i>i</i> Pr		0,6	> 15,6	> 26
I	<i>t</i> Bu		> 5	5,1 ± 1,0	-
J	<i>i</i> Pr		0,5	> 25	> 50
K	<i>t</i> Bu		> 5	32,3 ± 2,2	-
L	<i>i</i> Pr		0,5	27,1 ± 3,9	54
M	<i>t</i> Bu		3,6	14,1 ± 1,4	3,9
N	<i>t</i> Bu		1,7	4,0 ± 1,1	2,4
O	<i>t</i> Bu	H	> 5	8,4 ± 3,5	-

Le déplacement en position 7 du cycle phényle et non en position 6 entraîne elle-aussi une perte d'activité antiplasmodiale (**Tableau 17**).

Tableau 17. Valeurs biologiques des composés modulés en position 7.

Entrée	R ₁	R ₂	Pfk1 CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)	IS
P	tBu		> 5	1,4 ± 0,4	-
Q	iPr		2,7	8,8 ± 0,8	3,3
R	iPr		> 5	> 15,6	-
S	iPr		> 5	27,8 ± 4,1	-

Enfin, 2 composés en série quinazoline furent synthétisés pour étudier l'importance du cycle thiophène (**Tableau 18**). Ce remplacement entraîne une perte d'activité plasmodiale et une forte augmentation de la cytotoxicité.

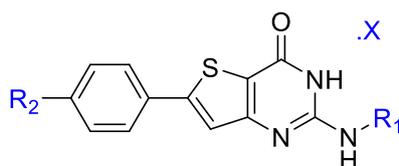
Tableau 18. Valeurs biologiques en série quinazolin-4(3H)-one.

Entrée	Position	Pfk1 CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)
T	6	> 5	0,49 ± 0,9
U	7	> 5	0,98 ± 0,6

Face aux difficultés concernant la solubilité des composés de cette série, certains ont été salifiés afin de pouvoir améliorer celle-ci (**Tableau 19**). Parmi les trois sels, tous ont montré une amélioration significative de l'activité antiplasmodiale et, le chlorhydrate du hit **A**, le composé M1 est la molécule avec la meilleure activité et le meilleur indice de sélectivité parmi tous les composés synthétisés lors de ces travaux. C'est sur ce composé que se sont focalisés les évaluations suivantes.^{261, 263}

²⁶³ Bosson-Vanga, H.; Primas, N.; Franetich, J.-F.; Lavazec, C.; Gomez, L.; Ashraf, K.; Tefit, M.; Soulard, V.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Grand, R.; Donnette, M.; Mustière, R.; Amanzougaghene, N.; Tajeri, S.; Suzanne, P.; Malzert-Fréon, A.; Rault, S.; Vanelle, P.; Hutter, S.; Cohen, A.; Snounou, G.; Roques, P.; Azas, N.; Lagardère, P.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Nguyen, M.; Paloque, L.;

Tableau 19. Influence de la salification sur les valeurs biologiques des composés.



Entrée	R ₁	R ₂	.X	Pfk1 CE ₅₀ (μM)	HepG2 CC ₅₀ (μM)	IS
A	tBu		-	0,20	25,6	128
M1	tBu		HCl	0,045	24	533
A	iPr		-	0,8	49,4	62
A _{fum}	iPr		Fumarate	0,2	26,9	135
H	tBu		-	0,8	15,0	19
H _{fum}	tBu		Fumarate	0,2	15,6	78

Ces premiers travaux de pharmacomodulation ont permis d'établir les premières données de relation structure-activité, résumées dans la **Figure 40**.

✓ Substituant en *para* :

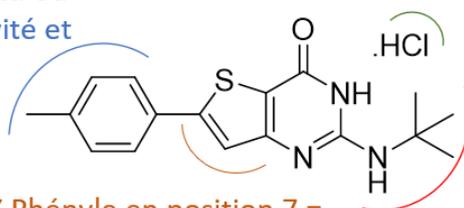
Me, F, Cl ou MeO

X Substituant en *meta* ou

ortho = perte d'activité et hausse cytotoxicité

✓ Sel de chlorhydrate ou

fumarate = amélioration de l'activité antiplasmodiale



X Phényle en position 7 = perte d'activité

X Thiophène → benzène = perte d'activité et forte cytotoxicité

✓ isopropyle ou *tert*butylamine
X amine non substituée, disubstituée ou substituant encombrant = perte d'activité et/ou solubilité

Figure 40. Données RSA à la suite des premiers travaux de pharmacomodulations.²⁶¹

5.2. Propriétés du composé M1

Sur le stade sanguin, le composé M1 possède donc une très bonne activité sur la souche multirésistante K1 (**Tableau 19**). Cette souche est résistante à la chloroquine, la pyriméthamine et la sulfadoxine. Afin de savoir si ce composé possède un intérêt contre les parasites résistants à l'artémisinine, des tests ont été réalisés sur une souche résistante, F32-ART5. Sur un test classique de sensibilité, M1 est actif sur la souche F32-ART5 (227 nM) de façon similaire à la souche parente, F32-TEM, sensible à l'artémisinine (283 nM). Cependant,

Benoit-Vical, F.; Verhaeghe, P.; Mazier, D. A New Thienopyrimidinone Chemotype Shows Multistage Activity against *Plasmodium Falciparum*, Including Artemisinin-Resistant Parasites. *Microbiol Spectr* **2021**, e00274-21, doi:[10/gm2vvp](https://doi.org/10/gm2vvp).

à cause du mécanisme de la résistance à l'artémisinine et ses dérivés, ce test ne permet aucune conclusion (cf. Chapitre 2 : 1.1.5. La résistance à l'artémisinine). Pour savoir si un composé est actif sur une souche résistante à l'artémisinine, il faut réaliser un test QSA (*Quiescent Stage Assay*). Ce test permet de déterminer l'effet d'un composé sur des parasites induits et maintenus en quiescence par le biais d'une exposition à un dérivé d'artémisinine. Le temps de retour à la parasitémie initiale est ensuite surveillé et s'il diffère significativement par rapport à un témoin, le composé est considéré comme actif sur souche résistante à l'artémisinine. Ce test a été réalisé sur M1, qui s'est montré actif sur F32-ART5 maintenu en quiescence (**Figure 41**).

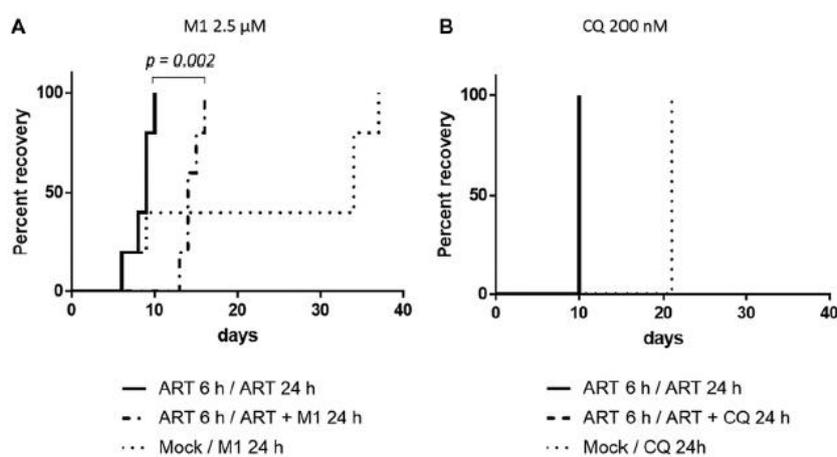


Figure 41. Résultats du test QSA sur le composé M1 (A) et de la chloroquine (B). La légende indique le détail de chaque condition : molécules et temps d'exposition. ART : dihydroartémisinine ; Mock : milieu sans composé ; CQ : chloroquine.

Un test RSA (cf. Chapitre 2 : 1.1.5. La résistance à l'artémisinine, **Figure 42**) a aussi été réalisé : aucune différence significative n'est visible entre la souche sensible et la souche résistante. Cela permet de conclure qu'il n'y a pas de résistance croisée entre M1 et l'artémisinine.

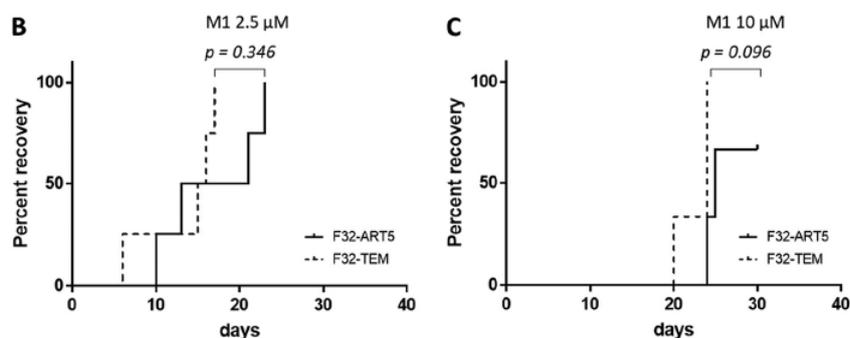


Figure 42. Résultats du test RSA sur le composé M1 à 2,5 et 10 μM.

Toujours *in vitro*, M1 a été testé sur différents modèles parasitaires pour évaluer son activité sur le stade hépatique de *Plasmodium*. Parmi les différents modèles testés (hépatocytes murins infectés par *P. yoelii*, hépatocytes simiens infectés par *P. cynomolgi* et hépatocytes humains infectés par *P. falciparum*), le composé M1 possède une activité (CE₅₀ entre 0,45 et 1,5 µM) supérieure à celle de la primaquine (CE₅₀ entre 0,6 et 2,7 µM). De plus, M1 inhibe l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (**Figure 43**). Le composé M1 possède donc des propriétés pouvant permettre son utilisation à des fins de chimioprophylaxie. En revanche, M1 n'a pas montré d'activité sur les hypnozoïtes de *P. cynomolgi*.

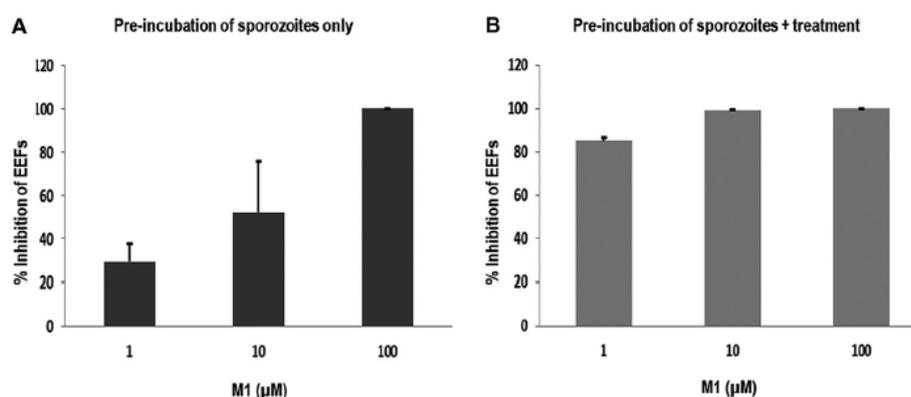


Figure 43. Effets du composé M1 sur l'invasion des hépatocytes, par des sporozoïtes, pré-incubés avec M1 à différentes concentrations pendant 1 heure. Trois heures après l'invasion des hépatocytes, la culture est rincée puis incubée avec un milieu de culture sans (A) ou avec M1 (B). La référence est la primaquine pour laquelle le pourcentage d'inhibition est de 100 % à toutes les concentrations testées. EEF : forme exo-erythrocytaire.

Des expériences ont enfin été réalisées pour évaluer l'efficacité du M1 sur les stades sexuels (**Figure 44**). A 10 µM, M1 diminue l'induction des gamétocytes de 87 % par rapport au témoin négatif. Après induction, M1 est capable de diminuer de plus de 50 % le développement des gamétocytes de stade III et V, toujours par rapport à un témoin négatif.

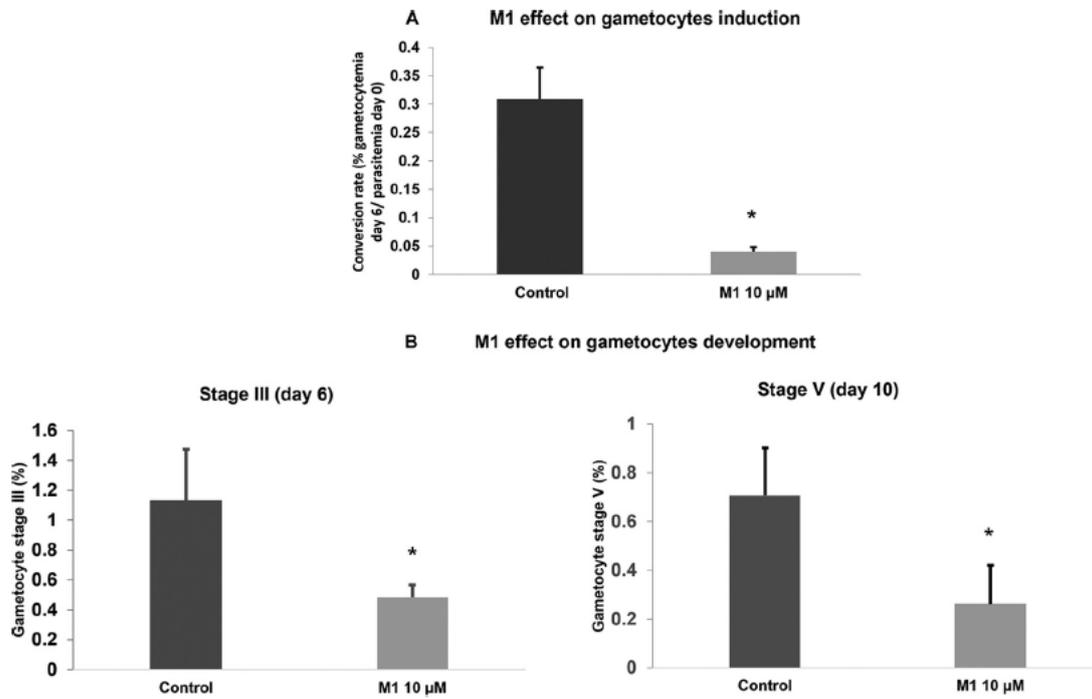


Figure 44. Effets du composé M1 sur la formation de gamétocytes (A) ainsi que sur leur développement (B). Pour les trois tests : *, *p-value* < 0,05.

Toujours à 10 μM, M1 inhibe l'exflagellation des gamétocytes mâles et donc la formation des gamètes mâles au sein du moustique (**Figure 45**).

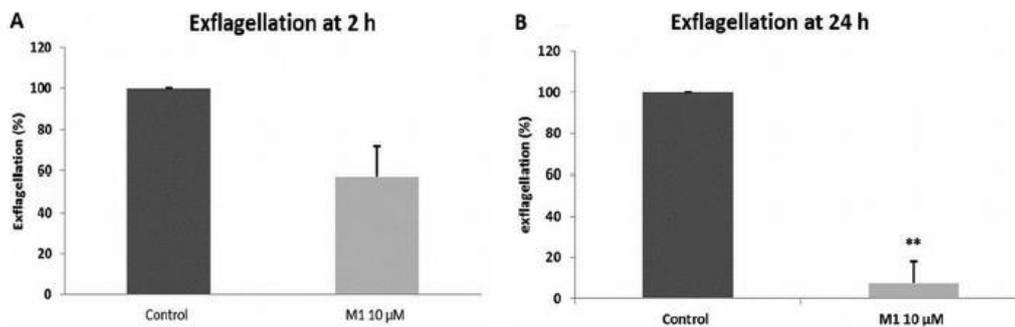


Figure 45. Effets du composé M1 sur l'exflagellation des gamétocytes mâles en gamètes mâles, après 2 heures (A) et 24 heures (B) de traitement. **, *p-value* = 0,065.

Ces effets sur le stade sexué entraînent une capacité de blocage de la transmission de l'infection de l'Homme vers le moustique par le composé M1 (**Figure 46**). Des expériences d'infection de moustiques sur des souris parasitées et traitées par M1 ont montré qu'il y a moins d'oocystes et par extension de sporozoïtes dans les moustiques.

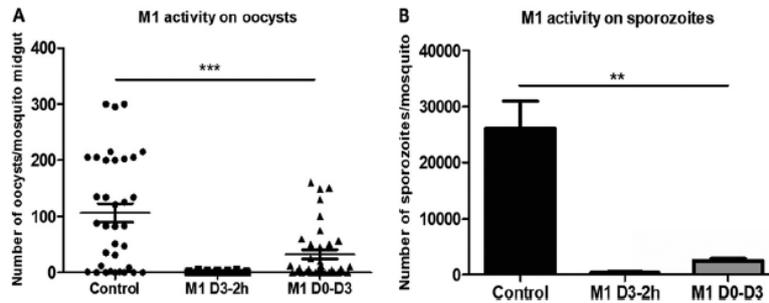


Figure 46. Effets du composé M1 sur l'infection de moustiques après un repas sanguin (à J3) sur des souris infectées et traitées par M1. M1 D0-D3 : les souris sont traitées pendant 3 jours (50 mg/kg (1 fois par jour) ; M1 D3-2h : les souris sont traitées à J3 (50 mg/kg), 2 heures avant le repas des moustiques. ***, p -value < 0,0001. **, p -value < 0,0265.

In vivo, sur modèle murin infecté par *P. berghei*, M1 a montré des résultats encourageants sur le stade sanguin. Avec une posologie de 2,5 mg/kg, 2 fois par jour pendant 4 jours, M1 a montré une réduction de 45 % de la parasitémie par rapport à des souris non traitées (4,9 % pour les souris traitées par M1 vs 9 % pour celles non traitées) ; à la même posologie, la chloroquine réduit de 85 % la parasitémie. Toujours sur ce modèle, l'activité sur stade hépatique a aussi été évaluée (par le biais de parasites exprimant une luciférase permettant une mesure par luminescence, **Figure 47**). De J-1 à J1 par rapport à l'infection par des sporozoïtes, des souris ont été traitées par M1 à 50 mg/kg (1 fois par jour). Cependant, M1 permet uniquement de limiter le temps d'apparition des parasites dans le sang (à J4) par rapport au témoin positif primaquine (J3). L'activité du composé M1 apparait pleinement lorsqu'un inhibiteur des CYP450, le 1-aminobenzotriazole, est administré simultanément à M1. Ce résultat démontre la sensibilité du composé M1 par rapport au métabolisme hépatique.

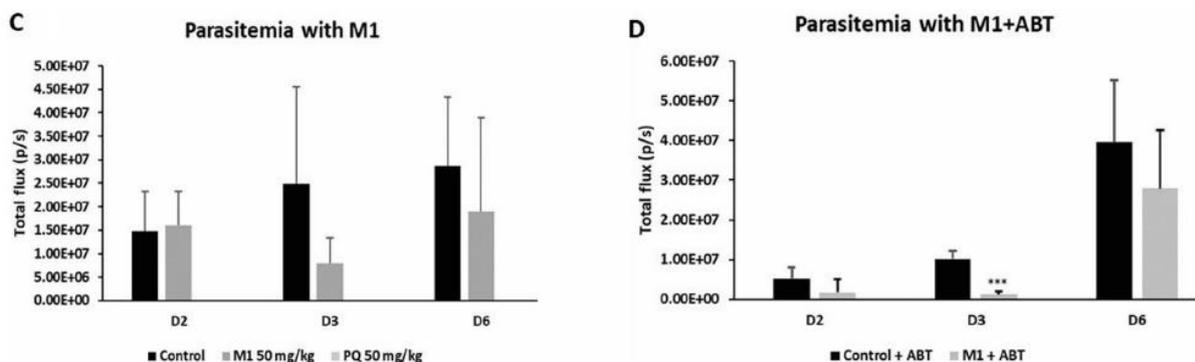
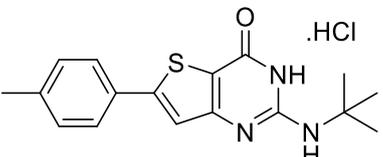
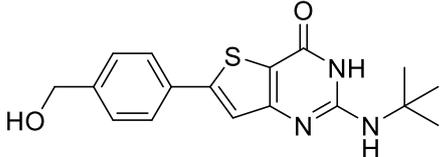
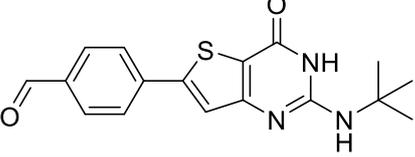
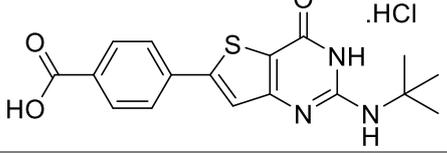
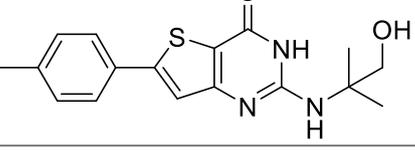


Figure 47. Effets du composé M1 sur la parasitémie *in vivo* sur modèle murin après infection par des sporozoïtes de *P. berghei* (à J0). Les souris ont été traitées de J-1 à J1. ***, p -value < 0,0056. PQ : primaquine ; ABT : 1-aminobenzotriazole ; p/s : photons par seconde

Cette sensibilité a été confirmée *in vitro* : la demi-vie microsomale de M1 est de 11 minutes sur microsomes hépatiques de souris femelle et de 57 minutes sur microsomes hépatiques humains (fraction S9). Des métabolites présumés ont été identifiés par LCMS-MS et certains ont pu être synthétisés pour confirmation. Ces métabolites résultent d'un métabolisme de type 1 oxydatif sur le groupement méthyle en position 4 du substituant 6-phényle ainsi que sur le *tert*-butyle en position 2 mais pour ce dernier, la synthèse des métabolites n'a pas pu être réalisée. Au fur et à mesure des oxydations, on observe une perte d'activité des métabolites (**Tableau 20**).

Tableau 20. Structures et valeurs biologiques associées des métabolites du M1.

Entrée	Structure	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
M1		0,045	24,0
M1 _{alcool}		0,4	25
M1 _{aldéhyde}		3,1	25,3
M1 _{acide}		> 10	> 10
M1 _{tBuOH}		Métabolite présumé non synthétisé	

Le composé M1 n'est pas cytotoxique (test d'Ames négatif) et non génotoxique (test coloration de l'acide désoxyribonucléique (ADN) au vert de méthyle). Sur hépatocytes primaires (murins, simiens ou humains), jusqu'à la concentration testée de 60 μM, aucune cytotoxicité n'a été observée. M1 ne possède pas d'affinité pour les canaux hERG, éloignant le risque de cardiotoxicité. M1 est une molécule se liant très fortement aux protéines

plasmatiques avec une fraction liée mesurée à plus de 99,998 % sur plasma humain. Enfin, M1 est très faiblement soluble en milieu aqueux ($1,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$).

Concernant le mécanisme d'action du composé M1, il est à l'heure actuelle inconnu. Il diffère des antipaludiques actuellement commercialisés : inhibition de la polymérisation de l'hémozoïne (dérivés quinoléiques), inhibition de *PfDHFR* ou *PfDHPS* (sulfadoxine et pyriméthamine), dépolarisation de la membrane mitochondriale (atovaquone) ou production de radicaux libres (dérivés d'artémisinine). Parmi les pistes envisagées, les kinases plasmodiales font partie des cibles potentielles puisque la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidinone a initialement été synthétisée pour donner des inhibiteurs de kinases humaines. Ces kinases sont connues pour être des cibles d'intérêt, et on retrouve dans la littérature des molécules ciblant des kinases plasmodiales,²⁶⁴ sans compter les composés capables d'agir sur plusieurs kinases, possédant un profil d'activité similaire à M1 (**Figure 48**) :²⁶⁵

- MMV048 et UCT943 : ciblent *PfPI4K* (cf. Chapitre 2 : 4.1.6. MMV048 et 4.3. Molécules au stade préclinique).
- TCMDC-135051 : cible la *Cyclin-Dependent-Like Kinase 3 (PfCLK3)*.²⁶⁶
- ML10 et thiazoles trisubstitués : ciblent la protéine kinase G (*PfPKG*).^{267, 268}

²⁶⁴ Arendse, L.B.; Wyllie, S.; Chibale, K.; Gilbert, I.H. *Plasmodium* Kinases as Potential Drug Targets for Malaria: Challenges and Opportunities. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 518–534, doi:[10/gm77mf](https://doi.org/10/gm77mf).

²⁶⁵ Mustière, R.; Vanelle, P.; Primas, N. Plasmodial Kinase Inhibitors Targeting Malaria: Recent Developments. *Molecules* **2020**, *25*, 5949, doi:[10/gkzswz](https://doi.org/10/gkzswz).

²⁶⁶ Alam, M.M.; Sanchez-Azqueta, A.; Janha, O.; Flannery, E.L.; Mahindra, A.; Mapesa, K.; Char, A.B.; Sriranganadane, D.; Brancucci, N.M.B.; Antonova-Koch, Y.; Crouch, K.; Simwela, N.V.; Millar, S.B.; Akinwale, J.; Mitcheson, D.; Solyakov, L.; Dudek, K.; Jones, C.; Zapatero, C.; Doerig, C.; Nwakanma, D.C.; Vázquez, M.J.; Colmenarejo, G.; Lafuente-Monasterio, M.J.; Leon, M.L.; Godoi, P.H.C.; Elkins, J.M.; Waters, A.P.; Jamieson, A.G.; Álvaro, E.F.; Ranford-Cartwright, L.C.; Marti, M.; Winzeler, E.A.; Gamo, F.J.; Tobin, A.B. Validation of the Protein Kinase *Pf* CLK3 as a Multistage Cross-Species Malarial Drug Target. *Science* **2019**, *365*, eaau1682, doi:[10/gm28h9](https://doi.org/10/gm28h9).

²⁶⁷ Baker, D.A.; Stewart, L.B.; Large, J.M.; Bowyer, P.W.; Ansell, K.H.; Jiménez-Díaz, M.B.; El Bakkouri, M.; Birchall, K.; Dechering, K.J.; Bouloc, N.S.; Coombs, P.J.; Whalley, D.; Harding, D.J.; Smiljanic-Hurley, E.; Wheldon, M.C.; Walker, E.M.; Dessens, J.T.; Lafuente, M.J.; Sanz, L.M.; Gamo, F.-J.; Ferrer, S.B.; Hui, R.; Bousema, T.; Angulo-Barturén, I.; Merritt, A.T.; Croft, S.L.; Gutteridge, W.E.; Kettleborough, C.A.; Osborne, S.A. A Potent Series Targeting the Malarial CGMP-Dependent Protein Kinase Clears Infection and Blocks Transmission. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 430, doi:[10/gbwfdz](https://doi.org/10/gbwfdz).

²⁶⁸ Matralis, A.N.; Malik, A.; Penzo, M.; Moreno, I.; Almela, M.J.; Camino, I.; Crespo, B.; Saadeddin, A.; Ghidelli-Disse, S.; Rueda, L.; Calderon, F.; Osborne, S.A.; Drewes, G.; Böesche, M.; Fernández-Álvaro, E.; Martín Hernando, J.I.; Baker, D.A. Development of Chemical Entities Endowed with Potent Fast-Killing Properties against *Plasmodium Falciparum* Malaria Parasites. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9217–9235, doi:[10/gm28sp](https://doi.org/10/gm28sp).

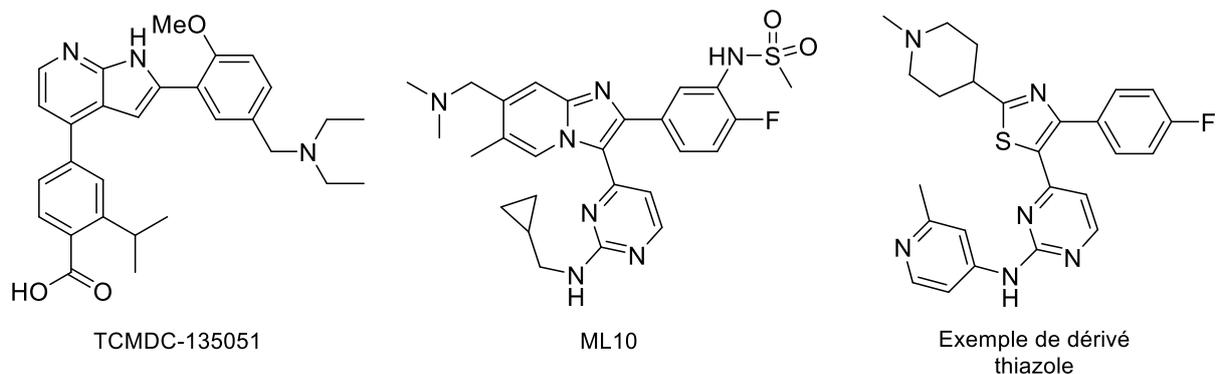


Figure 48. Structures chimiques d'inhibiteurs de kinases plasmodiales ayant un profil d'activité similaire à celui de M1

M1 a été testé sur les protéines *PfCLK3* et *PfCLK1* mais n'inhibe aucune de ces deux protéines. Des mesures d'affinités avec d'autres protéines plasmodiales sont en cours de réalisation. Afin d'anticiper d'éventuels problèmes de sélectivité, un Kinome Scan® a été réalisé et a montré que M1 n'inhibe partiellement que 3 kinases humaines sur 468 testées à la concentration de 10 μM .

Le composé M1 (**Figure 49**) est donc une molécule prometteuse par son activité sur tous les stades du paludisme et est en mesure de pouvoir s'inscrire dans trois des TCPs : TCP-1, 3 et 5. De plus, son mécanisme d'action reste encore à déterminer. Néanmoins, sa faible stabilité métabolique associée à sa faible solubilité aqueuse constituent des obstacles à lever afin de progresser sur les évaluations *in vivo* et progresser vers les étapes précliniques.

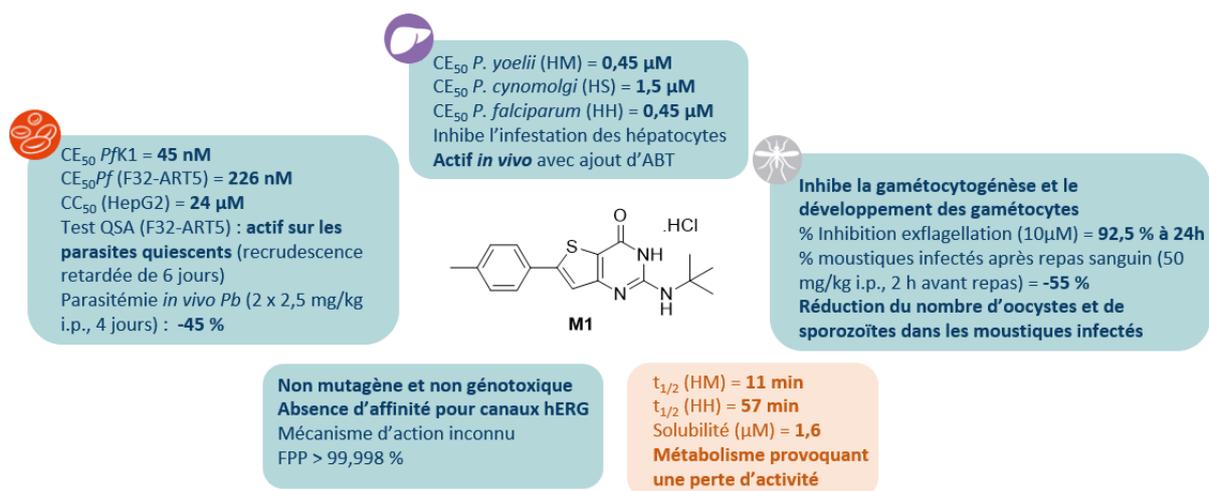


Figure 49. Profil biologique du composé M1.

5.3. Le cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidine dans la littérature

5.3.1. Autres thiéno[3,2-*d*]pyrimidines antiplasmodiales

En dehors des travaux exposés précédemment, deux autres séries de thiéno[3,2-*d*]pyrimidine ont été décrites dans la littérature.

La série 2,4-diaminothiéno[3,2-*d*]pyrimidine (**Figure 50**) est découverte en 2014 par un screening de chimiothèque portant sur 37 000 composés. Les premiers travaux ont concerné la modulation de la position 6 d'une thiéno[3,2-*d*]pyrimidine substituée en position 2 par une méthylamine et en position 4 par une chaîne *N*¹,*N*¹-diméthylpropane-1,3-diamine (**GC1**).²⁶⁹ Les substituants phényle, 4-trifluorométhylphényle et 4-trifluorométhoxyphényle ont donné de bons résultats *in vitro* (activité, solubilité, stabilité métabolique) mais un mauvais profil pharmacologique (volume de distribution important, biodisponibilité moyenne) et une inhibition sur les canaux hERG. Les travaux suivants ont porté sur la modulation des positions 2 et 4 sur le noyau 6-(4-(trifluorométhyl)phényl)thiéno[3,2-*d*]pyrimidine pour aboutir à la molécule **GC2** (**Figure 50**).²⁷⁰ Bien que ces travaux aient abouti à des activités *in vivo* sur modèle murin, des problèmes de reproductibilité des expériences pharmacocinétiques ainsi qu'une inhibition toujours présente sur les canaux hERG freinent l'avancée vers le stade préclinique de cette série.

²⁶⁹ González Cabrera, D.; Le Manach, C.; Douelle, F.; Younis, Y.; Feng, T.-S.; Paquet, T.; Nchinda, A.T.; Street, L.J.; Taylor, D.; de Kock, C.; Wiesner, L.; Duffy, S.; White, K.L.; Zabiulla, K.M.; Sambandan, Y.; Bashyam, S.; Waterson, D.; Witty, M.J.; Charman, S.A.; Avery, V.M.; Wittlin, S.; Chibale, K. 2,4-Diaminothienopyrimidines as Orally Active Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1014–1022, doi:[10/f5ssvk](https://doi.org/10/f5ssvk).

²⁷⁰ González Cabrera, D.; Douelle, F.; Le Manach, C.; Han, Z.; Paquet, T.; Taylor, D.; Njoroge, M.; Lawrence, N.; Wiesner, L.; Waterson, D.; Witty, M.J.; Wittlin, S.; Street, L.J.; Chibale, K. Structure–Activity Relationship Studies of Orally Active Antimalarial 2,4-Diamino-Thienopyrimidines. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7572–7579, doi:[10/gmijcv](https://doi.org/10/gmijcv).

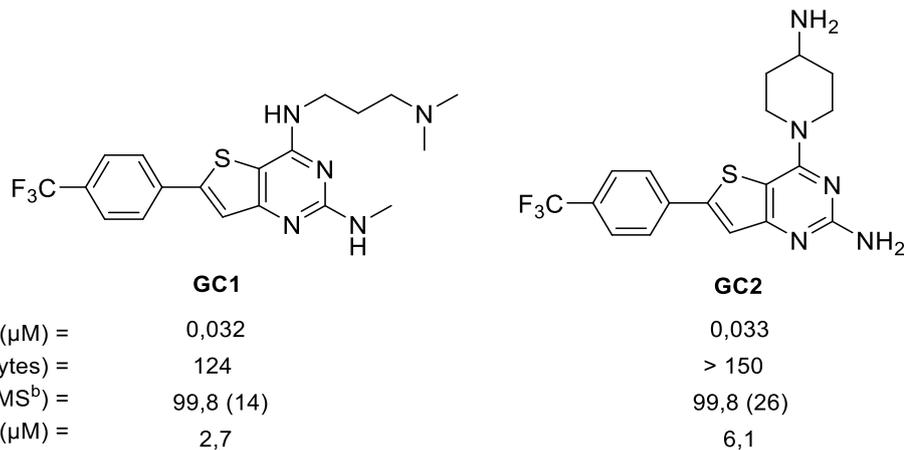


Figure 50. Structures chimiques et valeurs biologiques des 2,4-diaminothiéno[3,2-*d*]pyrimidines développées par González Cabrera *et al.*^{269, 270} a) posologie : 50 mg/kg/j pendant 4 jours. b) TMS : Temps moyen de survie (en jours)

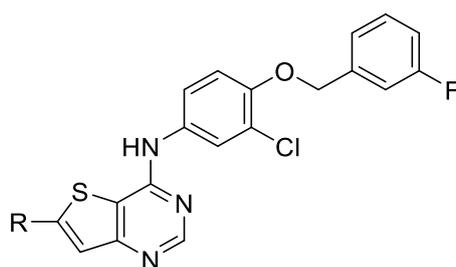
La seconde série de thiéno[3,2-*d*]pyrimidines antiplasmodiales est issue de pharmacomodulations du composé GW837016X, lui-même dérivé du lapatinib, comportant un noyau thiéno[3,2-*d*]pyrimidine substitué en position 6 par une chaîne pyrrolidin-2-yléthynyl.²⁷¹ Ces deux composés possèdent une activité sur *Trypanosoma brucei* (parasite responsable de la trypanosomase humaine africaine) et lors de modulations de la position 6 du composé GW837016X, les molécules obtenues furent testées sur *P. falciparum*.^{272, 273} Ainsi, 3 composés parmi ceux synthétisés ont montré une activité inférieure à 0,5 μ M sur *P. falciparum* (**Tableau 21**).

²⁷¹ Wood, E.R.; Shewchuk, L.M.; Ellis, B.; Brignola, P.; Brashear, R.L.; Caferro, T.R.; Dickerson, S.H.; Dickson, H.D.; Donaldson, K.H.; Gaul, M.; Griffin, R.J.; Hassell, A.M.; Keith, B.; Mullin, R.; Petrov, K.G.; Reno, M.J.; Rusnak, D.W.; Tadepalli, S.M.; Ulrich, J.C.; Wagner, C.D.; Vanderwall, D.E.; Waterson, A.G.; Williams, J.D.; White, W.L.; Uehling, D.E. 6-Ethynylthieno[3,2-*d*] and 6-Ethynylthieno[2,3-*d*]Pyrimidin-4-Anilines as Tunable Covalent Modifiers of ErbB Kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 2773–2778, doi:[10/b8st84](https://doi.org/10.1073/pnas.0708884105).

²⁷² Woodring, J.L.; Patel, G.; Erath, J.; Behera, R.; Lee, P.J.; Leed, S.E.; Rodriguez, A.; Sciotti, R.J.; Mensa-Wilmot, K.; Pollastri, M.P. Evaluation of Aromatic 6-Substituted Thienopyrimidines as Scaffolds against Parasites That Cause Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Malaria. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 339–346, doi:[10/gm2cb2](https://doi.org/10.1039/C4MD00022A).

²⁷³ Woodring, J.L.; Behera, R.; Sharma, A.; Wiedeman, J.; Patel, G.; Singh, B.; Guyett, P.; Amata, E.; Erath, J.; Roncal, N.; Penn, E.; Leed, S.E.; Rodriguez, A.; Sciotti, R.J.; Mensa-Wilmot, K.; Pollastri, M.P. Series of Alkynyl-Substituted Thienopyrimidines as Inhibitors of Protozoan Parasite Proliferation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 996–1001, doi:[10/gfhngm](https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00100).

Tableau 21. Structures chimiques des thiéno[3,2-*d*]-pyrimidines antiplasmodiales dérivant de GW837016X.^{272, 273}



R	PfD6 CE ₅₀ (μM)	R	PfD6 CE ₅₀ (μM)
	-		0,027
GW837016X			
	0,23		0,44

5.3.2. Thiéno[3,2-*d*]pyrimidines sur le marché ou en essais cliniques

Plusieurs candidats-médicaments comportant une thiéno[3,2-*d*]pyrimidine ont atteint le stade des essais cliniques (**Figure 51**), tous, sauf un, à visée anticancéreuse :

- SNS-314 : inhibiteur des kinases aurora A, B et C, des sérine/thréonine kinases importante dans la régulation de la mitose cellulaire.²⁷⁴ Son développement semble avoir été stoppé puisqu'un seul essai clinique de phase I a été complété.²⁷⁵
- Pictilisib : inhibiteur de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K, plus particulièrement la classe I pour ce composé) catalysant la synthèse du phosphatidylinositol-3-phosphate, second messenger cellulaire impliqué dans de multiples voies cellulaires et dont la synthèse est dérégulée chez les cellules cancéreuses.²⁷⁶ Employé dans des essais

²⁷⁴ Oslob, J.D.; Romanowski, M.J.; Allen, D.A.; Baskaran, S.; Bui, M.; Elling, R.A.; Flanagan, W.M.; Fung, A.D.; Hanan, E.J.; Harris, S.; Heumann, S.A.; Hoch, U.; Jacobs, J.W.; Lam, J.; Lawrence, C.E.; McDowell, R.S.; Nannini, M.A.; Shen, W.; Silverman, J.A.; Sopko, M.M.; Tangonan, B.T.; Teague, J.; Yoburn, J.C.; Yu, C.H.; Zhong, M.; Zimmerman, K.M.; O'Brien, T.; Lew, W. Discovery of a Potent and Selective Aurora Kinase Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4880–4884, doi:[10/b67cdh](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.041).

²⁷⁵ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00519662> (consulté le 06/10/21)

²⁷⁶ Folkes, A.J.; Ahmadi, K.; Alderton, W.K.; Alix, S.; Baker, S.J.; Box, G.; Chuckowree, I.S.; Clarke, P.A.; Depledge, P.; Eccles, S.A.; Friedman, L.S.; Hayes, A.; Hancox, T.C.; Kugendradas, A.; Lensun, L.; Moore, P.; Olivero, A.G.; Pang, J.; Patel, S.; Pergl-Wilson, G.H.; Raynaud, F.I.; Robson, A.; Saghir, N.; Salphati, L.; Sohal, S.; Ultsch, M.H.; Valenti, M.; Wallweber, H.J.A.; Wan, N.C.; Wiesmann, C.; Workman, P.; Zhyvoloup, A.; Zvelebil, M.J.; Shuttleworth, S.J. The Identification of 2-(1*H*-Indazol-4-yl)-6-(4-Methanesulfonyl-Piperazin-1-ylmethyl)-4-Morpholin-4-yl-Thieno[3,2-*d*]Pyrimidine (GDC-0941) as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Inhibitor of Class I PI3 Kinase for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5522–5532, doi:[10/cws2wh](https://doi.org/10.1021/cw52wh).

cliniques de phase II contre le cancer du sein ou du poumon, son développement a ensuite été stoppé par son manque d'efficacité.²⁷⁷

- Apitolisib : ce dérivé du pictilisib est un inhibiteur de PI3K lui aussi mais en plus, de mTOR (*Molecular Target Of Rapamycin*), protéine kinase impliquée dans la régulation de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire.²⁷⁸ Son utilisation a été explorée dans plusieurs essais cliniques de phase II contre le cancer du sein, du rein ou de la prostate.
- PF-03758309 : inhibiteur de la protéine PAK4 (*p21-activated kinase*), protéine kinase impliquée dans l'apoptose et la prolifération cellulaire.²⁷⁹ Cependant, l'essai clinique de phase I (essai sur des patients atteints de tumeurs solides) a dû être stoppé à cause de l'absence de relations dose-réponse du composé.²⁸⁰
- Olmutinib : inhibiteur de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) portant la mutation T790M.²⁸¹ L'EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase dont la dérégulation est impliquée dans de multiples cancers. L'olmutinib était en bonne voie pour être commercialisé en Corée du Sud (contre le cancer du poumon à petites cellules T790M positif) mais des cas de nécrose épidermique toxique ainsi que l'arrivée sur le marché de l'osimertinib (Tagrisso[®], indication similaire à l'olmutinib) ont provoqué l'arrêt de son développement.²⁸²
- MAX-40279 : inhibiteur de FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), protéine impliquée dans la différenciation et l'organisation des cellules dans les tissus conjonctifs.²⁸³ Il est actuellement dans plusieurs essais cliniques de phase I contre la leucémie aigüe myéloïde ou des tumeurs solides avancées.²⁸⁴

²⁷⁷ Vanacker, H.; Cassier, P.A.; Bachelot, T. The Complex Balance of PI3K Inhibition. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 127–128, doi:[10/gm2hfr](https://doi.org/10/gm2hfr).

²⁷⁸ Sutherland, D.P.; Bao, L.; Berry, M.; Castaneda, G.; Chuckowree, I.; Dotson, J.; Folks, A.; Friedman, L.; Goldsmith, R.; Gunzner, J.; Heffron, T.; Lesnick, J.; Lewis, C.; Mathieu, S.; Murray, J.; Nonomiya, J.; Pang, J.; Pegg, N.; Prior, W.W.; Rouge, L.; Salphati, L.; Sampath, D.; Tian, Q.; Tsui, V.; Wan, N.C.; Wang, S.; Wei, B.; Wiesmann, C.; Wu, P.; Zhu, B.-Y.; Olivero, A. Discovery of a Potent, Selective, and Orally Available Class I Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Kinase Inhibitor (GDC-0980) for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7579–7587, doi:[10/c77jcs](https://doi.org/10/c77jcs).

²⁷⁹ Murray, B.W.; Guo, C.; Piraino, J.; Westwick, J.K.; Zhang, C.; Lamerdin, J.; Dagostino, E.; Knighton, D.; Loi, C.-M.; Zager, M.; Kraynov, E.; Popoff, I.; Christensen, J.G.; Martinez, R.; Kephart, S.E.; Marakovits, J.; Karlcek, S.; Bergqvist, S.; Smeal, T. Small-Molecule P21-Activated Kinase Inhibitor PF-3758309 Is a Potent Inhibitor of Oncogenic Signaling and Tumor Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9446–9451, doi:[10/d3ztrz](https://doi.org/10/d3ztrz).

²⁸⁰ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00932126> (consulté le 06/10/21)

²⁸¹ Lee, K.-O.; Cha, M.Y.; Kim, M.; Song, J.Y.; Lee, J.-H.; Kim, Y.H.; Lee, Y.-M.; Suh, K.H.; Son, J. Abstract LB-100: Discovery of HM61713 as an Orally Available and Mutant EGFR Selective Inhibitor. In Proceedings of the Experimental and Molecular Therapeutics; American Association for Cancer Research, October 1 2014; p. LB-100-LB-100.

²⁸² *Biopharmadive*. <https://www.biopharmadive.com/news/hanmi-olita-development-astrazeneca-tagrisso/521326/> (consulté le 06/10/21).

²⁸³ Wang, Y.; Feng, Z.; Wang, F. Novel therapeutic methods. WO2021180032A1, 2021.

²⁸⁴ *Clinicaltrials.gov*. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MAX-40279&age_v=&gndr=&type=&rslt=&phase=0&Search=Apply (consulté le 06/10/21)

- Simurosertib : inhibiteur de CDC7 (*Cell Division Cycle 7*), sérine/thréonine kinase impliquée dans la réplication de l'ADN.²⁸⁵ Il vient de terminer un essai clinique de phase II contre différents cancers métastatiques.²⁸⁶
- Fimepinostat : ce composé est, par sa partie 4-morpholinopyrimidine, un inhibiteur de PI3K (comme le pictilisib et l'apitolisib) et de plus, l'acide hydroxamique sur la chaîne latérale en position 6 est une fonction typique des inhibiteurs d'histone déacétylases.²⁸⁷ Ces dernières sont des protéines impliquées dans l'expression des gènes, modulée par le niveau d'acétylation des histones (protéines sur lesquelles s'enroule l'ADN). Ce composé est actuellement testé dans deux essais cliniques de phase I contre des cancers cérébraux comme les gliomes et les neuroblastomes etc...^{288, 289}
- BMS-830216 : inhibiteur de MCHR1 (*Melanine Concentrating Hormone Receptor*), récepteur impliqué dans la régulation de l'appétit.²⁹⁰ La molécule a atteint les essais cliniques de phase II pour le traitement de l'obésité.²⁹¹

²⁸⁵ Kurasawa, O.; Miyazaki, T.; Homma, M.; Oguro, Y.; Imada, T.; Uchiyama, N.; Iwai, K.; Yamamoto, Y.; Ohori, M.; Hara, H.; Sugimoto, H.; Iwata, K.; Skene, R.; Hoffman, I.; Ohashi, A.; Nomura, T.; Cho, N. Discovery of a Novel, Highly Potent, and Selective Thieno[3,2-d]Pyrimidinone-Based Cdc7 Inhibitor with a Quinuclidine Moiety (TAK-931) as an Orally Active Investigational Antitumor Agent. *J. Med. Chem.* **2020**, *21*, doi:[10/gm2n3z](https://doi.org/10/gm2n3z).

²⁸⁶ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03261947> (consulté le 06/10/21)

²⁸⁷ Qian, C.; Lai, C.-J.; Bao, R.; Wang, D.-G.; Wang, J.; Xu, G.-X.; Atoyan, R.; Qu, H.; Yin, L.; Samson, M.; Zifcak, B.; Ma, A.W.S.; DellaRocca, S.; Borek, M.; Zhai, H.-X.; Cai, X.; Voi, M. Cancer Network Disruption by a Single Molecule Inhibitor Targeting Both Histone Deacetylase Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4104–4113, doi:[10/gm2m6w](https://doi.org/10/gm2m6w).

²⁸⁸ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02909777> (consulté le 06/10/21)

²⁸⁹ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03893487> (consulté le 06/10/21)

²⁹⁰ Washburn, W.N.; Manfredi, M.; Devasthale, P.; Zhao, G.; Ahmad, S.; Hernandez, A.; Robl, J.A.; Wang, W.; Mignone, J.; Wang, Z.; Ngu, K.; Pellemounter, M.A.; Longhi, D.; Zhao, R.; Wang, B.; Huang, N.; Flynn, N.; Azzara, A.V.; Barrish, J.C.; Rohrbach, K.; Devenny, J.J.; Rooney, S.; Thomas, M.; Glick, S.; Godonis, H.E.; Harvey, S.J.; Cullen, M.J.; Zhang, H.; Caporuscio, C.; Stetsko, P.; Grubb, M.; Maxwell, B.D.; Yang, H.; Apedo, A.; Gemzik, B.; Janovitz, E.B.; Huang, C.; Zhang, L.; Freedden, C.; Murphy, B.J. Identification of a Nonbasic Melanin Hormone Receptor 1 Antagonist as an Antiobesity Clinical Candidate. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7509–7522, doi:[10/gm2np9](https://doi.org/10/gm2np9).

²⁹¹ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00909766> (consulté le 06/10/21)

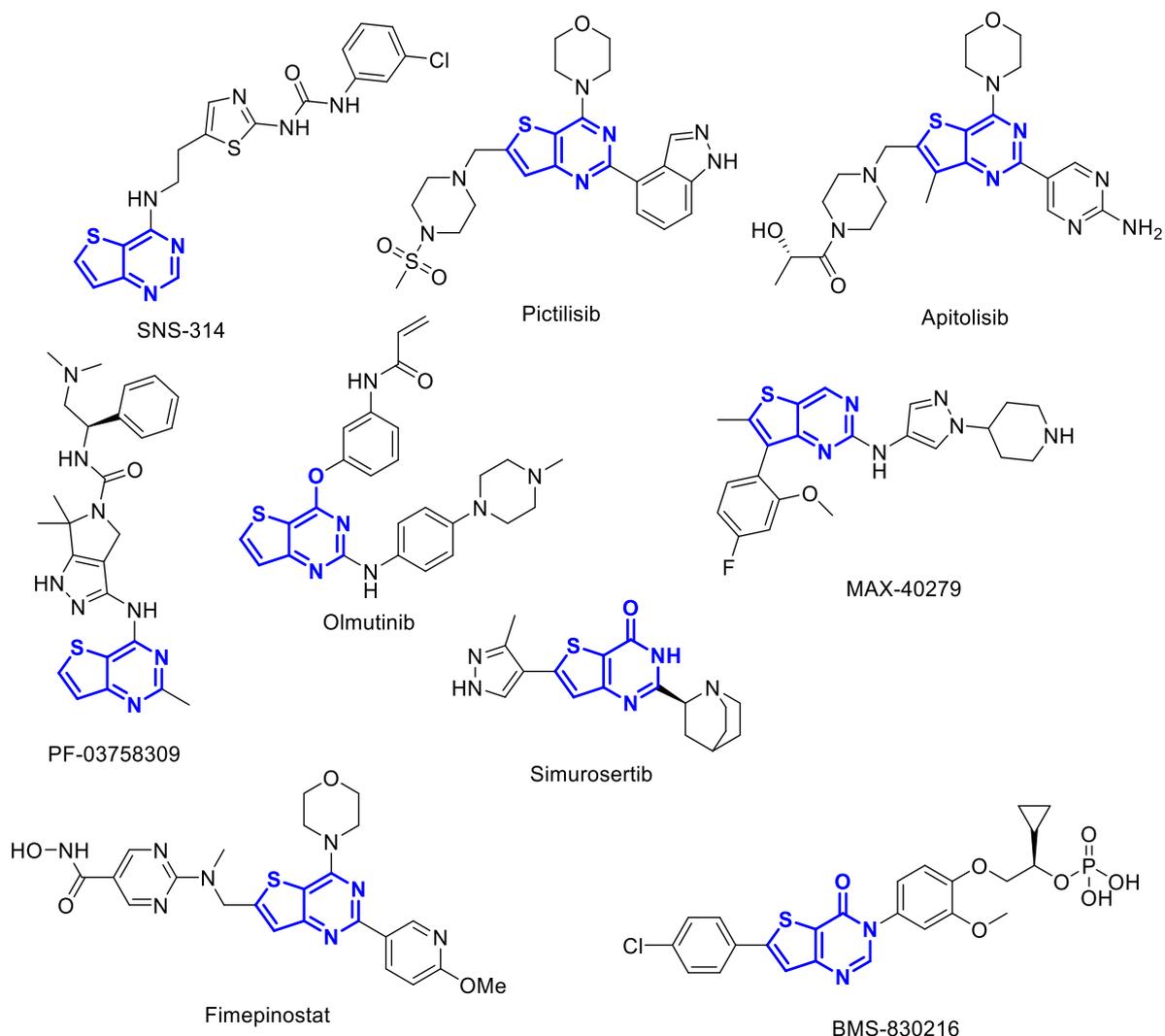


Figure 51. Composés comportant un cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidine et ayant atteint le stade des essais cliniques.

5.4. Objectifs des travaux de thèse

Les travaux de thèse exposés dans la suite de ce mémoire s'inscrivent donc dans la continuité de la découverte du composé hit M1 puisqu'il s'agit de la synthèse de nouveaux analogues du composé M1. Le premier objectif de ces travaux est l'obtention d'une nouvelle tête-de-série avec un profil d'activité similaire au M1 (sur tous les stades du paludisme) mais avec une stabilité métabolique augmentée (une demi-vie supérieure à 4 h chez les rongeurs est « idéale » d'après le MMV)²⁹² et une solubilité aqueuse améliorée (devant être au minimum de 10 μ M dans un tampon phosphate).¹⁸⁰ Le second objectif est l'approfondissement des études RSA sur la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidine. Afin de remplir ces deux objectifs, les travaux de synthèses se sont concentrés sur deux principaux éléments du

²⁹² *Medicines for Malaria Venture.* <https://www.mmv.org/research-development/information-scientists/call-proposals/19th-call-proposals> (consulté le 29/11/2021)

cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidine : le substituant en position 6 et la nature du cycle aromatique à 5 chaînons de la thiénoypyrimidine. Les composés synthétisés ont été testés sur le stade sanguin de *P. falciparum* et sur lignée cellulaire HepG2 afin de pouvoir guider les travaux de synthèses (**Schéma 16**).

La modulation de la position 6, objet du chapitre 3, a été réalisée via des couplages pallado-catalysés (Suzuki-Miyaura, Sonogashira et Buchwald-Hartwig) en partant d'un intermédiaire clé : le 3-amino-5-bromothiophène-2-carboxylate de méthyle. A partir de celui-ci, 67 composés ont pu être synthétisés et testés biologiquement. La stratégie de « *scaffold hopping* » visant à modifier le cycle à 5 chaînons de la thiénoypyrimidine, objet du chapitre 4, a permis d'obtenir 17 composés avec 4 noyaux aromatiques différents : thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et [1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one. En plus de ces deux axes majeurs, d'autres modifications, permettant la synthèse de 10 composés supplémentaires, ou essais de modifications ont été réalisés et seront exposés dans le chapitre 5. Enfin, les composés possédant une activité sur le stade sanguin de *P. falciparum* inférieure à 1 μ M avec une bonne valeur de cytotoxicité ont été engagés dans des tests supplémentaires dont les protocoles et les résultats seront décrits dans le chapitre 6, aux côtés d'une discussion sur les données RSA de la série de composés synthétisés.

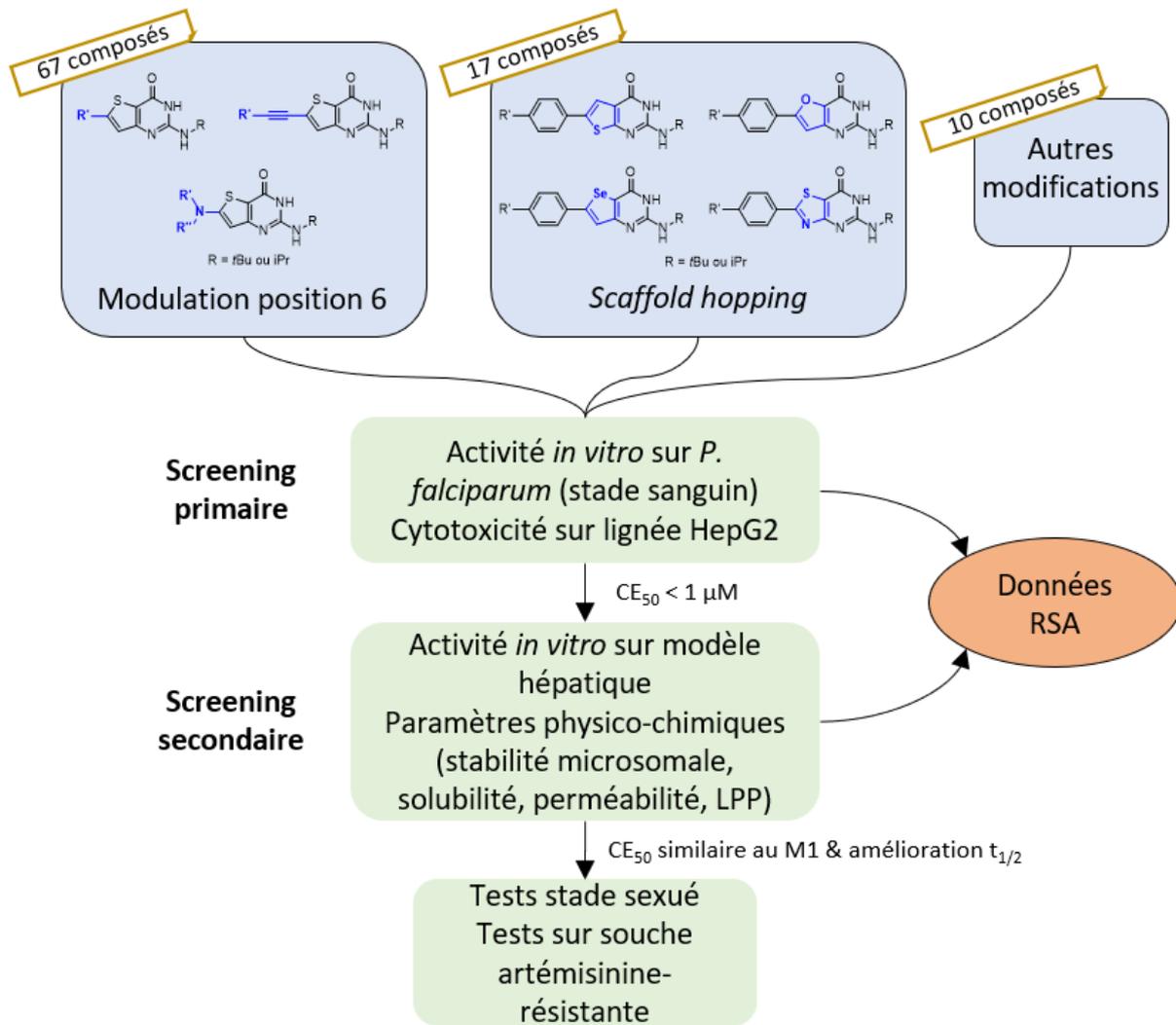


Schéma 16. Résumé des pharmacomodulations effectuées et stratégie de screening utilisée pour les tests biologiques et pharmaco-chimiques. LPP : Liaison aux Protéines Plasmatiques.

Chapitre 3 : Modulation de la position 6
en série 2-aminothiéno[3,2-*d*]-
pyrimidin-4(3*H*)-one par réactions de
couplages pallado-catalysés

1. Couplages pallado-catalysés et choix du partenaire halogéné de couplage

1.1. Généralités sur les couplages pallado-catalysés

Durant la première moitié du XX^{ème} siècle, la création de liaisons carbone-carbone sur des molécules nécessitait d'une part, un composé possédant un carbone électrophile (halogénure ou carbonyle par exemple), et d'autre part, un composé capable de pouvoir générer un carbanion, espèce nucléophile. Ces carbanions étaient, au départ, générés *via* les réactifs de Grignard, des halogénures organomagnésiens, découverts en 1900 par Victor Grignard, lui valant le prix Nobel de Chimie 1912 (au côté de Paul Sabatier).^{293, 294} Ces réactifs permettent des réactions d'addition nucléophile sur des carbones électrodéficients comme le carbone d'un carbonyle (**Schéma 17**).

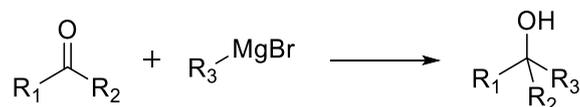


Schéma 17. Réaction de Grignard entre un carbonyle et un réactif de Grignard.

En 1930, Karl Ziegler (futur prix Nobel de chimie 1963)²⁹⁵ étudia la réactivité entre des alkyllithiens et des halogénures d'alkyle.²⁹⁶ La réaction entre ces composés permet la création d'une liaison carbone-carbone (**Schéma 18**). Cependant, les réactifs de Grignard et les organolithiens sont des composés qui sont très sensibles à l'eau et à l'oxygène, nécessitant des méthodes de conservation et des conditions de réaction délicates (milieu sec, atmosphère inerte, basses températures). De plus, ces réactions sont limitées aux halogénures d'alkyle.²⁹⁷

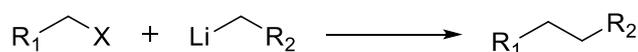


Schéma 18. Réaction entre un halogénure d'alkyle et un organolithien.

²⁹³ Grignard, V. Sur quelques nouvelles combinaisons organométalliques du magnésium et leur application à des synthèses d'alcools et d'hydrocarbures. *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci.* **1900**, *130*, 1322-1325.

²⁹⁴ *The Nobel Prize*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1912/summary/> (consulté le 13/10/21)

²⁹⁵ *The Nobel Prize*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1963/summary/> (consulté le 13/10/21)

²⁹⁶ Ziegler, K.; Colonius, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1930**, *479*, 135-149.

²⁹⁷ Negishi, E.; Wang, G.; Rao, H.; Xu, Z. Alkyne Elementometalation-Pd-Catalyzed Cross-Coupling. Toward Synthesis of All Conceivable Types of Acyclic Alkenes in High Yields, Efficiently, Selectively, Economically, and Safely: "Green" Way. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3151-3182, doi:[10/ck3tnj](https://doi.org/10.1021/jo101332a011).

La recherche s'est donc orientée vers des réactions avec des conditions moins contraignantes et des réactifs plus stables. En 1972, Heck décrit une réaction de couplage pallado-catalysée entre un iodo-arène et du styrène avec comme seule condition particulière de réaction un chauffage à 100 °C (**Schéma 19**).²⁹⁸

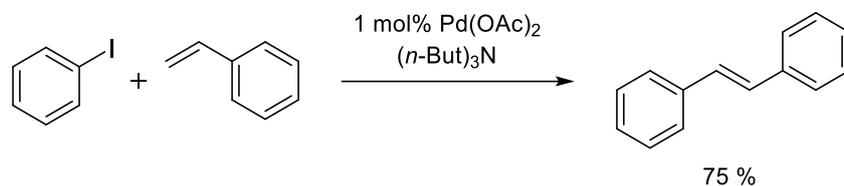


Schéma 19. Couplage de Heck.²⁹⁸

Dans la continuité de ces travaux, au cours des années 1970, plusieurs couplages pallado-catalysés apparaissent dans la littérature. Ils ont comme similitudes d'utiliser un dérivé halogéné, ou avec un autre groupement partant comme le groupement triflate, et un catalyseur au palladium. Les couplages pallado-catalysés diffèrent donc par l'autre partenaire engagé dans la réaction : une espèce comportant une fonction avec un atome métallique ou métalloïde (bore, zinc, silicium, étain etc..) ou une liaison carbone-carbone insaturée. Ces réactions ont aujourd'hui une place centrale dans la chimie organique et ont valu à Richard Heck, Ei-ichi Negishi et Akira Suzuki le prix Nobel de chimie 2010.²⁹⁹

²⁹⁸ Heck, R.F.; Nolley, J.P. Palladium-Catalyzed Vinylic Hydrogen Substitution Reactions with Aryl, Benzyl, and Styryl Halides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320–2322, doi:[10/cncp8z](https://doi.org/10.1021/jo00457a011).

²⁹⁹ *The Nobel Prize*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2010/summary/> (consulté le 14/10/21)

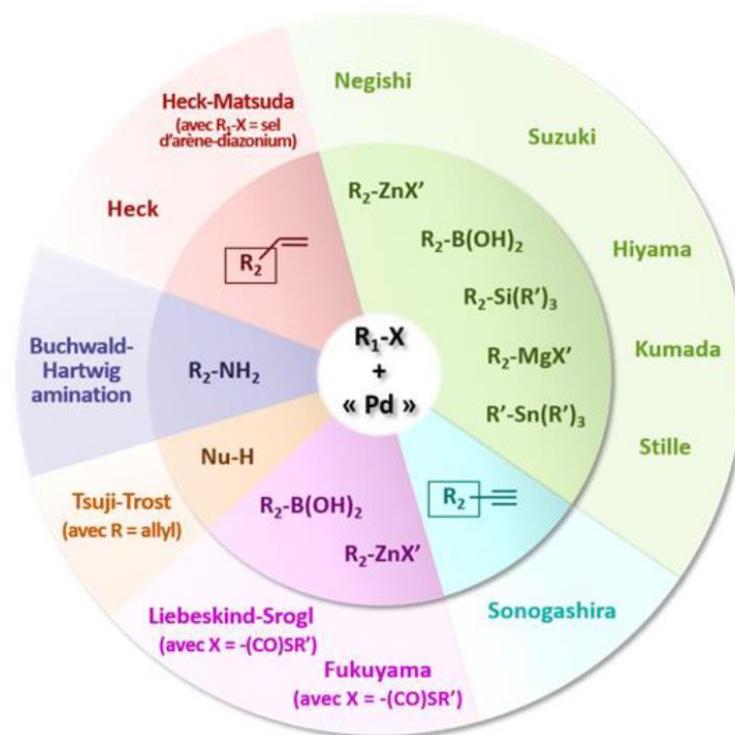


Figure 52. Résumé des différents couplages pallado-catalysés. D'après Feringa, C.³⁰⁰ X = Cl, Br, I, triflate, etc...

1.2. Choix et préparation de l'intermédiaire clé pour les couplages pallado-catalysés

Dans les travaux antérieurs menant au composé M1,²⁶¹ le substituant en position 6 sur le cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidine est présent dès le début de la voie de synthèse permettant d'obtenir les aminoesters du thiophène (**Schéma 20**), matière première menant aux thiéno[3,2-*d*]pyrimidines.³⁰¹

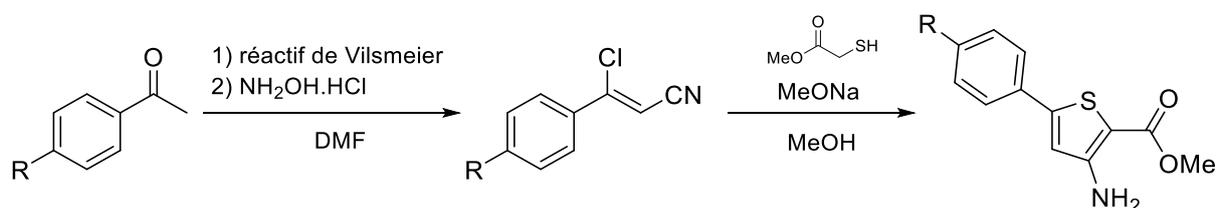


Schéma 20. Voie de synthèse des aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5 par un phényle.

³⁰⁰ Feringa, C. Synthèse et étude des relations structure-activité de nouvelles 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridines anti-kinétoplastidés. Doctorat, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2018. <https://www.theses.fr/2018AIXM0275>

³⁰¹ Hartmann, H.; Liebscher, J. A Simple Method for the Synthesis of 5-Aryl-3-Amino-2-Alkoxy-carbonylthiophenes. *Synthesis* **1984**, *1984*, 275–276, doi:[10/cv5d2j](https://doi.org/10.1055/s1984000275).

Bien que ces deux réactions donnent de bons rendements, elles doivent être répétées dès qu'il faut changer le substituant en position *para* du phényle. Or, la synthèse du β -chloroacrylonitrile est limitée par l'emploi d'acétophénonnes. De plus, la manipulation du thioglycolate de méthyle lors de la deuxième réaction, comme pour les autres thiols, est à faire précautionneusement à cause de son odeur désagréable pouvant se répandre très facilement. Pour ces raisons, le choix de l'intermédiaire pour synthétiser rapidement de nouvelles thiéno[3,2-*d*]pyrimidines avec des substituants variés en position 6 s'est porté sur le 3-amino-5-bromothiophène-2-carboxylate de méthyle (**Schéma 21**). L'atome de brome en position 5 du cycle thiophène permet la réalisation de couplages pallado-catalysés et l'introduction de substituants de nature plus variée que ceux disponibles à partir d'acétophénonnes commerciales.

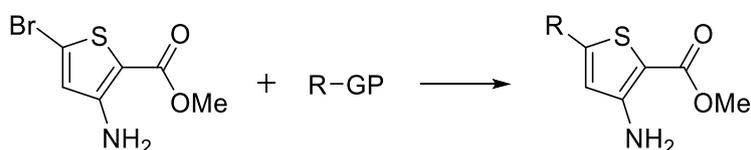


Schéma 21. Voie de synthèse des aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5. GP = groupement comportant un atome métallique ou métalloïde (cf. **Figure 52**)

Cet intermédiaire est disponible commercialement mais pour un prix élevé (environ 1500 USD pour 25 g). Sa synthèse peut cependant être réalisée facilement à partir du 3-aminothiophène-2-carboxylate de méthyle en 3 étapes (**Schéma 22**). La fonction amine en position 3 va être protégée par un groupement trichloroacétate grâce à l'attaque nucléophile de cette amine sur le carbone du carbonyle du chlorure de trichloroacétyle, en présence de triéthylamine. La position 5 du cycle thiophène de la molécule **1** est ensuite bromée sélectivement à l'aide de dibrome dans l'acide acétique. Enfin, le groupement protecteur de l'amine encore présent sur la molécule **2** est clivé à l'aide de carbonate de potassium pour aboutir à l'intermédiaire clé **3** avec un rendement global de 43 %. Les deux premières étapes ne nécessitent pas de colonne chromatographique pour la purification et la synthèse est globalement adaptée pour obtenir une dizaine de grammes de composé **3**.

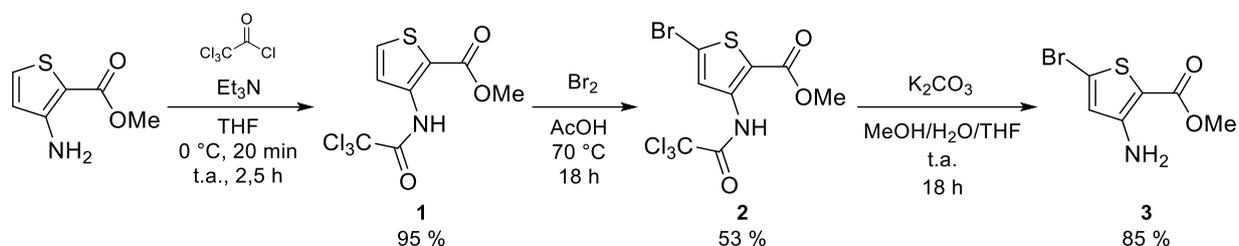


Schéma 22. Voie de synthèse du composé **3**.

Cette synthèse a aussi été réalisée avec un groupement protecteur trifluoroacétyle, alternative possible au groupement trichloroacétyle (**Schéma 23**). En reprenant des conditions déjà décrites dans la littérature sur le 3-aminothiophène-2-carboxylate de méthyle,³⁰² le groupement trifluoroacétyle est introduit à l'aide d'anhydride trifluoroacétique. A partir du composé **4**, les deux étapes suivantes sont similaires à la voie de synthèse précédente pour aboutir à l'intermédiaire clé **3**. Mais, bien que l'étape de déprotection soit simplifiée grâce à un rendement réactionnel quantitatif, le rendement global tombe à 24 % à cause de la bromation. En effet, contrairement à celle aboutissant au composé **2** pour laquelle seuls le produit réactionnel et la matière première sont retrouvés, un produit dibromé a en plus été observé lors de la bromation aboutissant à la molécule **5**.

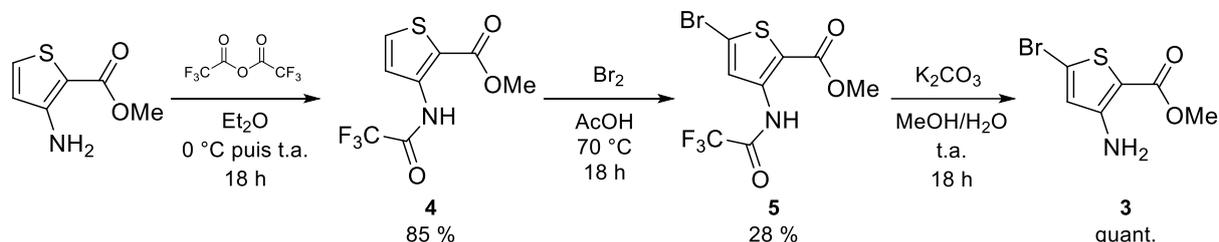


Schéma 23. Voie de synthèse du composé **3** avec protection de l'amine par un groupement trifluoroacétyle.

³⁰² Lazerwith, S.E.; Lew, W.; Zhang, J.; Morganelli, P.; Liu, Q.; Canales, E.; Clarke, M.O.; Doerffler, E.; Byun, D.; Mertzman, M.; Ye, H.; Chong, L.; Xu, L.; Appleby, T.; Chen, X.; Fenaux, M.; Hashash, A.; Leavitt, S.A.; Mabery, E.; Matles, M.; Mwangi, J.W.; Tian, Y.; Lee, Y.-J.; Zhang, J.; Zhu, C.; Murray, B.P.; Watkins, W.J. Discovery of GS-9669, a Thumb Site II Non-Nucleoside Inhibitor of NS5B for the Treatment of Genotype 1 Chronic Hepatitis C Infection. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1893–1901, doi:[10/f5vm2](https://doi.org/10/f5vm2).

2. Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-d]-pyrimidin-4(3H)-one obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura en position 6

2.1. Généralités sur le couplage de Suzuki-Miyaura

En 1979, sortent deux publications de Suzuki et Miyaura portant sur la synthèse de dérivés alcènes fonctionnalisés par des aryles³⁰³ ou des allyles³⁰⁴ *via* des réactions de couplage pallado-catalysés entre des halogénures d'allyle ou d'aryle et des alcènes substitués par un benzodioxaborole, en présence d'éthanoate de sodium (**Schéma 24**).

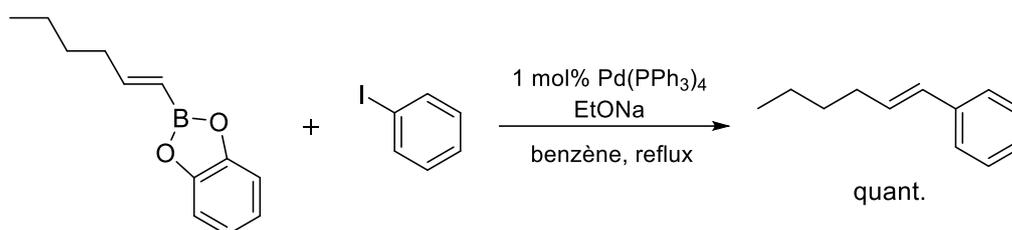


Schéma 24. Premier couplage de Suzuki-Miyaura entre un benzodioxaborole et l'iodobenzène.³⁰³

C'est ensuite en 1981 qu'est décrit le couplage de Suzuki-Miyaura sous sa forme la plus utilisée désormais (**Schéma 25**) : la réaction entre l'acide phénylboronique et un halogénure d'aryle en présence de carbonate de sodium.³⁰⁵

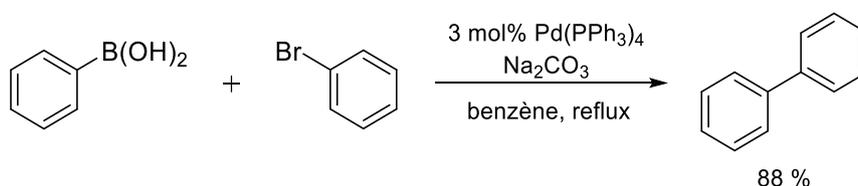


Schéma 25. Premier couplage de Suzuki-Miyaura employant un dérivé d'acide boronique.³⁰⁵

D'un point de vue mécanistique, le couplage de Suzuki-Miyaura, comme les autres couplages pallado-catalysés, est un cycle catalytique avec le palladium comme élément central de ce cycle (**Schéma 26**).

³⁰³ Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (E)-Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866, doi:[10/c5cw2w](https://doi.org/10.1039/c5cw2w).

³⁰⁴ Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437–3440, doi:[10/dvr79g](https://doi.org/10.1016/0040-4039(79)90799-6).

³⁰⁵ Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Commun.* **1981**, 11, 513–519, doi:[10/cjrdtj](https://doi.org/10.1080/00909638108839000).

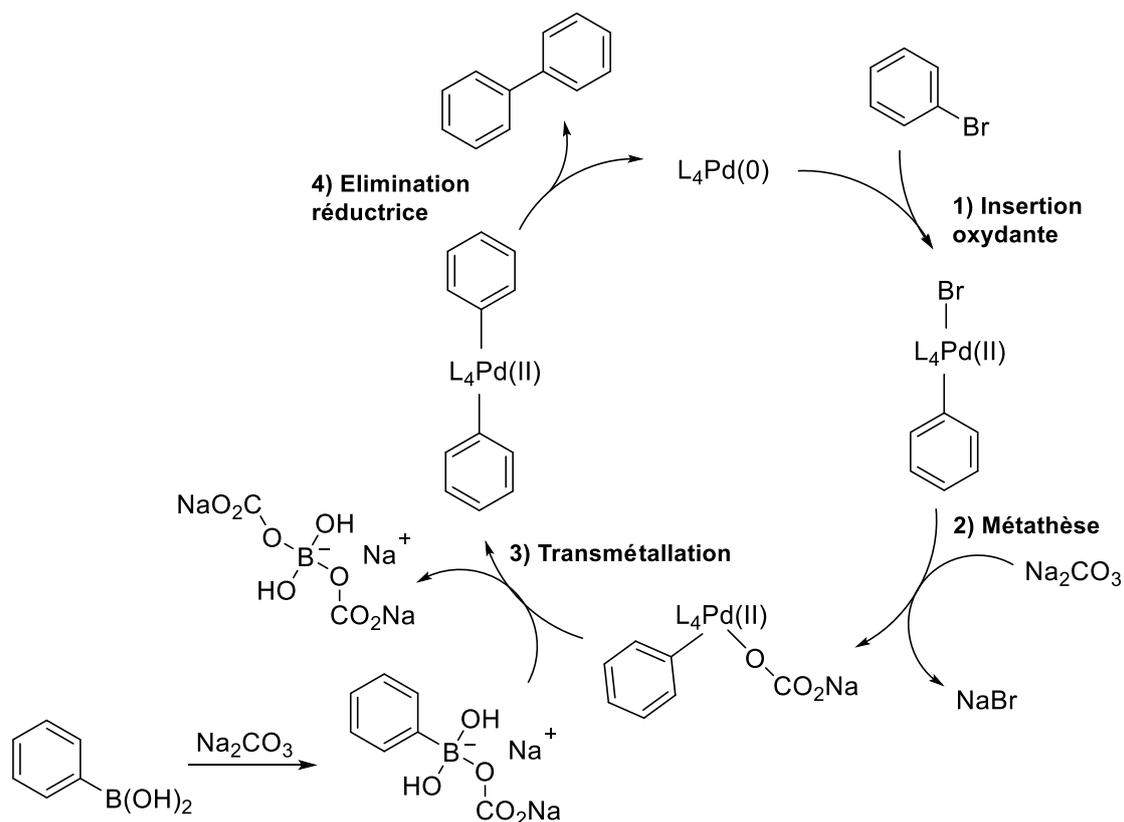


Schéma 26. Cycle catalytique du couplage de Suzuki-Miyaura, en reprenant la réaction du **Schéma 25**.

Ce cycle catalytique se décompose en 4 phases :

- 1) Une addition oxydante correspondant à l'insertion du palladium, avec un degré d'oxydation 0, entre le carbone et l'atome de brome. Cette insertion fait monter le palladium à un degré d'oxydation II. L'atome de brome (ou autre groupement partant) est, par la suite, échangé avec l'anion de la base utilisée dans la réaction.
- 2) Une métathèse où l'anion de la base employée va venir se substituer au brome sur l'atome de palladium. L'atome de brome forme alors un sel avec le cation libre de la base.
- 3) Une transmétallation qui consiste à l'insertion du complexe de palladium dans la liaison carbone-bore du triborate formé par l'acide boronique et l'anion de la base employée. Puis, un réarrangement a lieu entraînant le départ d'un tétraborate et le complexe de palladium inséré entre deux carbones.
- 4) Une élimination réductrice où le complexe de palladium libère un composé avec la liaison carbone-carbone formée et retourne à un degré d'oxydation 0 capable ensuite de réaliser un nouveau cycle.

2.2.Choix de l'intermédiaire pour le couplage de Suzuki-Miyaura

Le problème initial rencontré pour la synthèse de dérivés *via* le couplage de Suzuki-Miyaura est le choix du substrat bromé. Le couplage peut être réalisé soit sur le dérivé **3** ou bien sur les dérivés **6** et **7**, produit de la réaction de cyclisation servant à former le cycle thieno[3,2-*d*]-pyrimid4(3*H*)-one (**Schéma 27**, réaction détaillée dans le **Schéma 33**).

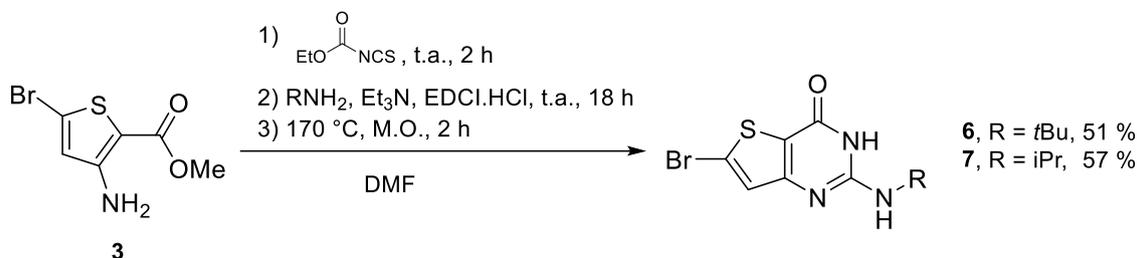


Schéma 27. Réaction de cyclisation permettant d'obtenir le cycle thieno[3,2-*d*]-pyrimid4(3*H*)-one à partir de **3**.

Des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura, ayant servi pour la synthèse des métabolites du M1,²⁶³ ont été ensuite utilisées sur les composés **6** et **7** mais n'ont pas permis d'isoler les produits souhaités (**Schéma 28**). Le brut réactionnel obtenu comportait, en termes de proportions (évaluées par LCMS), un mélange de 20 % de matière première, 55 % de produit réactionnel et 25 % d'un sous produit. La purification du brut réactionnel s'est avérée difficile, difficulté renforcée par la présence de ce sous-produit réactionnel formé par la réduction de la liaison carbone-brome, et qui possède un rapport frontal très proche de celui du produit réactionnel attendu.

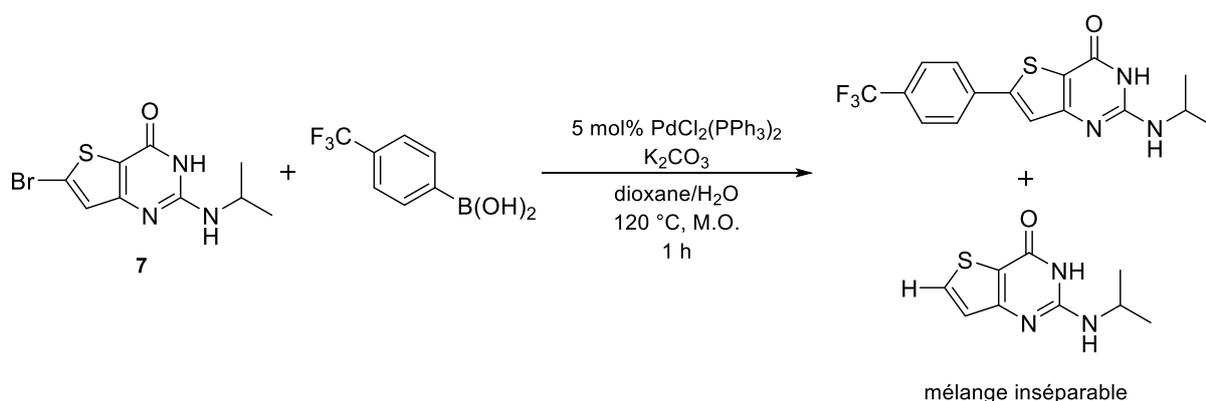


Schéma 28. Conditions de couplage de Suzuki-Miyaura sur le dérivé **7**.

Les conditions utilisées sont pourtant sensées limiter cette réaction de déshalogénéation. En effet, celle-ci a lieu principalement lorsque la réaction est effectuée dans un solvant

capable de s'oxyder (méthanol ou éthanol). Dans ces conditions, le solvant remplace la base lors de la métathèse et, complexé au palladium, est ensuite déprotonné par la base. Il y a alors une β -élimination suivie d'une élimination réductrice libérant d'une part l'aldéhyde (provenant du solvant alcool après oxydation) et d'autre part le substrat hydrodésalogéné (**Schéma 29**).^{306, 307} De plus, la base utilisée (K_2CO_3), ne disposant pas d'hydrogène pouvant réaliser la réduction observée, ne peut pas être la cause de cette hydrodésalogénéation.³⁰⁸

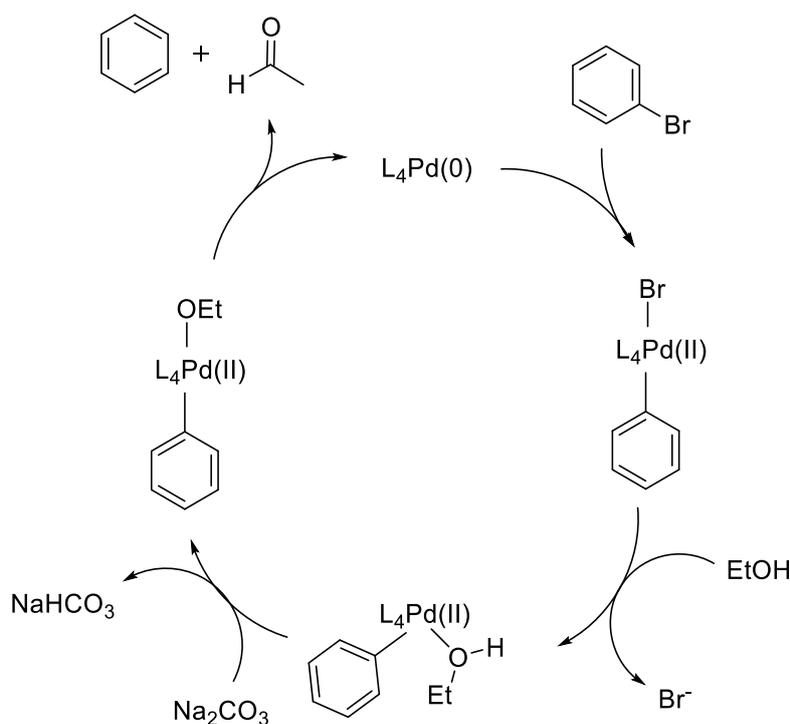


Schéma 29. Mécanisme aboutissant à l'hydrodésalogénéation d'un bromoaryle dans un couplage de Suzuki-Miyaura réalisé dans l'éthanol.

Afin de s'affranchir de ce problème de désalogénéation, nous avons utilisé le composé **3** pour la réalisation des couplages de Suzuki-Miyaura. Les cyclisations ont ensuite été réalisées sur les thiophènes fonctionnalisés en position 5. Des conditions déjà utilisées au sein du laboratoire sur le composé **3** ont ainsi été réemployées. Ces conditions diffèrent de celles retrouvées dans la littérature uniquement au niveau de la concentration en composé **3** (ces dernières sont cependant réalisées sur plusieurs grammes du composé **3**).³⁰⁹ La réaction a été testée dans deux conditions afin de déterminer la meilleure (**Tableau 22**). Finalement, un

³⁰⁶ Ahmadi, Z.; McIndoe, J.S. A Mechanistic Investigation of Hydrodehalogenation Using ESI-MS. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11488, doi:[10/gnmb9r](https://doi.org/10.1039/c3cc46999a).

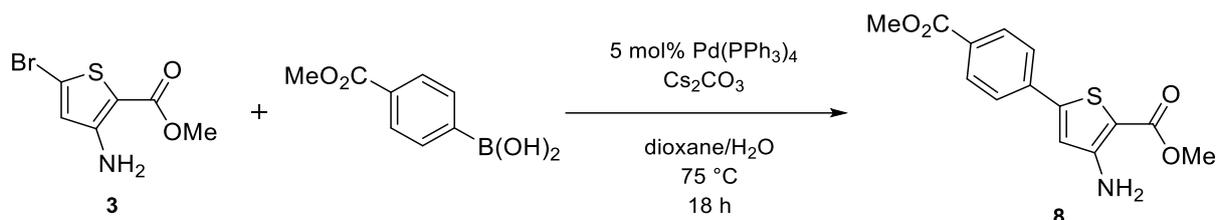
³⁰⁷ Sherwood, J.; Clark, J.H.; Fairlamb, I.J.S.; Slattery, J.M. Solvent Effects in Palladium Catalysed Cross-Coupling Reactions. *Green Chem.* **2019**, 21, 2164–2213, doi:[10/gnmb9v](https://doi.org/10.1039/c9gc00099a).

³⁰⁸ Viciu, M.S.; Grasa, G.A.; Nolan, S.P. Catalytic Dehalogenation of Aryl Halides Mediated by a Palladium/Imidazolium Salt System. *Organometallics* **2001**, 20, 3607–3612, doi:[10/dbxxvm](https://doi.org/10.1021/dbxxvm).

³⁰⁹ Synthesis med (Shanghai) Co Ltd. Method for preparing Chk protein kinase antagonist AZD-7762. CN101967141A, 2011.

milieu réactionnel plus concentrée en matière première permet à la réaction d'avoir lieu tandis que celles de la littérature entraînent une déhalogénéation. Par la suite, nous avons remarqué que le remplacement du carbonate de césium par le carbonate de potassium ne changeait pas le rendement final de la réaction. Etant donné que le carbonate de césium est une base plus chère que le carbonate de potassium, c'est cette dernière qui a été gardée comme base pour ce couplage de Suzuki-Miyaura.

Tableau 22. Impact de la quantité de solvant sur le couplage de Suzuki-Miyaura sur le composé **3**.



Condition	Concentration de 3 (mol.L ⁻¹)	Proportion d'eau	Résultats
A ³⁰⁹	0,11	36 %	Formation majoritaire de produit de réduction
B	0,57	33 %	55 % rendement

Les conditions B ont aussi été testées sur le composé **6** et le résultat a été une fois de plus la formation du dérivé déshalogéné (**Schéma 30**).

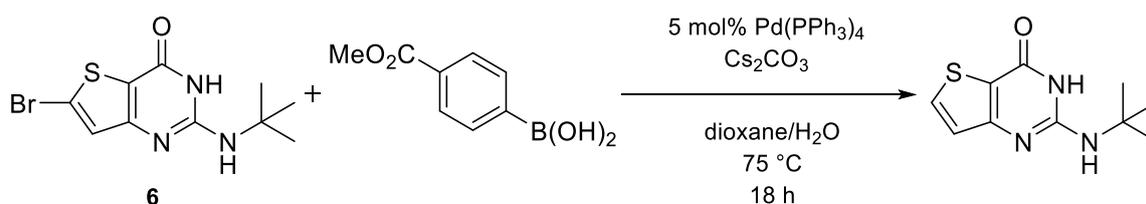


Schéma 30. Résultat des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura du **Tableau 22** sur le composé **6**.

C'est donc le composé **3** qui a été sélectionné pour être l'intermédiaire dans les couplages de Suzuki-Miyaura. Bien que l'inconvénient majeur soit de devoir effectuer la cyclisation après chaque couplage de Suzuki-Miyaura, ce choix a comme avantages par rapport à l'utilisation des dérivés **6** ou **7** :

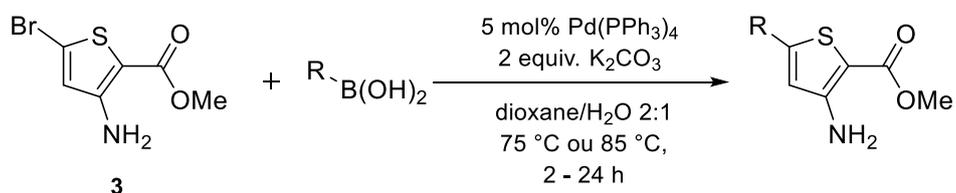
- Des purifications simplifiées avec peu de sous-produits et des produits réactionnels souvent fluorescents sous UV à 320 nm (contrairement à la molécule **3**) les rendant facilement identifiables sur CCM ;

- De pouvoir réaliser facilement ces réactions avec de grosses quantités (> 1 g) sans être limité contrairement à la cyclisation qui nécessite un passage au micro-onde étant donné que les vials utilisés au laboratoire peuvent contenir au maximum environ 15 mL de solvant (correspondant à une réaction lancée sur 700 mg de matière première en tenant compte des réactifs liquides utilisés) ;
- De pouvoir ensuite modifier l'amine en position 2.

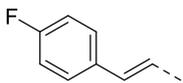
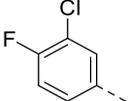
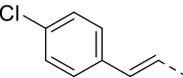
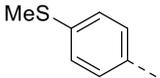
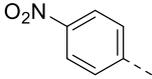
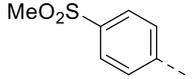
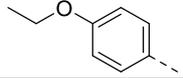
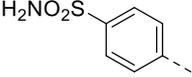
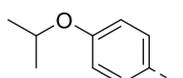
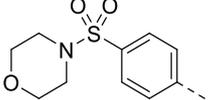
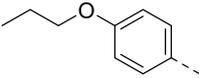
2.3. Couplage de Suzuki-Miyaura en position 5 du dérivé 3

Les conditions pour le couplage de Suzuki-Miyaura ont été appliquées à différents substrats permettant d'obtenir 29 composés avec des rendements allant de 34 à 89 % (Tableau 23).

Tableau 23. Conditions et résultats des couplages de Suzuki-Miyaura effectués sur le composé 3.



N°	R	Rdt (%)	N°	R	Rdt (%)
8		55	23		85
9		83	24		55
10		67	25		47
11		76	26		73
12		84	27		71
13		64	28		71
14		54	29		44
15		80	30		41
16		68	31		34 (2 étapes)

17		68	32		82
18		70	33		72
19		65	34		62
20		74	35		47
21		89	36		88
22		81			

Le temps de réaction est variable mais généralement aux alentours de quelques heures. Pour certaines réactions, l'augmentation de la température de 75 °C à 85 °C a été nécessaire pour accélérer la réaction. Le traitement de la réaction est quant à lui simple : le mélange réactionnel est versé dans l'eau et, si un précipité filtrable ne se forme pas, une extraction avec de l'acétate d'éthyle est réalisée. Si nécessaire (impuretés en trop grande quantité, produit pur pour caractérisations), une purification par colonne chromatographique sur gel de silice ou par chromatographie flash en utilisant des mélanges cyclohexane/dichlorométhane ou cyclohexane/acétate d'éthyle peut être réalisé. Les moins bons rendements sont retrouvés avec les acides boroniques comportant des diazahétérocycles **29**, **30** et **31** ou avec des substituants très encombrés comme l'éther de butyle **24** ou de phényle **25**.

Le composé **31** a été obtenu en deux temps : le couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé avec l'acide (1-(*tert*-butoxycarbonyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)boronique puis le groupement protecteur « Boc » a été éliminé à l'aide d'acide trifluoroacétique (**Schéma 31**).

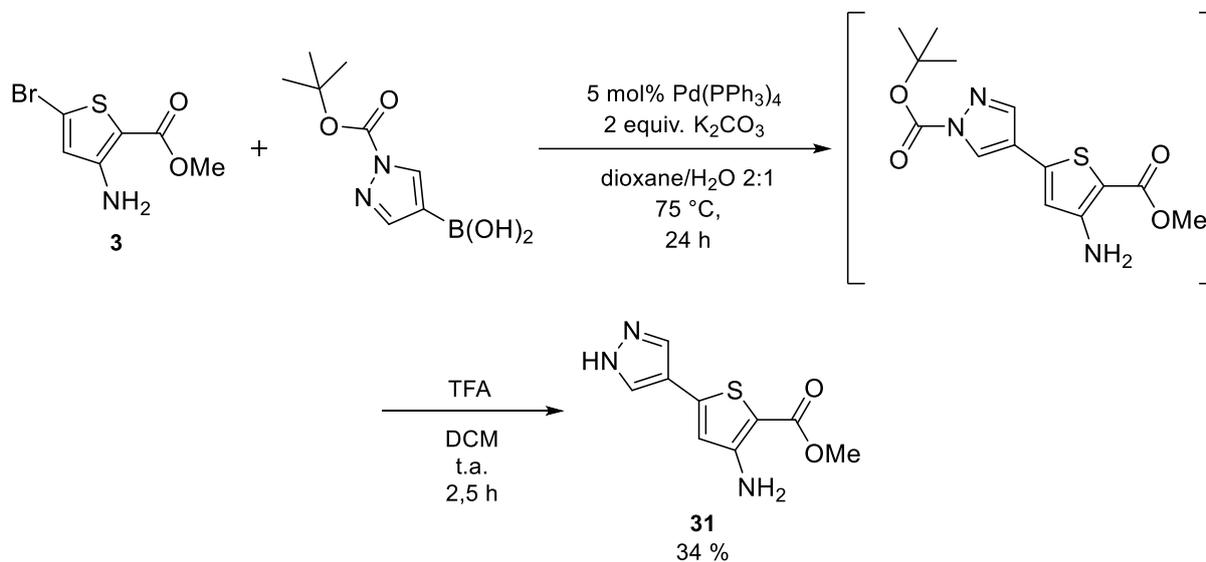


Schéma 31. Synthèse du composé **31**.

Pour le dérivé **29**, l'eau a été retirée de la réaction afin d'éviter la substitution de l'atome de chlore par celle-ci. L'atome de chlore de ce composé a ensuite été substitué par la morpholine ou la *N*-méthylpipérazine en présence de triéthylamine dans l'éthanol (**Schéma 32**). Cette réaction doit être réalisée avant la cyclisation puisque les conditions de celle-ci entraîneraient la substitution de l'atome de chlore avec l'amine utilisée lors de la cyclisation.

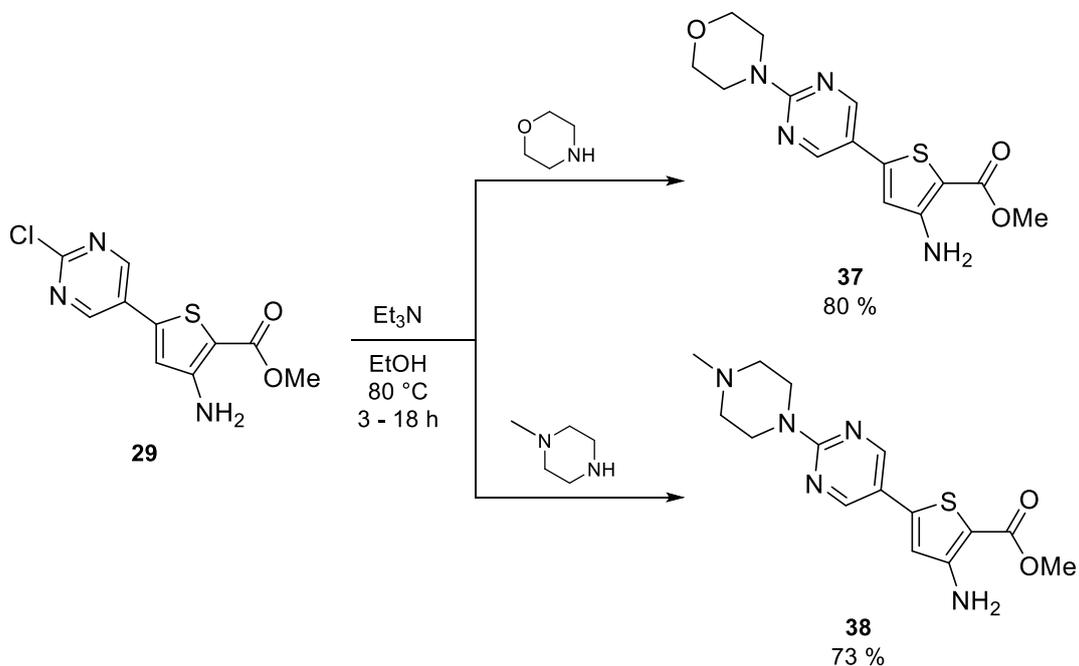


Schéma 32. Synthèse des composés **37** et **38** à partir du composé **29**.

Certains acides boroniques utilisés n'ont cependant pas abouti à la synthèse des dérivés souhaités (**Figure 53**) comme avec l'acide (2-phényléthyl)boronique, acide boronique au bout d'une chaîne aliphatique contrairement aux autres acides boroniques utilisés qui sont aromatiques, ou l'acide (4-sulfanylphényl)boronique dont la fonction thiol « empoisonne » le catalyseur au palladium, le rendant ainsi inactif. Probablement à cause de l'encombrement stérique provoqué par les deux méthyles entourant la fonction acide boronique, le dérivé 4-méthoxy-2,6-diméthylphényle n'a pas été formé. Enfin, la nature particulière de l'acide ferrocèneboronique, par rapport aux acides phénylboroniques classiques, n'a pas permis d'introduire le ferrocène en position 5 du thiophène.

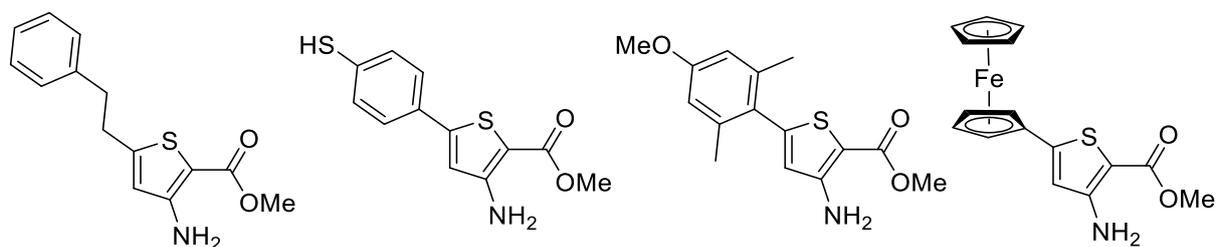


Figure 53. Dérivés non-obtenus après couplage de Suzuki-Miyaura.

2.4. Réaction de cyclisation sur les dérivés issus du couplage de Suzuki-Miyaura

2.4.1. Formation du cycle 2-aminopyrimidin-4(3H)-one

La réaction clé dans la synthèse des 2-aminothiéo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one est la formation du cycle 2-aminopyrimidin-4(3*H*)-one. Cette réaction est réalisée sur les aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5 et se déroule en 3 étapes, en « *one pot* » dans le diméthylformamide (DMF) (**Schéma 33**) :²⁶¹

- La formation d'un intermédiaire thiourée par la réaction de l'amine de l'ainoester du thiophène sur l'isothiocyanate d'éthoxycarbonyle ;
- Cette thiourée est transformée en guanidine par réaction avec une amine (*tert*-butylamine ici dans le **Schéma 33**) en présence de triéthylamine et d'un agent de couplage, le chlorhydrate d'1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide ;
- Par chauffage en tube scellé au réacteur micro-ondes, l'intermédiaire guanidine se cyclise pour former le cycle 2-aminopyrimidin-4(3*H*)-one.

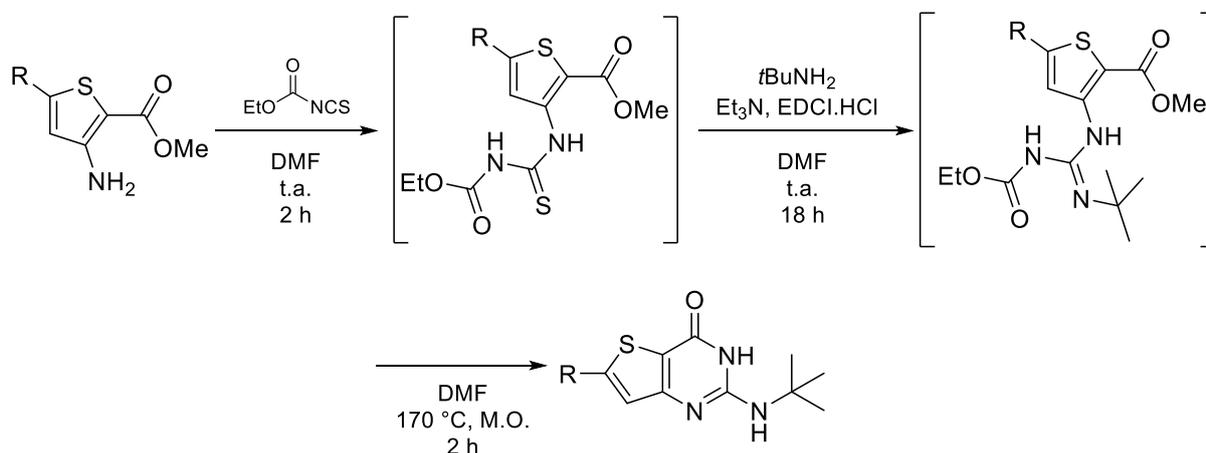
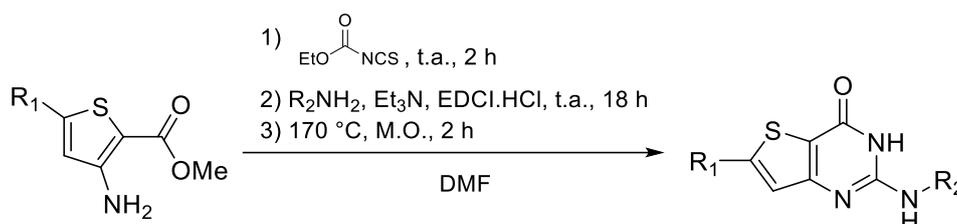


Schéma 33. Détails de la réaction de cyclisation permettant d'obtenir le cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

2.4.2. Dérivés thiéno[3,2-*d*]pyrimidine synthétisés à partir des thiophènes fonctionnalisés par le couplage de Suzuki-Miyaura

La réaction précédemment décrite a été appliquée sur les aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5 (composés **8** à **28** et **29** à **37**) afin d'obtenir des 2-*tert*-butylaminothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones et quelques dérivés 2-isopropylaminothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. Un total de 38 composés a été obtenu avec cette réaction avec des rendements allant de 18 à 75 % (**Tableau 24**).

Tableau 24. Conditions et rendements des réactions de cyclisation sur aminoesters du thiophène fonctionnalisés en position 5.



N°	R ₁	R ₂	Rdt (%)	N°	R ₁	R ₂	Rdt (%)
37		<i>t</i> Bu	55	57		<i>t</i> Bu	52
38		<i>t</i> Bu	75	58		<i>i</i> Pr	32
39		<i>t</i> Bu	54	59		<i>t</i> Bu	51
40		<i>i</i> Pr	33	60		<i>i</i> Pr	18
41		<i>t</i> Bu	42	61		<i>t</i> Bu	44

42		iPr	17	62		tBu	57
43		tBu	53	63		tBu	69
44		iPr	47	64		tBu	69
45		tBu	55	65		tBu	23
46		iPr	34	66		tBu	51
47		tBu	33	67		tBu	57
48		tBu	30	68		tBu	19
49		iPr	24	69		tBu	58
50		tBu	39	70		tBu	49
51		iPr	40	71		tBu	49
52		iPr	27	72		tBu	37
53		iPr	53	73		tBu	65
54		tBu	55	74		tBu	44
55		iPr	33	75		tBu	56
56		tBu	71	76		tBu	33

Après la réaction, le traitement de ces cyclisations est réalisé de manière similaire à celle pour les couplages de Suzuki-Miyaura (cf. Chapitre 3 : 2.3. Couplage de Suzuki-Miyaura en position 5 du dérivé 3) : le milieu réactionnel versé dans un mélange d'eau et de glace et, s'il n'y a pas de précipité filtrable (correspondant au composé d'intérêt avec possiblement des impuretés), une extraction avec de l'acétate d'éthyle est effectuée. Les purifications ont été plus compliquées que pour l'étape précédente à cause de la forte polarité des produits formés (mélange de dichlorométhane/méthanol utilisé pour les chromatographies) associée à la

présence de plusieurs impuretés avec des rapports frontaux proches du produit d'intérêt. De manière générale, les rendements sont plus faibles sur les composés en série isopropylamine par rapport à leurs analogues en série *tert*-butylamine à cause de purifications plus compliquées.

2.4.3. Réactions additionnelles

Les composés **54** et **55** furent ensuite engagés dans une réaction de réduction en présence de fer dans l'acide acétique afin d'obtenir les dérivés **77** et **78**.

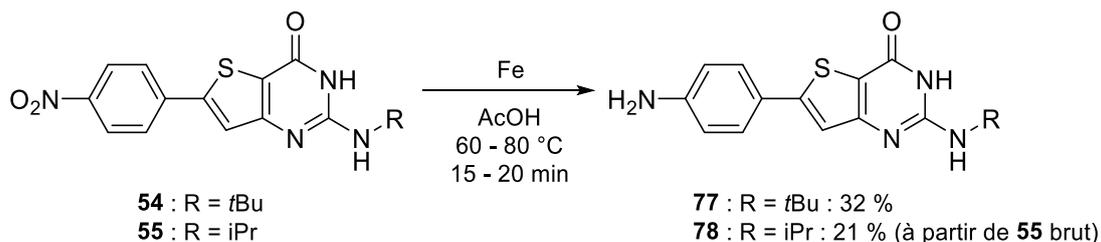


Schéma 34. Réduction des composés **54** et **55**.

La réaction a été initialement effectuée à 120 °C pendant 30 minutes mais l'acétylation de l'aniline par l'acide acétique a été observée dans ces conditions. Le composé **79**, comportant une fonction acétamide sur le cycle phényle, a ainsi pu être isolé (**Figure 54**).

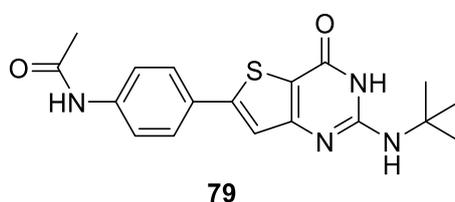


Figure 54. Structure chimique du composé **79**.

Le composé **73** a été utilisé afin d'obtenir un dérivé sulfoximine **80** à l'aide de carbamate d'ammonium et de diacétate d'iodobenzène (PIDA) (**Schéma 35**).³¹⁰ Cette réaction permet d'obtenir en une seule étape la fonction sulfoximine à partir d'un thioether. Sans cela, il faudrait passer par une étape intermédiaire d'oxydation du soufre en sulfoxyde, avec le risque de former le dérivé sulfone et la nécessité de réaliser un traitement et potentiellement une purification ; avant de former la sulfoximine par imination du sulfoxyde.

³¹⁰ Lohier, J.-F.; Glachet, T.; Marzag, H.; Gaumont, A.-C.; Reboul, V. Mechanistic Investigation of the NH-Sulfoximation of Sulfide. Evidence for λ^6 -Sulfanenitrile Intermediates. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 2064–2067, doi:[10/gm7zzf](https://doi.org/10.1039/C6CC07277F).

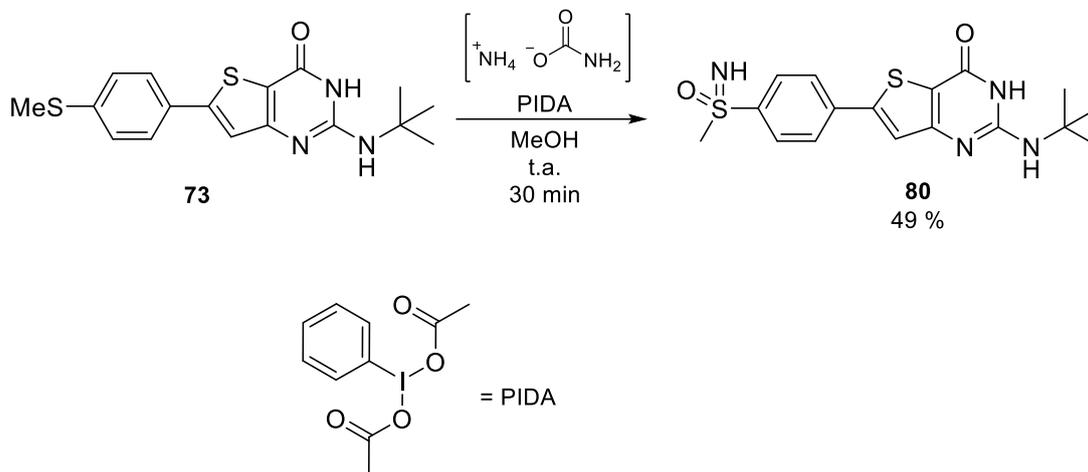


Schéma 35. Synthèse du composé **80**.

2.5. Criblage primaire des composés obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura

Les composés synthétisés ont ensuite été testés sur le stade sanguin de *P. falciparum* pour déterminer leur activité (CE_{50}) ainsi que sur lignée cellulaire HepG2 pour mesurer leur cytotoxicité (CC_{50}), en comparaison avec des molécules de référence dans les deux cas. Dans les différents tableaux présentant ces valeurs biologiques, la présence d'un « > x » comme résultat indique que la valeur biologique exacte est supérieure à x, x étant la concentration maximale de produit testé avant sa précipitation dans le milieu.

2.5.1. Principe du test de mesure de la CE_{50} sur *P. falciparum*

La mesure de l'activité antiplasmodiale, sur stade sanguin de *P. falciparum*, est réalisée sur la souche K1. Cette souche est multi-résistante à la chloroquine, la pyriméthamine et au proguanil. La méthode utilisée est une méthode par fluorescence au SYBR green I.³¹¹ Ce composé (**Figure 55**) est capable de se lier à l'ADN et sous lumière UV (à 497 nm) d'émettre à son tour de la lumière (à 520 nm).

³¹¹ Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J.X.; Wilairat, P.; Riscoe, M. Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1803–1806, doi:[10/csb6nh](https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.1803-1806.2004).

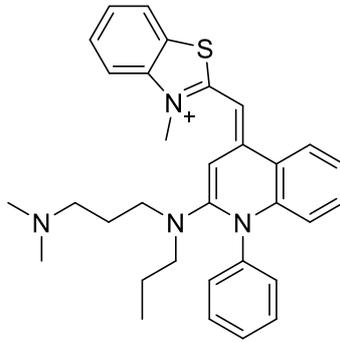


Figure 55. Structure chimique du SYBR green I.

Cette technique est employée car les seules cellules possédant du matériel génétique lors de ce test sont les parasites ; les érythrocytes étant anucléés. La méthode permet donc de ne détecter que la quantité d'ADN parasitaire. La culture parasitaire, dans une plaque 96-puits, est incubée en présence du composé testé pendant 72 heures. Après l'incubation, une petite quantité de chaque puit est mélangée à un milieu capable de lyser les cellules et les parasites, et incluant le SYBR green I. Celui-ci va alors pouvoir se lier au matériel génétique parasitaire. La quantité de complexe ADN-SYBR (déterminée par spectroscopie UV) est le reflet de la quantité de matériel génétique parasitaire et donc de la parasitémie de l'échantillon. Plus cette quantité est petite et plus l'activité antiplasmodiale du composé testé est importante. Les différentes concentrations testées permettent, après analyse statistique, de déterminer la CE_{50} , concentration conduisant à une réduction de 50 % de la parasitémie. Celle-ci peut ensuite être comparée aux molécules de référence qui sont, pour ce test, la chloroquine (à laquelle le parasite est résistant) et l'atovaquone.

2.5.2. Principe du test de mesure de la CC_{50} sur lignée cellulaire HepG2

La mesure de la CC_{50} est réalisée par un test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (ou MTT).³¹² Ce composé, de couleur jaune, est réduit en formazan, de couleur violette, par les cellules vivantes (**Schéma 36**).

³¹² Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63, doi:[10/drmgk3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90003-3).

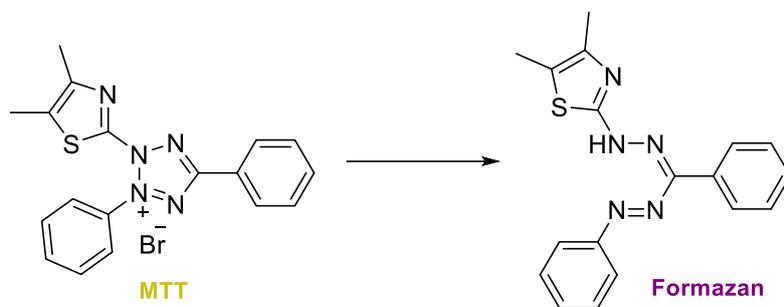


Schéma 36. Modification structurale du MTT aboutissant au formazan par réduction en milieu cellulaire.

Les cellules utilisées pour ce test dans le cadre de ces travaux de thèse sont des cellules de la lignée HepG2, une lignée cellulaire immortelle dérivant d'un hépatocarcinome humain. Puisqu'il s'agit d'hépatocytes, ces cellules sont capables de pouvoir métaboliser les composés testés et de prédire l'apparition de métabolites toxiques. Ces cellules en culture, dans une plaque 96-puits, sont mises à incuber en présence de différentes concentrations du composé testé pendant 72 heures. Après ce temps d'incubation, le milieu de culture est changé afin d'y incorporer un autre comprenant le MTT. Les cellules sont incubées en présence de ce dernier pendant 2 heures. Le formazan formé est dissous et les résultats peuvent alors être analysés (**Figure 56**). La plaque 96-puits est lue par spectroscopie d'absorbance à 540 nm. Plus l'absorbance est grande, plus la quantité de formazan produite est importante et donc plus la quantité de cellules vivantes est importante. L'absorbance aux différentes concentrations du produit testé permet une analyse statistique pour déterminer la CC_{50} , concentration de produit à laquelle 50 % des cellules survivent. Ces valeurs sont ensuite comparées à la doxorubicine, molécule de référence.

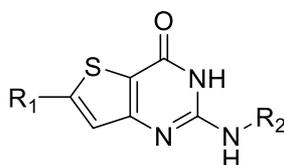


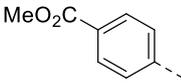
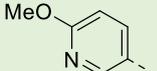
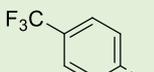
Figure 56. Exemple de plaque 96 puits ayant servi à réaliser un test de cytototoxicité au MTT-formazan. Les puits les plus violets contiennent le plus de cellules vivantes.

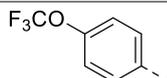
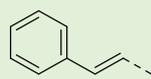
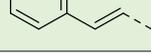
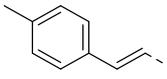
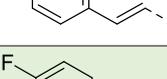
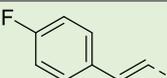
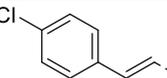
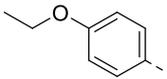
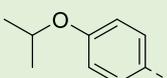
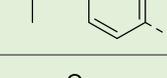
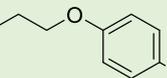
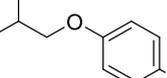
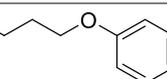
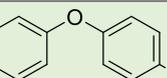
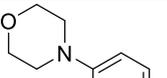
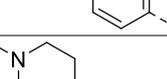
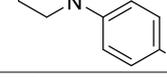
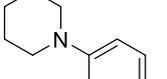
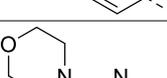
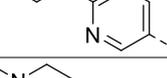
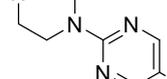
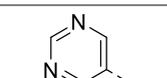
2.5.3. Résultats du criblage

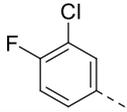
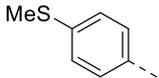
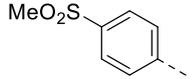
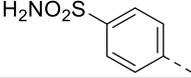
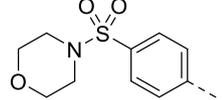
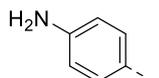
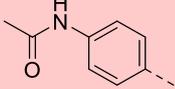
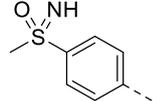
Le **Tableau 25** rassemble les résultats biologiques obtenus des 43 composés synthétisés à partir du couplage de Suzuki-Miyaura. Parmi ces composés, 8 possèdent une activité antiplasmodiale inférieure ou égale à 1 μM (surlignés en vert dans le **Tableau 25**), en comparaison de la chloroquine à 0,5 μM (et dont la souche employée est considérée comme résistante). Seul le composé **79**, possédant une fonction acétamide, s'est montré plus cytotoxique que la doxorubicine. On remarque aussi que selon le substituant en position 6, certains composés vont avoir de bonnes valeurs biologiques en série *tert*-butylamine mais pas en série isopropylamine (**43** et **45** par exemple) ; l'inverse est aussi valable notamment pour les dérivés comportant une fonction alcène. Devant ces résultats variant fortement selon la fonction amine en position 2, la synthèse s'est progressivement concentrée sur les dérivés en série *tert*-butylamine.

Tableau 25. Résultats biologiques des thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones obtenus après fonctionnalisation par couplage de Suzuki-Miyaura. En vert, les composés ayant une CE_{50} inférieure à 1 μM . En rouge, les composés fortement cytotoxiques.



N°	R ₁	R ₂	CE ₅₀ <i>PfK1</i> (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
6	Br	<i>t</i> Bu	43,2 \pm 2,6	38,2 \pm 3,5	0,9
7		<i>i</i> Pr	> 50	89,1 \pm 9,7	< 1,8
37		<i>t</i> Bu	2,5 \pm 0,9	> 12,5	> 5
39		<i>t</i> Bu	5,7 \pm 1,7	52,4 \pm 11,3	9,2
40		<i>i</i> Pr	9,7 \pm 1,2	> 50	> 5,2
41		<i>t</i> Bu	4,3 \pm 1,1	4,1 \pm 1,3	0,9
42		<i>i</i> Pr	> 5	4 \pm 1,6	< 0,8
43		<i>t</i> Bu	0,09 \pm 0,01	20,7 \pm 4,1	230
44		<i>i</i> Pr	0,2 \pm 0,03	3,3 \pm 1,8	16,5
45		<i>t</i> Bu	0,8 \pm 0,2	9,2 \pm 3,1	11,5
46		<i>i</i> Pr	2,5 \pm 0,5	19,5 \pm 4,2	7,8

47		tBu	-	-	-
48		tBu	1,1 ± 0,2	29,7 ± 2,1	27,0
49		iPr	0,5 ± 0,03	23,6 ± 3,3	47,2
50		tBu	2,3 ± 0,6	16,5 ± 3,8	7,2
51		iPr	1,0 ± 0,1	> 5	> 5,0
52		iPr	0,4 ± 0,01	13,6 ± 0,1	34,0
53		iPr	1,2 ± 0,02	13,1 ± 0,6	10,9
56		tBu	1,0 ± 0,4	> 6,25	> 6,3
57		tBu	0,7 ± 0,3	> 12,5	17,9
58		iPr	1,5 ± 0,7	8,4 ± 0,1	5,6
59		tBu	0,8 ± 0,5	> 12,5	15,6
60		iPr	1,5 ± 0,7	> 25	> 16,7
61		tBu	1,1 ± 0,4	> 12,5	11,4
62		tBu	1,3 ± 0,3	8,5 ± 1,9	6,5
63		tBu	0,8 ± 0,4	6,1 ± 1,7	7,6
64		tBu	2,4 ± 0,9	7,9 ± 1,3	3,3
65		tBu	4,1 ± 0,7	5,8 ± 0,5	1,4
66		tBu	4,1 ± 1,2	> 6,25	1,5
67		tBu	2,1 ± 0,6	26,4 ± 4,6	12,6
68		tBu	4,4 ± 1	11,2 ± 1,3	2,5
69		tBu	> 12,5	> 62,5	-
70		tBu	5,5 ± 2,1	6,1 ± 3,8	1,1
71		tBu	2,0 ± 0,9	> 12,5	> 6,3

72		iPr	3,6 ± 1,2	> 6,25	> 1,7
73		tBu	1,0 ± 0,3	> 12,5	> 12,5
74		tBu	3,0 ± 0,6	> 25	> 8,3
75		tBu	> 12,5	> 6,25	-
76		tBu	5,1 ± 2,6	> 12,5	> 2,5
77		tBu	3,5 ± 1,2	2,5 ± 1	0,7
78		tBu	6 ± 1,1	11,3 ± 3,5	1,9
79		tBu	3,9 ± 1,1	0,16 ± 0,04	0,04
80		tBu	> 12,5	63,3 ± 14,6	< 5,1
	M1		0,045	24	533
	Chloroquine		0,5	30	60
	Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
	Doxorubicine		-	0,2	-

Déjà vu avec les dérivés sans substituant en position 6 (**tableau chap 2**), un simple atome de brome en position 6 (composé **6** et **7**) ne confère pas d'activité antipaludique. Les composés **37** et **79** peuvent être considérés comme des prodrogues (esters, amides) et les composés **77** et **78** des précurseurs de prodrogues, mais ces 4 molécules montrent une faible activité voire une augmentation de la cytotoxicité comme pour le composé **79**.

La nature du cycle en position 6 est importante : une diminution de la cytotoxicité pour les dérivés comportant une 3-pyridine (**39** et **40**) ou une pyrimidine (**69**) a été observée tandis que l'insertion d'une 4-pyridine (**41** et **42**) ou un pyrazole (**70**) s'accompagne d'une augmentation de celle-ci. L'hypothèse fut émise qu'un substituant était absent sur les composés **39** et **40** pour l'obtention d'une activité antiplasmodiale. Parmi les substituants possibles, le groupement méthoxy fut sélectionné, ayant montré de bons résultats en série isopropylamine (**Tableau 16**) lors des travaux aboutissant au composé M1. Deux dérivés avec un substituant méthoxypyridine (**43** et **44**) ont donc été synthétisés menant à des résultats biologiques prometteurs pour le composé **43**.

Afin de stopper le métabolisme oxydatif sur le cycle phényle, des composés comportant des fonctions qualifiées de bloqueur métabolique ont été synthétisés (**45** à **47**) et possèdent des valeurs biologiques intéressantes en série *tert*-butylamine. Des dérivés possédant une chaîne vinyle, pour étudier l'impact de l'allongement de la chaîne carbonée entre le cycle thiénoypyrimidine et le substituant phényle (**48** à **53**), ont pu être obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura avec des acides vinylboroniques. Les valeurs biologiques intéressantes de **49** nous ont poussés à synthétiser d'autres dérivés en série isopropylamine (**52** et **53**) qui conservent cette bonne activité biologique.

Dans le but d'étudier l'impact de l'encombrement stérique en *para* du cycle phényle, plusieurs dérivés étherés ont été synthétisés avec des chaînes de longueur variable (**56** à **63**). Avec les chaînes étherées comportant 2 ou 3 atomes de carbone, **56**, **57** et **59** possèdent des activités antiplasmodiales intéressantes mais ont une solubilité dans le milieu de test limitée par rapport au composé M1. Les analogues en série isopropylamine de **57** et **59**, les composés **58** et **60** ont une activité antiplasmodiale réduite par rapport à **57** et **59**. Bien que fortement encombré avec son substituant phénoxyphényle, **63** possède une activité plasmodiale submicromolaire mais une cytotoxicité moyenne. Toujours dans l'optique d'étudier l'influence de l'encombrement stérique mais aussi afin de pouvoir améliorer la solubilité aqueuse avec l'introduction d'une amine cyclique, les dérivés **64** à **68** ont une activité antiplasmodiale réduite ainsi que qu'une cytotoxicité accrue dans la majorité des cas.

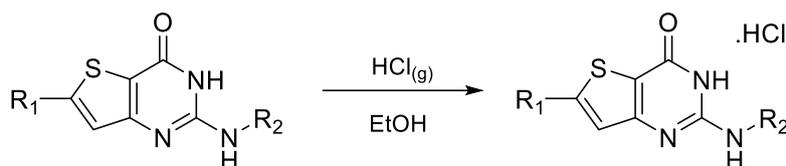
La série de dérivés comportant une fonction soufrée (**73** à **76** et **80**) possède des activités antiplasmodiales moyennes mais surtout une perte de solubilité dans le milieu de test, à l'exception du dérivé sulfoximine (**80**). Enfin, deux composés substitués à la fois par un atome de fluor en *para* et un atome de chlore en *meta* (**71** et **72**) ne possèdent pas de bonnes activités biologiques, limitant l'intérêt d'une disubstitution du cycle phényle.

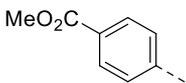
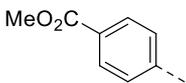
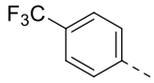
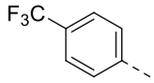
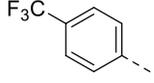
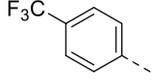
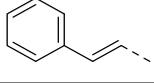
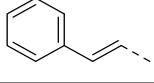
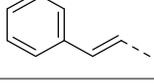
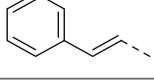
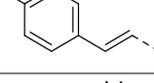
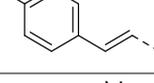
2.6. Salification des composés

Considérant que le composé M1 est un chlorhydrate, il a initialement été envisagé de convertir une grande partie des composés synthétisés dans ces travaux sous cette forme. Pour réaliser ces sels, nous avons opté pour l'utilisation du chlorure d'hydrogène dans un solvant anhydre. Les composés à salifier sont solubilisés dans de l'éthanol absolu (à chaud si besoin) puis du chlorure d'hydrogène est barboté dans l'éthanol, provoquant la formation du sel et sa précipitation. Cette méthode a l'avantage d'être rapide à réaliser mais possède deux inconvénients : l'élimination du solvant résiduel peut être compliquée d'un sel à l'autre et il

est difficile de limiter la formation d'espèces autre que le monochlorhydrate voulu. Concernant ce dernier point, la stœchiométrie a pu être confirmée, en grande majorité, par analyse élémentaire. Parmi les premiers composés envoyés en screening biologique primaire, 8 sels ont été testés. Le **Tableau 26** résume leurs activités biologiques, comparativement à celles de leur base libre.

Tableau 26. Résultats biologiques des premiers chlorhydrates réalisés par comparaison à ceux de leur base libre.



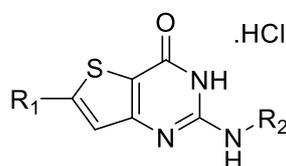
N°	R ₁	R ₂	.HCl	Rdt (%)	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
6				-	43,2 ± 2,6	38,2 ± 3,5	0,9
6s	Br	tBu	✓	67	41,3 ± 6,6	26,2 ± 9,9	0,6
7				-	> 50	89,1 ± 9,7	< 1,8
7s	Br	iPr	✓	65	> 50	96,4 ± 14,3	2,1
37		tBu		-	2,5 ± 0,9	> 12,5	> 5
37s		tBu	✓	78	2,6 ± 0,6	> 6,25	> 2,4
45		tBu		-	0,8 ± 0,2	9,2 ± 3,1	11,5
45s		tBu	✓	89	0,9 ± 0,2	10,8 ± 1,8	12,0
46		iPr		-	2,5 ± 0,5	19,5 ± 4,2	7,8
46s		iPr	✓	87	_a	_a	-
48		tBu		-	1,1 ± 0,2	29,7 ± 2,1	27,0
48s		tBu	✓	74	1,3 ± 0,2	30,1 ± 3,8	23,2
49		iPr		-	0,5 ± 0,03	23,6 ± 3,3	47,2
49s		iPr	✓	75	0,5 ± 0,03	18,1 ± 4,6	36,2
50		tBu		-	2,3 ± 0,6	16,5 ± 3,7	7,2
50s		tBu	✓	80	2,7 ± 0,3	30,4 ± 1,6	11,3

a) le composé n'a pas pu être testé à cause de son manque de solubilité

Ces premiers résultats nous ont montré que la salification a, au mieux, un effet nul ou légèrement délétère sur l'activité ou la cytotoxicité, et, au pire, de manière inattendue est capable de donner des composés très peu solubles dans le milieu de test (**46s**). Considérant que la salification donnant le composé M1 a été faite sur un composé déjà bien actif biologiquement (**Tableau 19**), la décision a donc été prise de limiter la réalisation de sels pour

les meilleurs composés d'un point de vue biologique. Ainsi, sur la série issue du couplage de Suzuki-Miyaura, seuls deux autres sels ont été synthétisés et évalués (**Tableau 27**).

Tableau 27. Résultats biologiques des chlorures des composés **57** et **59**.



N°	R ₁	R ₂	.HCl	Rdt (%)	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
57		tBu		-	0,7 ± 0,3	> 12,5	17,9
57s		tBu	✓	90	0,5 ± 0,06	> 25	> 50
59		tBu		-	0,8 ± 0,5	> 12,5	15,6
59s		tBu	✓	97	0,9 ± 0,6	> 25	> 35,7

Cette approche s'est montrée fructueuse avec les sels **57s** et **59s** qui ont montré une amélioration de leur solubilité dans le milieu de test.

3. Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one obtenus par couplage de Sonogashira en position 6

3.1. Généralités sur le couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira est un couplage pallado-catalysé nécessitant un co-catalyseur à base de cuivre, généralement un sel de cuivre comme l'iodure de cuivre(I). Il permet la création d'une liaison carbone-carbone après la réaction entre un alcyne et un halogénure d'aryle, d'alkyle ou d'allyle, en présence d'une base organique ou inorganique. Cette réactivité entre ces deux types de substrats est décrite par trois publications émanant de diverses équipes et, seuls les travaux de Sonogashira³¹³ utilisent le cuivre en plus de palladium pour ses couplages (**Schéma 37**). L'utilisation du cuivre permet l'utilisation de

³¹³ Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A Convenient Synthesis of Acetylenes: Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes and Bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470, doi:[10/bphsxg](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(75)00000-0).

conditions plus douces, à température ambiante, par rapport aux conditions décrites, sans le cocatalyseur à base de cuivre qui elles, nécessitent un chauffage.^{314, 315}

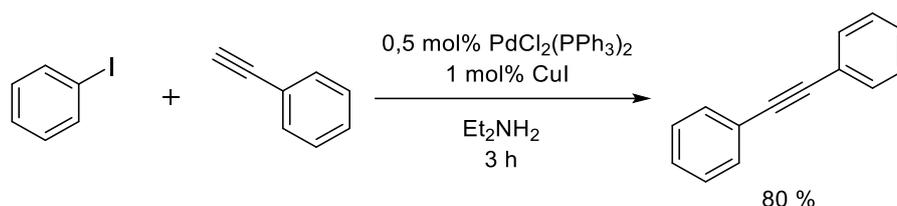


Schéma 37. Premier couplage de Sonogashira entre l'iodobenzène et le phénylacétylène.³¹³

Etant donné l'implication du cuivre dans ce couplage, on retrouve deux cycles catalytiques au sein du mécanisme de la réaction : celui du palladium et celui du cuivre (**Schéma 38**). Le premier possède les mêmes étapes que celle du couplage de Suzuki-Miyaura : insertion oxydante du catalyseur au palladium dans la liaison carbone-halogène, transmétallation puis élimination réductrice permettant la libération du produit réactionnel. Le cycle du cuivre, quant à lui, consiste à remplacer l'atome d'hydrogène de la fonction alcyne pour former un intermédiaire organocuprate pour l'étape de transmétallation.

³¹⁴ Dieck, H.A.; Heck, F.R. Palladium Catalyzed Synthesis of Aryl, Heterocyclic and Vinyl Acetylene Derivatives. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259–263, doi:[10/bq594f](https://doi.org/10.1016/0167-7370(75)90000-0).

³¹⁵ Cassar, L. Synthesis of Aryl- and Vinyl-Substituted Acetylene Derivatives by the Use of Nickel and Palladium Complexes. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 253–257, doi:[10/b7g3kt](https://doi.org/10.1016/0167-7370(75)90000-0).

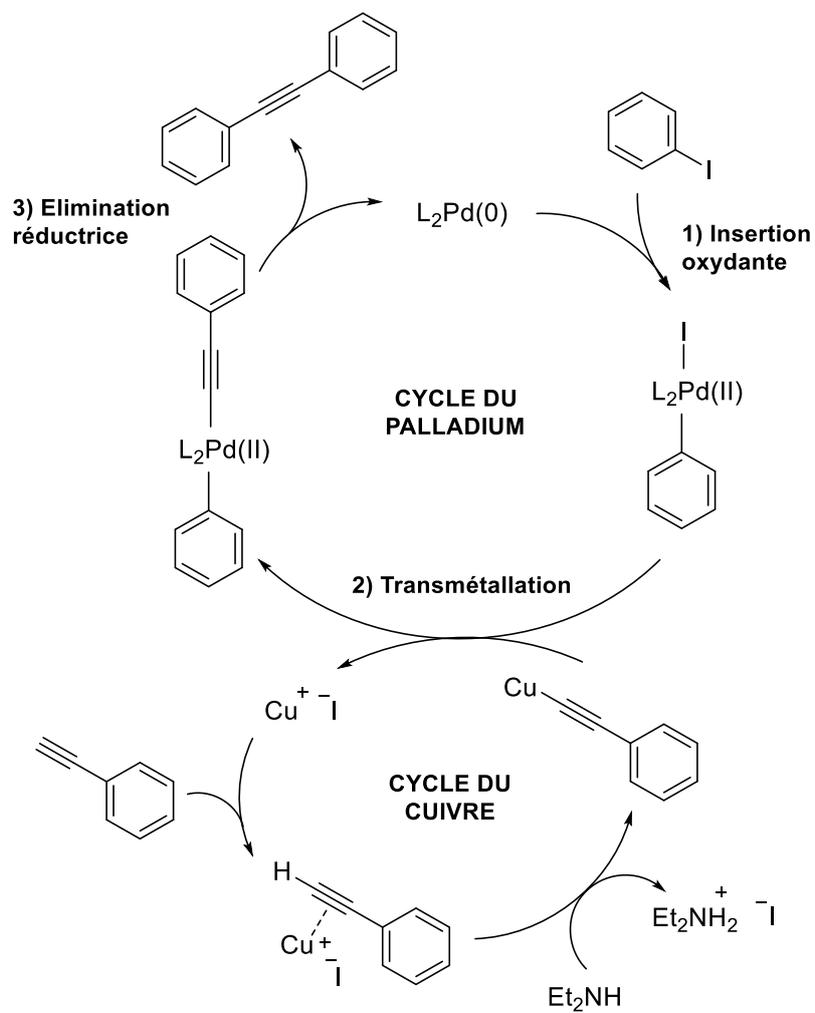


Schéma 38. Cycles catalytiques du couplage de Sonogashira.

3.2. Couplage de Sonogashira en position 6

Les conditions utilisées pour la synthèse de dérivés par des couplages de Sonogashira découlent de conditions décrites dans la littérature et réalisées sur le 5-bromothiophène-2-carboxylate de méthyle.³¹⁶ Ces conditions ont été donc testées sur le composé **3** aboutissant au composé **81** avec un temps de réaction rapide et un bon rendement (Schéma 39).

³¹⁶ Wang, L.; Desmoulin, S.K.; Cherian, C.; Polin, L.; White, K.; Kushner, J.; Fulterer, A.; Chang, M.-H.; Mitchell-Ryan, S.; Stout, M.; Romero, M.F.; Hou, Z.; Matherly, L.H.; Gangjee, A. Synthesis, Biological, and Antitumor Activity of a Highly Potent 6-Substituted Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine Thienoyl Antifolate Inhibitor with Proton-Coupled Folate Transporter and Folate Receptor Selectivity over the Reduced Folate Carrier That Inhibits β -Glycinamide Ribonucleotide Formyltransferase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7150–7164, doi:[10/fhxmj3](https://doi.org/10/fhxmj3).

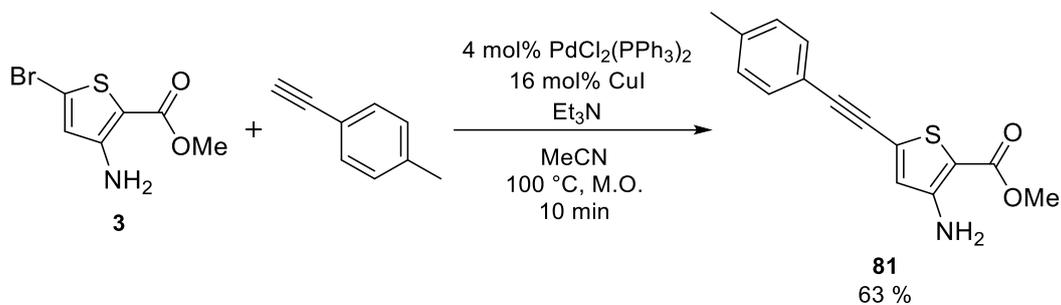
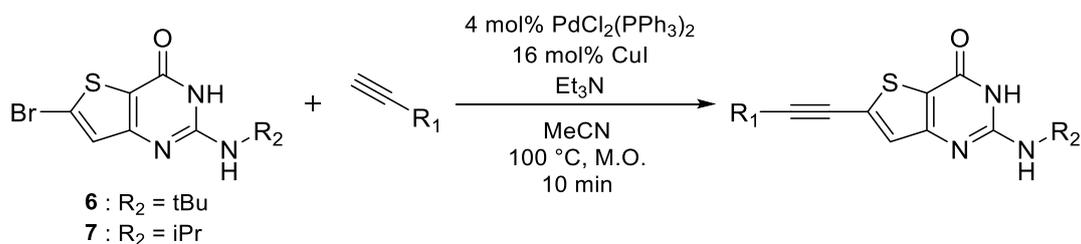


Schéma 39. Couplage de Sonogashira sur le composé **3**.

Ces conditions ont été ensuite testées de manière satisfaisante sur l'intermédiaire **6** conduisant ensuite à la synthèse de 7 dérivés 6-alcynyl-2-aminothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one diversement substitués (**Tableau 28**).

Tableau 28. Conditions et rendements du couplage de Sonogashira sur les composés **6** et **7**.



N°	R ₁	R ₂	Rdt (%)
82		<i>t</i> Bu	60
83		<i>i</i> Pr	23
84		<i>i</i> Pr	85
85		<i>t</i> Bu	23
86		<i>t</i> Bu	47
87		<i>t</i> Bu	35
88		<i>t</i> Bu	62 ^a

a) rendement brut

Nous pouvons observer que le rendement est nettement plus faible pour le composé **83** (issu de l'isopropylamine **7**) par rapport à **82** (issu de la *tert*-butylamine **6**) à cause de problèmes de purification. Pour les composés **85** à **87**, malgré l'augmentation de la quantité d'alcyne (de 1,2 à entre 2,5 et 4 équivalents) à cause de la volatilité des alcynes employés, les rendements sont moyens voire faibles. En plus des problèmes de purification, la nature

différente des alcynes (alcynes n'ayant pas de chaîne aromatique) pourrait expliquer ce résultat. Le groupement triméthylsilane du composé **88** a ensuite subi une protodésilylation afin d'obtenir l'alcyne terminal **89** avec un rendement quasiment quantitatif (**Schéma 40**).

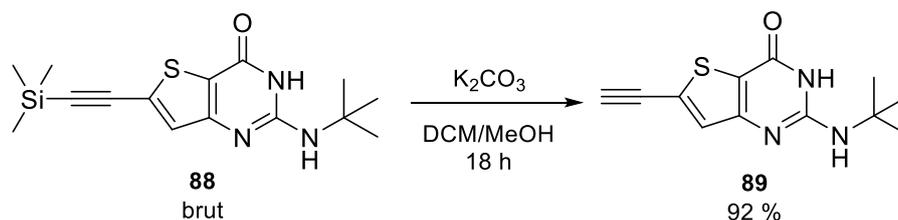


Schéma 40. Protodésilylation du composé **88**.

Le composé **89** a ensuite été engagé dans des réactions de cycloaddition azoture-alcyne catalysées au cuivre (**Schéma 41**). Cette réaction décrite en 2002, dans deux publications indépendantes,^{317, 318} permet l'obtention d'un cycle triazole à partir d'un alcyne et d'un azoture dans des conditions douces y compris en milieu aqueux. Une seule condition a été testée et le mélange complexe obtenu n'a pas permis d'isoler le composé triazole.

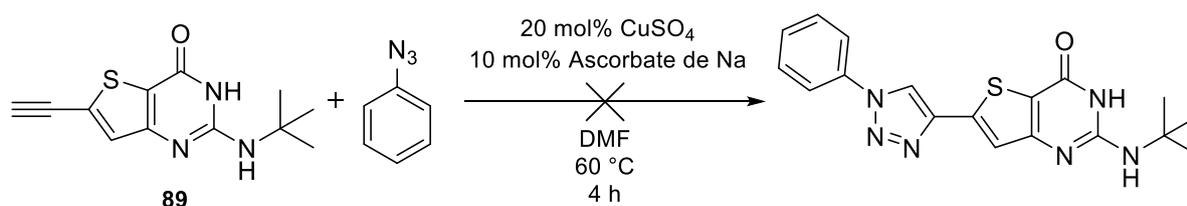


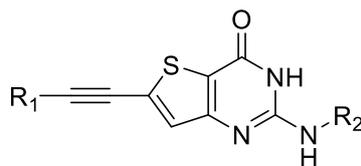
Schéma 41. Essai de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre sur le composé **89**.

3.3. Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 29** résume les valeurs biologiques des 7 composés testés et obtenus par couplage de Sonogashira.

³¹⁷ Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064, doi:[10/d6m7h8](https://doi.org/10.1021/d6m7h8).

³¹⁸ Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599, doi:[10/dx8spb](https://doi.org/10.1002/dx8spb).

Tableau 29. Résultats biologiques des dérivés obtenus par couplage de Sonogashira.

N°	R ₁	R ₂	CE ₅₀ PfK1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
82		tBu	2,35 ± 0,38	> 12,5	> 5,3
83		iPr	4,6 ± 1,0	3,1 ± 0,6	0,7
84		iPr	2,8 ± 1,0	> 12,5	> 4,5
85		tBu	1,9 ± 0,6	20,8 ± 1,4	10,9
86		tBu	> 10	> 50	-
87		tBu	13,2 ± 0,3	41,6 ± 5,2	3,2
89	H	tBu	> 12,5	4,7 ± 1	< 0,38
	M1		0,045	24	533
	Chloroquine		0,5	30	60
	Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
	Doxorubicine		-	0,2	-

Parmi ces 7 composés, aucun ne possède une activité antiplasmodiale inférieure à 1 μM. L'analogue en série alcyne de la base libre du M1, **82**, montre une perte d'activité antiplasmodiale et une solubilité limitée dans le milieu de test. Le composé **85** est le meilleur de la série avec son cyclopropyle ; un carbocycle saturé semble donc maintenir une certaine activité par rapport à un phényle. La chaîne alcool de **86**, pouvant permettre une amélioration de la solubilité aqueuse de la molécule, entraîne une perte d'activité antiplasmodiale, tout comme la chaîne *N*-méthylpipérazinyle de **87**, retrouvée dans des travaux détaillés précédemment (cf. Chapitre 2 : 5.3.1. Autres thiéno[3,2-*d*]pyrimidines antiplasmodiales). Enfin, la fonction alcyne vrai de **89** ne permet pas d'avoir une activité antiplasmodiale et augmente la cytotoxicité. Ces résultats biologiques ont conduit à ne pas synthétiser davantage de dérivés alcynes que ceux présentés ici.

4. Dérivés en série 2-aminothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one obtenus par couplage de Buchwald-Hartwig en position 6

4.1. Généralités sur le couplage de Buchwald-Hartwig

Appelé aussi amination de Buchwald-Hartwig, ce couplage pallado-catalysé permet la création d'une liaison carbone-azote à partir d'un halogénure d'aryle et d'une amine primaire ou secondaire. Les premiers travaux concernant une amination pallado-catalysée sont publiés en 1983 par Migita (**Schéma 42**),³¹⁹ en faisant réagir le *N,N*-diméthylaminotributylétain avec divers halogénures d'aryle en présence d'un catalyseur au palladium. En 1994, Buchwald s'inspire de ces travaux et utilise le *N,N*-diméthylaminotributylétain afin de créer *in situ*, avec une autre amine, un intermédiaire aminostannylé utilisé ensuite dans une réaction de couplage pallado-catalysé (**Schéma 42**).³²⁰

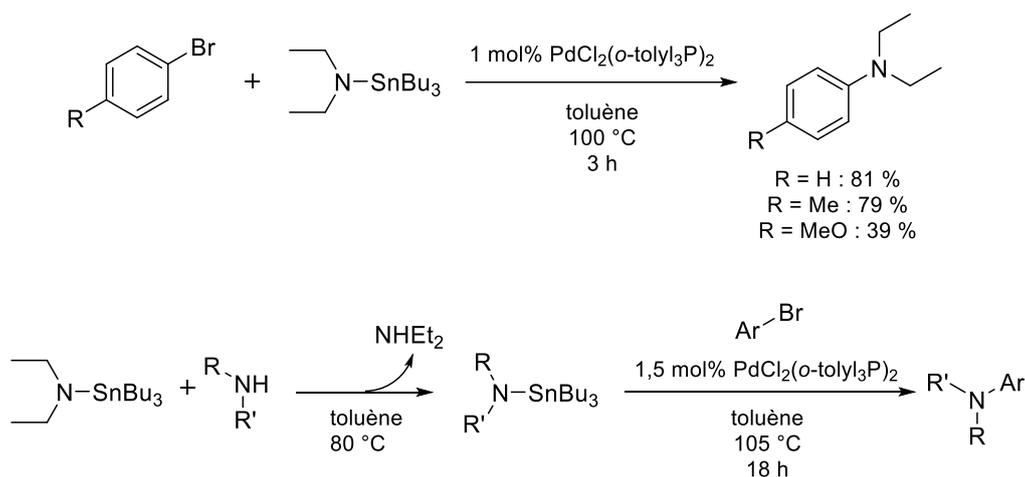


Schéma 42. En haut, amination pallado-catalysée décrite par Migita.³¹⁹ En bas, amination pallado-catalysée de Buchwald basée sur la réaction précédente.³²⁰

³¹⁹ Kosugi, M.; Kameyama, M.; Migita, T. Palladium-catalyzed aromatic amination of aryl bromides with *N,N*-di-ethylamino-tributyltin. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 927–928, doi:[10/bgbnfp](https://doi.org/10/bgbnfp).

³²⁰ Guram, A.S.; Buchwald, S.L. Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with *in Situ* Generated Aminostannanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901–7902, doi:[10/bdp6b8](https://doi.org/10/bdp6b8).

L'année suivante, Buchwald³²¹ mais aussi Hartwig³²² publient des conditions (**Schéma 43**) permettant de réaliser ces réactions sans utiliser d'intermédiaires organostanniques, réputés pour leur toxicité,³²³ et en employant une base forte (NaOtBu ou LiHMDS). Les deux scientifiques finiront par avoir leurs noms donnés à cette réaction.

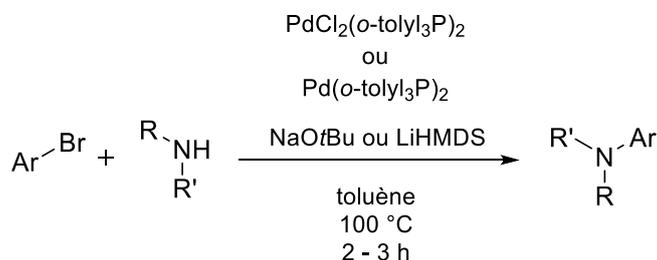


Schéma 43. Premières conditions décrites du couplage de Buchwald-Hartwig.

Les évolutions apportées par la suite se sont focalisées sur le ligand du palladium (**Schéma 44**). Le système de « 1^{ère} génération » utilisant la tri-*ortho*tolylphosphine était effectif avec des amines secondaires. Les systèmes suivants ont utilisé des ligands bidentates comme le BINAP ou le dppf, afin de pouvoir réaliser la réaction avec des amines primaires.^{324, 325, 326} Les travaux de l'équipe de Buchwald ont ensuite conduit à la synthèse de dialkylbiaryl phosphines comme ligand du palladium avec le DavePhos en 1998,³²⁷ suivis par de nombreux autres ligands du même type.³²⁸ Ces nouveaux ligands ont permis d'élargir encore plus le spectre de substrats utilisables. Les travaux de Hartwig se sont eux orientés vers des dérivés du dppf.³²⁹

³²¹ Guram, A.S.; Rennels, R.A.; Buchwald, S.L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348–1350, doi:[10/czxi2d](https://doi.org/10/czxi2d).

³²² Louie, J.; Hartwig, J.F. Palladium-Catalyzed Synthesis of Arylamines from Aryl Halides. Mechanistic Studies Lead to Coupling in the Absence of Tin Reagents. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609–3612, doi:[10/dpdwns](https://doi.org/10/dpdwns).

³²³ Antizar-Ladislao, B. Environmental Levels, Toxicity and Human Exposure to Tributyltin (TBT)-Contaminated Marine Environment. A Review. *Environ. Int.* **2008**, *34*, 292–308, doi:[10/c2ir3x](https://doi.org/10/c2ir3x).

³²⁴ Driver, M.S.; Hartwig, J.F. A Second-Generation Catalyst for Aryl Halide Amination: Mixed Secondary Amines from Aryl Halides and Primary Amines Catalyzed by (DPPF)PdCl₂. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7217–7218, doi:[10/dx5jc8](https://doi.org/10/dx5jc8).

³²⁵ Wolfe, J.P.; Wagaw, S.; Buchwald, S.L. An Improved Catalyst System for Aromatic Carbon–Nitrogen Bond Formation: The Possible Involvement of Bis(Phosphine) Palladium Complexes as Key Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215–7216, doi:[10/bmcqcn](https://doi.org/10/bmcqcn).

³²⁶ Louie, J.; Driver, M.S.; Hamann, B.C.; Hartwig, J.F. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates and Importance of Triflate Addition Rate. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1268–1273, doi:[10/cvkgj4](https://doi.org/10/cvkgj4).

³²⁷ Old, D.W.; Wolfe, J.P.; Buchwald, S.L. A Highly Active Catalyst for Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions: Room-Temperature Suzuki Couplings and Amination of Unactivated Aryl Chlorides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9722–9723, doi:[10/fpzg6c](https://doi.org/10/fpzg6c).

³²⁸ Surry, D.S.; Buchwald, S.L. Dialkylbiaryl Phosphines in Pd-Catalyzed Amination: A User's Guide. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27–50, doi:[10/c3sg8y](https://doi.org/10/c3sg8y).

³²⁹ Hamann, B.C.; Hartwig, J.F. Sterically Hindered Chelating Alkyl Phosphines Provide Large Rate Accelerations in Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Iodides, Bromides, and Chlorides, and the First Amination of Aryl Tosylates. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7369–7370, doi:[10/cqb2kn](https://doi.org/10/cqb2kn).

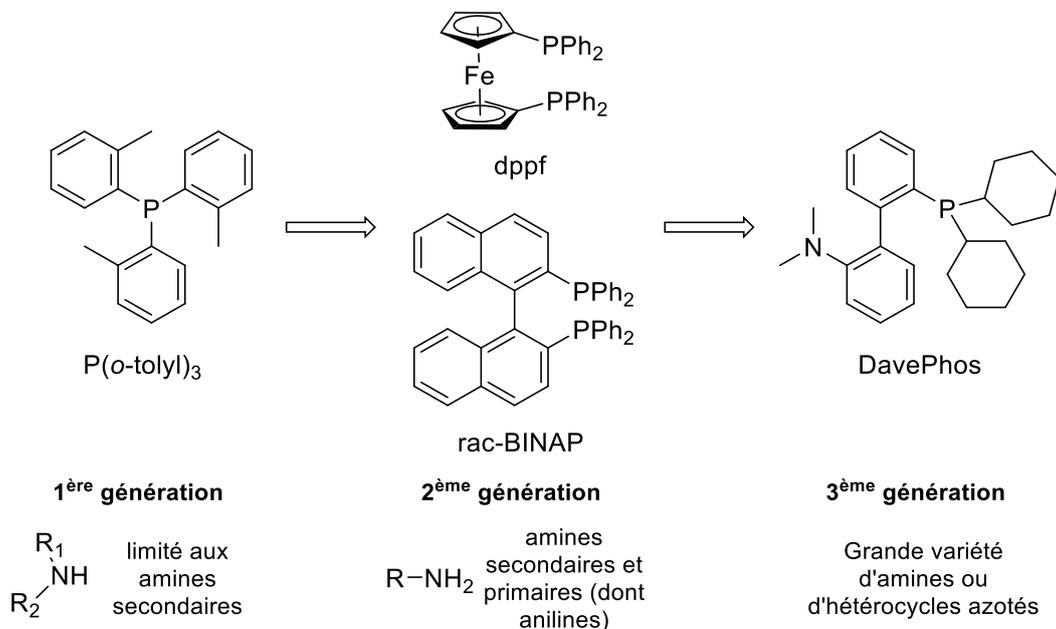


Schéma 44. Evolution des ligands du palladium utilisés dans le couplage de Buchwald-Hartwig.

Le cycle catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig diffère légèrement au niveau des étapes par rapport aux deux couplages précédemment décrits. Il comporte 4 étapes principales (**Schéma 45**) :

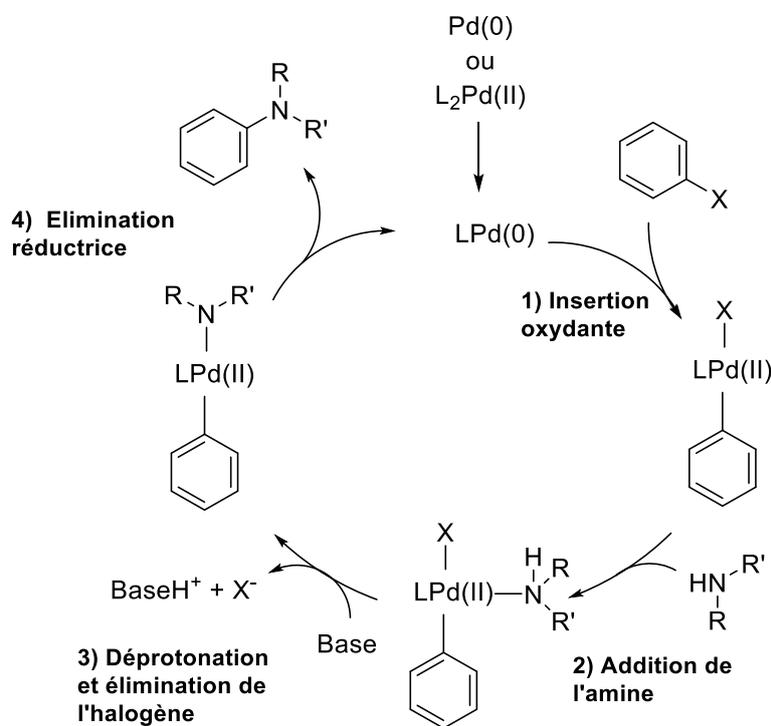


Schéma 45. Cycle catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig.

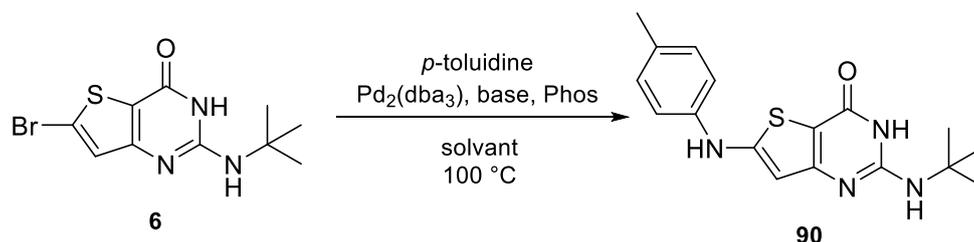
- 1) Une addition oxydante du couple palladium-ligand dans la liaison carbone-groupe partant ;

- 2) La liaison de l'amine sur le complexe précédemment formé ;
- 3) Une déprotonation du complexe par action de la base dans le milieu réactionnel, entraînant aussi l'élimination du groupe partant du complexe ;
- 4) Une élimination réductrice permettant de libérer le produit de couplage.

4.2. Mise au point des conditions réactionnelles

De nombreux paramètres rentrent en jeu dans le couplage de Buchwald-Hartwig : le substrat halogéné, le type d'amine utilisée, la nature du ligand et du palladium, la base, la température et le solvant.³²⁸ Il existe donc une multitude de conditions possibles pour le couplage de Buchwald-Hartwig.³³⁰ Malheureusement, aucune condition sur le cycle thiénoypyrimidine n'a pu être trouvée dans la littérature ; seules des conditions de couplage sur le noyau thiophène ont été décrites.^{331, 332} Il a donc fallu mettre au point des conditions de couplage à partir du composé **6** et dont le **Tableau 30** résume le déroulement. L'amine utilisée dans ces conditions est la *para*-toluidine, dans le but d'obtenir le composé **90**, analogue du M1 en série « Buchwald-Hartwig ».

Tableau 30. Conditions testées pour la synthèse du composé **90** à partir du composé **6**.



Essai	Eq NH ₂	mol% Pd	Phosphine	mol% Phos	Base	Eq Base	Solvant	Rdt estimé (%) ^a
1	1,2	2	Rac-BINAP	4	Cs ₂ CO ₃	3	Dioxane	0
2 ³³²	1,2	10 ^b	Rac-BINAP	10	Cs ₂ CO ₃	1,4	Toluène	0
3 ³³¹	1,2	2	RhuPhos	8	NaOtBu	1,4	Toluène	0
4	1,2	5	RhuPhos	10	NaOtBu	3	Toluène	0
5	1,2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Toluène	Traces ^c
6	1,2	5	RhuPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	4

³³⁰ Heravi, M.M.; Kheilkordi, Z.; Zadsirjan, V.; Heydari, M.; Malmir, M. Buchwald-Hartwig Reaction: An Overview. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *861*, 17–104, doi:[10/gdbzgt](https://doi.org/10/gdbzgt).

³³¹ Charles, M.D.; Schultz, P.; Buchwald, S.L. Efficient Pd-Catalyzed Amination of Heteroaryl Halides. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3965–3968, doi:[10/fhm8v3](https://doi.org/10/fhm8v3).

³³² Begouin, A.; Hesse, S.; Queiroz, M.-J.R.; Kirsch, G. Synthesis of Diarylamines in the Thiophene Series by Buchwald-Hartwig Coupling. *Synthesis* **2005**, 2373–2378, doi:[10/fghjvb](https://doi.org/10/fghjvb).

7	1,2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	46
8	1,2	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	47
9	1,2	5	tBuXPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	0
10	1,2	5	SPhos	10	LiHMDS	3	Dioxane	0
11	1,2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	DME	Traces ^c
12	5	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	66
13	5	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	100 (1h)
14	3	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	100 (2h)
15	5	4	XPhos	8	NaOtBu	3	Dioxane	100 (2h)

a) Par LCMS ; b) Pd(dba)₂ ; c) Déshalogénéation importante de la matière première observée

Le suivi de ces réactions a été réalisé par LCMS, jusqu'à 48 heures après le lancement de la réaction. Les 4 premiers essais, basés sur les conditions de la littérature ou des conditions classiques de couplage n'ont pas permis d'observer la formation de **90**. L'utilisation du SPhos dans la condition 5 par rapport à la condition 4 a provoqué une importante déshalogénéation de la matière première mais a permis l'observation de traces de **90**. Le passage du toluène au dioxane (condition 6 vs 4), dans le but d'améliorer la solubilité de la matière première, a permis d'observer une très légère formation de **90**. L'utilisation du dioxane avec le SPhos et le XPhos a permis d'amener le rendement estimé à quasiment 50 %. Des changements supplémentaires portant sur la nature de la phosphine (9), la base (10) ou du solvant (11) n'ont pas été fructueux. A partir des conditions 7 et 8, la quantité d'amine utilisée a été augmentée de 1,2 à 5 équivalents. Ce changement a permis d'obtenir une conversion complète avec le Xphos comme ligand (13), en seulement une heure de chauffage. La diminution de la quantité d'amine (14) ou du couple catalytique (15) entraîne uniquement une augmentation du temps de réaction.

Afin de confirmer l'intérêt du couplage de Buchwald-Hartwig, un essai de couplage d'Ullman (couplage au cuivre aboutissant aussi à la formation d'une liaison carbone-azote) a été effectué sur les composés **3** et **6**. Aucune réaction ne fut observée dans les deux cas (**Schéma 46**).

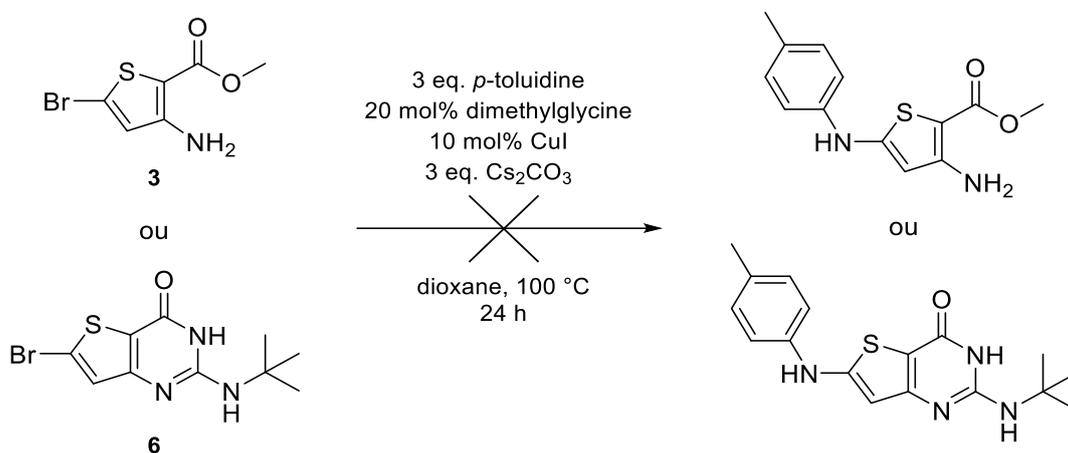
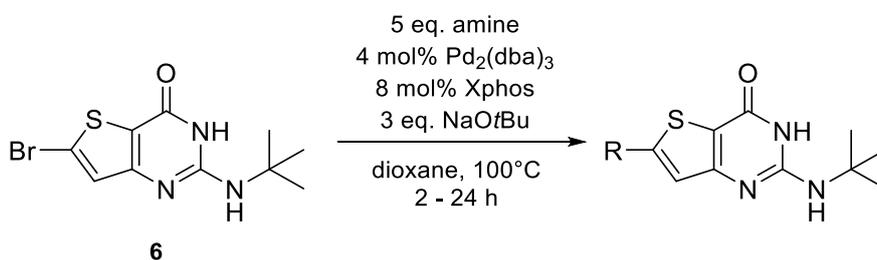


Schéma 46. Essais de couplage d'Ullman sur les composés **3** et **6**.

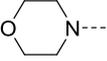
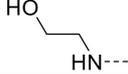
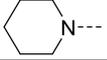
4.3. Couplage de Buchwald-Hartwig en position 6

Les conditions désormais établies furent donc utilisées avec des anilines, amines cycliques, amines hétéroaromatiques ou amines aliphatiques mais seuls 7 composés ont pu être synthétisés (**Tableau 31**).

Tableau 31. Rendements ou résultats des couplages de Buchwald-Hartwig sur le composé **6**.



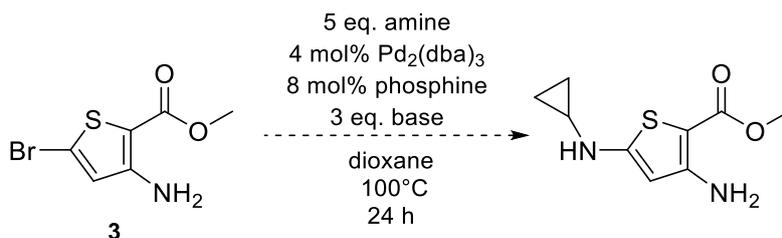
N°	R	Rdt (%)	Essai	R	Résultat
90		55	A		Déshalogénéation totale de 6
91		31	B		Pas de réaction
92		15	C		Pas de réaction
93		14	D		Traces de produit et de déshalogénéation de 6
94		23	E		Déshalogénéation totale de 6

95		35	F		Déshalogénéation totale de 6
96		15			

Après un traitement classique du milieu réactionnel, la purification est effectuée par chromatographie flash à l'aide de dichlorométhane et de méthanol. Les rendements ont été modifiés grandement par le changement dans les amines employées. La position du substituant impacte le rendement : plus celui-ci est proche de la fonction amine et plus rendement final diminue (*para* **90** > *mé*ta **91** > *ortho* **92**). Un substituant électroattracteur favorise la réaction par rapport à un substituant électrodonneur (**93** vs **94**), ce qui semble aussi être le cas pour les amines cycliques (**95** vs **96**). Aucune réaction n'a été observée avec les amines aromatiques testées ainsi que pour l'aminopyridine. Enfin, les amines aliphatiques entraînent la réduction complète de la matière première. Cette réduction est aussi observée avec la *N*-méthylpipérazine.

La réduction du composé **6** dans ce couplage rappelle celle qui a été observée avec le couplage de Suzuki-Miyaura. Nous avons donc essayé le couplage de Buchwald-Hartwig sur l'ainoester du thiophène **3** avec la cyclobutylamine (**Tableau 32**). Malheureusement, le *tert*-butoxyde de sodium conduit à la saponification de l'ester méthylique en acide carboxylique dans les conditions employées. L'acide carboxylique formé n'a pas pu être isolé par la suite. Ainsi, 3 essais visant à modifier la base employée ou la phosphine ont été réalisés mais ils n'ont pas permis d'aboutir au produit réactionnel souhaité. A la place, le produit d'homocouplage (essai B et D) ou la formation du cyclopropylamide à la place de l'ester méthylique (essai C) ont été observés par LCMS. L'introduction de la cyclopropylamine en position 5 du thiophène semble donc possible, mais une nouvelle recherche de conditions de couplage prenant en compte tous les paramètres semble nécessaire.

Tableau 32. Essais de couplage de Buchwald-Hartwig sur le composé **3**.

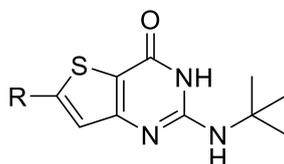


Essai	Base	Phosphine	Produit observé	Rdt estimé (%)
A	<i>t</i> BuONa	XPhos		100 (1h)
B	Cs ₂ CO ₃	XPhos		100 (24 h)
C	LiHMDS	XPhos		88 (24 h)
D	Cs ₂ CO ₃	BrettPhos		48 (24 h)

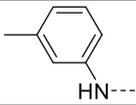
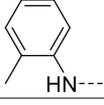
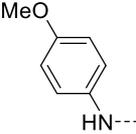
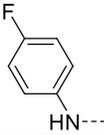
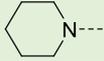
4.4. Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 33** rassemble les valeurs d'activité antiplasmodiale et de cytotoxicité des composés obtenus après couplage de Buchwald-Hartwig.

Tableau 33. Résultats biologiques des composés obtenus par couplage de Buchwald-Hartwig.



N°	R ₁	CE ₅₀ PfK1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
90		10,3 ± 0,2	21,7 ± 2,1	2,1

91		1,1 ± 0,3	5,3 ± 0,4	4,8
92		4,3 ± 0,2	14,1 ± 0,3	3,3
93		7,2 ± 2	24 ± 3,1	3,3
94		7,1 ± 1,4	21,3 ± 1,6	3
95		4,5 ± 1,1	> 50	> 11,1
96		0,77 ± 0,13	33,9 ± 1,4	44
M1		0,045	24	533
Chloroquine		0,5	30	60
Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
Doxorubicine		-	0,2	-

De manière générale, ces dérivés, possédant une fonction amine entre le cycle thiénopyrimidine et le cycle phényle, montrent une perte d'activité antiplasmodiale mais, à l'exception du composé **91**, affichent une cytotoxicité comparable ou légèrement augmentée par rapport au composé M1. Le composé **96**, quant à lui, montre de bons paramètres biologiques ; avec une activité diminuant de manière notable lorsque l'on passe d'un cycle piperidine (**96**) à un cycle morpholine (**95**).

5. Conclusion

En partant de l'intermédiaire **3**, les couplages de Suzuki-Miyaura, de Sonogashira et de Buchwald-Hartwig nous ont permis de synthétiser un total de 67 composés en série 2-aminothiéno[3,2-*d*]pyrimidi-4(3*H*)-one. Les résultats du criblage primaire nous ont permis d'obtenir de précieuses données RSA sur la série et d'obtenir 14 composés avec une activité antiplasmodiale inférieure à 1 µM. Le couplage de Suzuki-Miyaura permet la synthèse de dérivés avec des chaînes latérales variées, avec comme limitation principale l'accès aux acides boroniques désirés. Bien que les conditions du couplage de Sonogashira soient simples à mettre en œuvre, les mauvais résultats biologiques de la série nous ont obligés à stopper la synthèse de ces dérivés. Enfin, le couplage de Buchwald-Hartwig a nécessité de mettre au

point des conditions réactionnelles qui nous permis d'obtenir un dérivé biologiquement intéressant parmi les 7 obtenus. Malheureusement, les conditions sont apparues limité vis-à-vis des substrats utilisables et un nouveau travail d'optimisation est requis pour poursuivre l'exploration de cette série.

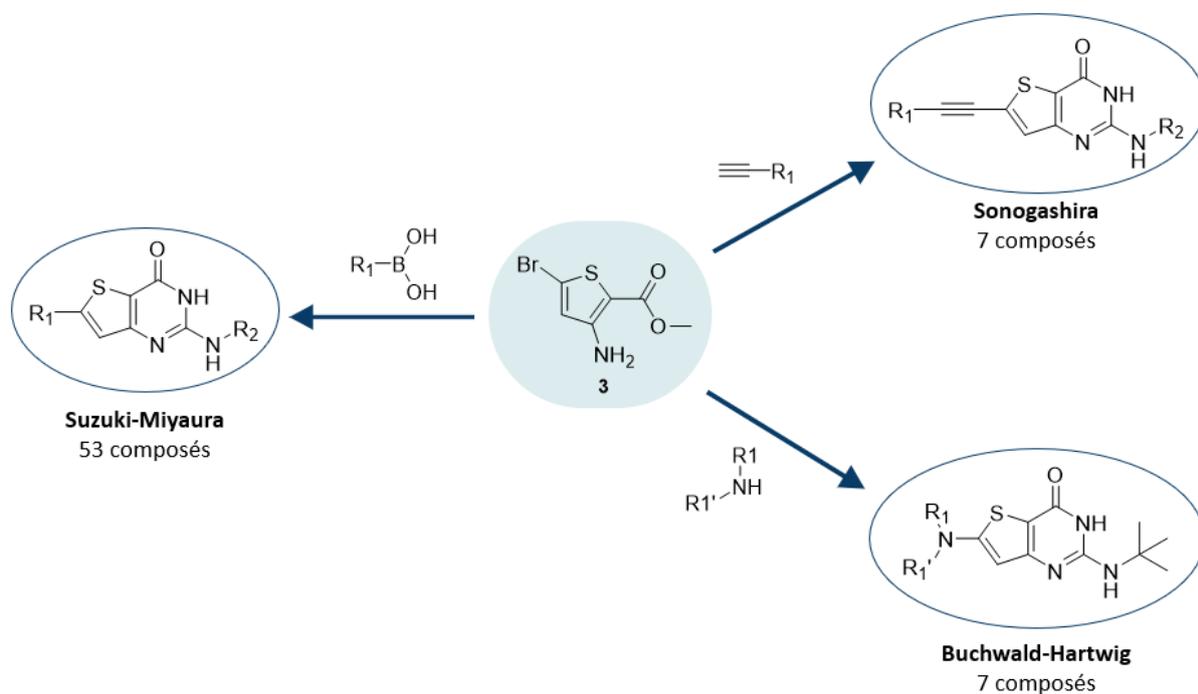


Schéma 47. Récapitulatif des dérivés synthétisés par réactions couplages pallado-catalysés.

Les tests biologiques supplémentaires sur les meilleurs composés ainsi que les données RSA obtenues grâce à ces composés seront abordés dans le **Chapitre 6**. Les travaux concernant les composés issus du couplage de Sonogashira, de Buchwald-Hartwig ainsi qu'une partie de ceux issus du couplage de Suzuki-Miyaura font l'objet d'une publication soumise auprès du journal *RSC Advances* ; publication actuellement en cours de relecture par les pairs (cf. **Annexe 2**).

6. Experimental part

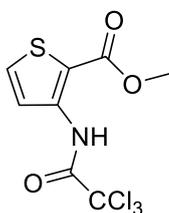
6.1. Materials and methods

Starting materials were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) or Fluorochem (Derbyshire, UK). NMR spectra were recorded on Bruker Avance 250 MHz or a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the "Faculté de Pharmacie" of Marseille. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm for ^1H and 77.16 for ^{13}C and $\text{DMSO}-d_6$ $\delta = 2.50$ ppm for ^1H and

39.52 ppm for ^{13}C . Data for ^1H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; sept, septuplet; dd, doublet of doublet; dt, doublet of triplet; m, multiplet), coupling constants (J) in Hertz (Hz) and integration. Data for ^{13}C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm). Melting points were determined on a Köfler melting point apparatus (Wagner & Munz GmbH, München, Germany) and are uncorrected. HRMS spectrum (ESI) were recorded on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) and elemental analyses were recorded on a Thermo Finnigan EA 1112; both analyses were performed at the "Faculté des Sciences" of Marseille (St Jérôme campus). Silica Gel 60 (Merk 70–230) was used for column chromatography. Flash chromatographies were performed on a puriFlash[®] 5.020 apparatus. TLC were performed on aluminium plates coated with silica gel 60F-254 (Merk) in an appropriate eluent. Visualisation was made with ultraviolet light (254 or 365 nm). Reactions using microwave heating were performed with a Biotage[®] Initiator or Initiator+ apparatus (Biotage, Uppsala, Sweden).

6.2. Access to compound 3

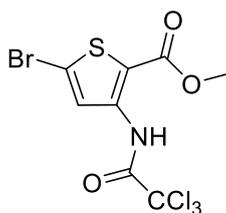
3-(2,2,2-trichloroacetamido)thiophene-2-carboxylate **1**



Chemical Formula: $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{S}$
Exact Mass: 300,9134
Molecular Weight: 302,5500

To a solution of methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (10 g, 63.6 mmol) in dry tetrahydrofuran at 0 °C under nitrogen atmosphere was added dropwise triethylamine (8.9 mL, 63.6 mmol) and trichloroacetyl chloride (7.1 mL, 63.6 mmol). The mixture was stirred at 0 °C for 20 min and for 2.5 h at room temperature. Water (50 mL) was added to the reaction mixture, which was then extracted with ethyl acetate (3 x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 100 mL), dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo* affording methyl 3-(2,2,2-trichloroacetamido)thiophene-2-carboxylate as a light brown powder (18.3 g, 95 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ 11.60 (bs, 1H), 8.09 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 7.57 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H).

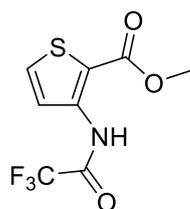
Methyl 5-bromo-3-[(trichloroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate 2



Chemical Formula: $C_8H_5BrCl_3NO_3S$
Exact Mass: 378,8239
Molecular Weight: 381,4460

To a solution of methyl 3-(2,2,2-trichloroacetamido)thiophene-2-carboxylate (9.3 g, 36.7 mmol) in glacial acetic acid (90 mL) was added dropwise bromide (5.68 mL, 0.11 mmol) and the obtained solution was stirred at 70 °C for 18 h. Bromide was neutralized with sodium thiosulfate and then the mixture pH was adjusted to 7 with sodium carbonate. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with water (150 mL) and dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* crystallization in cold methanol affording methyl 5-bromo-3-(2,2,2-trichloroacetamido)thiophene-2-carboxylate as a white solid (6.52 g, 53 % yield). 1H NMR ($CDCl_3$, 250 MHz) δ 11.54 (bs, 1H), 8.13 (s, 1H), 3.92 (s, 3H).

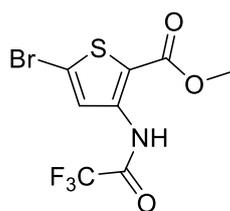
Methyl 3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate 4



Chemical Formula: $C_8H_6F_3NO_3S$
Exact Mass: 253,0020
Molecular Weight: 253,1952

To a solution of methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (5 g, 31.8 mmol) in diethyl ether (35 mL) at 0 °C was added dropwise trifluoroacetic anhydride (4.4 mL, 31.8 mmol). The solution was stirred for 30 min at 0 °C then at room temperature for 3 days. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained residue was dissolved in dichloromethane (35 mL). The organic layer was washed with 1N HCl aqueous solution (20 mL), water (20 mL) and brine (20 mL). Then the organic layer was dried anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo* affording methyl 3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate as a beige solid (6.91 g, 86 % yield). 1H NMR ($CDCl_3$, 250 MHz) δ 11.17 (bs, 1H), 8.04 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 7.55 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

Methyl 5-bromo-3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate 5

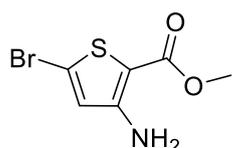


Chemical Formula: $C_8H_5BrF_3NO_3S$
Exact Mass: 330,9126
Molecular Weight: 332,0912

To a solution of methyl 3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate (2.95 g, 11.7 mmol) in glacial acetic acid (30 mL) was added dropwise bromide (1.8 mL, 34.9 mmol) and the obtained solution was stirred at 70 °C for 18 h. Bromide was neutralized with sodium thiosulfate and then the mixture pH was adjusted to 7 with

sodium carbonate. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (120 mL) and dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography over silica gel (from 100 % cyclohexane to 90:10 cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 5-bromo-3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate as a white solid (1.12 g, 28 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 11.13 (bs, 1H), 8.11 (s, 1H), 3.92 (s, 3H).

Methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate **3**

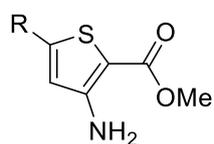


Chemical Formula: C₆H₆BrNO₂S
 Exact Mass: 234,9303
 Molecular Weight: 236,0830

To a suspension of methyl 5-bromo-3-(2,2,2-trichloroacetamido)thiophene-2-carboxylate (5.43 g, 14.2 mmol) in a mixture of methanol (30 mL), water (30 mL) and tetrahydrofuran (30 mL) was added potassium carbonate (5.90 g, 42.7 mmol) and the obtained mixture was stirred at room temperature for 18 h. The excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained aqueous phase was extracted with ethyl acetate (50 mL) then the obtained solution was washed with water (2 x 60 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (from 100 % petroleum ether to 60:40 petroleum ether/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate as a white solid (2.87 g, 85 % yield). Conditions are similar when starting from methyl 5-bromo-3-[(trifluoroacetyl)amino]thiophene-2-carboxylate. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.56 (s, 1H), 5.47 (bs, 2H), 3.80 (s, 3H).

6.3.Suzuki-Miyaura couplings

General procedure for Suzuki-Miyaura couplings on compound **3**

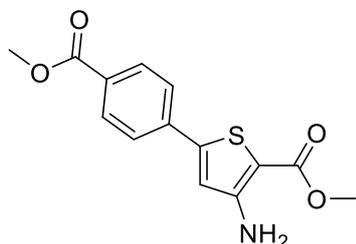


To a mixture of dioxane (0.5 mL per 100 mg) and water (0.25 mL per 100 mg), in a microwave vial, was added methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (1 eq), appropriate boronic acid (1.6 eq) and potassium carbonate (2 eq). The mixture was then put under nitrogen atmosphere and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.05% mol) was added and the mixture was stirred at 75 °C for the appropriate time. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.

- If no precipitate was formed, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

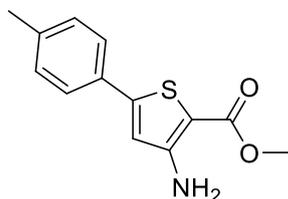
Methyl 3-amino-5-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **8**



Chemical Formula: C₁₄H₁₃NO₄S
 Exact Mass: 291,0565
 Molecular Weight: 291,3210

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.5 g, 2.12 mmol) and 4-methoxycarbonylphenylboronic acid (0.610, 3.39 mmol) with a reaction time of 6 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (deactivated with 3 % triethylamine, using 80:20 cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (340 mg, 55 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 8.05 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.64 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 5.49 (bs, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 166.6, 164.9, 154.3, 147.5, 137.6, 130.4 (2C), 130.3, 125.9 (2C), 116.7, 101.7, 52.4, 51.6. mp = 190-192 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₄NO₄S [M+H]⁺ 292.0638, found 292.0637.

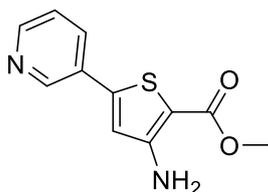
Methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-2-carboxylate **9**



Chemical Formula: C₁₃H₁₃NO₂S
 Exact Mass: 247,0667
 Molecular Weight: 247,3120

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (1 g, 4.24 mmol) and *p*-tolylboronic acid (0.921 g, 6.78 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-2-carboxylate as a white powder (0.870 g, 83 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 7.48 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7.20 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.46 (bs, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 165.1, 154.5, 149.5, 139.3, 130.7, 129.8 (2C), 126.0 (2C), 115.1, 100.1, 51.4, 21.4.

Methyl 3-amino-5-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate **10**



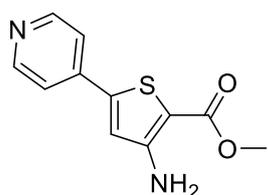
Chemical Formula: C₁₁H₁₀N₂O₂S

Exact Mass: 234,0463

Molecular Weight: 234,2730

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and pyridine-3-boronic acid (0.333g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was triturated with diethyl ether affording methyl 3-amino-5-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (230 mg, 58 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 8.86 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 8.58 (dd, ³J = 5 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7.85 (dt, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7.34 (dd, ³J = 8 Hz, ³J = 5 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 164.9, 154.3, 149.9, 147.1, 145.1, 133.3, 129.6, 123.9, 116.6, 101.5, 51.6. mp = 145-147 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₁H₁₁N₂O₂S [M+H]⁺ 235.0536, found 235.0541.

Methyl 3-amino-5-(pyridin-4-yl)thiophene-2-carboxylate **11**



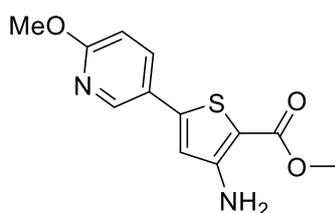
Chemical Formula: C₁₁H₁₀N₂O₂S

Exact Mass: 234,0463

Molecular Weight: 234,2730

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol), pyridine-4-boronic acid (0.333 g, 2.71 mmol), with a heating temperature of 85 °C and a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (50:50 dichloromethane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(pyridin-4-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (260 mg, 66 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 8.63 (dd, ³J = 4.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2H), 7.44 (dd, ³J = 4.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 5.52 (bs, 2H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 164.8, 154.1, 150.6 (2C), 145.3, 140.6, 120.0 (2C), 117.4, 102.3, 51.6. mp = 124-126 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₁H₁₁N₂O₂S [M+H]⁺ 235.0536, found 235.0535.

Methyl 3-amino-5-(6-methoxypyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate **12**



Chemical Formula: C₁₂H₁₂N₂O₃S

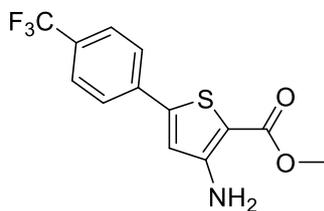
Exact Mass: 264,0569

Molecular Weight: 264,2990

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol), (6-methoxypyridin-3-yl)boronic acid (0.415 g, 2.71 mmol), with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(6-methoxypyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (376 mg, 84 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ

7.66-7.59 (m, 2H), 7.15-7.07 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 5.01 (s, 1H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.0, 164.5, 154.5, 145.7, 144.2, 136.6, 123.3, 115.3, 111.4, 100.3, 54.1, 51.5. mp = 168-170 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 265.0641, found 265.0647.

Methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **13**

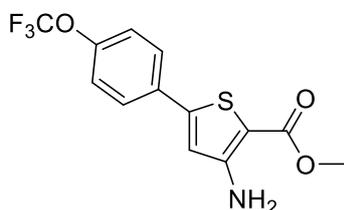


Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}$
Exact Mass: 301,0384
Molecular Weight: 301,2832

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and 4-trifluoromethylphenylboronic acid (0.515 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 40:60 to 30:70 cyclohexane/dichloromethane). If needed, the obtained

residue can be triturated in petroleum ether affording methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a pale-yellow solid (390 mg, 76 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ 7.72-7.61 (m, 4H), 6.84 (s, 1H), 3.86 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164.9, 154.3, 147.0, 136.9, 130.8 (q, $^2J = 32.6$ Hz), 126.3 (2C), 126.1 (q, $^3J = 3.8$ Hz, 2C), 124.1 (q, $^1J = 271.8$ Hz), 116.8, 101.8, 51.5. mp = 139-141 °C.

Methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate **14**

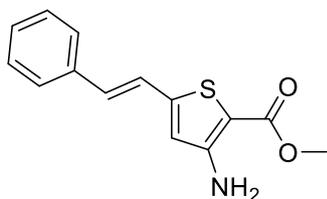


Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_3\text{S}$
Exact Mass: 317,0333
Molecular Weight: 317,2822

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(trifluoromethoxy)phenyl]boronic acid (0.558 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/cyclohexane) affording methyl 3-amino-5-

[4-(trifluoromethoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a white solid (290 mg, 54 % yield). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7.78-7.73 (m, 2H), 7.44 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.62 (s, 2H), 3.74 (s, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 163.9, 155.5, 148.6, 145.7, 132.1, 127.6 (2C), 121.8 (2C), 120.0 (q, $^1J = 257$ Hz, 1C), 117.1, 97.2, 51.0. mp = 143-145 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.0406, found 318.0407.

Methyl 3-amino-5-[(E)-2-phenylethenyl]thiophene-2-carboxylate 15



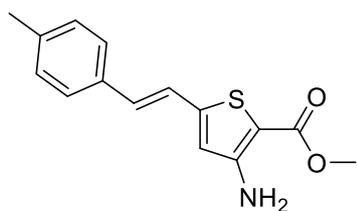
Chemical Formula: C₁₄H₁₃NO₂S

Exact Mass: 259,0667

Molecular Weight: 259,3230

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [(E)-2-phenylethenyl]boronic acid (0.401 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (70:30 dichloromethane/cyclohexane). The obtained residue was triturated in petroleum ether affording methyl 3-amino-5-[(E)-2-phenylethenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (280 mg, 64 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 7.42-7.33 (m, 2H), 7.31-7.18 (m, 3H), 6.93 (d, ³J = 1.4 MHz, 2H), 6.44 (s, 1H), 3.74 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 165.0, 154.1, 147.3, 136.2, 131.7, 128.9 (2C), 128.6, 126.9 (2C), 121.2, 117.9, 99.6, 51.4. mp = 163-165 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₄NO₂S [M+H]⁺ 260.0740, found 260.0741.

Methyl 3-amino-5-[(E)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate 16



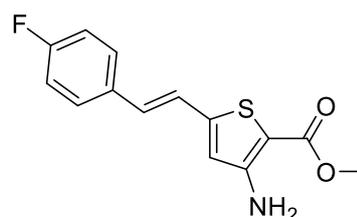
Chemical Formula: C₁₅H₁₅NO₂S

Exact Mass: 273,0823

Molecular Weight: 273,3500

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [(E)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]boronic acid (0.439 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 80:20 to 90:10 dichloromethane/cyclohexane) affording methyl 3-amino-5-[(E)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (0.320 g, 69 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.36 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7.16 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.36 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 147.5, 138.6, 133.4, 131.7, 129.5 (2C), 129.3, 128.6, 126.7 (2C), 120.1, 117.4, 51.2, 26.9, 21.3. mp = 150-152 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₆NO₂S [M+H]⁺ 274.0896, found 274.0896.

Methyl 3-amino-5-[(E)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate 17



Chemical Formula: C₁₄H₁₂FNO₂S

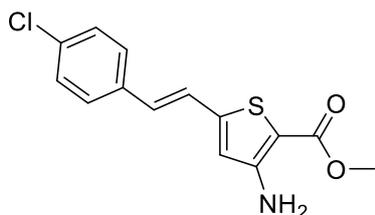
Exact Mass: 277,0573

Molecular Weight: 277,3134

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [(E)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]boronic acid (0.450 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (with 40:60 cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-

[(E)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate as an orange powder (0.32 g, 68 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.47-7.39 (m, 2H), 7.08-7.01 (m, 2H), 6.98-6.94 (m, 2H), 6.52 (s, 1H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.0, 162.9 (d, $^1J = 249$ Hz), 154.1, 147.1, 132.5 (d, $^4J = 2.9$ Hz), 130.5, 128.5 (d, $^3J = 8$ Hz, 2C), 121.0 (d, $^5J = 2.3$ Hz), 118.0, 116.0 (d, $^2J = 22$ Hz, 2C), 99.7, 51.4. mp = 157-159 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClNO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278.0646, found 278.0643.

Methyl 3-amino-5-[(E)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate **18**

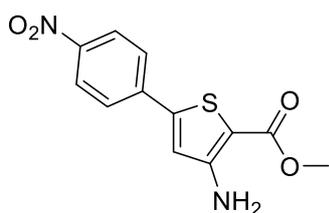


Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$
Exact Mass: 293,0277
Molecular Weight: 293,7650

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [(E)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]boronic acid (0.495 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (with 60:40 dichloromethane/cyclohexane) affording methyl 3-amino-5-

[(E)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (0.35 g, 70 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.39 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.32 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.01 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 6.94 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.0, 154.0, 146.8, 134.8, 134.2, 130.3, 129.2 (2C), 128.0 (2C), 121.8, 118.2, 99.9, 51.5. mp = 140-142 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClNO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 294.0350, found 294.0349.

Methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate **19**

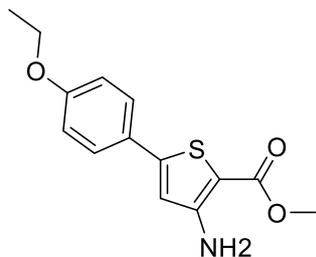


Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$
Exact Mass: 278,0361
Molecular Weight: 278,2820

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and 4-nitrophenylboronic acid (0.453 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 18 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 75:25 cyclohexane/ethyl acetate to 50:50 cyclohexane/ethyl acetate)

affording methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate as an orange solid (316 mg, 65 % yield) which was used without further purifications. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz) δ 8.32-8.23 (m, 2H), 7.95-7.87 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 3.76 (s, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ 163.8, 155.3, 147.2, 144.3, 138.8, 126.6 (2C), 124.5 (2C), 118.7, 98.8, 51.2. mp = 212-214 °C.

Methyl 3-amino-5-(4-ethoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate **20**



Chemical Formula: C₁₄H₁₅NO₃S

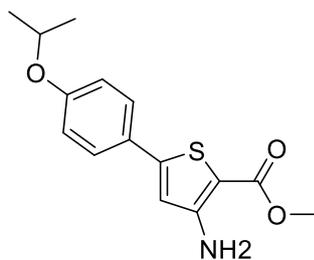
Exact Mass: 277,0773

Molecular Weight: 277,3380

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-ethoxyphenyl)boronic acid (0.45 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Combined fractions of interest can be triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-ethoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate

as a beige solid (0.346 g, 74 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 5.46 (bs, 2H), 4.05 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.43 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 159.9, 154.6, 149.5, 127.4 (2C), 126.0, 114.9 (2C), 114.5, 99.5, 63.7, 51.4, 14.9. mp = 175-177 °C.

Methyl 3-amino-5-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate **21**



Chemical Formula: C₁₅H₁₇NO₃S

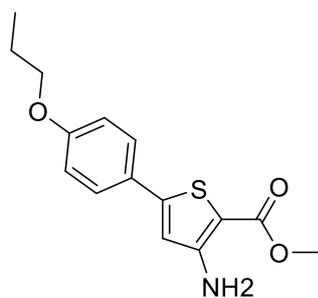
Exact Mass: 291,0929

Molecular Weight: 291,3650

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(propan-2-yloxy)phenyl]boronic acid (0.488 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 50:50 cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a white

solid (0.438 g, 89 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.49 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.88 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 5.36 (bs, 2H), 4.58 (sept, ³J = 6 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 1.35 (d, ³J = 6 Hz, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 158.8, 154.6, 149.5, 127.4 (2C), 125.8, 116.1 (2C), 114.4, 99.5, 70.1, 51.4, 22.1 (2C). mp = 132-134 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₈NO₃S [M+H]⁺ 292.1002, found 292.1002.

Methyl 3-amino-5-(4-propoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate 22

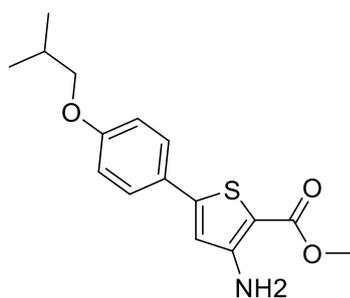


Chemical Formula: C₁₅H₁₇NO₃S
Exact Mass: 291,0929
Molecular Weight: 291,3650

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-propoxyphenyl)boronic acid (0.488 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 3 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/dichloromethane). Fractions of interest were combined and dissolved in a minimum amount of dichloromethane. Cyclohexane was added and the obtained precipitate was filtered and washed with cyclohexane

affording methyl 3-amino-5-(4-propoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate as an off-white solid (0.4 g, 81 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 5.45 (bs, 2H), 3.95 (t, ³J = 7 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.88-1.76 (m, 2H), 1.04 (t, ³J = 7 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 160.1, 154.6, 149.5, 127.4 (2C), 125.9, 115.0 (2C), 114.4, 99.5, 69.7, 51.4, 22.6, 10.6. mp = 159-161 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₈NO₃S [M+H]⁺ 292.1002, found 292.1001.

Methyl 3-amino-5-[4-(2-methylpropoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate 23

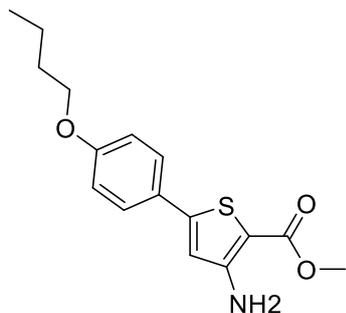


Chemical Formula: C₁₆H₁₉NO₃S
Exact Mass: 305,1086
Molecular Weight: 305,3920

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(2-methylpropoxy)phenyl]boronic acid (0.526 g, 85% yield), with a reaction time of 3 h. The obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/dichloromethane) Fractions of interest were combined and dissolved in minimum amount of dichloromethane. Cyclohexane was added and the obtained precipitate was filtered and washed with cyclohexane affording

methyl 3-amino-5-[4-(2-methylpropoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a white solid (0.44 g, 85 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.75 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H), 2.16-2.03 (m, 1H), 1.03 (d, ³J = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 160.2, 154.6, 149.5, 127.4 (2C), 125.9, 115.0 (2C), 114.4, 99.5, 74.6, 51.4, 28.4, 19.4 (2C). mp = 127-129 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₂₀NO₃S [M+H]⁺ 306.1158, found 306.1156.

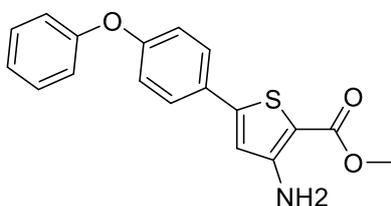
Methyl 3-amino-5-(4-butoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate **24**



Chemical Formula: C₁₆H₁₉NO₃S
Exact Mass: 305,1086
Molecular Weight: 305,3920

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-butoxyphenyl)boronic acid (0.526 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and dissolved in minimum amount of dichloromethane. Cyclohexane was added and the obtained precipitate was filtered and washed with cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-butoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 3.99 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.83-1.73 (m, 2H), 1.56-1.44 (m, 2H), 0.98 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 160.1, 154.6, 149.5, 127.4 (2C), 126.0, 115.0 (2C), 114.5, 99.6, 68.0, 51.4, 31.4, 19.4, 14.0. mp = 147-149 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₂₀NO₃S [M+H]⁺ 306.1158, found 306.1158.

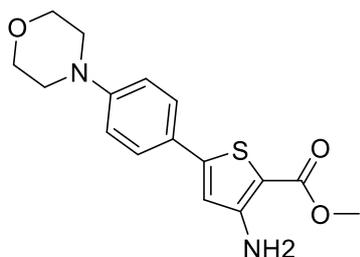
Methyl 3-amino-5-(4-phenoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate **25**



Chemical Formula: C₁₈H₁₅NO₃S
Exact Mass: 325,0773
Molecular Weight: 325,3820

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-phenoxyphenyl)boronic acid (0.580 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and dissolved in minimum amount of dichloromethane. Cyclohexane was added and the obtained precipitate was filtered and washed with cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-phenoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate as a pinkish solid (0.257 g, 47 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.56-7.51 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 7.18-7.12 (m, 1H), 7.07-7.03 (m, 2H), 7.02-6.97 (m, 2H), 6.70 (s, 1H), 3.84 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 158.5, 156.6, 154.5, 148.8, 130.0 (2C), 128.4, 127.6 (2C), 124.0, 119.6 (2C), 118.9 (2C), 115.3, 100.2, 51.4. mp = 121-123 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₁₆NO₃S [M+H]⁺ 326.0845, found 326.0843.

Methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate 26



Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₂O₃S

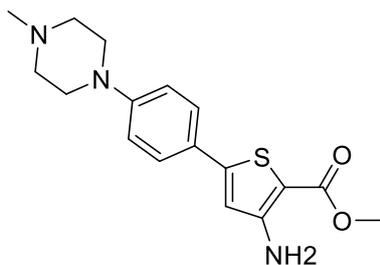
Exact Mass: 318,1038

Molecular Weight: 318,3910

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(morpholin-4-yl)phenyl]boronic acid (0.561 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-

yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.395 g, 73 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.46 (bs, 2H), 3.90-3.85 (m, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.25-3.17 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 154.7, 151.7, 149.6, 127.1 (2C), 124.9, 115.4 (2C), 114.1, 99.4, 66.8, 51.3 (2C), 48.8 (2C). mp = 208-210 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₉NO₃S [M+H]⁺ 319.1111, found 319.1110.

Methyl 3-amino-5-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate 27



Chemical Formula: C₁₇H₂₁N₃O₂S

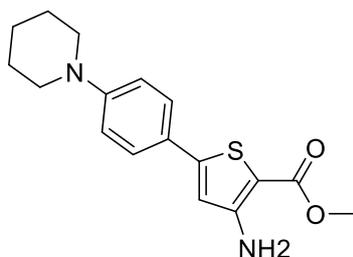
Exact Mass: 331,1354

Molecular Weight: 331,4340

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]boronic acid (0.597 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(4-

methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.4 g, 71 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.47 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.64 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.30-3.23 (m, 4H), 2.60-2.53 (m, 4H), 2.35 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 154.7, 151.7, 149.8, 127.0 (2C), 124.3, 115.5 (2C), 113.9, 99.1, 55.0 (2C), 51.3, 48.4 (2C), 46.3. mp = 191-193 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 332.1427, found 332.1427.

Methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **28**



Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₂O₂S

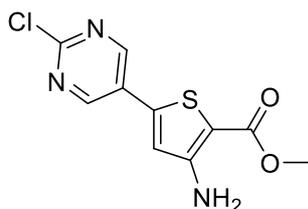
Exact Mass: 316,1245

Molecular Weight: 316,4190

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(piperidin-1-yl)phenyl]boronic acid (0.556 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-

yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.38 g, 71 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.63 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.29-3.18 (m, 4H), 1.76-1.53 (m, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.2, 154.8, 152.4, 150.1, 127.0 (2C), 123.5, 115.7 (2C), 113.6, 98.9, 51.3 (2C), 49.8, 25.7 (2C), 24.4. mp = 191-193 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₂O₂S [M+H]⁺ 317.1318, found 317.1319.

Methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate **29**



Chemical Formula: C₁₀H₈ClN₃O₂S

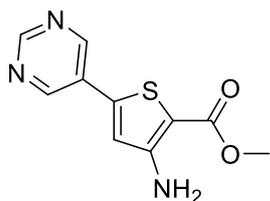
Exact Mass: 269,0026

Molecular Weight: 269,7030

To a solution of methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.5 g, 2.12 mmol) in dioxane (3.75 mL) was added (2-chloropyrimidin-5-yl)boronic acid (0.537 g, 3.39 mmol) and potassium carbonate (0.585 g, 4.24 mmol) and the solution was deoxygenated with nitrogen during 5 min. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.05% mol) was

added, the mixture was putted under nitrogen atmosphere and stirred at 85 °C for 24 h. The reaction mixture was poured into water (75 mL) and extracted with ethyl acetate (3x75 mL). The combined organic phases were washed with brine (3x150 mL), dried over sodium sulfate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 100% dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.25 g, 44 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.79 (s, 2H), 6.84 (s, 1H), 5.55 (bs, 2H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.6, 161.0, 156.2 (2C), 154.1, 139.2, 126.7, 117.7, 102.6, 51.8. mp = 176-178 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₀H₉ClN₃O₂S [M+H]⁺ 270.0099, found 270.0097.

Methyl 3-amino-5-(pyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate 30



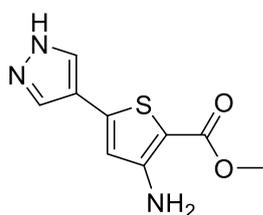
Chemical Formula: C₁₀H₉N₃O₂S

Exact Mass: 235,0415

Molecular Weight: 235,2610

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and pyrimidin-5-ylboronic acid (0.336 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(pyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (164 mg, 41 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 9.18 (s, 1H), 9.09 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 6.69 (s, 2H), 3.75 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.3, 158.6, 155.7, 154.1 (2C), 140.5, 127.7, 119.0, 98.7, 51.7. mp = 166-168 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₀H₁₀N₃O₂S [M+H]⁺ 258.0308, found 258.0307.

Methyl 3-amino-5-(1H-pyrazol-4-yl)thiophene-2-carboxylate 31



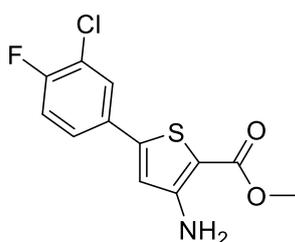
Chemical Formula: C₉H₉N₃O₂S

Exact Mass: 223,0415

Molecular Weight: 223,2500

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (1-(*tert*-butoxycarbonyl)-1H-pyrazol-4-yl)boronic acid (0.797, 2.71 mmol), the obtained crude was dissolved in dichloromethane (10 mL). Trifluoroacetic acid (1 mL) was added dropwise, and the solution was stirred 2.5 h room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-(1H-pyrazol-4-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (130 mg, 34 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.98 (s, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.55 (bs, 2H), 3.70 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.0, 155.7, 140.7, 144.9, 114.6 (2C), 104.2, 94.1, 50.8. mp = 189-191 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₉H₁₀N₃O₂S [M+H]⁺ 224.0488, found 224.0489.

Methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate 32



Chemical Formula: C₁₂H₉ClFNO₂S

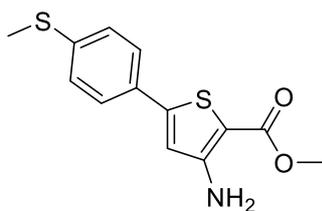
Exact Mass: 285,0027

Molecular Weight: 285,7174

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.8 g, 3.39 mmol) and (3-chloro-4-fluorophenyl)boronic acid (0.945 g, 5.42 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 80:20 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-

carboxylate as a beige solid (790 mg, 82 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.61 (dd, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 1H), 7.42 (ddd, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 4.4$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, 1H), 7.15 (t, $^3J = 8.6$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 164.9, 158.5 (d, $^1J = 252$ Hz, 1C), 154.3, 146.4, 130.9 (d, $^3J = 4.3$ Hz, 1C), 128.6, 128.3, 125.9 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1C), 121.9 (d, $^2J = 18.2$ Hz, 1C), 117.3 (d, $^2J = 21.7$ Hz, 1C), 116.2, 51.5. mp = 161-163 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClFNO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 286.0099, found 286.0102.

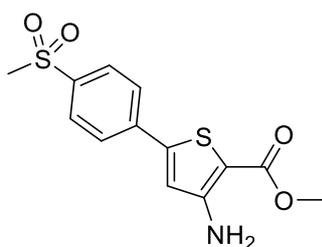
Methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **33**



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}_2$
 Exact Mass: 279,0388
 Molecular Weight: 279,3720

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.8 g, 3.39 mmol) and [4-(methylsulfanyl)phenyl]boronic acid (0.911 g, 5.42 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as pale-yellow solid (0.678 g, 72 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.52-7.46 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.50 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.1, 154.5, 148.8, 140.2, 130.1, 126.6 (2C), 126.3 (2C), 115.2, 100.2, 51.4, 15.6. mp = 173-175 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 280.0460, found 280.0460.

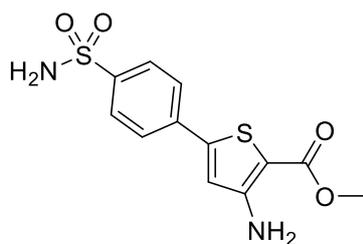
Methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **34**



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}_2$
 Exact Mass: 311,0286
 Molecular Weight: 311,3700

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(methylsulfonyl)phenyl]boronic acid (0.542 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate a yellow solid (0.325 g, 62 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.96 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.75 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.07 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164.8, 154.2, 146.1, 140.4, 138.8, 128.4 (2C), 126.7 (2C), 117.4, 102.4, 51.6, 44.7. mp = 213-214 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.0359, found 312.0359.

Methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate 35

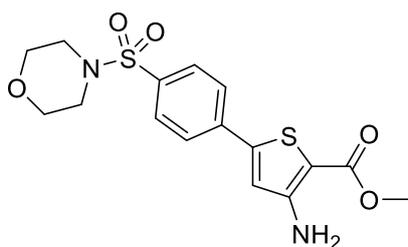


Chemical Formula: C₁₂H₁₂N₂O₄S₂
Exact Mass: 312,0238
Molecular Weight: 312,3580

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-sulfamoylphenyl)boronic acid (0.545, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.249 g, 47 %) which was used

without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.90-7.79 (m, 4H), 7.44 (s, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.64 (s, 2H), 3.75 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 155.4, 145.5, 144.1, 135.7, 126.6 (2C), 126.0 (2C), 117.6, 97.7, 51.1. mp = 225-227 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₂H₁₃N₂O₄S₂ [M+H]⁺ 313.0311, found 313.0312.

Methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate 36



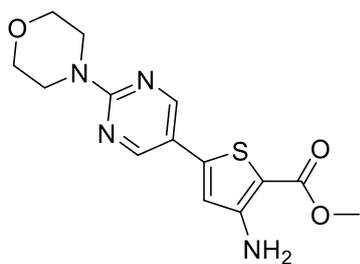
Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₂O₅S₂
Exact Mass: 382,0657
Molecular Weight: 382,4490

Following the general procedure starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]boronic acid (0.734 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 50:50 (cyclohexane/ethyl acetate to 100% ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-

ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as an orange powder (570 mg, 88 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.90 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.67-3.60 (m, 4H), 2.94-2.86 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 155.3, 145.0, 137.2, 134.4, 128.6 (2C), 126.4 (2C), 118.1, 98.2, 65.3 (2C), 51.2, 45.9 (2C). mp = 272-274 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₉N₂O₅S₂ [M+H]⁺ 405.0549, found 405.0546.

6.4. Substitution reactions on 29

Methyl 3-amino-5-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate **37**

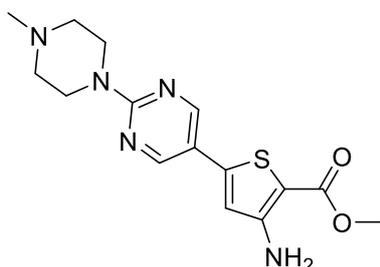


Chemical Formula: C₁₄H₁₆N₄O₃S
Exact Mass: 320,0943
Molecular Weight: 320,3670

To a solution of methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.25 g, 0.93 mmol) in ethanol (10 mL) was added morpholine (77.3 μ L, 0.88 mmol) and triethylamine (0.33 mL, 2.38 mmol). The reaction mixture was stirred for 3 h at 80 °C. After being allowed to cool to room temperature, the reaction mixture was filtered and the obtained precipitate was washed with ethanol, brine and water

affording methyl 3-amino-5-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate as a white solid (0.225 g, 80 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.66 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.60 (s, 2H), 3.79-3.74 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 3.69-3.64 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 160.7, 155.6, 155.0 (2C), 142.4, 116.2, 114.9, 95.6, 65.9 (2C), 50.9, 44.0 (2C). mp = 170-172 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₁₇N₄O₃S [M+H]⁺ 321.1016, found 321.1017.

Methyl 3-amino-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate **38**



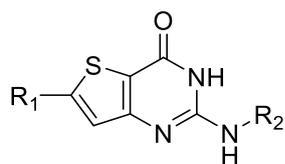
Chemical Formula: C₁₅H₁₉N₅O₂S
Exact Mass: 333,1259
Molecular Weight: 333,4100

To a solution of methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.25 g, 0.93 mmol) in ethanol (10 mL) was added *N*-methylpiperazine (97.4 μ L, 0.88 mmol) and triethylamine (0.33 mL, 2.38 mmol). The reaction mixture was stirred for 16 h at 80 °C. The reaction mixture was poured into water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 200

mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo* affording methyl 3-amino-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (215 mg, 73 % yield) which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.63 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.60 (s, 2H), 3.82-3.75 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 2.41-2.34 (m, 4H), 2.22 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.3, 161.1, 156.1, 155.5 (2C), 143.0, 116.4, 115.2, 95.9, 54.7 (2C), 51.4, 46.2, 43.8 (2C). mp = 148-150 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₂₀N₅O₂S [M+H]⁺ 334.1332, found 334.1331.

6.5. Cyclisation reaction on compounds from Suzuki-Miyaura couplings

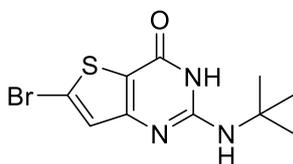
General procedure for cyclisations



To a solution of the appropriate functionalised methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2.25 mL per 100 mg) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (1 eq) and the solution was stirred for 2 h at room temperature. To the reaction mixture was added *tert*-butylamine or isopropylamine (2 eq), triethylamine (3 eq) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.05 eq) and it was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred at 170 °C under microwave irradiation for 2 h. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.
- If no precipitate was obtained, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

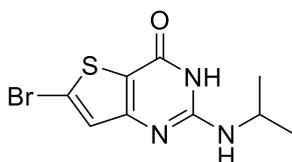
6-Bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 6



Chemical Formula: C₁₀H₁₂BrN₃OS
Exact Mass: 300,9884
Molecular Weight: 302,1900

Starting from methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (2 g, 8.47 mmol) and with *tert*-butylamine (1.78 mL, 16.9 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (1.3 g, 51 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.53 (bs, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 159.3, 156.5, 152.4, 127.8, 121.9, 113.4, 51.1, 28.5 (3C). mp: degradation observed at 162-164 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₀H₁₃BrN₃OS [M+H]⁺ 301.9957, found 301.9954.

6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 7

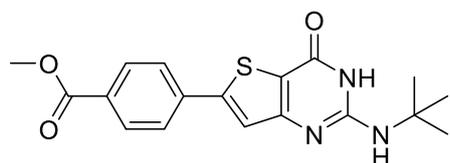


Chemical Formula: C₉H₁₀BrN₃OS
Exact Mass: 286,9728
Molecular Weight: 288,1630

Starting from methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (1 g, 4.24 mmol) and with isopropylamine (0.728 mL, 8.47 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. The precipitate was isolated and the filtrate was further purified *via* flash chromatography (using

dichloromethane and methanol) affording 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (0.695 g, 57 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.72 (bs, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.21 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 1.16 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 161.2, 156.7, 152.9, 127.5, 122.0, 113.3, 42.2, 22.3 (2C). mp = 240-242 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₉H₁₁BrN₃O₃ [M+H]⁺ 287.9801, found 287.9801.

4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate 37

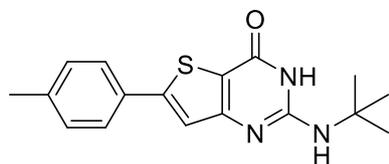


Chemical Formula: C₁₈H₁₉N₃O₃S
Exact Mass: 357,1147
Molecular Weight: 357,4280

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.69 mmol) and with *tert*-butylamine (144 μL, 1.37 mmol), the obtained crude was triturated in methanol affording methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-

dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate as a beige powder (0.134 mg, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.56 (bs, 1H), 8.01 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.95 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 165.7, 160.0, 157.6, 152.3, 148.1, 137.2, 130.0 (2C), 129.7, 126.0 (2C), 122.2, 112.6, 52.2, 51.0, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₂₀N₃O₃S [M+H]⁺ 358.1220, found 358.1216.

2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 38

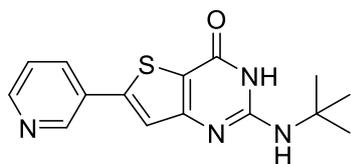


Chemical Formula: C₁₇H₁₉N₃O₃S
Exact Mass: 313,1249
Molecular Weight: 313,4190

Starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.115 g, 0.47 mmol) and with *tert*-butylamine (98 μL, 0.93 mmol), the obtained crude was triturated in methanol affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-

4(3*H*)-one as a beige powder (0.109 g, 75 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.46 (bs, 1H), 7.69 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.27 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 6.09 (s, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 160.3, 157.6, 152.2, 150.2, 139.0, 130.3, 129.8 (2C), 125.8 (2C), 120.0, 111.1, 51.0, 28.6 (3C), 20.9. mp = 277-279 °C.

2-*tert*-butylamino-6-(pyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 39

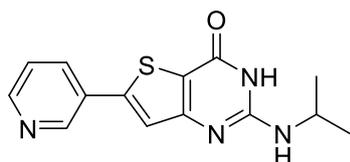


Chemical Formula: C₁₅H₁₆N₄O₃S
Exact Mass: 300,1045
Molecular Weight: 300,3800

Starting from methyl 3-amino-5-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (0.225 g, 0.96 mmol) and with *tert*-butylamine (202 μL, 1.92 mmol), the obtained crude was dissolved in methanol and stirred 30 min at room temperature. The obtained suspension was filtered and the precipitate isolated

affording 2-*tert*-butylamino-6-(pyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (0.156 g, 54 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.55 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.59 (d, ³*J* = 4.7 Hz, 1H), 8.19 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.49 (dd, ³*J* = 4.7 Hz, ³*J* = 8.6 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 160.1, 157.6, 152.3, 150.0, 146.6, 146.2, 133.3, 129.0, 124.2, 121.9, 112.2, 51.1, 28.6 (3C). mp = 213-215 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₇N₄OS [M+H]⁺ 301.1118, found 301.1119.

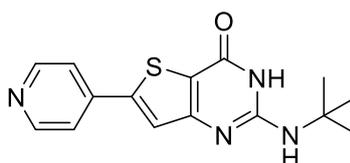
2-(propan-2-ylamino)-6-(pyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 40



Chemical Formula: C₁₄H₁₄N₄OS
Exact Mass: 286,0888
Molecular Weight: 286,3530

Starting from methyl 3-amino-5-(pyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.85 mmol) and with isopropylamine (147 μL, 1.71 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 98:2 to 96:4 dichloromethane/methanol) affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(pyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (78 mg, 32 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 9.03 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.20 (d, ³*J* = 8 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.56-7.47 (m, 1H), 6.21 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H), 4.11-3.95 (m, 1H), 1.18 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.7, 152.7, 149.8, 146.4, 146.2, 133.3, 129.1, 124.1, 121.6, 112.2, 42.2, 22.4 (2C). mp = 249-251 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₁₅N₄OS [M+H]⁺ 287.0960, found 287.0961.

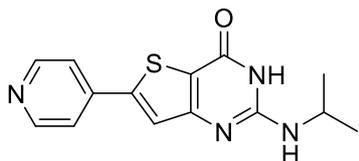
2-*tert*-butylamino-6-(pyridin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 41



Chemical Formula: C₁₅H₁₆N₄OS
Exact Mass: 300,1045
Molecular Weight: 300,3800

Starting from methyl 3-amino-5-(pyridin-4-yl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.85 mmol) and with *tert*-butylamine (179 μL, 1.71 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 98:2 to 97:3 dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(pyridin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (107 mg, 42 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.57 (s, 1H), 8.67-8.62 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.80-7.76 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.8, 157.6, 152.3, 150.5 (2C), 146.5, 139.8, 123.2, 119.8 (2C), 113.1, 51.0, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₇N₄OS [M+H]⁺ 301.1118, found 301.1119.

2-(propan-2-ylamino)-6-(pyridin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **42**

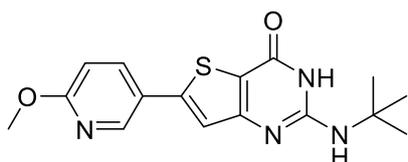


Chemical Formula: C₁₄H₁₄N₄OS
Exact Mass: 286,0888
Molecular Weight: 286,3530

Starting from methyl 3-amino-5-(pyridin-4-yl)thiophene-2-carboxylate (0.43 g, 1.84 mmol) and with isopropylamine (315 μ L, 3.67 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (deactivated with 3 % triethylamine, starting from 100 % dichloromethane to 90:10

dichloromethane/isopropanol) affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(pyridin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow/orange powder (87 mg, 17 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.66 (d, ³*J* = 6.1 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.81-7.78 (m, 2H), 6.25 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 4.09-3.95 (m, 1H), 1.18 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 158.2, 153.3, 150.5 (2C), 146.8, 140.9, 123.7, 120.5 (2C), 113.8, 42.7, 22.9 (2C). mp = 266-268 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₁₅N₄OS [M+H]⁺ 287.0960, found 287.0960.

2-*tert*-butylamino-6-(6-methoxypyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **43**

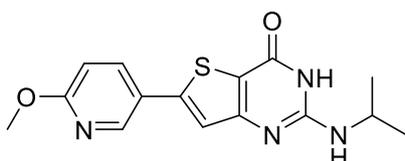


Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₄O₂S
Exact Mass: 330,1150
Molecular Weight: 330,4060

Starting from methyl 3-amino-5-(6-methoxypyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (0.35 g, 1.32 mmol) and with *tert*-butylamine (278 μ L, 2.65 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-

tert-butylamino-6-(6-methoxypyridin-3-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (233 mg, 53 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.46 (s, 1H), 8.63 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz 1H), 8.11 (dd, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 6.91 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.9, 160.2, 157.5, 152.3, 146.6, 144.2, 136.8, 123.0, 120.3, 111.1, 111.0, 53.5, 51.0, 28.6 (3C). mp = 263-265 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₉N₄O₂S [M+H]⁺ 331.1223, found 331.1223.

6-(6-methoxypyridin-3-yl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **44**



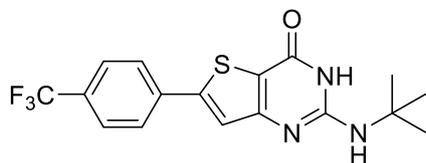
Chemical Formula: C₁₅H₁₆N₄O₂S
Exact Mass: 316,0994
Molecular Weight: 316,3790

Starting from methyl 3-amino-5-(6-methoxypyridin-3-yl)thiophene-2-carboxylate (0.45 g, 1.70 mmol) and with isopropylamine (291 μ L, 3.39 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 6-(6-methoxypyridin-3-yl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-

d]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (0.25 g, 47 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.61 (s, 1H), 8.62 (d, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1H), 8.08 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.92

(d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H), 6.13 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.07-3.96 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 1.18 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 163.9, 160.5, 157.6, 152.7, 146.7, 144.2, 136.7, 123.0, 120.1, 111.1, 111.0, 53.5, 42.2, 22.4 (2C). mp = 244-246 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 317.1067, found 317.1073.

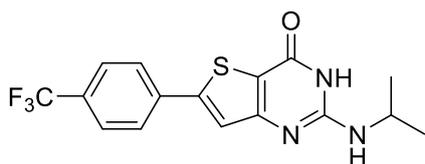
2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 45



Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$
 Exact Mass: 367,0966
 Molecular Weight: 367,3902

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.66 mmol) and with *tert*-butylamine (140 μL , 1.33 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% dichloromethane to 99:1 dichloromethane/methanol). The residue obtained from the desired fractions was washed with acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (133 mg, 55 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.54 (bs, 1H), 8.03 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.81 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.6, 136.8, 129.0 (q, $^2J = 32$ Hz), 126.6 (2C), 126.1 (q, $^3J = 3.8$ Hz, 2C), 124.0 (q, $^1J = 271.3$ Hz), 122.4, 112.6, 51.0, 28.5 (3C). mp = 296-298 °C.

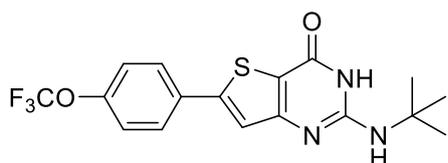
2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 46



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}$
 Exact Mass: 353,0810
 Molecular Weight: 353,3632

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 0.99 mmol) and with isopropylamine (171 μL , 1.99 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 80:20 to 70:30 dichloromethane/ethyl acetate) affording 2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (118 mg, 34 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.70 (s, 1H), 8.00 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.81 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 6.17 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H), 4.10-3.97 (m, 1H), 1.19 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.3, 157.7, 152.8, 147.7, 136.8, 129.0 (q, $^2J = 32.1$ Hz), 126.5 (2C), 126.1 (q, $^3J = 3.8$ Hz, 2C), 124.0 (q, $^1J = 272.1$ Hz), 122.2, 112.6, 42.2, 22.4 (2C). mp = 287-289 °C.

2-*tert*-butylamino-6-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 47

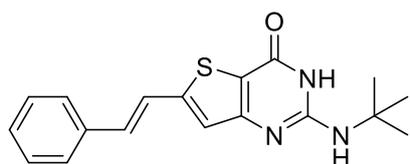


Chemical Formula: C₁₇H₁₆F₃N₃O₂S
Exact Mass: 383,0915
Molecular Weight: 383,3892

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.26 g, 0.82 mmol) and with *tert*-butylamine (172 μ L, 1.64 mmol), the obtained crude was purified *via* two flash chromatography (using dichloromethane/methanol).

Fractions of interest were triturated in cyclohexane affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (105 mg, 33 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.52 (s, 1H), 7.93 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.45 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H), 6.12 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.6, 152.3, 148.7, 148.0, 132.3, 127.9 (2C), 121.7 (2C), 121.5, 120.0 (q, ¹*J* = 257 Hz, 1C), 112.1, 51.0, 28.6 (3C). mp = 267-269 °C. HRMS (ESI) ongoing.

2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-phenylethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 48

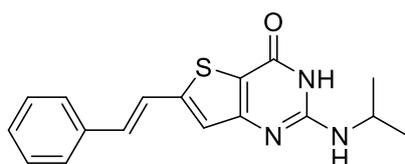


Chemical Formula: C₁₈H₁₉N₃OS
Exact Mass: 325,1249
Molecular Weight: 325,4300

Starting from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-phenylethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.77 mmol) and with *tert*-butylamine (162 μ L, 1.54 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (deactivated with 3 % triethylamine, starting from 60:40

cyclohexane/ethyl acetate to 50:50 cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and purified *via* column chromatography on silica (80:20 dichloromethane/ethyl acetate) affording 2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-phenylethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (75 mg, 30 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.44 (s, 1H), 7.62 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2H), 7.46 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.42-7.37 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 1H), 7.20 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.7, 157.5, 152.2, 148.6, 135.9, 131.3, 128.8 (2C), 128.4, 126.8 (2C), 122.8, 121.6, 110.9, 50.9, 28.6 (3C). mp = 248-250 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₂₀N₃OS [M+H]⁺ 326.1322, found 326.1320.

6-[(*E*)-2-phenylethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 49

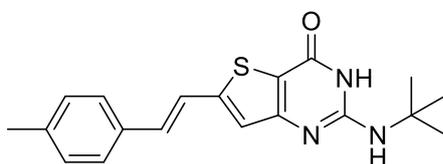


Chemical Formula: C₁₇H₁₇N₃OS
Exact Mass: 311,1092
Molecular Weight: 311,4030

Starting from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-phenylethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.35 g, 1.35 mmol) and with isopropylamine (232 μ L, 2.7 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 80:20 to 70:30 dichloromethane/ethyl

acetate). Fractions of interest was combined and purified *via* column chromatography on silica gel deactivated with triethylamine (20:80 cyclohexane/ethyl acetate) affording 6-[(*E*)-2-phenylethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (86 mg, 24 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.60 (s, 1H), 7.62 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 2H), 7.47 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.43-7.36 (m, 2H), 7.34-7.28 (m, 1H), 7.19 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.10 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H), 4.08-3.95 (m, 1H), 1.17 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.9, 157.5, 152.6, 148.6, 135.9, 131.3, 128.8 (2C), 128.4, 126.8 (2C), 122.7, 121.7, 110.8, 42.1, 22.4 (2C). mp = 243-245 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₁₈N₃OS [M+H]⁺ 312.1165, found 312.1165.

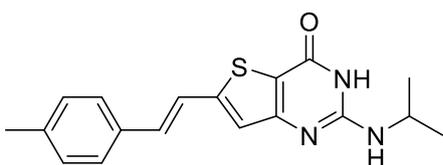
2-(*tert*-butylamino)-6-((*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 50



Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₃OS
Exact Mass: 339,1405
Molecular Weight: 339,4570

Starting from methyl 3-amino-5-((*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl)thiophene-2-carboxylate (0.31 g, 1.13 mmol) and with *tert*-butylamine (238 μL, 2.27 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 90:10 to 60:40 cyclohexane/ethyl acetate) affording 2-(*tert*-butylamino)-6-((*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (152 mg, 39 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 7.51 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.39 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.23-7.16 (m, 3H), 7.14 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.7, 157.4, 152.3, 148.8, 138.1, 133.1, 131.3, 129.4 (2C), 126.8 (2C), 122.5, 120.6, 110.7, 50.9, 28.6 (3C), 20.9. mp = 294-296 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₂₂N₃OS [M+H]⁺ 340.1478, found 340.1478.

6-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 51

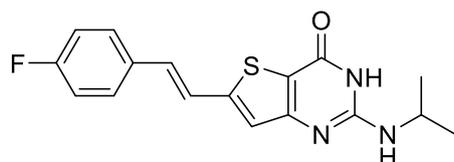


Chemical Formula: C₁₈H₁₉N₃OS
Exact Mass: 325,1249
Molecular Weight: 325,4300

Starting from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.32 g, 1.17 mmol) and with isopropylamine (201 μL, 2.34 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol) affording 6-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (0.15 g, 40 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H),

7.52 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 7.41 (d, $^3J = 16.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 7.14 (d, $^3J = 16.2$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.10 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.6, 149.0, 138.1, 133.1, 131.3, 129.5 (2C), 126.9 (2C), 122.4, 120.7, 110.6, 42.1, 22.4 (2C), 20.9. mp = 239-241 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326.1322, found 326.1320.

6-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **52**

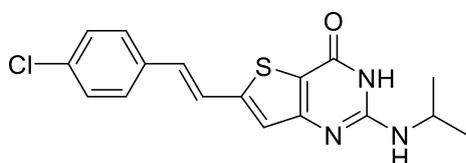


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{OS}$
 Exact Mass: 329,0998
 Molecular Weight: 329,3934

Starting from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.08 mmol) and with isopropylamine (186 μL , 2.16 mmol), the obtained crude was purified *via* chromatography (using dichloromethane and methanol).

Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 6-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (95 mg, 27 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.61 (s, 1H), 7.72-7.65 (m, 2H), 7.43 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 7.28-7.16 (m, 3H), 7.15 (s, 1H), 6.10 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H), 4.07-3.94 (m, 1H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162.1 (d, $^1J = 246$ Hz, 1C), 160.0, 157.6, 152.7, 148.7, 132.6 (d, $^4J = 3$ Hz, 1C), 130.2, 128.9 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2C), 122.7, 121.6 (d, $^5J = 2.8$ Hz, 1C), 115.8 (d, $^2J = 22$ Hz, 2C), 110.8, 42.1, 22.4 (2C). mp = 259-261 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 330.1071, found 330.1069.

6-[(*E*)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **53**

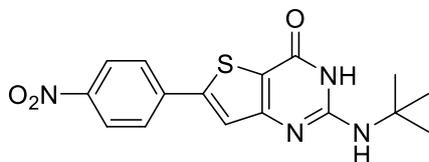


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$
 Exact Mass: 345,0703
 Molecular Weight: 345,8450

Starting from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.32 g, 1.09 mmol) and with isopropylamine (187 μL , 2.18 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 6-[(*E*)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (198 mg, 53 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.62 (s, 1H), 7.65 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.54-7.42 (m, 3H), 7.22-7.14 (m, 2H), 6.11 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 1H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 159.9, 157.6, 152.7, 148.4, 134.9, 132.8, 129.9, 128.8 (2C), 128.5 (2C), 123.0, 122.6, 111.1, 42.1, 22.4

(2C). mp = 255-257 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₇ClN₃OS [M+H]⁺ 346.0775, found 346.0774.

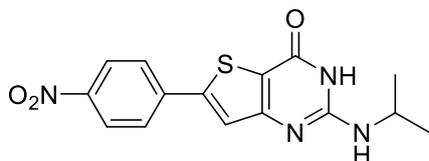
2-*tert*-butylamino-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 54



Chemical Formula: C₁₆H₁₆N₄O₃S
Exact Mass: 344,0943
Molecular Weight: 344,3890

Starting from methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.41 g, 1.47 mmol) and with *tert*-butylamine (313 μL, 2.95 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 60:40 to 50:50 cyclohexane/ethyl acetate) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an orange solid (0.277 g, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.56 (s, 1H), 8.26 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 8.06 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.9, 157.5, 152.3, 147.2, 146.7, 139.1, 126.8 (2C), 124.3 (2C), 123.5, 113.5, 51.0, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₇N₄O₃S [M+H]⁺ 345.1016, found 345.1016.

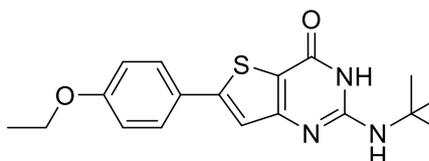
6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 55



Chemical Formula: C₁₅H₁₄N₄O₃S
Exact Mass: 330,0787
Molecular Weight: 330,3620

Starting from methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.44 mmol) and with isopropylamine (244 μL, 2.88 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 70:30 to 50:50 dichloromethane/ethyl acetate) affording 6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an orange solid (0.156 g, 33 % crude yield) which was used without further purifications. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.79 (s, 1H), 8.31-8.25 (m, 2H), 8.09-8.02 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 6.26 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 1H), 4.08-3.98 (m, 1H), 1.19 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H).

2-*tert*-butylamino-6-(4-ethoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 56

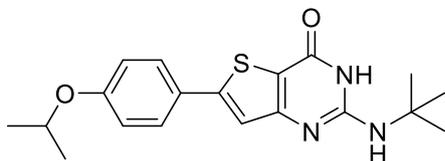


Chemical Formula: C₁₈H₂₁N₃O₂S
Exact Mass: 343,1354
Molecular Weight: 343,4450

Starting from methyl 3-amino-5-(4-ethoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.08 mmol) and with *tert*-butylamine (227 μL, 2.16 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-ethoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.264 g, 71 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.44 (s, 1H), 7.71 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.39 (s, 1H),

6.99 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 4.06 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.34 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.4, 159.5, 157.6, 152.3, 150.2, 127.4 (2C), 125.5, 119.2, 115.0 (2C), 110.6, 63.3, 51.0, 28.6 (3C), 14.6. mp = 277-279 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 344.1427, found 344.1427.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 57

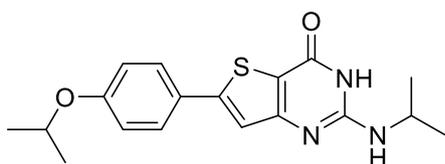


Chemical Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$
Exact Mass: 357.1511
Molecular Weight: 357.4720

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.37 mmol) and with *tert*-butylamine (289 μL , 2.75 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(propan-2-

yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.257 g, 52 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.70 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 6.98 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 4.68 (sept, $^3J = 6$ Hz, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.27 (d, $^3J = 6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.4, 158.4, 157.6, 152.2, 150.2, 127.4 (2C), 125.3, 119.1, 116.0 (2C), 110.5, 69.4, 51.0, 28.6 (3C), 21.8 (2C). mp = 258-260 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 358.1584, found 358.1583.

2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 58

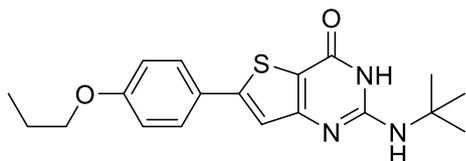


Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$
Exact Mass: 343.1354
Molecular Weight: 343.4450

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.37 g, 1.27 mmol) and with isopropylamine (218 μL , 2.54 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-

(propan-2-ylamino)-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (140 mg, 32 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.68 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 6.98 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 6.13 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1H), 4.74-4.61 (m, 1H), 4.08-3.96 (m, 1H), 1.28 (d, $^3J = 6$ Hz, 6H), 1.18 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.7, 158.4, 157.7, 152.7, 150.2, 127.4 (2C), 125.3, 118.8, 116.0 (2C), 110.5, 69.4, 42.1, 22.4 (2C), 21.7 (2C). mp = 229-231 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 344.1427, found 344.1420.

2-*tert*-butylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 59



Chemical Formula: C₁₉H₂₃N₃O₂S

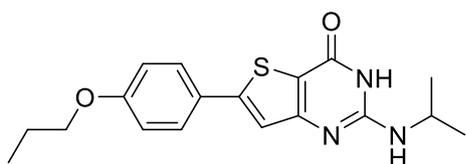
Exact Mass: 357,1511

Molecular Weight: 357,4720

Starting from methyl 3-amino-5-(4-propoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.35 g, 1.20 mmol) and with *tert*-butylamine (252 μ L, 2.40 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol)

affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (0.217 g, 51 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 7.71 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.00 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.98 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 2H), 1.81-1.68 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 0.98 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.9, 160.0, 158.0, 152.7, 150.6, 127.8 (2C), 125.9, 119.6, 115.5 (2C), 111.0, 69.6, 51.4, 29.1 (3C), 22.4, 10.8. mp = 253-255 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₂₄N₃O₂S [M+H]⁺ 358.1584, found 358.1581.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 60



Chemical Formula: C₁₈H₂₁N₃O₂S

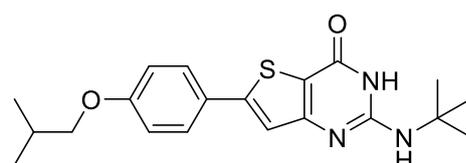
Exact Mass: 343,1354

Molecular Weight: 343,4450

Starting from methyl 3-amino-5-(4-propoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.37 g, 1.27 mmol) and with isopropylamine (218 μ L, 2.54 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-

propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (80 mg, 18 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.58 (s, 1H), 7.70 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.00 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 6.12 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 4.08-3.90 (m, 3H), 1.80-1.67 (m, 2H), 1.18 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H), 0.98 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.7, 159.6, 157.7, 152.7, 150.2, 127.3 (2C), 125.5, 118.9, 115.1 (2C), 110.5, 69.1, 42.1, 22.4 (2C), 22.0, 10.4. mp = 241-243 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 344.1427, found 344.1428.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(2-methylpropoxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 61



Chemical Formula: C₂₀H₂₅N₃O₂S

Exact Mass: 371,1667

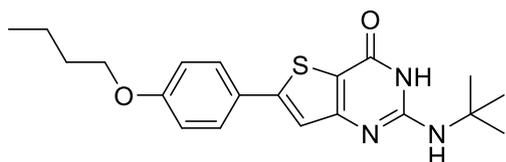
Molecular Weight: 371,4990

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(2-methylpropoxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.355 g, 1.16 mmol) and with *tert*-butylamine (244 μ L, 2.33 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were combined and

triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(2-

methylpropoxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (0.19 g, 44 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.71 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.00 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.80 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 2H), 2.03 (sept, ³*J* = 6.8 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H), 0.99 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 159.7, 157.5, 152.2, 150.1, 127.3 (2C), 125.5, 119.1, 115.1 (2C), 110.5, 73.9, 51.0, 28.6 (3C), 27.7, 19.0 (2C). mp = 259-261 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₆N₃O₂S [M+H]⁺ 372.1740, found 372.1737.

6-(4-butoxyphenyl)-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 62

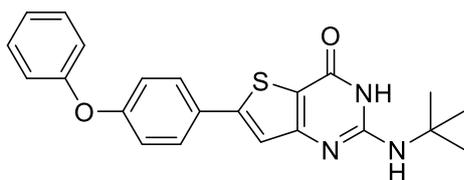


Chemical Formula: C₂₀H₂₅N₃O₂S
Exact Mass: 371,1667
Molecular Weight: 371,4990

Starting from methyl 3-amino-5-(4-butoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.26 g, 0.85 mmol) and with *tert*-butylamine (179 μL, 1.70 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 6-(4-butoxyphenyl)-2-*tert*-

butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.18 g, 57 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 7.71 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 6.99 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 4.01 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 2H), 1.75-1.65 (m, 2H), 1.50-1.36 (m, 11H), 0.93 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 159.6, 157.5, 152.2, 150.1, 127.3 (2C), 125.4, 119.1, 115.0 (2C), 110.5, 67.4, 51.0, 30.7, 28.6 (3C), 18.7, 13.7. mp = 230-232 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₆N₃O₂S [M+H]⁺ 372.1740, found 372.1740.

2-*tert*-butylamino-6-(4-phenoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 63

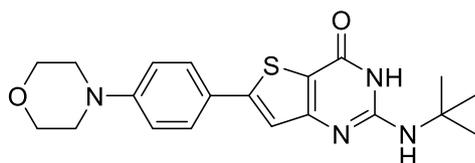


Chemical Formula: C₂₂H₂₁N₃O₂S
Exact Mass: 391,1354
Molecular Weight: 391,4890

Starting from methyl 3-amino-5-(4-phenoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.23 g, 0.71 mmol) and with *tert*-butylamine (149 μL, 1.41 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-phenoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a

white solid (0.19 g, 69 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.45 (s, 1H), 7.81 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.47-7.40 (m, 3H), 7.23-7.17 (m, 1H), 7.12-7.07 (m, 2H), 7.05 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 157.8, 157.3, 155.9, 152.2, 149.4, 130.2 (2C), 128.1, 127.7 (2C), 124.1, 120.0, 119.3 (2C), 118.6 (2C), 111.1, 51.0, 28.6 (3C). mp = 230-232 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 392.1427, found 392.1421.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 64



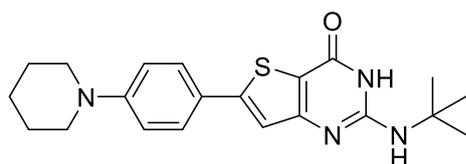
Chemical Formula: C₂₀H₂₄N₄O₂S
Exact Mass: 384,1620
Molecular Weight: 384,4980

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.36 g, 1.13 mmol) and with *tert*-butylamine (238 μ L, 2.26 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a pale-yellow powder (0.3 g, 69 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.41 (s, 1H), 7.64 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 6.99 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.74 (s, 4H), 3.18 (s, 4H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.6, 150.7, 126.8 (2C), 123.4, 118.2, 114.8 (2C), 110.0, 65.9 (2C), 50.9, 47.6 (2C), 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₅N₄O₂S [M+H]⁺ 385.1683, found 385.1689.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-

2-*tert*-butylamino-6-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 65

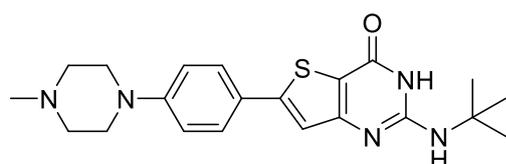


Chemical Formula: C₂₁H₂₆N₄OS
Exact Mass: 382,1827
Molecular Weight: 382,5260

Starting with methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.350 g, 1.11 mmol) and with *tert*-butylamine (232 μ L, 2.21 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and

methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (216 mg, 51 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.37 (s, 1H), 7.60 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.95 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 3.29-3.20 (m, 4H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.45-1.36 (m, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.7, 150.9, 126.8 (2C), 122.2, 117.8, 115.0 (2C), 109.7, 50.9, 48.5 (2C), 28.6 (3C), 24.9 (2C), 23.9. mp = 289-291 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₁H₂₇N₄OS [M+H]⁺ 383.1900, found 383.1898.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 66

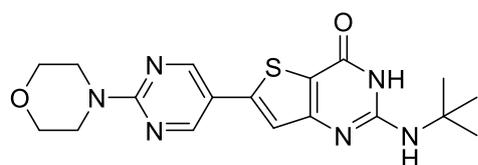


Chemical Formula: C₂₁H₂₇N₅OS
Exact Mass: 397,1936
Molecular Weight: 397,5410

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.325 g, 0.98 mmol) and with *tert*-butylamine (200 μ L, 1.96 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using

dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (90 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.39 (s, 1H), 7.62 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.97 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.27-3.18 (m, 4H), 2.47-2.41(m, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.4, 150.8, 126.8 (2C), 122.9, 118.1, 114.9 (2C), 109.9, 54.4 (2C), 50.9, 47.2 (2C), 45.7, 28.6 (3C). mp = 282-284 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₁H₂₈N₅OS [M+H]⁺ 398.2009, found 398.2006.

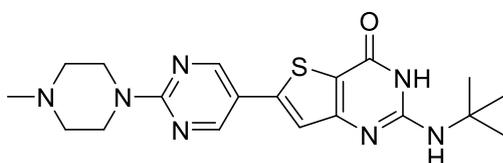
2-*tert*-butylamino-6-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **67**



Chemical Formula: C₁₈H₂₂N₆O₂S
Exact Mass: 386,1525
Molecular Weight: 386,4740

Starting from methyl 3-amino-5-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.62 mmol) and with *tert*-butylamine (131 μL, 1.25 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (138 mg, 57 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 8.80 (s, 2H), 6.09 (s, 1H), 3.81-3.74 (m, 4H), 3.70-3.64 (m, 4H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.7, 160.2, 157.4, 155.2 (2C), 152.3, 144.7, 119.1, 116.5, 110.4, 65.9 (2C), 51.0, 44.0 (2C), 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₂₃N₆O₂S [M+H]⁺ 387.1598, found 387.1597.

2-*tert*-butylamino-6-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **68**

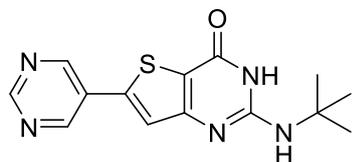


Chemical Formula: C₁₉H₂₅N₇OS
Exact Mass: 399,1841
Molecular Weight: 399,5170

Starting from methyl 3-amino-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate (0.195 g, 0.58 mmol) and with *tert*-butylamine (122 μL, 1.17 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (45 mg, 19 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 8.77 (s, 2H), 7.43 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 3.84-3.75 (m, 4H), 2.41-2.32 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.6, 160.3,

157.4, 155.2 (2C), 152.3, 144.8, 119.0, 116.1, 110.3, 54.3 (2C), 51.0, 45.8, 43.4 (2C), 28.6 (3C). mp = 289-291. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₉H₂₆N₇OS [M+H]⁺ 400.1914, found 400.1914.

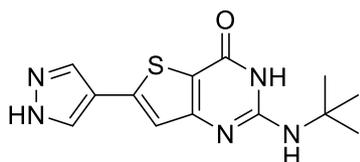
2-*tert*-butylamino-6-(pyrimidin-5-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 69



Chemical Formula: C₁₄H₁₅N₅OS
Exact Mass: 301,0997
Molecular Weight: 301,3680

Starting from methyl 3-amino-5-(pyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.235 g, 1 mmol) and with *tert*-butylamine (210 μ L, 2 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(pyrimidin-5-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (176 mg, 58 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.58 (s, 1H), 9.24 (s, 2H), 9.20 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.9, 158.2, 157.5, 153.8 (2C), 152.4, 142.3, 127.4, 123.1, 113.0, 51.1, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₆N₅OS [M+H]⁺ 302.1070, found 302.1068.

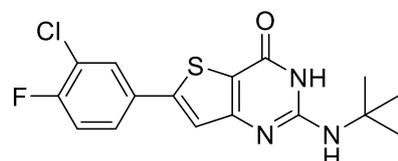
2-*tert*-butylamino-6-(1*H*-pyrazol-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 70



Chemical Formula: C₁₃H₁₅N₅OS
Exact Mass: 289,0997
Molecular Weight: 289,3570

Starting from methyl 3-amino-5-(1*H*-pyrazol-4-yl)thiophene-2-carboxylate (0.19 g, 0.85 mmol) and with *tert*-butylamine (180 μ L, 1.70 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(1*H*-pyrazol-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a light brown powder (120 mg, 49 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.38 (s, 1H), 8.10 (bs, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 157.5, 152.2 (2C), 142.8, 118.7, 115.3, 109.2, 50.9, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₃H₁₆N₅OS [M+H]⁺ 290.1070, found 290.1066.

2-*tert*-butylamino-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 71

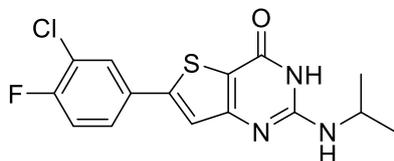


Chemical Formula: C₁₆H₁₅ClFN₃OS
Exact Mass: 351,0608
Molecular Weight: 351,8244

Starting from methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.05 mmol) and with *tert*-butylamine (220 μ L, 2.1 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether then purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (180 mg, 49 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.51 (s, 1H), 8.07 (dd, ⁴*J* = 7 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (ddd, ³*J* = 8.6 Hz, ⁴*J* = 4.6 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.50 (t, ³*J* = 9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.5 (d, ¹*J*

= 250 Hz, 1C), 157.5, 152.3, 147.0, 130.9 (d, $^3J = 3.7$ Hz, 1C), 127.9, 126.7 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1C), 121.9, 120.6 (d, $^2J = 18.1$ Hz, 1C), 117.7 (d, $^3J = 21.6$, 1C), 112.1, 51.0, 28.6 (3C). mp = 259-261 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₆ClFN₃OS [M+H]⁺ 352.0681, found 352.0681.

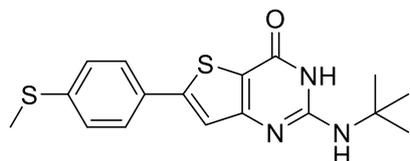
2-(propan-2-ylamino)-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 72



Chemical Formula: C₁₅H₁₃ClFN₃OS
Exact Mass: 337,0452
Molecular Weight: 337,7974

Starting from methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.05 mmol) and with isopropylamine (180 μL, 2.1 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a grey solid (130 mg, 37 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.67 (s, 1H), 8.04 (dd, $^4J = 7$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, 1H), 7.78 (ddd, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 4.6$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.51 (t, $^3J = 8.9$ Hz, 1H), 6.15 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.09-3.94 (m, 1H), 1.18 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 157.6, 157.5 (d, $^1J = 250$ Hz, 1C), 152.7, 147.1, 131.0 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 1C), 127.9, 126.7 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1C), 121.6, 120.6 (d, $^2J = 18.1$ Hz, 1C), 117.7 (d, $^2J = 21.5$ Hz, 1C), 112.0, 42.2, 22.4 (2C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₄ClFN₃OS [M+H]⁺ 338.0525, found 338.0522.

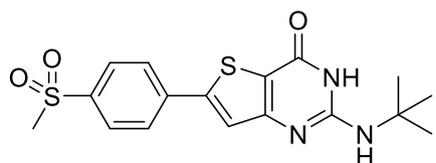
2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 73



Chemical Formula: C₁₇H₁₉N₃OS₂
Exact Mass: 345,0970
Molecular Weight: 345,4790

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.65 g, 2.45 mmol) and with *tert*-butylamine (515 μL, 4.9 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an off-white solid (547 mg, 65 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.46 (s, 1H), 7.73 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.32 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H), 6.09 (s, 1H), 2.52 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 157.6, 152.3, 149.6, 140.0, 129.4, 126.3 (2C), 126.1 (2C), 120.0, 111.1, 51.0, 28.6 (3C), 14.4. mp = 272-274 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₀N₃OS₂ [M+H]⁺ 346.1042, found 346.1039.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **74**

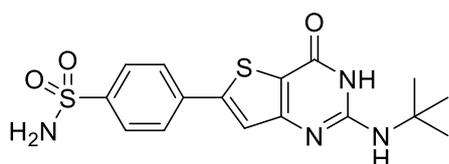


Chemical Formula: C₁₇H₁₉N₃O₃S₂
 Exact Mass: 377,0868
 Molecular Weight: 377,4770

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 0.96 mmol) and with *tert*-butylamine (200 μ L, 1.93 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording

2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (160 mg, 44 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.56 (s, 1H), 8.08 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.98 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H), 3.26 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.5, 140.8, 137.6, 127.9 (2C), 126.6 (2C), 122.9, 112.9, 51.1, 43.4, 28.6 (3C). mp = 294-296 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃O₃S₂ [M+H]⁺ 378.0941, found 378.0934.

4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzenesulfonamide **75**

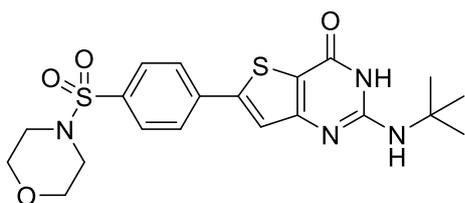


Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₄O₃S₂
 Exact Mass: 378,0820
 Molecular Weight: 378,4650

Starting from methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.64 mmol) and with *tert*-butylamine (135 μ L, 1.28 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (from 100% dichloromethane to 97:3

dichloromethane/methanol) affording 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzenesulfonamide as a yellow powder (135 mg, 56 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.55 (s, 1H), 8.00 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.87 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 6.14 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.9, 144.2, 136.0, 126.5 (2C), 126.3 (2C), 122.3, 112.5, 51.0, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₉N₄O₃S₂ [M+H]⁺ 379.0893, found 379.0893.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **76**



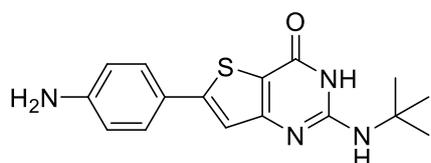
Chemical Formula: C₂₀H₂₄N₄O₄S₂
 Exact Mass: 448,1239
 Molecular Weight: 448,5560

Starting from methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 0.78 mmol) and with *tert*-butylamine (170 μ L, 1.57 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in

diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (117 mg, 33 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.57 (s, 1H), 8.09 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.80 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.68-3.61 (m, 4H), 2.96-2.87 (m, 4H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.4, 137.4, 134.5, 128.6 (2C), 126.7 (2C), 122.8, 112.9, 62.3 (2C), 51.1, 45.9 (2C), 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₅N₄O₄S₂ [M+H]⁺ 449.1312, found 449.1305.

6.6. Compounds obtained after additional reactions from cyclisation derivatives

6-(4-aminophenyl)-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 77



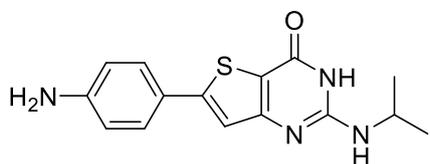
Chemical Formula: C₁₆H₁₈N₄OS

Exact Mass: 314,1201

Molecular Weight: 314,4070

To a solution of 2-*tert*-butylamino-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.227 g, 0.66 mmol) in acetic acid (6.9 mL) was added iron powder (0.368 g, 6.59 mmol) and the mixture was stirred at 80 °C for 15 min. Excess solvent was removed *in vacuo* and crude product was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 95:5 dichloromethane/methanol). Fractions of interest were purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol) affording 6-(4-aminophenyl)-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige solid (66 mg, 32 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.31 (s, 1H), 7.45 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.60 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.56 (s, 2H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.4, 152.1, 151.9, 150.2, 126.9 (2C), 120.3, 116.7, 113.8 (2C), 109.0, 50.9, 28.6 (3C). mp = 259-261 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₉N₄OS [M+H]⁺ 315.1274, found 315.1274.

6-(4-aminophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 78



Chemical Formula: C₁₅H₁₆N₄OS

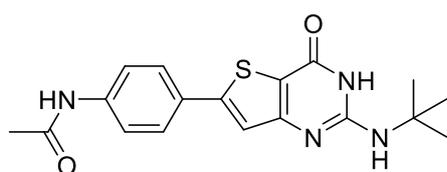
Exact Mass: 300,1045

Molecular Weight: 300,3800

To a solution of 6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.156 g, 0.47 mmol) in acetic acid (4.7 mL) was added iron powder (0.264 g, 4.72 mmol) and the mixture was stirred at 60 °C for 20 min. The reaction mixture was filtered through celite, the filtrate was isolated, and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 90:10 dichloromethane/isopropanol). Fractions of interest were recrystallized in isopropanol affording 6-(4-aminophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-

d]pyrimidin-4(3*H*)-one as light brown powder (30 mg, 21 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.47 (s, 1H), 7.44 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.60 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 6.07 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 4.08-3.94 (m, 1H), 1.17 (d, ³*J* = 6.55 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.8, 157.5, 152.6, 152.0, 150.2, 126.9 (2C), 120.3, 116.4, 113.8 (2C), 109.0, 42.0, 22.4 (2C). Mp = 296-298 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₇N₄OS [M+H]⁺ 301.1118, found 301.1117.

N-[4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)phenyl]acetamide **79**

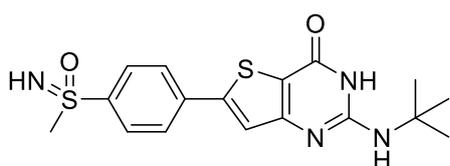


Chemical Formula: C₁₈H₂₀N₄O₂S
Exact Mass: 356,1307
Molecular Weight: 356,4440

N-[4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)phenyl]acetamide (brown powder) was isolated as a side product from the purification of 6-(4-aminophenyl)-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one when the reaction was stirred at 120 °C for 30 min. ¹H NMR (DMSO-

*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (bs, 1H), 10.12 (s, 1H), 7.73 (d, ³*J* = 11.6 Hz, 2H), 7.66 (d, ³*J* = 12 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 168.5, 160.3, 157.5, 152.2, 150.0, 140.3, 127.5, 126.4 (2C), 119.5, 119.2 (2C), 110.8, 51.0, 28.6 (3C), 24.1. mp > 300 °C HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 357.1380, found 357.1377.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonimidoyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **80**



Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₄O₂S₂
Exact Mass: 376,1028
Molecular Weight: 376,4930

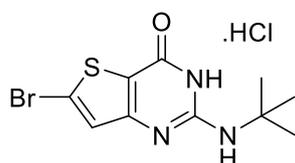
To a suspension of 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.15 g, 0.43 mmol) and ammonium carbamate (51 mg, 0.65 mmol) in methanol (868 μL) was added (diacetoxyiodo)benzene (0.293 g, 0.91 mmol) and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on neutral alumina gel (starting from 100 % dichloromethane to 95:5 dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonimidoyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (80 mg, 49% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.55 (bs, 1H), 8.05-7.94 (m, 4H), 7.69 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.10 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.6, 152.3, 147.9, 144.3, 136.6, 128.2 (2C), 126.3 (2C), 122.4, 112.7, 51.0,

45.6, 28.6 (3C). mp = 251-253 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 377.1100, found 377.1094.

6.7. Hydrochloride salts synthesis

To absolute ethanol (10 mL) was added appropriate 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. The suspension was heated if needed to dissolve the molecule and then allowed to cool down to room temperature. Hydrogen chloride was bubbled through the solution for a short period then the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction mixture was then degassed with nitrogen for 10 min and filtered. The precipitate was washed with diethyl ether affording the desired 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride salt.

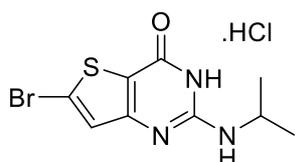
6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 6s



Chemical Formula: C₁₀H₁₃BrClN₃OS
Exact Mass: 336,9651
Molecular Weight: 338,6480

Following the general procedure with 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.33 mmol), 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a white powder (75 mg, 67 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.27 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 157.0, 153.0, 128.0, 122.5, 114.0, 51.7, 29.0 (3C). mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for C₁₀H₁₃BrClN₃OS: C 35.47, H 3.87, N 12.41, S 9.47, found: C 35.49, H 3.57, N 12.25, S 9.17.

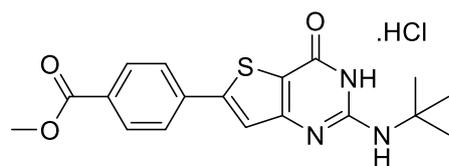
6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 7s



Chemical Formula: C₉H₁₁BrClN₃OS
Exact Mass: 322,9495
Molecular Weight: 324,6210

Following the general procedure with 6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.35 mmol), 6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a white powder (74 mg, 65 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.89 (bs, 1H), 7.43 (s, 1H), 4.18-4.02 (m, 1H), 1.20 (d, ³J = 6.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 155.6, 151.7, 125.1, 123.2, 114.0, 43.3, 22.2 (2C). mp = 289-291 °C. Elemental analysis calculated (%) for C₉H₁₁BrClN₃OS: C 33.30, H 3.42, N 12.94, found C 33.15, H 3.25, N 12.54.

Methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate hydrochloride **37s**



Chemical Formula: C₁₈H₂₀ClN₃O₃S

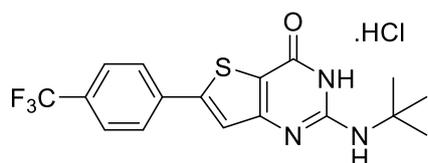
Exact Mass: 393,0914

Molecular Weight: 393,8860

Following the general procedure with methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate (87 mg, 0.24 mmol), methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate hydrochloride was obtained

as a white powder (74 mg, 78 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.01 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 7.96 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 6.48 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 165.7, 157.6, 152.4, 148.2, 137.2, 130.0 (2C), 129.7, 126.1 (2C), 122.1, 112.7, 52.3, 52.1, 28.6 (3C). mp > 300 °C.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **45s**



Chemical Formula: C₁₇H₁₇ClF₃N₃OS

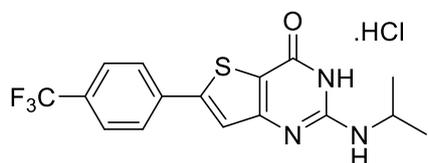
Exact Mass: 403,0733

Molecular Weight: 403,8482

Following the general procedure 2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (80 mg, 0.22 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a grey powder (78 mg, 89

% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.02 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.81 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 6.51 (bs, 1H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 157.4, 152.3, 147.9, 136.7, 129.1 (q, ²*J* = 32 Hz, 2C), 126.6, 126.1 (q, ³*J* = 4 Hz, 2C), 124.1 (q, ¹*J* = 324 Hz, 1C), 121.8, 112.8, 51.3, 28.5 (3C). mp > 300 °C.

2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **46s**



Chemical Formula: C₁₆H₁₅ClF₃N₃OS

Exact Mass: 389,0576

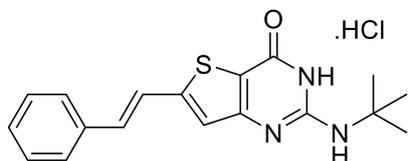
Molecular Weight: 389,8212

Following the general procedure with 2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (70 mg, 0.23 mmol), 2-(propan-2-ylamino)-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a

white powder (67 mg, 87 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.02 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.84 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 4.18-4.02 (m, 1H), 1.22 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 6H). Due to lack of solubility in DMSO-

d_6 , ^{13}C NMR could not be performed. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{OS}$: C 49.30, H 3.88, N 10.78, S 8.22, found C 49.37, H 3.61, N 11.03, S 8.01.

2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-phenylethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **48s**

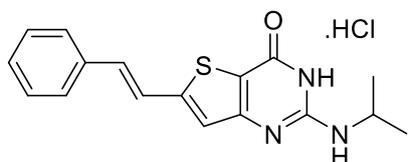


Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{OS}$
Exact Mass: 361,1016
Molecular Weight: 361,8880

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-phenylethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (70 mg, 0.22 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-phenylethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a yellow powder (58 mg, 74

% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.64 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H), 7.50 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 7.40 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H), 7.32 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 3H), 1.42 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 157.2, 151.9, 149.3, 135.8, 131.9, 128.9 (2C), 128.6, 127.0 (2C), 121.5, 111.1, 51.5, 30.7, 28.5 (3C). mp > 300 °C.

6-[(*E*)-2-phenylethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **49s**

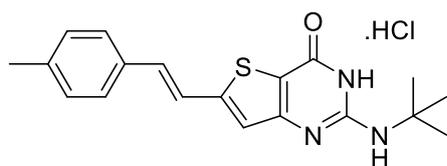


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$
Exact Mass: 347,0859
Molecular Weight: 347,8610

Following the general procedure with 6-[(*E*)-2-phenylethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (90 mg, 0.29 mmol), 6-[(*E*)-2-phenylethenyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a

yellow powder (75 mg, 75 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.66 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H), 7.60 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 7.41 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 7.37-7.31 (m, 2H), 7.27 (d, $^3J = 16$ Hz, 1H), 4.19-4.05 (m, 1H), 1.23 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 155.9, 151.0, 150.8, 135.6, 132.9, 129.9, 129.9 (2C), 127.2 (2C), 121.3, 118.2, 111.3, 43.9, 22.2 (2C). mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$: C 58.70, H 5.22, N 12.08, S 9.22, found C 58.48, H 5.16, N 12.09, S 8.94.

2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **50s**

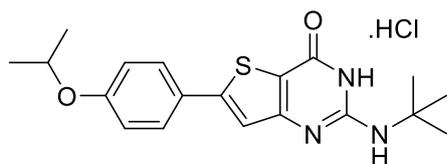


Chemical Formula: C₁₉H₂₂ClN₃OS
Exact Mass: 375,1172
Molecular Weight: 375,9150

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (90 mg, 0.27 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-[(*E*)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

hydrochloride was obtained as a yellow powder (80 mg, 80 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.53 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 7.44 (d, ³*J* = 16 Hz, 1H), 7.26-7.14 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 157.2, 151.9, 149.5, 138.3, 133.1, 131.8, 129.5 (2C), 127.0 (2C), 121.2, 120.5, 110.8, 51.4, 28.5 (3C), 20.9. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for C₁₉H₂₂ClN₃OS: C 60.71, H 5.90, N 11.18, S 8.53, found C 60.55, H 6.06, N 11.11, 7.96.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **57s**

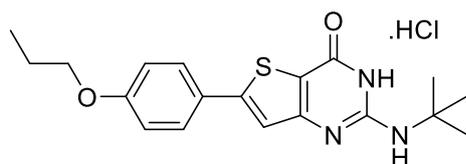


Chemical Formula: C₁₉H₂₄ClN₃O₂S
Exact Mass: 393,1278
Molecular Weight: 393,9300

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.28 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a

yellow solid (99 mg, 90 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.69 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.44, 6.99 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 4.68 (sept, ³*J* = 6 Hz, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.28 (d, ³*J* = 6 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.0, 157.8, 152.5, 151.2, 128.0 (2C), 125.5, 118.4, 116.6 (2C), 111.1, 69.9, 51.9, 29.0 (3C), 22.2 (2C). mp = 266 °C. Elemental analysis calculated (%) for C₁₉H₂₄ClN₃O₂S: C 57.93, H 6.14, N 10.67, S 8.14, found C 58.05, H 6.22, N 10.63, S 7.99.

2-*tert*-butylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **59s**



Chemical Formula: C₁₉H₂₄ClN₃O₂S
Exact Mass: 393,1278
Molecular Weight: 393,9300

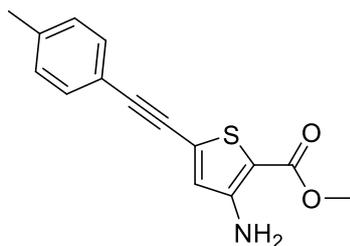
Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.08 g, 0.22 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a

white solid (85 mg, 97 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.72 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.44

(s, 1H), 7.02 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 3.99 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H), 1.80-1.69 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 0.99 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 159.7, 157.4, 152.1, 150.6, 127.4 (2C), 125.3, 118.2, 115.1 (2C), 110.6, 69.2, 51.3, 28.6 (3C), 22.0, 10.4. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: C 57.93, H 6.14, N 10.67, S 8.14, found C 57.71, H 6.23, N 10.63, S 7.98.

6.8. Compounds obtained after Sonogashira coupling

Methyl 3-amino-5-[(4-methylphenyl)ethynyl]thiophene-2-carboxylate **81**



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$
Exact Mass: 271,0667
Molecular Weight: 271,3340

Methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.27 mmol), 1-ethynyl-4-methylbenzene (0.155 g, 1.33 mmol), copper (I) iodide (39 mg, 0.2 mmol) triethylamine (1.76 mL, 12.7 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (4 mol%) and dried acetonitrile (0.5 mL) were put under nitrogen atmosphere.

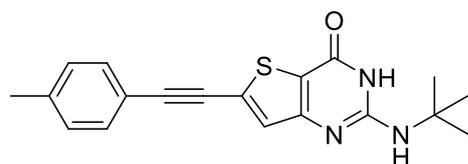
The obtained reaction mixture was stirred 10 min under microwave irradiation at 100 °C. Water (10 mL) was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 30 mL), dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained residue was purified *via* column chromatography on silica gel (90:10 cyclohexane/ethyl acetate). The desired fractions were combined, the excess solvent removed *in vacuo* and the obtained solid was triturated in cyclohexane affording ethyl 3-amino-5-[(4-methylphenyl)ethynyl]thiophene-2-carboxylate as a brown powder (217 mg, 63 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.40 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.16 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 5.42 (bs, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164.5, 153.2, 139.5, 131.7 (2C), 129.4 (2C), 128.7, 123.3, 119.3, 102.1, 95.7, 81.9, 51.1, 21.7. mp = 156-158 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272.0740, found 272.0743.

General procedure for Sonogashira coupling on **6** or **7**

Under nitrogen atmosphere, the appropriate 2-amino-6-bromothienopyrimidinone, the appropriate alkyne, copper iodide (16% mol), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (4% mol) and triethylamine (10 eq) were dissolved in dry acetonitrile (1:1 v:v with triethylamine). The obtained suspension was stirred for 10 min under microwave irradiation at 100 °C. Water (20 times the quantity of acetonitrile) was added to the reaction mixture which was then extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water

and the excess was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* the appropriate method.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)ethynyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **82**

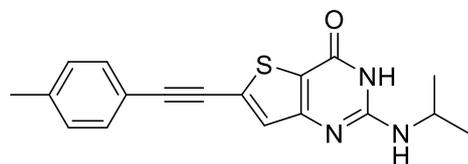


Chemical Formula: C₁₉H₁₉N₃OS
Exact Mass: 337,1249
Molecular Weight: 337,4410

Starting from 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and 1-ethynyl-4-methylbenzene (151 μ L, 1.19 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate).

Fractions of interest were combined, the excess solvent was removed *in vacuo* and the solid triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)ethynyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow/brown powder (200 mg, 60 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.49 (d, ³*J* = 10.8 Hz, 2H), 7.30-7.24 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.4, 157.7, 152.8, 140.2, 131.9 (2C), 130.0 (2C), 129.2, 129.1, 118.5, 113.7, 97.0, 82.3, 51.6, 29.0 (3C), 21.6. mp = 235-237 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₂₀N₃OS [M+H]⁺ 338.1322, found 338.1319.

6-[(4-methylphenyl)ethynyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **83**

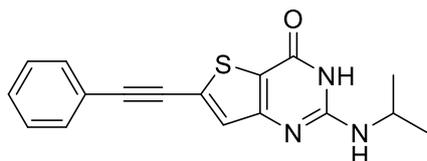


Chemical Formula: C₁₈H₁₇N₃OS
Exact Mass: 323,1092
Molecular Weight: 323,4140

Starting from 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.172 g, 0.60 mmol) and 1-ethynyl-4-methylbenzene (91 μ L, 0.72 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (cyclohexane and ethanol) affording

6-[(4-methylphenyl)ethynyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (44 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.78 (s, 1H), 7.48 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H), 7.30-7.23 (m, 3H), 6.22 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.17 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.2, 157.3, 152.8, 139.7, 131.4 (2C), 129.5 (2C), 128.7, 128.5, 118.0, 113.2, 96.4, 81.9, 42.2, 22.4 (2C), 21.1. mp = 277-279 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₁₇N₃OS [M+H]⁺ 324.1165, found 324.1163.

6-(phenylethynyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **84**



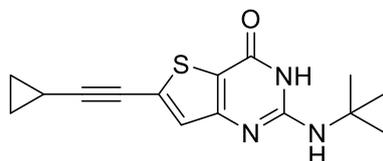
Chemical Formula: C₁₇H₁₅N₃OS

Exact Mass: 309,0936

Molecular Weight: 309,3870

Starting from 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 1.04 mmol) and ethynylbenzene (137.2 μ L, 1.25 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether affording 6-(phenylethynyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown solid (285 mg, 85 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.94 (bs, 1H), 7.64-7.56 (m, 2H), 7.51-7.42 (m, 3H), 7.32 (s, 1H), 6.41 (bs, 1H), 4.08-3.95 (m, 1H), 1.17 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.1, 157.3, 153.1, 131.5 (2C), 129.7, 128.9 (2C), 128.7, 128.2, 121.0, 113.4, 96.0, 82.4, 42.1, 20.8 (2C). mp = 276-278 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₁₆N₃OS [M+H]⁺ 310.1009, found 310.1003.

2-*tert*-butylamino-6-(cyclopropylethynyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **85**



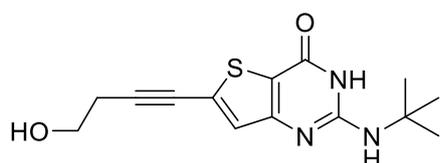
Chemical Formula: C₁₅H₁₇N₃OS

Exact Mass: 287,1092

Molecular Weight: 287,3810

Starting from 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and ethynylcyclopropane (336 μ L, 3.97 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethanol). Fractions of interest were triturated in cyclohexane affording 2-*tert*-butylamino-6-(cyclopropylethynyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (66 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.53 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 1.68-1.59 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.98-0.91 (m, 2H), 0.83-0.77 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.9, 157.1, 152.3, 129.7, 128.0, 112.3, 102.0, 68.9, 51.0, 28.5 (3C), 8.8 (2C), 0.0. mp = 158-160 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₇N₃OS [M+H]⁺ 288.1165, found 288.1166.

2-*tert*-butylamino-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **86**



Chemical Formula: C₁₄H₁₇N₃O₂S

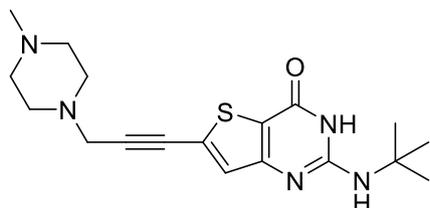
Exact Mass: 291,1041

Molecular Weight: 291,3690

Starting from 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and but-3-yn-1-ol (90 μ L, 1.19 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. Precipitate was filtered and isolated while the filtrate was purified *via* column chromatography over silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 97:3 dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown powder (137 mg, 47 %

yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.53 (bs, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.95 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H), 3.58 (q, $^3J = 6.4$ Hz, 2H), 2.63 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.9, 157.1, 152.3, 129.6, 128.0, 112.4, 97.2, 74.2, 59.2, 51.0, 28.5 (3C), 23.6. mp = 215-217 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 292.1114, found 292.1115.

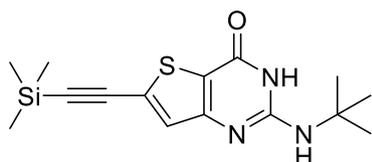
2-*tert*-butylamino-6-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)prop-1-yn-1-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **87**



Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{OS}$
Exact Mass: 359,1780
Molecular Weight: 359,4920

Starting from 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and 1-methyl-4-(prop-2-yn-1-yl)piperazine (0.36 g, 2.60 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)prop-1-yn-1-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an orange solid (135 mg, 35 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.58 (bs, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 3.57 (s, 2H), 2.34 (bs, 4H), 2.16 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 4H presumably situated below DMSO signal. ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.8, 157.1, 152.4, 128.7, 128.6, 112.7, 93.7, 77.9, 54.5, 51.2 (2C), 51.1 (2C), 46.8, 45.6, 28.5 (3C). mp = 109-111 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 360.1853, found 360.1853.

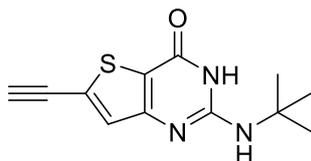
2-*tert*-butylamino-6-[(trimethylsilyl)ethynyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **88**



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{OSSi}$
Exact Mass: 319,1175
Molecular Weight: 319,4980

Starting from 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and ethynyltrimethylsilane (550 μL , 3.97 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[(trimethylsilyl)ethynyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (198 mg) which was used without further purification. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 1.39 (s, 9H), 0.25 (s, 9H).

2-*tert*-butylamino-6-ethynylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 89



Chemical Formula: C₁₂H₁₃N₃OS

Exact Mass: 247,0779

Molecular Weight: 247,3160

To a solution of 2-*tert*-butylamino-6-[(trimethylsilyl)ethynyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.183 g, 0.57 mmol) in a mixture of dichloromethane and

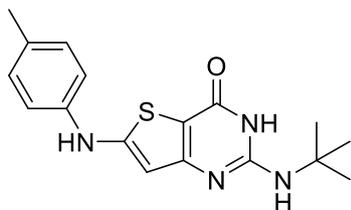
methanol (1:1 v:v, 0.2 M) was added potassium carbonate (0.396 g, 2.86 mmol) and reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature. The reaction mixture was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% dichloromethane to 97:3 dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-ethynylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a grey powder (150 mg, 92 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.60 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.6, 157.1, 152.4, 129.7, 127.7, 113.2, 88.5, 76.6, 51.1, 28.5 (3C). mp = 195-197 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₄N₃OS [M+H]⁺ 248.0852, found 248.0854.

6.9. Compounds obtained from Buchwald-Hartwig coupling

General procedure for Buchwald-Hartwig coupling on 6

6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 1 mmol), appropriate amine (5 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (36 mg, 4% mol), XPhos (38 mg, 8% mol) and sodium *tert*-butoxyde (0.286 g, 3 mmol) were put under nitrogen atmosphere and dried dioxane (0.01 M) was added. The obtained suspension was stirred at 100 °C up to 24 h (reaction progress followed by LC-MS). The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was dissolved in ethyl acetate (40 mL). The organic phase was washed with brine (2 x 40 mL) and the combined aqueous phases were extracted with ethyl acetate (2 x 80 mL). Combined organic phases were dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified with appropriate method.

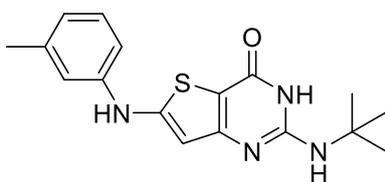
2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 90



Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₄OS
Exact Mass: 328,1358
Molecular Weight: 328,4340

Following the general procedure with 4-methylaniline (0.532 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown powder (173 mg, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.06 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 7.17-7.07 (m, 4H), 6.22 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 156.8, 155.4, 152.3, 139.4, 130.7, 129.8 (2C), 117.5 (2C), 101.5, 98.5, 50.8, 28.7 (3C), 20.3. mp = 204-206 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄OS [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1429.

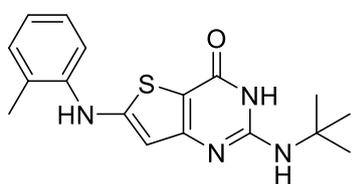
2-*tert*-butylamino-6-[(3-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 91



Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₄OS
Exact Mass: 328,1358
Molecular Weight: 328,4340

Following the general procedure with 3-methylaniline (0.532 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[(3-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (0.1 g, 31 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.09 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 7.04-6.99 (m, 2H), 6.78 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.98 (bs, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 156.9, 154.9, 152.3, 141.9, 138.8, 129.3, 122.4, 117.6, 114.3, 102.3, 98.9, 50.9, 28.7 (3C), 21.1. mp = 225-227 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄OS [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1428.

2-*tert*-butylamino-6-[(2-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 92

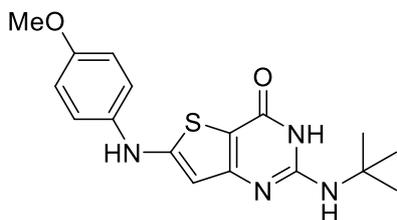


Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₄OS
Exact Mass: 328,1358
Molecular Weight: 328,4340

Following the general procedure with 2-methylaniline (0.532 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in cyclohexane affording 2-*tert*-butylamino-6-[(2-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown powder (50 mg, 15 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.02 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.36 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H), 7.27-7.17 (m, 2H), 7.04 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.37 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.8, 156.8, 152.2, 140.2, 131.1, 130.4, 126.8, 124.1, 121.4,

100.9, 98.6, 50.8, 28.7 (3C), 17.7. mp = 159-161 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄OS [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1429.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-methoxyphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 93

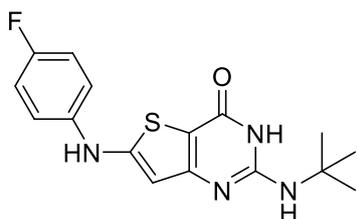


Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₄O₂S
Exact Mass: 344,1307
Molecular Weight: 344,4330

Following the general procedure with 4-methoxyaniline (0.611 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-methoxyphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as

a beige powder (49 mg, 14 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.02 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 6.96-6.90 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.6, 156.7, 156.7, 154.8, 152.3, 135.1, 120.1 (2C), 114.7 (2C), 100.2, 97.9, 55.3, 50.8, 28.7 (3C). mp = 205-207 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 345.1380, found 345.1381.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-fluorophenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 94

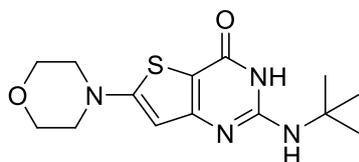


Chemical Formula: C₁₆H₁₇FN₄OS
Exact Mass: 332,1107
Molecular Weight: 332,3974

Following the general procedure with 4-fluoroaniline (0.470 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-fluorophenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a

beige powder (77 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.10 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 7.26-7.20 (m, 2H), 7.20-7.13 (m, 2H), 6.24 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 157.2 (d, ¹J = 238 Hz, 1C), 156.8, 155.3, 152.3, 138.4 (d, ⁴J = 2.8 Hz, 1C), 119.2 (d, ³J = 8.0 Hz, 2C), 116.0 (d, ²J = 22.5 Hz, 2C), 101.8, 98.8, 50.8, 28.7 (3C). mp = 195-197 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₈FN₄OS [M+H]⁺ 333.1180, found 333.1182.

2-*tert*-butylamino-6-(morpholin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 95

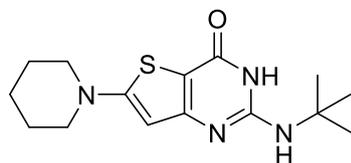


Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₄O₂S
Exact Mass: 308,1307
Molecular Weight: 308,4000

Following the general procedure with morpholine (0.434 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(morpholin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (106 mg,

35 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.04 (bs, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.75-3.68 (m, 4H), 3.25-3.17 (m, 4H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 163.6, 160.8, 156.8, 152.3, 99.5, 99.0, 65.3 (2C), 50.8, 49.1 (2C), 28.6 (3C). mp = 264-266 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 309.1380, found 309.1379.

2-*tert*-butylamino-6-(piperidin-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **96**



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{OS}$
Exact Mass: 306,1514
Molecular Weight: 306,4280

Following the general procedure with piperidine (0.490 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(piperidin-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a pale-yellow powder (45 mg, 15 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 9.95 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.28-3.20 (m, 4H), 1.65-1.51 (m, 6H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 163.7, 161.3, 156.8, 152.2, 98.5, 98.2, 50.8, 50.2 (2C), 28.7 (3C), 24.5 (2C), 23.2. mp = 171-173 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 307.1587, found 307.1590.

Chapitre 4 : Analogues de la thiéno[3,2-
d]pyrimidine obtenus par stratégie de
« *scaffold hopping* »

1. Généralités sur la stratégie de « *scaffold hopping* »

1.1.Principe et méthodes

Le terme de « *scaffold hopping* » apparaît pour la première fois dans la littérature en 1999,³³³ bien que la pratique en elle-même était déjà utilisée antérieurement. Le « *scaffold hopping* » est considéré comme une sous-catégorie du bioisostérisme.³³⁴

On parle de bioisostères quand deux groupements possédant des propriétés physiques et/ou chimiques similaires sont remplacés l'un par l'autre sur une même molécule. On espère la conservation de la plupart des propriétés biologiques hormis certaines que nous souhaitons améliorer. Un exemple de bioisostérisme est le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de deutérium, on parle alors de deutération. La tétrabénazine (Xenazine®), médicament neurologique utilisé dans le traitement de maladies neurologiques et notamment la chorée de Huntington, est un exemple concret de deutération réussie (**Figure 57**). Ce médicament nécessite une forte dose quotidienne pour être efficace, entraînant de nombreux effets secondaires (sommolence, fatigue, dépression etc...), à cause de son instabilité métabolique. Un analogue deutéré, la deutétrabénazine (Austedo®), a été développé. Les essais cliniques ont permis de montrer une posologie requise plus faible, grâce à une stabilité métabolique améliorée, par rapport à la tétrabénazine.³³⁵ Cette posologie réduite permet de diminuer les effets secondaires associés à la molécule. La deutétrabénazine est le premier médicament deutéré à avoir été approuvé par la FDA.³³⁶

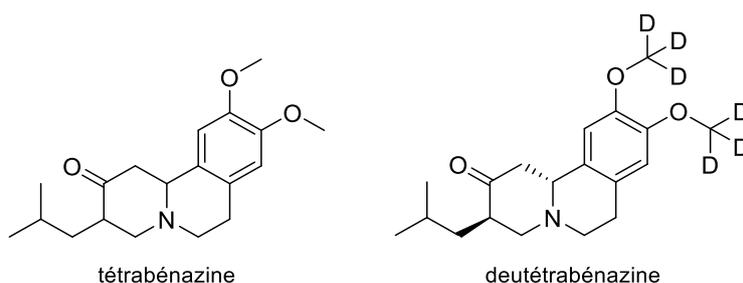


Figure 57. Exemple de deutération avec celui de la tétrabénazine en deutétrabénazine.

³³³ Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2894–2896, doi:[10/b2gvhj](https://doi.org/10.1002/anie.199910000).

³³⁴ *Scaffold Hopping in Medicinal Chemistry*; Brown, N., Ed.; Methods and Principles in Medicinal Chemistry; 1st ed.; Wiley, 2013; ISBN 978-3-527-33364-6.

³³⁵ Anderson, K.E.; Stamler, D.; Davis, M.D.; Factor, S.A.; Hauser, R.A.; Isojärvi, J.; Jarskog, L.F.; Jimenez-Shahed, J.; Kumar, R.; McEvoy, J.P.; Ochudlo, S.; Ondo, W.G.; Fernandez, H.H. Deutetrabenazine for Treatment of Involuntary Movements in Patients with Tardive Dyskinesia (AIM-TD): A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Psychiat.* **2017**, *4*, 595–604, doi:[10/gbqh9d](https://doi.org/10.1016/S2053-2504(17)30090-9).

³³⁶ Schmidt, C. First Deuterated Drug Approved. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 493–494, doi:[10/gm84qg](https://doi.org/10.1038/nbt.3944).

Le « *scaffold hopping* » se concentre sur l'identification et la modulation des motifs structuraux centraux au sein des composés afin, comme pour le bioisostérisme, de modifier un ou plusieurs paramètres biologiques sans trop modifier les autres.³³⁴ On peut diviser le *scaffold hopping* en deux catégories :³³⁷

- « *Scaffold hopping* » par remplacement de noyau (**Schéma 48**) : les éléments centraux de la molécule sont remplacés par des éléments permettant de conserver la géométrie initiale de la molécule ou bien par suppression d'une liaison covalente, entraînant l'ouverture du cycle ;

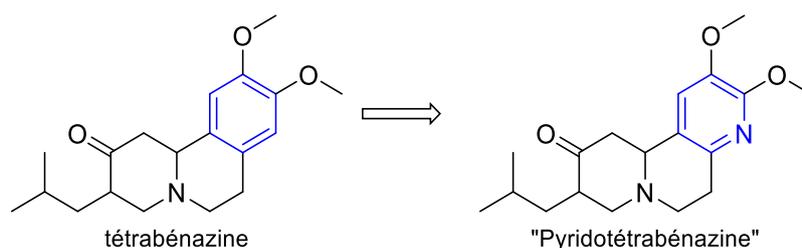


Schéma 48. Exemple de remplacement de noyau du cycle phényle par une pyridine sur la tétrabénazine.

- « *Scaffold hopping* » par screening virtuel (**Schéma 49**) : à l'aide de méthodes *in silico*, la molécule est décomposée sous forme de descripteurs 2D (ex : système CATS) ou 3D (pharmacophore), puis ces descripteurs sont utilisés à cribler des bases de données pour chercher des molécules correspondantes ou générer des composés pouvant correspondre.

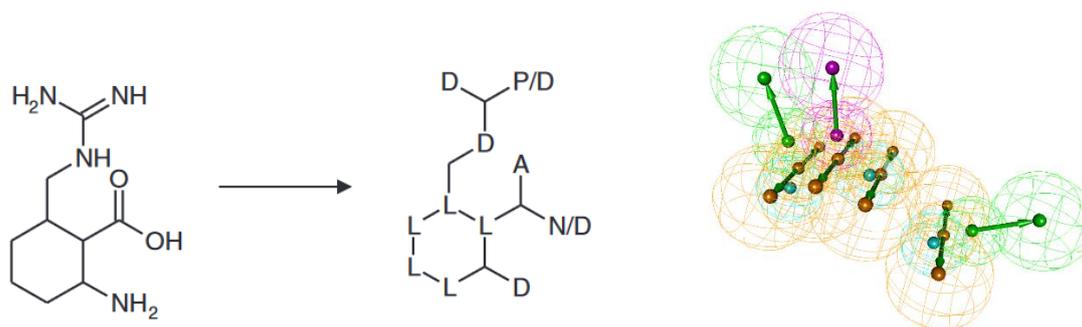


Schéma 49. A gauche, molécule transposée sous forme de structure CATS (L = lipophile, D = donneur de liaison hydrogène, A = accepteur de liaison hydrogène, P = positivement ionisable, N = négativement ionisable). A droite, exemple de pharmacophore représentant en 3D les éléments clés structuraux d'une (série de) molécule(s).

³³⁷ Hessler, G.; Baringhaus, K.-H. The Scaffold Hopping Potential of Pharmacophores. *Drug Discovery Today: Technologies* **2010**, 7, e263–e269, doi:[10/c432rs](https://doi.org/10/c432rs).

1.2. Approche retenue pour la synthèse d'analogues de M1

Pour le composé M1, l'absence de cible connue limite l'utilisation du screening virtuel puisque les interactions clés entre la molécule et la protéine cible ne sont pas connues. Seule l'approche par modification de noyau reste, de ce fait, envisageable. Sur le composé M1, le noyau principal est le cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Un premier essai de « *scaffold hopping* » avait déjà été initié durant les travaux aboutissant au M1 avec la série quinazolin-4(3*H*)-one qui s'était montrée délétère à la fois pour l'activité et la cytotoxicité (**Tableau 18**).²⁶¹ Nous avons décidé de continuer à remplacer la partie thiophénique du cycle thiénoypyrimidine en nous focalisant sur les hétérocycles aromatiques à 5 chaînons. Une double contrainte nous était imposée avec l'emplacement des hétéroatomes pour permettre la formation du cycle pyrimidinone et la possibilité de mettre une chaîne latérale sur la position 5. Sept hétérocycles correspondent à ces critères (**Figure 58**) et la position des hétéroatomes pouvant varier selon l'orientation du cycle, cela nous conduit à 12 possibilités (en plus de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidine).

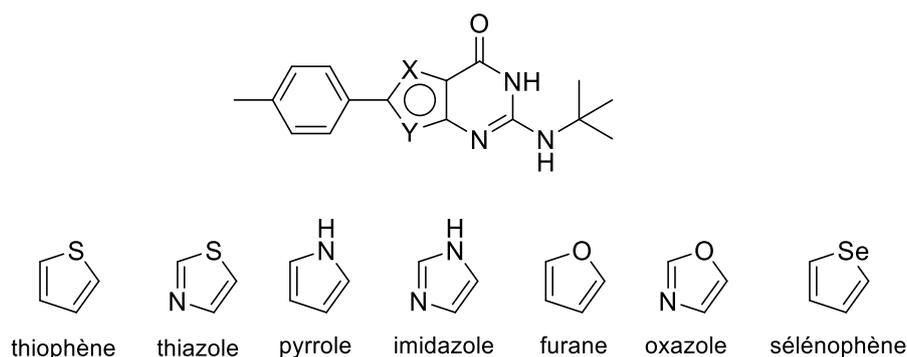


Figure 58. Cycles aromatiques à 5 chaînons répondant aux critères requis pour notre approche de « *scaffold hopping* » du composé M1.

La synthèse de ces analogues est envisageable s'il est possible d'accéder à un aminoester de l'hétérocycle voulu, intermédiaire clé pour la formation du cycle pyrimidinone (**Schéma 50**).

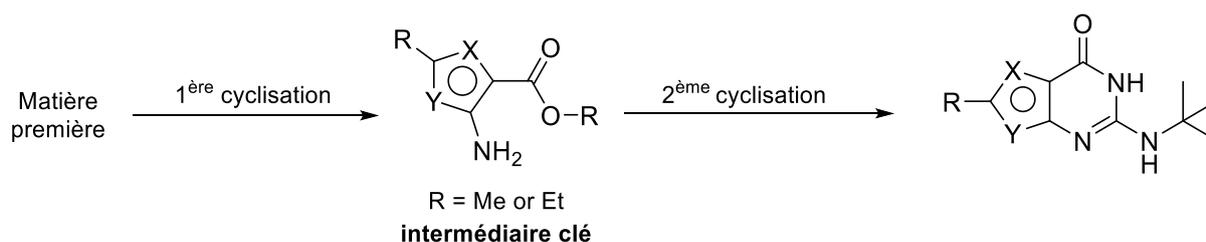


Schéma 50. Stratégie de synthèse des analogues du composé M1.

Les séries présentées dans la **Figure 59** ont donc été sélectionnées en analysant l'accès synthétique précédemment évoqué et l'apport de nouvelles données de relation structure-activité :

- thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one : connaître l'importance ou non de la position de l'atome de soufre ;
- thiazolopyrimidin-7(6*H*)-one : connaître l'impact de l'introduction de l'atome d'azote dans le cycle ;
- furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one : connaître l'impact du remplacement de l'atome de soufre par un autre atome de la famille des chalcogènes.

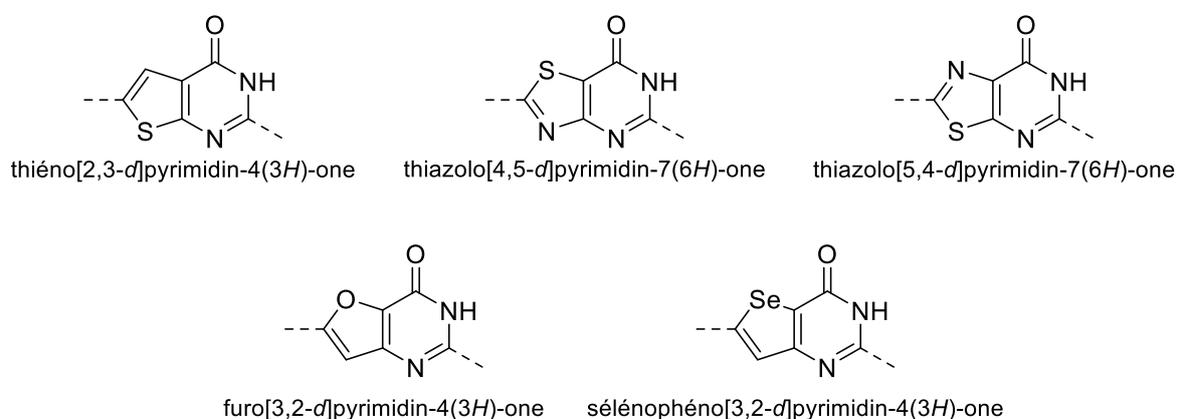


Figure 59. Séries retenues pour la synthèse d'analogue du composé M1.

2. Série thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

2.1. Le cycle thieno[2,3-*d*]pyrimidine dans la littérature

Parmi les composés comportant un cycle thiéno[2,3-*d*]pyrimidine, le relugolix (Orgovyx[®] et Relumina[®]) est le seul principe actif à l'heure actuelle sur le marché le possédant (**Figure 60**). Ce médicament développé par le laboratoire Takeda,³³⁸ comportant un cycle thiéno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione, est un antagoniste non peptidique du récepteur de l'hormone de libération des gonadotrophines. Il est indiqué dans le traitement du cancer de la prostate ou du fibrome utérin.

³³⁸ Miwa, K.; Hitaka, T.; Imada, T.; Sasaki, S.; Yoshimatsu, M.; Kusaka, M.; Tanaka, A.; Nakata, D.; Furuya, S.; Endo, S.; Hamamura, K.; Kitazaki, T. Discovery of 1-{4-[1-(2,6-Difluorobenzyl)-5-[(Dimethylamino)Methyl]-3-(6-Methoxypyridazin-3-yl)-2,4-Dioxo-1,2,3,4-Tetrahydrothieno[2,3-*d*]Pyrimidin-6-yl]Phenyl}-3-Methoxyurea (TAK-385) as a Potent, Orally Active, Non-Peptide Antagonist of the Human Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4998–5012, doi:[10/bnrwnp](https://doi.org/10/bnrwnp).

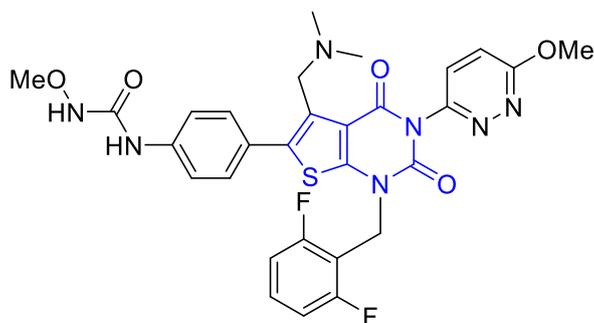


Figure 60. Structure chimique du regulolix.

Pour les composés ayant atteint le stade des essais cliniques, on retrouve (**Figure 61**) :

- Firsocostat :³³⁹ dérivé thiéno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione, inhibiteur de l'acétyl-CoA carboxylase, en phase II des essais cliniques contre la stéatose hépatique non alcoolique ;
- PRX-08066 :³⁴⁰ cet antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} a atteint le stade des essais cliniques de phase II contre la bronchopneumopathie chronique obstructive et l'hypertension pulmonaire ;
- DDP-225 :³⁴¹ à la fois inhibiteur des récepteurs 5-HT₃ et inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, ce composé a atteint la phase II des essais cliniques contre le syndrome du côlon irrité.

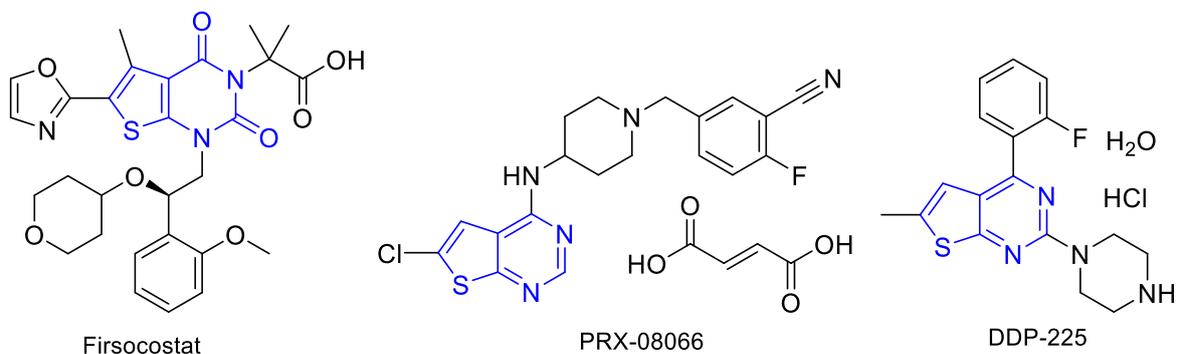


Figure 61. Structures chimiques de thiéno[2,3-*d*]pyrimidines ayant atteint le stade des essais cliniques.

³³⁹ Harriman, G.; Greenwood, J.; Bhat, S.; Huang, X.; Wang, R.; Paul, D.; Tong, L.; Saha, A.K.; Westlin, W.F.; Kapeller, R.; Harwood, H.J. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition by ND-630 Reduces Hepatic Steatosis, Improves Insulin Sensitivity, and Modulates Dyslipidemia in Rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1796–E1805, doi:[10/f8f3pn](https://doi.org/10/f8f3pn).

³⁴⁰ Porvasnik, S.L.; Germain, S.; Embury, J.; Gannon, K.S.; Jacques, V.; Murray, J.; Byrne, B.J.; Shacham, S.; Al-Mousily, F. PRX-08066, a Novel 5-Hydroxytryptamine Receptor 2B Antagonist, Reduces Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 364–372, doi:[10/fchd8q](https://doi.org/10/fchd8q).

³⁴¹ Drugbank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB05642> (consulté le 14/11/2021).

De manière plus globale, ce cycle thiéno[2,3-*d*]pyrimidine est retrouvé dans des composés avec des activités biologiques variées :³⁴² anticancéreux (majoritairement inhibiteurs de kinases mais aussi inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline et agents antiprolifératifs), anti-inflammatoires, antibiotiques, antiviraux, etc...

2.2.Synthèse des dérivés thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

2.2.1. Test de la réaction de cyclisation

Avant de lancer la synthèse de plusieurs dérivés en série thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, la réaction de cyclisation pour former le cycle pyrimidinone a été testée sur le 2-amino-5-phénylthiophène-3-carboxylate de méthyle, disponible commercialement. Celui-ci, dans les conditions de cyclisation déjà décrites, a permis d'obtenir la thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **97** avec un rendement de 44 % (**Schéma 51**).

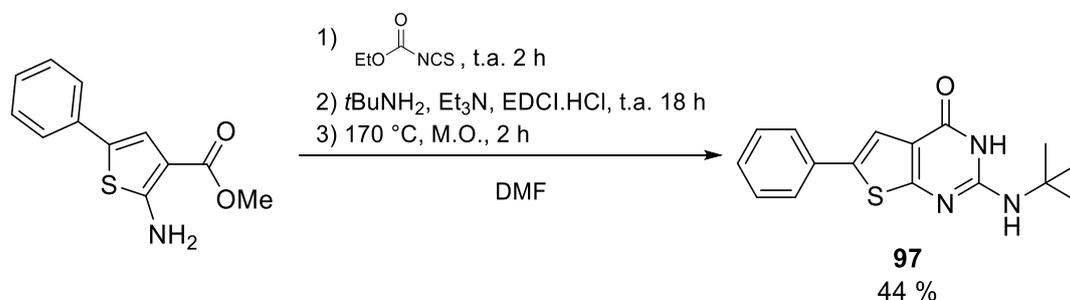


Schéma 51. Synthèse du composé **97**.

2.2.2. Voie de synthèse des 2-amino-thiophène-3-carboxylate d'alkyle fonctionnalisé en position 5

La synthèse des 2-aminothiophène-3-carboxylates d'alkyle est une synthèse connue depuis plusieurs décennies grâce à la réaction de Gewald, du nom de Karl Gewald, chimiste à l'origine de la réaction en 1966.³⁴³ Il s'agit une condensation entre une cétone (ou aldéhyde) et un α -cyanoester en présence de soufre (**Schéma 52**).

³⁴² Ali, E.M.H.; Abdel-Maksoud, M.S.; Oh, C.-H. Thieno[2,3-*d*]Pyrimidine as a Promising Scaffold in Medicinal Chemistry: Recent Advances. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1159–1194, doi:[10/gm97td](https://doi.org/10/gm97td).

³⁴³ Gewald, K.; Schinke, E.; Böttcher, H. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VIII. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven Nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 94–100, doi:[10/ccwj26](https://doi.org/10/ccwj26).

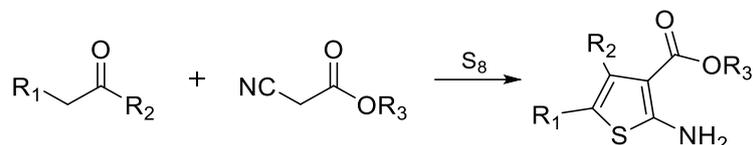


Schéma 52. Réaction de Gewald.

Afin d'obtenir les thiophènes correctement substitués en position 5, il est nécessaire de partir de phénylacétaldéhydes. Hormis les dérivés simples comme le phénylacétaldéhyde ou le 4-méthylphénylacétaldéhyde, ces dérivés sont disponibles commercialement à des tarifs élevés. Il est donc plus avantageux de les synthétiser, par oxydation de 2-aryléthanol. Toutes ces considérations nous permettent d'établir la rétrosynthèse présentée dans le **Schéma 53**.

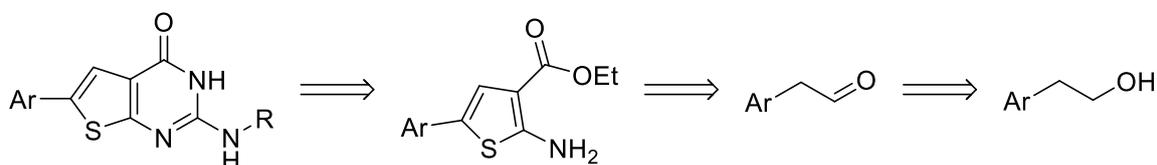


Schéma 53. Schéma rétrosynthétique de la série thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

2.2.3. Oxydation des 2-aryléthanol

L'oxydation a initialement été réalisée en utilisant l'acide *ortho*iodoxybenzoïque (appelé aussi IBX) comme réactif oxydant.³⁴⁴ Ce réactif a permis la formation de l'aldéhyde souhaité **98**, dans l'acétonitrile à 80 °C pendant 2 heures (**Schéma 54**). Mais l'IBX employé, d'origine commerciale, est mélangé à des stabilisants ce qui rend la quantité de réactifs à introduire très importante : plus de 16 g d'IBX (à 30 %) pour une oxydation de 0,8 g de 2-(4-tolyl)-éthanol. Ainsi, la purification du brut réactionnel a été compliquée et le produit réactionnel n'a pas pu être isolé de manière satisfaisante.

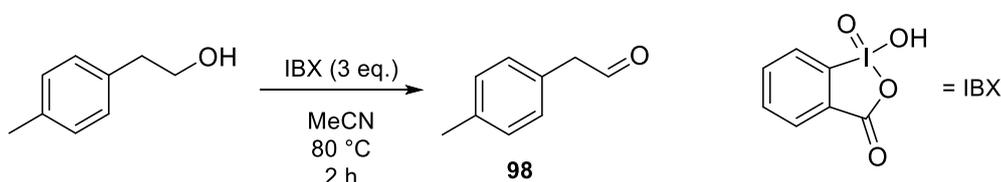


Schéma 54. Synthèse du composé **98** en utilisant l'IBX.

³⁴⁴ Lin, C.-K.; Lu, T.-J. A Simple Method for the Oxidation of Primary Alcohols with O-Iodoxybenzoic Acid (IBX) in the Presence of Acetic Acid. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9688–9693, doi:[10/dkp62m](https://doi.org/10/dkp62m).

Plutôt que de passer par une étape de synthèse de l'IBX afin de l'avoir sans stabilisant, le choix a été fait de se reporter sur un autre réactif oxydant : le periodinane de Dess-Martin (DMP),³⁴⁵ qui a l'avantage d'être disponible commercialement sans contenir de stabilisant. Un protocole a été établi et a permis de synthétiser trois phénylacétaldéhydes avec des rendements supérieurs à 75 %, dans le dichlorométhane après 2 heures de réaction (**Schéma 55**).

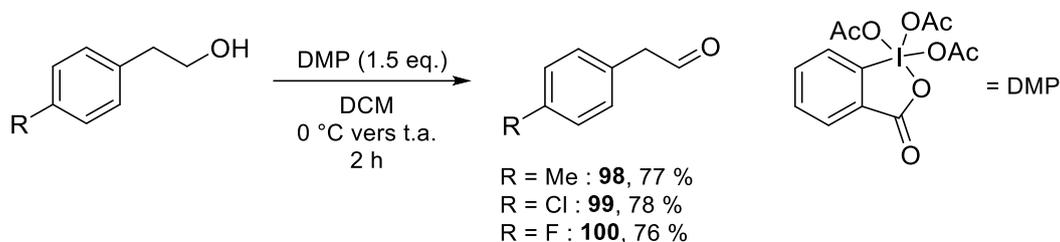


Schéma 55. Synthèse des composés **98** à **100** utilisant le DMP.

2.2.4. Synthèse des 2-amino-thiophène-3-carboxylates d'éthyle fonctionnalisés en position 5

Les aminoesters du thiophène ont pu alors être synthétisés à partir des phénylacétaldéhydes en utilisant la réaction de Gewald. Des conditions rapides, retrouvées dans la littérature,³⁴⁶ ont été employées : le 2-cyanoacétate d'éthyle et le phénylacétaldéhyde correctement substitué réagissent, sous chauffage micro-ondes à 70 °C, en présence de soufre et de morpholine dans l'éthanol. Trois composés (**101** à **103**) ont été obtenus avec des rendements allant de 29 à 66 % (**Schéma 56**).

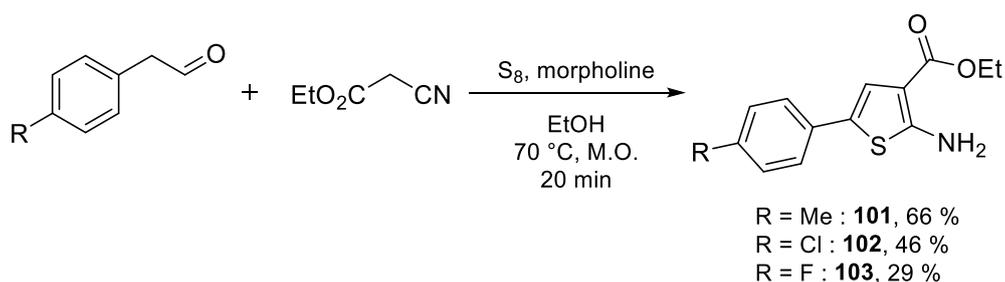


Schéma 56. Réaction de Gewald aboutissant aux composés **101** à **103**.

³⁴⁵ Dess, D.B.; Martin, J.C. A Useful 12-I-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277–7287, doi:[10/dcj17v](https://doi.org/10.1021/cj0171a007).

³⁴⁶ Revelant, G.; Dunand, S.; Hesse, S.; Kirsch, G. Microwave-Assisted Synthesis of 5-Substituted 2-Aminothiophenes Starting from Arylacetaldehydes. *Synthesis* **2011**, *2011*, 2935–2940, doi:[10/bgz2q3](https://doi.org/10.1055/s-0002940).

Contrairement aux phénylacétaldéhydes, le substituent en position *para* du phényl agit sur le rendement de la réaction de Gewald : on observe une baisse de celui-ci avec l'introduction d'un substituent fortement électronégatif comme un atome de fluor dans le cas du composé **103** (rdt = 29 %).

2.2.5. Synthèse des thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Les aminoesters du thiophène **101** à **103** ont ensuite été engagés pour former le cycle 2-aminopyrimidin-4(3*H*)-one. Ainsi, 3 dérivés thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, en plus de **97**, ont pu être synthétisés (**Schéma 57**).

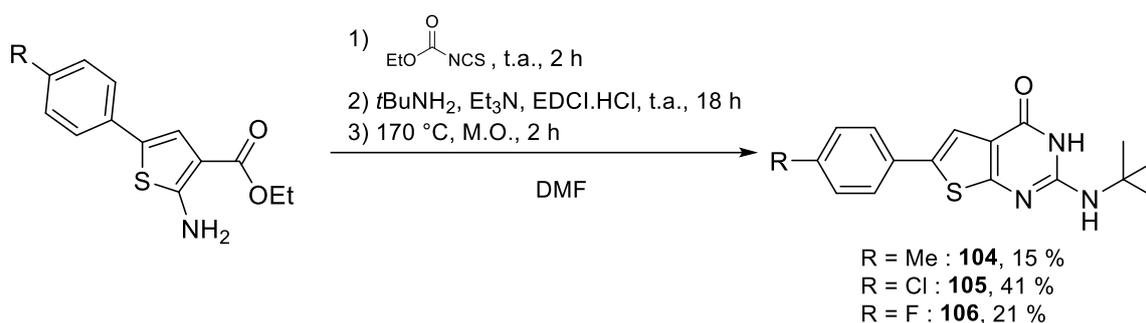
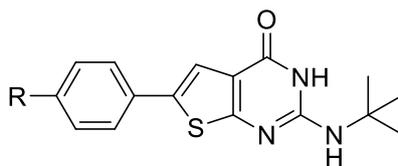


Schéma 57. Synthèse des composés **104** à **106**.

Ces rendements ainsi, que celui de la réaction amenant au composé **97** (**Schéma 51**, rendement de 44%), montrent que la position 7 de l'atome de soufre à diminuer le rendement des cyclisations par rapport à la série initiale. Le faible rendement du composé **104** est du au fait que la réaction a été lancée à partir d'une matière première brut.

2.2.6. Résultat du criblage primaire

Les 4 composés de cette série ont été testés pour déterminer leur activité biologique et leur cytotoxicité. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 34**.

Tableau 34. Données biologiques de la série thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

N°	R	CE ₅₀ <i>PfK1</i> (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
97	H	33,8 ± 3,7	> 12,5	0,4
104	Me	32,4 ± 5,2	20,5 ± 2,1	0,6
105	Cl	> 50	21,4 ± 1,8	< 0,4
106	F	> 12,5	> 25	-
M1		0,045	24	533
Chloroquine		0,5	30	60
Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
Doxorubicine		-	0,2	-

Ces résultats montrent clairement la perte de l'activité antiplasmodiale dès lors que l'atome de soufre se situe en position 7 du cycle thiénoypyrimidine. Cependant, cette perte d'activité ne s'associe pas à une hausse de la cytotoxicité. Sur la base de ces résultats, le développement de la série thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one n'a pas été poursuivi.

3. Série thiazolopyrimidin-7(6*H*)-one

La série thiazolopyrimidin-7(6*H*)-one rassemble les thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones et les thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones (**Figure 59**).

3.1. Le cycle thiazolopyrimidine dans la littérature

Parmi ces deux cycles, seul le cycle thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one est présent sur des composés ayant atteint le stade des essais cliniques de phase I, avec 3 dérivés indiqués dans le traitement de l'hépatite C (**Figure 62**) :

- Isatoribine :^{347, 348} inhibiteur des récepteurs de type Toll 7 ;
- RG-7795 :³⁴⁹ prodrogue, elle-aussi inhibiteur des récepteurs de type Toll 7 ;
- JTK-853 :³⁵⁰ inhibiteur non nucléosidique de l'ARN polymérase et dont le développement, contrairement aux deux molécules précédentes, est toujours en cours.³⁵¹

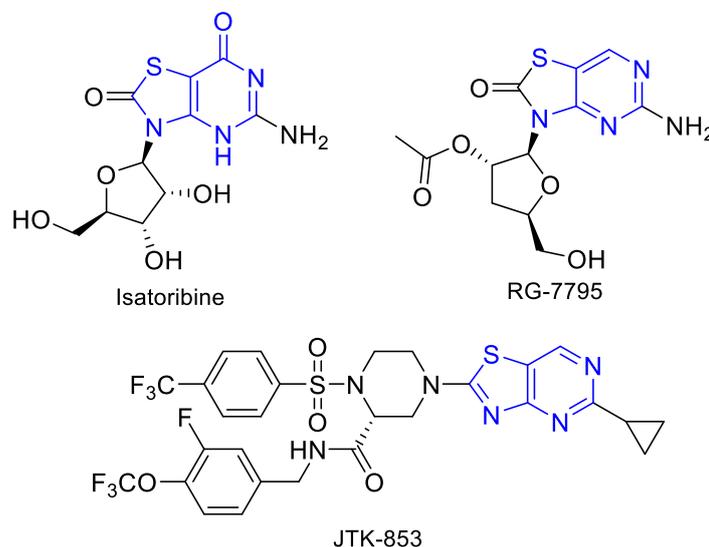


Figure 62. Thiazolo[4,5-*d*]pyrimidines ayant atteint le stade des essais cliniques.

Plus récemment, des composés comportant des thiazolo[4,5-*d*]pyrimidines ont été décrits comme anticancéreux : inhibiteurs de PAK4 ou CDK1.^{352, 353}

³⁴⁷ Parandoosh, Z.; Ojo-Amaize, E.; Robins, R.K.; Jolley, W.B.; Rubalcava, B. Stimulation of Phosphoinositide Signaling Pathway in Murine B Lymphocytes by a Novel Guanosine Analog, 7-Thia-8-Oxoguanosine. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1989**, *163*, 1306–1311, doi:[10/d6bp45](https://doi.org/10/d6bp45).

³⁴⁸ Horsmans, Y.; Berg, T.; Desager, J.-P.; Mueller, T.; Schott, E.; Fletcher, S.P.; Steffy, K.R.; Bauman, L.A.; Kerr, B.M.; Averett, D.R. Isatoribine, an Agonist of TLR7, Reduces Plasma Virus Concentration in Chronic Hepatitis C Infection. *Hepatology* **2005**, *42*, 724–731, doi:[10/bpsfqg](https://doi.org/10/bpsfqg).

³⁴⁹ Boonstra, A.; Liu, B.-S.; Groothuisink, Z.M.; Bergmann, J.F.; de Bruijne, J.; Hotho, D.M.; Hansen, B.E.; van Vliet, A.A.; van de Wetering de Rooij, J.; Fletcher, S.P.; Bauman, L.A.; Rahimy, M.; Appleman, J.R.; Freddo, J.L.; Reesink, H.W.; de Knegt, R.J.; Janssen, H.L. Potent Immune Activation in Chronic Hepatitis C Patients upon Administration of an Oral Inducer of Endogenous Interferons That Acts via Toll-like Receptor 7. *Antivir. Ther.* **2011**, *17*, 657–667, doi:[10/fj5jdr](https://doi.org/10/fj5jdr).

³⁵⁰ Ando, I.; Adachi, T.; Ogura, N.; Toyonaga, Y.; Sugimoto, K.; Abe, H.; Kamada, M.; Noguchi, T. Preclinical Characterization of JTK-853, a Novel Nonnucleoside Inhibitor of the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4250–4256, doi:[10/f343bw](https://doi.org/10/f343bw).

³⁵¹ Tamaki, S.; Shibata, T.; Hunt, T.; Gerhardt, B.; Yamada, H.; Pai, S.M. Pharmacokinetics, Food Effect, Ketoconazole Interaction, and Safety of JTK-853, a Novel Nonnucleoside HCV Polymerase Inhibitor, After Ascending Single and Multiple Doses in Healthy Subjects. *Clin. Pharm. Drug Dev.* **2019**, *8*, 371–384, doi:[10/gnbhp2](https://doi.org/10/gnbhp2).

³⁵² Li, R.; Wang, H.; Wang, J.; Cheng, M. PB-10, a Thiazolo[4,5-*d*] Pyrimidine Derivative, Targets P21-Activated Kinase 4 in Human Colorectal Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 126807, doi:[10/gnbhqn](https://doi.org/10/gnbhqn).

³⁵³ Mohamed, S.H.; Elgiushy, H.R.; Taha, H.; Hammad, S.F.; Abou-Taleb, N.A.; A. M. Abouzid, K.; Al-Sawaf, H.; Hassan, Z. An Investigative Study of Antitumor Properties of a Novel Thiazolo[4,5-*d*]Pyrimidine Small Molecule Revealing Superior Antitumor Activity with CDK1 Selectivity and Potent pro-Apoptotic Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115633, doi:[10/gnbhqt](https://doi.org/10/gnbhqt).

Du côté des thiazolo[5,4-*d*]pyrimidines, dans la littérature récente, on retrouve des composés inhibiteurs de mTOR mais dans l'optique d'un traitement pour des affections du système nerveux central,³⁵⁴ des inhibiteurs de PI3K à visée anticancéreuse³⁵⁵ et des composés ciblant les récepteurs à l'adénosine à visée antidépressive (**Figure 63**).³⁵⁶

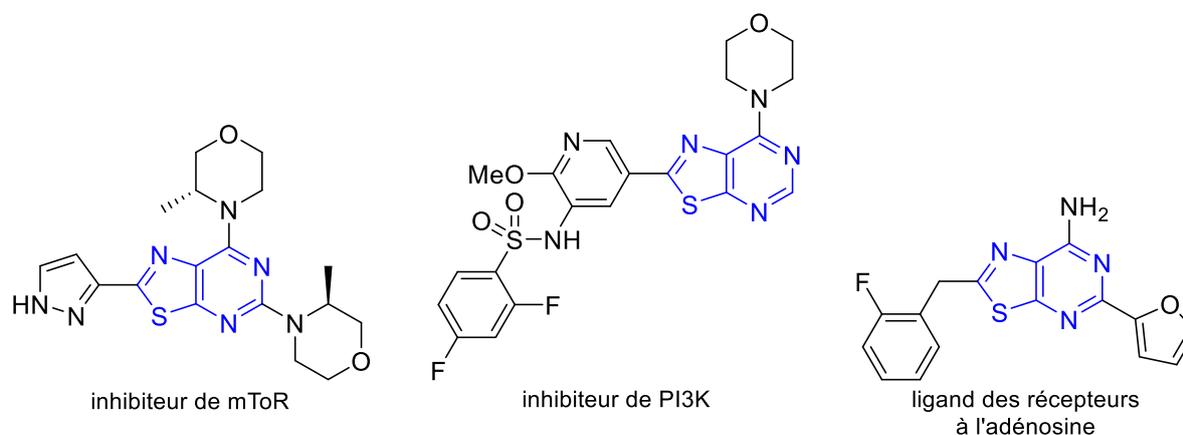


Figure 63. Thiazolo[5,4-*d*]pyrimidines décrites récemment dans la littérature.

3.2.Série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one

3.2.1. Voie de synthèse

Pour cette série, il est possible d'obtenir les composés souhaités en deux étapes à partir du 4-amino-2-(méthylsulfanyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate de méthyle, disponible commercialement (**Schéma 58**).

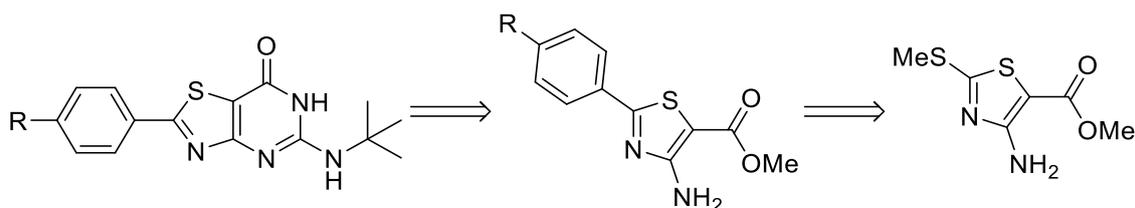


Schéma 58. Schéma rétrosynthétique de la série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one.

³⁵⁴ Bonazzi, S.; Goold, C.P.; Gray, A.; Thomsen, N.M.; Nunez, J.; Karki, R.G.; Gorde, A.; Biag, J.D.; Malik, H.A.; Sun, Y.; Liang, G.; Lubicka, D.; Salas, S.; Labbe-Giguere, N.; Keaney, E.P.; McTighe, S.; Liu, S.; Deng, L.; Piizzi, G.; Lombardo, F.; Burdette, D.; Dodart, J.-C.; Wilson, C.J.; Peukert, S.; Curtis, D.; Hamann, L.G.; Murphy, L.O. Discovery of a Brain-Penetrant ATP-Competitive Inhibitor of the Mechanistic Target of Rapamycin (MTOR) for CNS Disorders. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1068–1083, doi:[10/gnbhrx](https://doi.org/10/gnbhrx).

³⁵⁵ Sun, Y.; Fu, R.; Lin, S.; Zhang, J.; Ji, M.; Zhang, Y.; Wu, D.; Zhang, K.; Tian, H.; Zhang, M.; Sheng, L.; Li, Y.; Jin, J.; Chen, X.; Xu, H. Discovery of New Thieno[2,3-*d*]Pyrimidine and Thiazolo[5,4-*d*]Pyrimidine Derivatives as Orally Active Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *29*, 115890, doi:[10/gnbhr3](https://doi.org/10/gnbhr3).

³⁵⁶ Varano, F.; Catarzi, D.; Vigiani, E.; Dal Ben, D.; Buccioni, M.; Marucci, G.; Di Cesare Mannelli, L.; Lucarini, E.; Ghelardini, C.; Volpini, R.; Colotta, V. Design and Synthesis of Novel Thiazolo[5,4-*d*]Pyrimidine Derivatives with High Affinity for Both the Adenosine A1 and A2A Receptors, and Efficacy in Animal Models of Depression. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 657, doi:[10/gnbhsp](https://doi.org/10/gnbhsp).

La première étape, permettant la fonctionnalisation du thiazole, est réalisée à l'aide d'un couplage de Liebeskind-Srogl, réaction de couplage pallado-catalysé décrite en 2000 (**Schéma 59**).³⁵⁷ Il a lieu entre un dérivé sulfuré et un acide boronique, mais d'autres composés comme des stannanes ou des alcynes peuvent être utilisés.³⁵⁸ Ce couplage utilise aussi un dérivé du cuivre afin de chélater le soufre et ainsi l'empêcher « d'empoisonner » le catalyseur au palladium, ce qui le rendrait inactif.

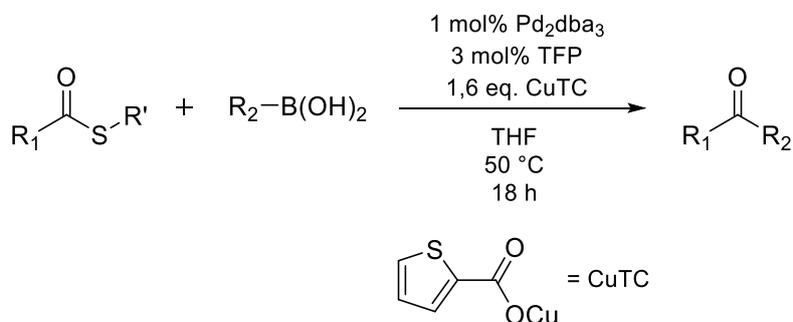


Schéma 59. Exemple de couplage de Liebeskind-Srogl. TFP : tris-2-furylphosphine

D'un point de vue mécanistique, ce couplage est similaire aux précédemment décrits avec comme seule différence, la chélation de l'atome de soufre par le cuivre (**Schéma 60**). Le catalyseur au palladium s'insère ensuite entre l'atome de soufre et le carbone (insertion oxydante). Les étapes de transmétallation et d'élimination réductrice interviennent ensuite.

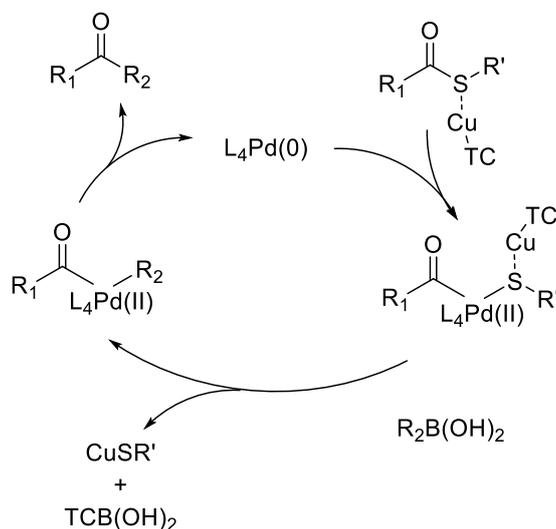


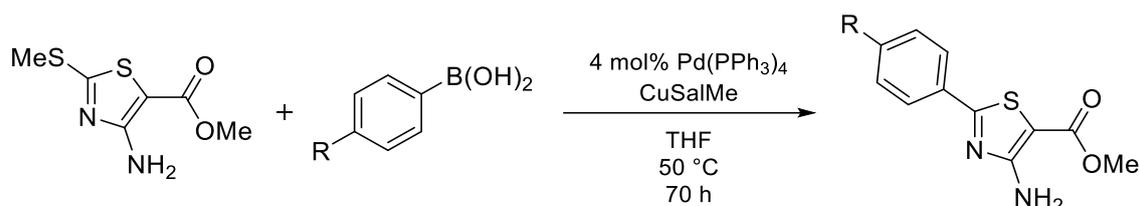
Schéma 60. Cycle catalytique du couplage de Liebeskind-Srogl.

³⁵⁷ Liebeskind, L.S.; Srogl, J. Thiol Ester–Boronic Acid Coupling. A Mechanistically Unprecedented and General Ketone Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11260–11261, doi:[10/d2xmz3](https://doi.org/10.1021/d2xmz3).

³⁵⁸ Cheng, H.-G.; Chen, H.; Liu, Y.; Zhou, Q. The Liebeskind-Srogl Cross-Coupling Reaction and Its Synthetic Applications. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 490–508, doi:[10/gdc6gw](https://doi.org/10/gdc6gw).

Des conditions décrites dans la littérature ont été identifiées afin de nous permettre de synthétiser les aminoesters du thiazole correctement substitués en position 2.³⁵⁹ En partant du 4-amino-2-(méthylsulfanyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate de méthyle commercial et de divers acides phénylboroniques, en présence de méthylsalicylate de cuivre et de tétrakis(triphénylphosphine)palladium, 4 thiazoles différents (**107** à **110**) ont été obtenus (**Tableau 35**).

Tableau 35. Couplage de Liebeskind-Srogl aboutissant aux composés **107** à **110**.

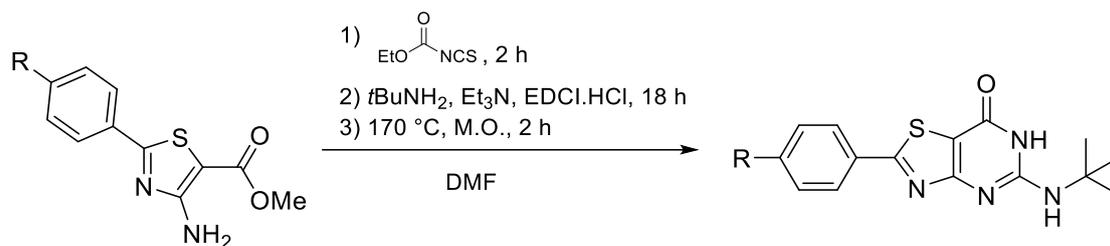


N°	R	Rdt (%)
107	H	75
108	Me	60
109	Cl	56
110	F	66

Les rendements réactionnels sont bons et les purifications ont été simples par chromatographie flash (avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle). Cette méthode de synthèse apparaît être adaptée pour la synthèse d'une série de composés plus large. Les 4 thiazoles obtenus ont ensuite été engagés dans la réaction de cyclisation pour former le cycle pyrimidinone et obtenir 4 dérivés en série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one avec des rendements compris entre 28 et 48 % (**Tableau 36**).

³⁵⁹ McCoull, W.; Barton, P.; Broo, A.; Brown, A.J.H.; Clarke, D.S.; Coope, G.; Davies, R.D.M.; Dossetter, A.G.; Kelly, E.E.; Knerr, L.; MacFaul, P.; Holmes, J.L.; Martin, N.; Moore, J.E.; Morgan, D.; Newton, C.; Österlund, K.; Robb, G.R.; Rosevere, E.; Selmi, N.; Stokes, S.; Svensson, T.S.; Ullah, V.B.K.; Williams, E.J. Identification of Pyrazolo-Pyrimidinones as GHS-R1a Antagonists and Inverse Agonists for the Treatment of Obesity. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 456, doi:[10/gmjht](https://doi.org/10.1039/c3md00011a).

Tableau 36. Synthèse des thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones **111** à **114**.

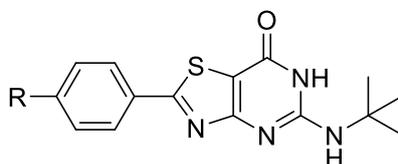


N°	R	Rdt (%)
111	H	35
112	Me	48
113	Cl	46
114	F	28

3.2.2. Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 37** résume les données biologiques des composés **111** à **114**.

Tableau 37. Résultats biologiques de la série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one.



N°	R	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
111	H	> 12,5	> 25	-
112	Me	4,6 ± 1,6	> 5	> 1,1
113	Cl		Non soluble	
114	F		Non soluble	
M1		0,045	24	533
Chloroquine		0,5	30	60
Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
Doxorubicine		-	0,2	-

Le passage en série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one est associé à une perte d'activité antiplasmodiale ainsi qu'à une baisse de la solubilité dans les milieux de test allant jusqu'à empêcher la réalisation des tests biologiques. De ce fait, bien que la synthèse de la série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one soit simple, le développement de celle-ci ne fut pas poursuivi au-delà de ces 4 composés.

3.3.Série thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one

La synthèse de thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one est, elle, plus compliquée. Dans un premier temps, il faut synthétiser l'ainoester du thiazole. Cette synthèse est réalisable en 3 étapes à partir du (2-*Z*)-cyano(hydroxyimino)éthanoate d'éthyle commercial (**Schéma 61**).

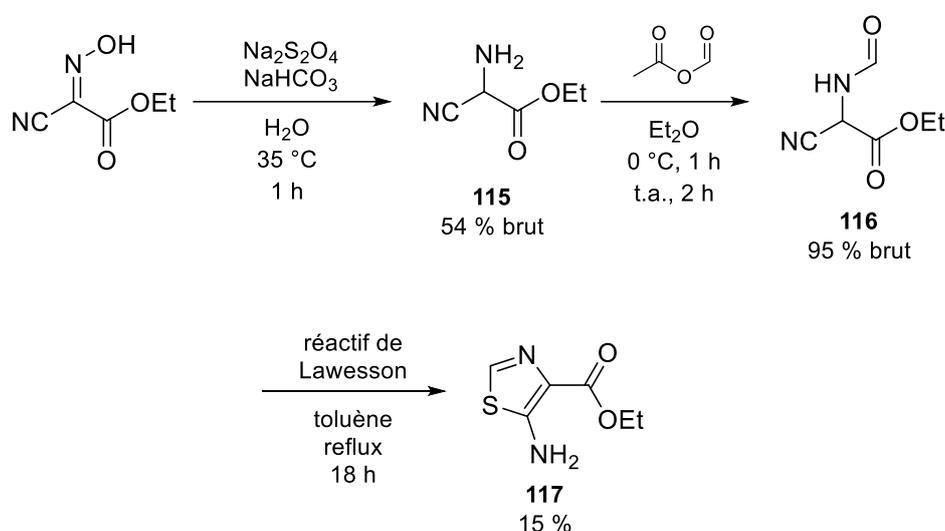


Schéma 61. Voie de synthèse aboutissant au thiazole **117**.

La fonction cétoxime du (2-*Z*)-cyano(hydroxyimino)éthanoate d'éthyle est réduite en amine **115** à l'aide d'un mélange de thiosulfate de sodium et de carbonate de sodium. Il a été difficile de reproduire les rendements décrits dans la littérature pour cette réaction.³⁶⁰ De plus, **115** se dégrade rapidement à l'air libre et ne doit donc pas être purifié, sous peine d'une importante baisse de rendement. Il doit être engagé rapidement dans la réaction de formylation de la fonction amine, réalisée à l'aide d'anhydride formique acétique (préparé à partir d'anhydride acétique et d'acide formique), aboutissant au formamide **116** avec un rendement pratiquement quantitatif.³⁶¹ La cyclisation permettant la formation du thiazole **117** est réalisée à l'aide de réactif de Lawesson qui va transformer le formamide en

³⁶⁰ Liu, W.; Wang, Z.; Xu, F.; Li, Q.; Wang, H.; Bian, Q.; Hu, F. Synthesis and Activity Investigation of Novel 1 *H*-Purin-6(9 *H*)-One and 3 *H*-Imidazo[4,5-*d*][1,2,3]Triazin-4(7 *H*)-One Derivatives. *ACS Omega* **2019**, *4*, 15742–15753, doi:[10/gnbn28](https://doi.org/10.1021/acsc.3c00288).

³⁶¹ Blum, C.; Chenard, B.; Martinez, I.; Zheng, X. Substituted aryl pyrimidinone derivatives. WO2009121036A3, 2009.

thioformamide. Cet intermédiaire se cyclise ensuite sous l'action de la chaleur. La formation d'un épais résidu a compliqué la purification de la réaction. Différents traitements d'après des protocoles décrits ont été testés mais cela n'a pas permis d'atteindre le rendement annoncé de 65 %.³⁶²

La suite de la synthèse se focalise sur la fonctionnalisation de la position 2 du thiazole (**Schéma 62**). Ayant envisagé celle-ci par un couplage de Suzuki-Miyaura, il faut d'abord bromer la position 2. Cette bromation a été réalisée à l'aide de *N*-bromosuccinimide. Le bromothiazole **118** a été isolé mais avec une quantité importante de succinimide résiduelle. Les conditions de couplage de Suzuki-Miyaura décrites précédemment (**renvoi**) ont été testées directement sur ce lot isolé de **118** et le produit attendu **119**, fonctionnalisé en position 2, a pu être isolé et décrit.

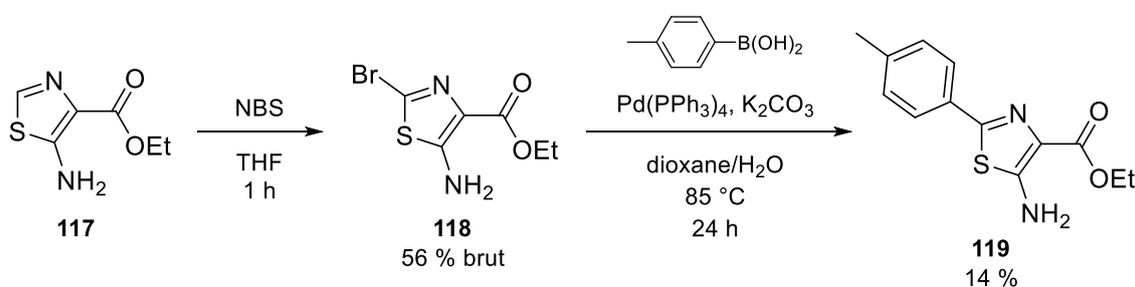


Schéma 62. Voie de synthèse aboutissant au thiazole **119**.

Face aux résultats biologiques de la série thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one et la complexité de la synthèse, le développement de la série thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one n'a pas été poursuivie.

4. Chalcogéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Les chalcogènes sont les atomes appartenant à la 16^{ème} colonne du tableau périodique des éléments dans laquelle on retrouve : l'oxygène, le soufre, le sélénium et un élément plus rare, le tellure.

³⁶² Kung, P-P.; Meng, J.J. Fused 2-amino pyrimidine compounds and their use for the treatment of cancer. WO2008059368A2, 2008.

4.1. Série furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

4.1.1. Le cycle furo[3,2-*d*]pyrimidine dans la littérature

Un unique composé comportant le cycle furo[3,2-*d*]pyrimidine a atteint le stade des essais cliniques. Le poseltinib, ou HM71224, est un inhibiteur irréversible de la tyrosine kinase de Bruton (Btk) (**Figure 64**).³⁶³ Cette action lui confère un effet immunosuppresseur, recherché dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, pour laquelle il vient de conclure un essai clinique de phase II.³⁶⁴

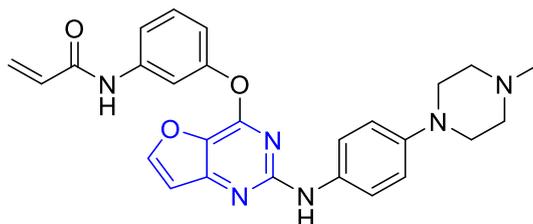


Figure 64. Structure chimique du poseltinib.

Cependant, la série n'est pas retrouvée de manière importante dans la littérature. Des dérivés furo[3,2-*d*]pyrimidines ont été décrits comme inhibiteurs de la tyrosine kinase SYK (visée immunosuppressive),³⁶⁵ ainsi que des inhibiteurs de la voie hedgehog (visée antinéoplasique) (**Figure 65**).³⁶⁶

³⁶³ Park, J.K.; Byun, J.-Y.; Park, J.A.; Kim, Y.-Y.; Lee, Y.J.; Oh, J.I.; Jang, S.Y.; Kim, Y.H.; Song, Y.W.; Son, J.; Suh, K.H.; Lee, Y.-M.; Lee, E.B. HM71224, a Novel Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor, Suppresses B Cell and Monocyte Activation and Ameliorates Arthritis in a Mouse Model: A Potential Drug for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 91, doi:[10/gmd3zw](https://doi.org/10/gmd3zw).

³⁶⁴ Genovese, M.C.; Spindler, A.; Sagawa, A.; Park, W.; Dudek, A.; Kivitz, A.; Chao, J.; Chan, L.S.M.; Witcher, J.; Barchuk, W.; Nirula, A. Safety and Efficacy of Poseltinib, Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, 2-Part Phase II Study. *J. Rheumatol.* **2021**, *48*, 969–976, doi:[10/gmd3zv](https://doi.org/10/gmd3zv).

³⁶⁵ Hoemann, M.; Wilson, N.; Argiriadi, M.; Banach, D.; Burchat, A.; Calderwood, D.; Clapham, B.; Cox, P.; Duignan, D.B.; Konopacki, D.; Somal, G.; Vasudevan, A. Synthesis and Optimization of Furano[3,2-*d*]Pyrimidines as Selective Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5562–5567, doi:[10/f9cgdw](https://doi.org/10/f9cgdw).

³⁶⁶ Zhang, L.; Xin, M.; Shen, H.; Wen, J.; Tang, F.; Tu, C.; Zhao, X.; Wei, P. Five-Membered Heteroaromatic Ring Fused-Pyrimidine Derivatives: Design, Synthesis, and Hedgehog Signaling Pathway Inhibition Study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3486–3492, doi:[10/gnbsbb](https://doi.org/10/gnbsbb).

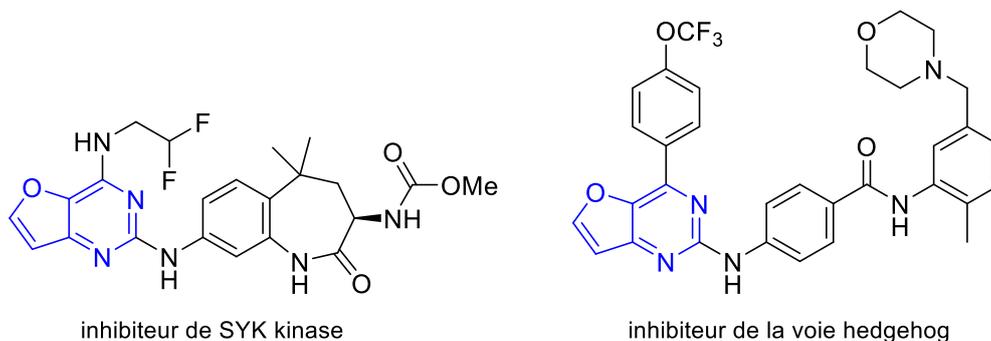


Figure 65. Furo[3,2-*d*]pyrimidines récemment décrites dans la littérature.

4.1.2. Synthèse des dérivés furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Les aminoesters de furane ont été préparés à partir de dérivés du 3-oxo-3-phénylpropanenitrile,³⁶⁷ disponibles commercialement mais pouvant aussi être synthétisés à partir d'acétophénone.³⁶⁸ Ces 3-oxo-3-phénylpropanenitriles subissent une condensation, avec le glycolate de méthyle, dans les conditions d'une réaction de Mitsunobu (triphénylphosphine et azodicarboxylate de diéthyle), conduisant aux intermédiaires **120** à **122** obtenus avec des rendements entre 51 et 61 %. Ces intermédiaires ont ensuite été traités avec de l'hydruure de sodium afin de former les furanes **123** à **125** avec des rendements allant de 36 à 75 % (**Schéma 63**). L'introduction d'un substituant électroattracteur sur le phényle réduit considérablement le rendement de l'étape de cyclisation. La première réaction nécessite une purification tandis que pour la deuxième, une simple trituration dans le cyclohexane permet d'éliminer les impuretés.

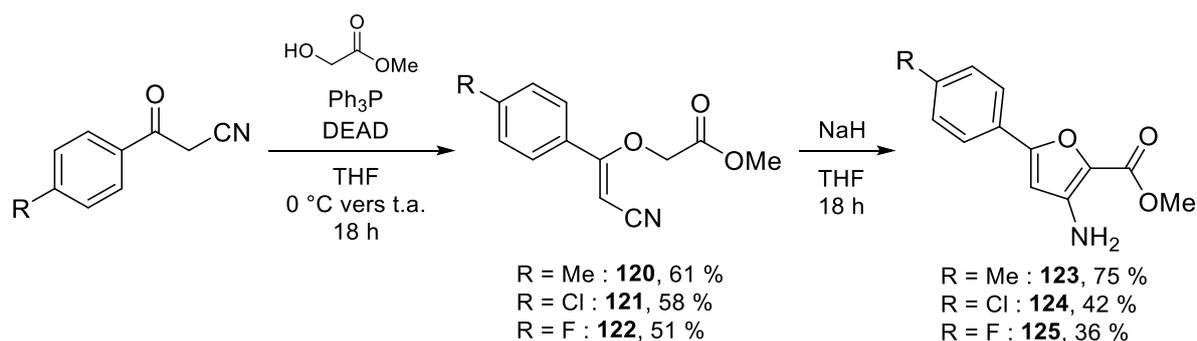


Schéma 63. Voie de synthèse des furanes substitués **123** à **125**.

³⁶⁷ Redman, A.M.; Dumas, J.; Scott, W.J. Preparation of 5-Substituted 3-Aminofuran-2-Carboxylate Esters. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2061–2063, doi:[10/b7m5mn](https://doi.org/10.1021/b7m5mn).

³⁶⁸ Elgaher, W.A.M.; Fruth, M.; Groh, M.; Hauptenthal, J.; Hartmann, R.W. Expanding the Scaffold for Bacterial RNA Polymerase Inhibitors: Design, Synthesis and Structure–Activity Relationships of Ureido-Heterocyclic-Carboxylic Acids. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 2177–2194, doi:[10/gnbscb](https://doi.org/10.1039/gnbscb).

Ces trois furanes ont ensuite été engagés dans la réaction de cyclisation et ont permis d'obtenir 4 dérivés en série furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one avec des rendements voisins de 40 % pour les dérivés *tert*-butylamine, tandis que le rendement du dérivé isopropyle **127** a été diminué à cause d'une purification compliquée (**Tableau 38**).

Tableau 38. Synthèse des furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones **126** à **129**.

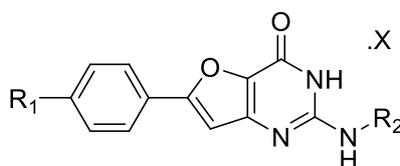


N°	R ₁	R ₂	Rdt (%)
126	Me	<i>t</i> Bu	41
127		<i>i</i> Pr	15
128	Cl	<i>t</i> Bu	45
129	F	<i>t</i> Bu	39

4.1.3. Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 39** résume les résultats biologiques des composés **126** à **129**.

Tableau 39. Résultats biologiques de la série furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.



N°	R ₁	R ₂	.X	CE ₅₀ <i>Pf</i> K1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
126		<i>t</i> Bu		0,8 ± 0,3	10,9 ± 1,1	13,6
126s	Me	<i>t</i> Bu	.HCl	0,3 ± 0,02	21,7 ± 0,5	72,3
127		<i>i</i> Pr		0,09 ± 0,02	20,4 ± 3,2	227
128	Cl	<i>t</i> Bu		0,4 ± 0,1	> 6,25	> 15,6
129	F	<i>t</i> Bu		2,9 ± 2	> 3,125	> 1,1
M1				0,045	24	533
Chloroquine				0,5	30	60

Atovaquone	0,0013	> 15,6	> 12 000
Doxorubicine	-	0,2	-

L'analogue furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one de la base libre du M1, le composé **126** qui a été synthétisé en premier, montre une activité biologique réduite par rapport à M1 mais tout de même submicromolaire ; tandis que sa cytotoxicité a augmenté. Les résultats biologiques intéressants de **126** nous ont poussés alors à synthétiser les 3 autres dérivés furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. On observe une amélioration de l'activité antiplasmodiale et de la cytotoxicité lorsque l'on passe en série isopropylamine avec le composé **127**. Concernant les composés **128** et **129**, leur activité antiplasmodiale est comparable à celle de leurs analogues en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Tableau 16**). Cependant, l'introduction d'un atome d'halogène diminue la solubilité dans le milieu de test de ces composés, limitant la détermination de leur CC₅₀. Les résultats du composés **126** nous ont aussi conduits à synthétiser le chlorhydrate correspondant, **126s**. Ce composé possède une activité antiplasmodiale et une cytotoxicité, toutes deux améliorées par rapport à **126**.

4.2.Série sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

4.2.1. Le sélénium en chimie médicinale

Le sélénium est un atome pour lequel l'intérêt est croissant depuis plusieurs années, aussi bien en chimie organique qu'en chimie médicinale.³⁶⁹ Le sélénium est retrouvé dans une multitude de fonctions chimiques (**Figure 66**) :³⁷⁰ sélénocyanate, disélényde, sélényourée, sélényoester, sélényone, etc... Le sélénium peut aussi se retrouver dans des cycles avec le sélénophène et les sélényazoles/sélényadiazoles³⁷¹ sont parmi les plus explorés. Les composés sélényés ont de manière globale été testés comme anti-cancéreux, anti-oxydants (les protéines humaines contenant du sélénium sont impliqués dans les mécanismes anti-oxydants), anti-infectieux (principalement anti-trypanosomases et antibiotiques), etc...³⁷⁰

³⁶⁹ May, S.W. Selenium-Based Drug Design. In *Atypical Elements in Drug Design*; Schwarz, J., Ed.; Topics in Medicinal Chemistry; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 17, pp. 87–118 ISBN 978-3-319-27740-0.

³⁷⁰ Chuai, H.; Zhang, S.-Q.; Bai, H.; Li, J.; Wang, Y.; Sun, J.; Wen, E.; Zhang, J.; Xin, M. Small Molecule Selenium-Containing Compounds: Recent Development and Therapeutic Applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113621, doi:[10/gnb2br](https://doi.org/10/gnb2br).

³⁷¹ Ruberte, A.C.; Sanmartin, C.; Aydillo, C.; Sharma, A.K.; Plano, D. Development and Therapeutic Potential of Selenazo Compounds. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1473–1489, doi:[10/gnb2gh](https://doi.org/10/gnb2gh).

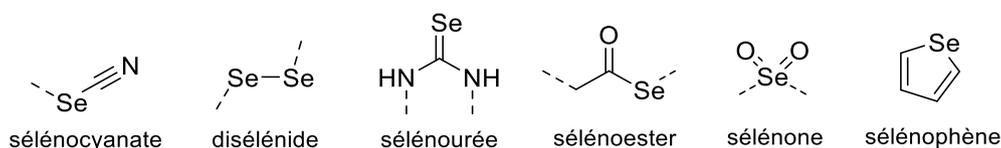


Figure 66. Fonctions chimiques incluant un atome de sélénium.

L'intérêt pour les sélénaoles est important à cause de l'ebsele (Figure 67). Ce dérivé sélénaolone, synthétisé pour la première fois en 1924,³⁷² est à l'heure actuelle étudié dans plusieurs essais cliniques concernant le diabète mais surtout des atteintes auditives et vestibulaires, notamment la maladie de Meunière pour laquelle un essai de phase III est sur le point de démarrer.³⁷³ Outre les propriétés antioxydantes utilisées pour traiter ces pathologies, l'ebsele possède aussi des propriétés immunomodulatrices et est capable d'interagir avec de nombreuses cibles protéiques.^{371, 374}

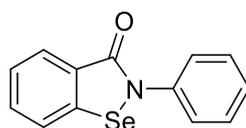


Figure 67. Structure chimique de l'ebsele.

Le sélénaole est, quant à lui, retrouvé dans des composés avec des propriétés antidépressives,³⁷⁵ antioxydantes,³⁷⁶ antitumorales³⁷⁷ ou encore antibiotiques (Figure 68).³⁷⁸

³⁷² Lesser, R.; Weiß, R. U'ber selenhaltige aromatische verbindungen (VI). *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1924**, *57*, 1077–1082.

³⁷³ *Clinicaltrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=ebsele&cntry=&state=&city=&dist=> (consulté le 05/11/2021)

³⁷⁴ Chen, Z.; Jiang, Z.; Chen, N.; Shi, Q.; Tong, L.; Kong, F.; Cheng, X.; Chen, H.; Wang, C.; Tang, B. Target Discovery of Ebselen with a Biotinylated Probe. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9506–9509, doi:10/ggrtcm.

³⁷⁵ Velasquez, D.; Quines, C.; Pistóia, R.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Selective Inhibition of MAO-A Activity Results in an Antidepressant-like Action of 2-Benzoyl 4-Iodoselenophene in Mice. *Physiol. Behav.* **2017**, *170*, 100–105, doi:10/f9qkgv.

³⁷⁶ Paegle, E.; Domracheva, I.; Turovska, B.; Petrova, M.; Kanep-Lapsa, I.; Gulbe, A.; Liepinsh, E.; Arsenyan, P. Natural-Antioxidant-Inspired Benzo[*b*]Selenophenes: Synthesis, Redox Properties, and Antiproliferative Activity. *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 1929–1938, doi:10/f3qc8n.

³⁷⁷ Zhang, S.; Wang, Z.; Hu, Z.; Li, C.; Tang, C.; Carlson, K.E.; Luo, J.; Dong, C.; Katzenellenbogen, J.A.; Huang, J.; Zhou, H.-B. Selenophenes: Introducing a New Element into the Core of Non-Steroidal Estrogen Receptor Ligands. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 235–249, doi:10/f3tvjc.

³⁷⁸ Wiles, J.A.; Phadke, A.S.; Bradbury, B.J.; Pucci, M.J.; Thanassi, J.A.; Deshpande, M. Selenophene-Containing Inhibitors of Type IIA Bacterial Topoisomerases. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3418–3425, doi:10/ddsfzr.

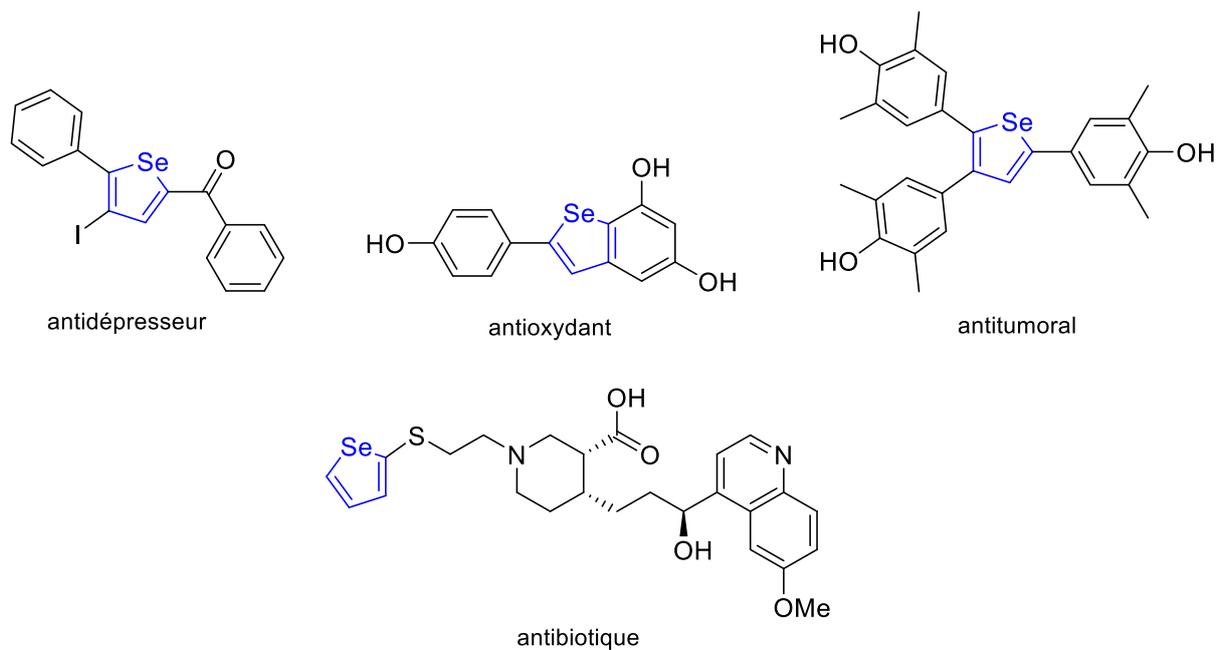


Figure 68. Structures chimiques de composés ayant montré une activité biologique et incluant un séléniophène.

Comme évoqué précédemment, les composés séléniés ont été très peu étudiés comme potentiels composés antiplasmodiaux. On retrouve dans la littérature une seule publication portant sur l'étude de composés séléniés sur *P. falciparum* (**Figure 69**).³⁷⁹ Ces composés simples possèdent des activités antiplasmodiales modérées (entre 9 et 65 μM) et agissent par induction de l'apoptose chez le parasite.

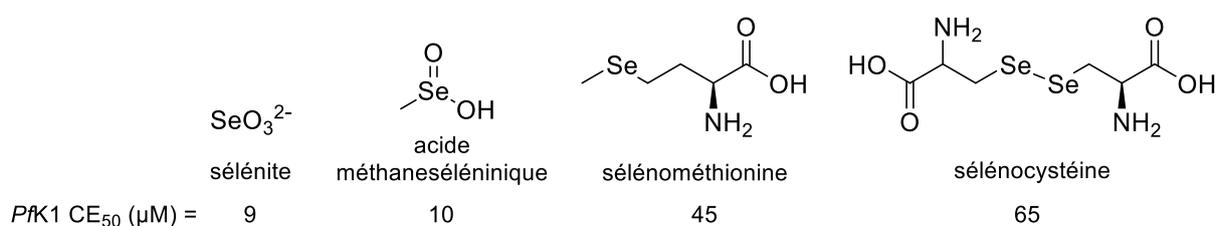


Figure 69. Dérivés séléniés testés sur *P. falciparum*.³⁷⁹

³⁷⁹ Suradji, E.W.; Hatabu, T.; Kobayashi, K.; Yamazaki, C.; Abdulah, R.; Nakazawa, M.; Nakajima-Shimada, J.; Koyama, H. Selenium-Induced Apoptosis-like Cell Death in *Plasmodium Falciparum*. *Parasitology* **2011**, *138*, 1852–1862, doi:[10/dp3dzm](https://doi.org/10.1017/S0022278X11000328).

4.2.2. Synthèse des dérivés sélénophène[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Il existe de nombreuses voies synthétiques pour accéder au sélénophène.³⁸⁰ Dans le but de synthétiser un aminoester du sélénophène, une approche similaire à celle aboutissant aux aminoesters du thiophène (**Schéma 20**) a été utilisée (**Schéma 64**).³⁸¹ En partant de la 4-méthylacétophénone, celle-ci a été convertie en β -chloroacrylonitrile **130** à l'aide du réactif de Vilsmeier (préparé à partir de POCl₃ et DMF) puis de chlorhydrate d'hydroxylamine. Celui-ci est ensuite traité avec du sélénure de sodium. Ce sel de sélénium doit être préparé extemporanément à partir de sélénium métallique, de soude et de rongalite dans l'eau.³⁸² Il est important d'ajouter le sélénure de sodium sur le chloroacrylonitrile et non l'inverse, sous peine de former un produit réactionnel diacrylonitrile. Une fois traité au sélénure de sodium, l'ainoester du sélénophène **131** est formé à l'aide de 2-bromoacétate de méthyle et méthanoate de sodium. Celui-ci précipite dans l'eau et nécessite une simple filtration pour être obtenu sans impuretés organiques avec de bons rendements. Afin de déterminer la présence et la quantité de sélénium métallique résiduel dans les composés, il serait nécessaire de réaliser une analyse par spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS).

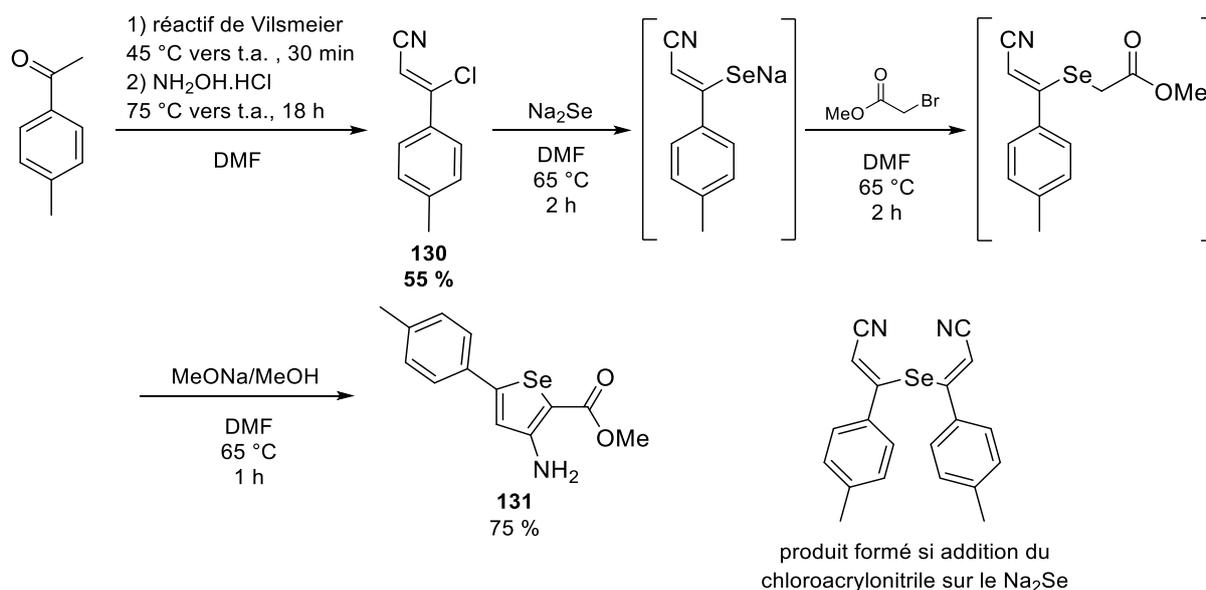


Schéma 64. Voie de synthèse du sélénophène **131**.

³⁸⁰ Hellwig, P.S.; Peglow, T.J.; Penteadó, F.; Bagnoli, L.; Perin, G.; Lenardão, E.J. Recent Advances in the Synthesis of Selenophenes and Their Derivatives. *Molecules* **2020**, *25*, 5907, doi:[10/gnb2vn](https://doi.org/10/gnb2vn).

³⁸¹ Thomae, D.; Kirsch, G.; Seck, P. Synthesis of Selenophene Analogues of the Tacrine Series: Comparison of Classical Route and Microwave Irradiation. *Synthesis* **2008**, *2008*, 1600–1606, doi:[10/cp9gzc](https://doi.org/10/cp9gzc).

³⁸² Gokaraju, G.R.; Kasina, S.; Gokaraju, R.R.; Gokaraju, V.K.R.R.; Somepalli, V.; Golakoti, T.; Bhupathiraju, K.; Krishanu, S.; Alluri, V.K.R. US20100272678, 2012.

Les conditions de cyclisation pour former le cycle aminopyrimidinone nous ont ensuite permis d'obtenir les sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones **132** et **133** (Schéma 65). Les rendements de la cyclisation pour la série sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidine sont comparables à ceux observés en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidine (renvoi).

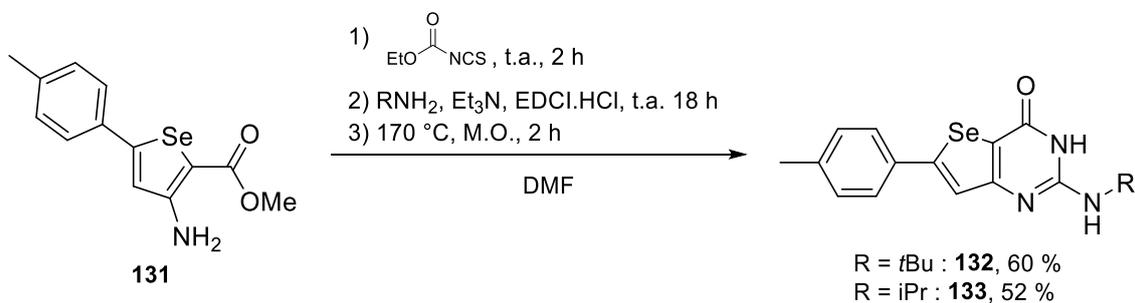
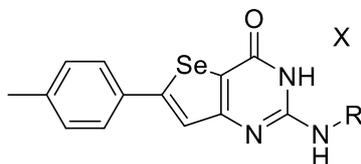


Schéma 65. Synthèse des sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones **132** et **133**.

4.2.3. Résultats du criblage primaire

Le Tableau 40 résume les résultats biologiques de la série sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

Tableau 40. Résultats biologiques de la série sélénophèno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.



N°	R	X	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
132	<i>t</i> Bu		1,3 ± 0,5	> 7,8	6
132s		HCl	0,13 ± 0,05	> 3,125	24
133	<i>i</i> Pr		0,8 ± 0,2	> 25	> 31,3
133s		HCl	0,77 ± 0,13	> 10	> 12,9
	M1		0,045	24	533
	Chloroquine		0,5	30	60
	Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
	Doxorubicine		-	0,2	-

Devant les activités micromolaires des composés **132** et **133**, les chlorhydrates de ces composés, **132s** et **133s**, ont été synthétisés afin de voir l'impact de la salification sur la série sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Les deux sels montrent une activité améliorée par rapport à leurs bases libres. Cependant et étonnamment, la salification a fortement diminué la solubilité de ces composés dans le milieu de test ; au point d'empêcher le composé **132s** d'avoir des tests supplémentaires malgré sa bonne activité antiplasmodiale.

5. Conclusion

La stratégie de « *scaffold hopping* » nous a permis de réaliser la synthèse de 17 composés appartenant à 4 séries chimiques analogues de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Schéma 66**) : 4 thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones, 4 [1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones, 5 furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones, et 4 sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. Parmi ces 17 composés, nous avons obtenu 5 composés avec une CE₅₀ inférieure à 1 μM, pouvant par la suite être utilisé pour des tests biologiques supplémentaires. Ces séries nous ont aussi fournis des données très intéressantes de RSA qui seront discutées, avec les autres tests biologiques dans le **Chapitre 6**. Ces différentes séries, ainsi que la première abordée dans le chapitre suivant, figurent au sein d'une publication qui sera prochainement soumise (cf. **Annexe 3**).

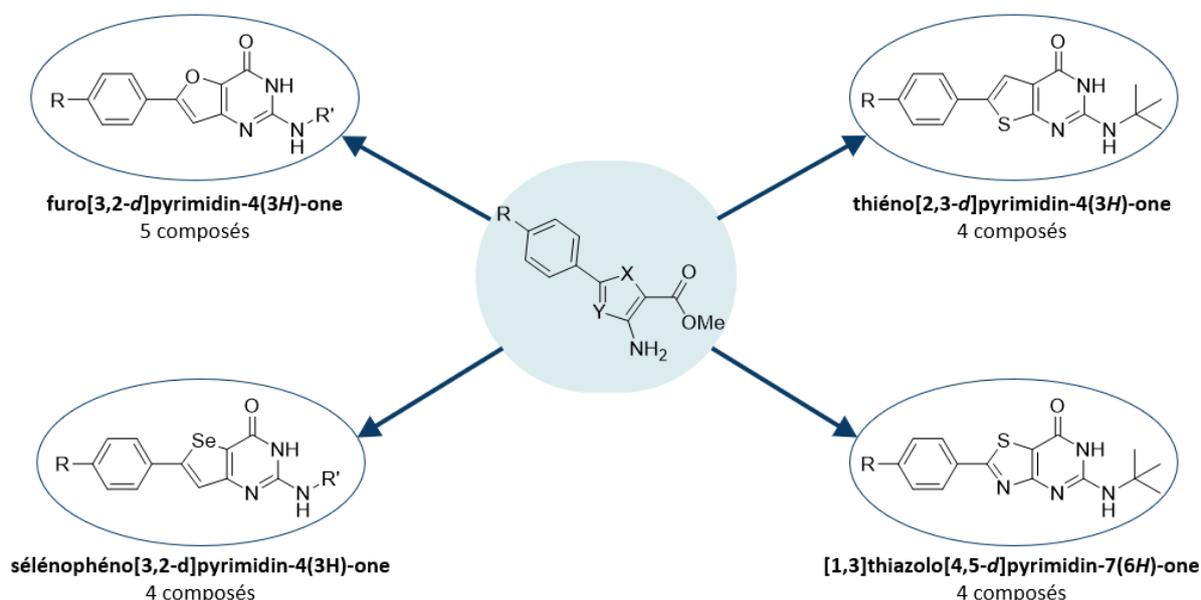


Schéma 66. Schéma récapitulatif des séries réalisées par stratégie de « *scaffold hopping* ».

Les travaux concernant ce chapitre et le précédent sont les axes majeurs ayant été explorés durant ce travail de thèse. Le **Chapitre 5** rassemble les différentes modifications,

effectuées ou tentées, entreprennent sur le noyau thiénopyrimidinone et ne pouvant être incluses avec celles réalisées précédemment.

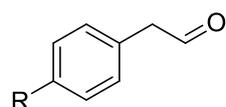
6. Experimental part

6.1. Material and methods

See Chapitre 3 : 6.1. Materials and methods for details.

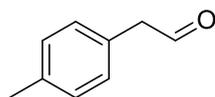
6.2. Oxydation of 2-phenylethanols

General procedure



To a solution of appropriate alcohol (1 eq) in dichloromethane (0.2 M) at 0 °C was added Dess-Martin periodinane (1.5 eq) and the suspension was stirred 2 h at room temperature. The mixture was washed with a mixture (5:1 v/v) of saturated aqueous NaHCO₃ and 2M aqueous Na₂S₂O₃ and the obtained aqueous layer was extracted three times with diethyl ether. The organic phases were combined, washed with 0.1 M HCl aqueous solution and brine, dried over sodium sulfate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 50:50 cyclohexane/dichloromethane) affording the desired compound.

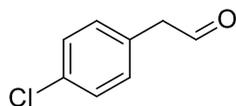
(4-methylphenyl)acetaldehyde 98



Chemical Formula: C₉H₁₀O
Exact Mass: 134,0732
Molecular Weight: 134,1780

Following the general procedure starting from 2-(4-methylphenyl)ethanol (0.8 g, 5.8 mmol), (4-methylphenyl)acetaldehyde was isolated as a yellowish oil (0.6 g, 77 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.73 (s, 1H), 7.19 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H), 7.11 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 3.65-3.62 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

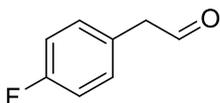
(4-chlorophenyl)acetaldehyde 99



Chemical Formula: C₈H₇ClO
Exact Mass: 154,0185
Molecular Weight: 154,5930

Following the general procedure starting from 2-(4-chlorophenyl)ethanol (0.6 g, 3.8 mmol), (4-chlorophenyl)acetaldehyde was isolated as a yellow oil (0.457 g, 78 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.75 (s, 1 H), 7.36-7.32 (m, 2H), 7.17-7.12 (m, 2H), 3.69-3.68 (m, 2H).

(4-fluorophenyl)acetaldehyde 100

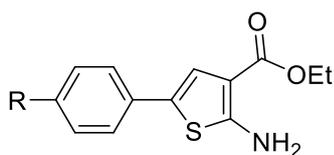


Chemical Formula: C₈H₇FO
Exact Mass: 138,0481
Molecular Weight: 138,1414

Following the general procedure starting from 2-(4-fluorophenyl)ethanol (0.8 g, 5.7 mmol), (4-fluorophenyl)acetaldehyde was isolated as a yellow oil (0.6 g, 76 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.74 (s, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 7.09-7.03 (m, 2H), 3.69- 3.68 (m, 2H).

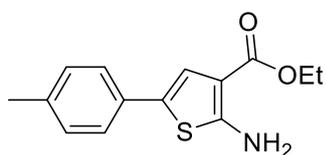
6.3.Synthesis of ethyl 2-aminothiophene-3-carboxylates

General procedure



A mixture of the appropriate phenylacetaldehyde (1 eq), ethyl cyanoacetate (1 eq), S₈ (1.1 eq) and morpholine (1.15 eq) in EtOH (0.2 M) was stirred under microwave irradiation for 20 min at 70 °C. After cooling, the reaction was filtered, and the filtrate was extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified by column chromatography on silica gel (starting from 70:30 to 50:50 cyclohexane/dichloromethane) affording the desired compound.

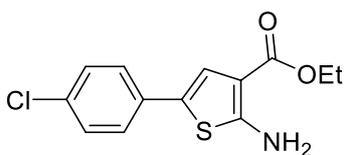
ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate 101



Chemical Formula: C₁₄H₁₅NO₂S
Exact Mass: 261,0823
Molecular Weight: 261,3390

Following the general procedure starting from (4-methylphenyl)acetaldehyde (0.5 g, 3.7 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as an orange solid (0.637 g, 66 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.45 (s, 2H), 7.35 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.05 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 4.19 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.22 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.4, 162.3, 132.7, 132.3, 129.0 (2C), 125.9 (2C), 123.6, 121.9, 108.2, 60.1, 21.5, 14.7. mp = 87-89 °C.

ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate 102

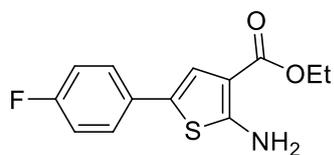


Chemical Formula: C₁₃H₁₂ClNO₂S
Exact Mass: 281,0277
Molecular Weight: 281,7540

Following the general procedure starting from (4-chlorophenyl)acetaldehyde (0.16 g, 0.94 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as a brown solid (0.123 g, 47 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.35 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.28 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 6.02 (s, 2H), 4.30 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H), 1.37 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR

(CDCl₃, 100 MHz) δ 165.4, 162.3, 132.7, 132.3, 129.0 (2C), 125.9 (2C), 123.6, 121.9, 108.2, 60.1, 14.7. mp = 99-101 °C.

ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate 103



Chemical Formula: C₁₃H₁₂FNO₂S
Exact Mass: 265,0573
Molecular Weight: 265,3024

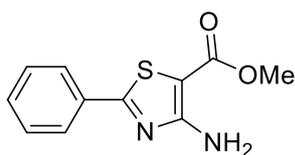
Following the general procedure starting from (4-fluorophenyl)acetaldehyde (0.6 g, 4.34 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as a yellow solid (0.33 g, 29 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.41-7.38 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.05-7.02 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.30 (q, ³J = 8.0 Hz, 2H), 1.37 (t, ³J = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.5, 162.1, 161.9 (d, ¹J = 240.0 Hz, 1C), 130.4 (d, ⁴J = 3.1 Hz, 1C), 126.5 (d, ³J = 7.9 Hz, 2C), 123.9, 121.3, 115.9 (d, ²J = 21.9 Hz, 2C), 108.1, 60.0, 14.68. mp = 94-96 °C.

6.4.Liebeskind-Srogl couplings

General procedure

Methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (1 eq), appropriate phenylboronic acid (1.1 eq), copper(I) 2-hydroxy-3-methylbenzoate (1.5 eq) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium (4 mol%) were put under nitrogen atmosphere and dissolved in tetrahydrofuran (0.6 M). The obtained suspension was stirred at 50 °C for 72 h. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The organic phase was washed sequentially with saturated aqueous NaHCO₃ (3x 10 mL), water (10 mL), and brine (10 mL). The organic phase was dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from cyclohexane/ethyl acetate 95:5 to 80:20). If needed, fractions of interest were triturated in cyclohexane to afford the desired product.

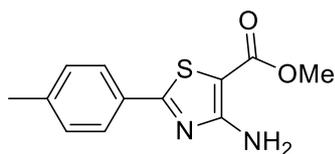
methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 107



Chemical Formula: C₁₁H₁₀N₂O₂S
Exact Mass: 234,0463
Molecular Weight: 234,2730

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.6 g, 2.9 mmol) and phenylboronic acid (0.39, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.53 g, 77 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.96-7.89 (m, 2H), 7.51-7.40 (m, 3H), 5.93 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 170.7, 164.7, 163.2, 132.9, 131.5, 129.2 (2C), 126.8 (2C), 93.8, 51.8. mp = 107-109 °C.

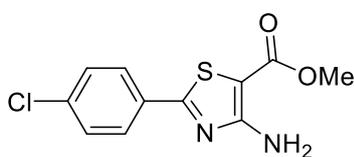
methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate **108**



Chemical Formula: C₁₂H₁₂N₂O₂S
Exact Mass: 248,0619
Molecular Weight: 248,3000

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.600 g, 2.9 mmol) and (4-methylphenyl)boronic acid (0.434 g, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.440 g, 60 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.81 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.24 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 5.94 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.40 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.0, 164.7, 163.2, 142.1, 130.2, 129.9 (2C), 126.7 (2C), 93.3, 51.7, 21.7. mp = 130-132 °C.

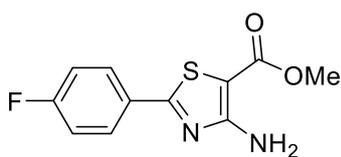
methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate **109**



Chemical Formula: C₁₁H₉ClN₂O₂S
Exact Mass: 268,0073
Molecular Weight: 268,7150

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (1.25 g, 6.12 mmol) and (4-chlorophenyl)boronic acid (1.05 g, 6.73 mmol), methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as yellow solid (0.925 g, 56 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.85 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.41 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 5.91 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 169.3, 164.6, 163.2, 137.6, 131.4, 129.4 (2C), 128.0 (2C), 94.2, 51.8. mp = 182-184 °C.

methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate **110**

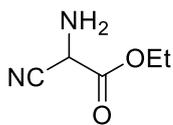


Chemical Formula: C₁₁H₉FN₂O₂S
Exact Mass: 252,0369
Molecular Weight: 252,2634

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.600 g, 2.9 mmol) and (4-fluorophenyl)boronic acid (0.941 g, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.49 g, 66 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.87-7.81 (m, 2H), 7.08-7.01 (m, 2H), 5.91 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 169.4, 164.8 (d, ¹J = 252 Hz, 1C), 164.6, 163.2, 129.2 (d, ⁴J = 3.3 Hz, 1C), 128.9 (d, ³J = 8.7 Hz, 2C), 116.3 (d, ²J = 22.4 Hz, 2C), 93.8, 51.8. mp = 167-169 °C.

6.5. Access to thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one scaffold

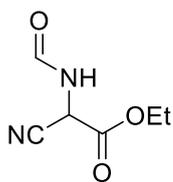
ethyl amino(cyano)acetate 115



Chemical Formula: C₅H₈N₂O₂
Exact Mass: 128,0586
Molecular Weight: 128,1310

To a stirred solution of ethyl (*E*)-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (10 g, 70.4 mmol) in water (36 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (18 mL) was added portion wise sodium thiosulphate (33.1 g, 190 mmol). The solution was stirred for 1 h at 35 °C. The reaction mixture was extracted three times with dichloromethane. The combined organic phases were dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo* affording ethyl amino(cyano)acetate as a red oil (4.87 g, 54 % crude yield), which was used without further purifications. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.47 (s, 1H), 4.33 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (bs, 2H), 1.34 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H).

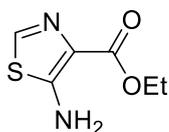
ethyl cyano(formylamino)acetate 116



Chemical Formula: C₆H₈N₂O₃
Exact Mass: 156,0535
Molecular Weight: 156,1410

To a stirred solution of ethyl amino(cyano)acetate (4.87 g, 38 mmol) in diethyl ether (100 mL) at 0 °C was added dropwise formyl acetate (5.1 mL, 64.6 mmol). The obtained solution was stirred 1 h at 0 °C and 2 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* affording ethyl cyano(formylamino)acetate as an orange oil (5.65 g, 95 % crude yield), which was used without further purifications. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.29 (s, 1H), 6.46 (bs, 1H), 5.55 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H), 4.36 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H), 1.35 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H)

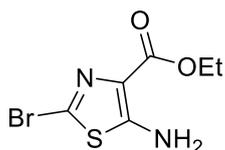
ethyl 5-amino-1,3-thiazole-4-carboxylate 117



Chemical Formula: C₆H₈N₂O₂S
Exact Mass: 172,0306
Molecular Weight: 172,2020

Ethyl cyano(formylamino)acetate (3.0 g, 19 mmol) was dissolved in toluene (90 mL) and stirred to reflux for 1 h with a Dean-Stark apparatus. Lawesson reagent (4.0 g, 9 mmol) was added to the solution and the obtained suspension was stirred vigorously to reflux for 18 h. The excess solvent was removed *in vacuo* and the black gummy material was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2) affording ethyl 5-amino-1,3-thiazole-4-carboxylate as a yellow powder (0.49 g, 15 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.87 (s, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.39 (q, ³J = 8.0 Hz, 2H), 1.42 (t, ³J = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.8, 160.4, 135.3, 120.0, 59.2, 14.4. mp = 164 °C

ethyl 5-amino-2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate **118**



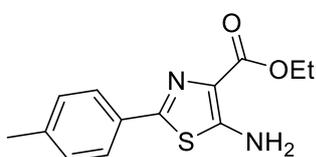
Chemical Formula: C₆H₇BrN₂O₂S

Exact Mass: 249,9412

Molecular Weight: 251,0980

To a solution of ethyl 5-amino-1,3-thiazole-4-carboxylate (0.45 g, 3.09 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL) was added *N*-bromosuccinimide (0.586, 3.29 mmol) and the solution was stirred for 1 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was triturated in ethyl acetate affording ethyl 5-amino-2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate as a white solid (0.44 g) which was used without further purifications. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.35 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H), 1.38 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H).

ethyl 5-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-4-carboxylate **119**



Chemical Formula: C₁₃H₁₄N₂O₂S

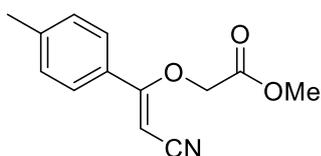
Exact Mass: 262,0776

Molecular Weight: 262,3270

To a mixture of dioxane (1.5 mL) and water (0.75 mL) was added crude ethyl 5-amino-2-bromo-1,3-thiazole-4-carboxylate (0.3 g, 1.19 mmol), (4-methylphenyl)boronic acid (0.259 g, 1.91 mmol) and potassium carbonate (0.328 g, 2.38 mmol). The mixture was then put under nitrogen atmosphere and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (5 mol%) was added and the mixture was stirred at 75 °C for 24 h. The reaction mixture was poured into cold water (50 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic phases were washed with brine (2 x 150 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording ethyl 5-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-4-carboxylate as a white solid (45 mg, 15 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.68 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H), 4.42 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.43 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.9, 159.3, 150.0, 139.9, 130.6, 129.6 (2C), 126.2 (2C), 122.6, 60.8, 21.5, 14.7. mp = 169–171 °C.

6.6.Synthesis of furane aminoesters

methyl {[*Z*]-2-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl}oxy}acetate **120**



Chemical Formula: C₁₃H₁₃NO₃

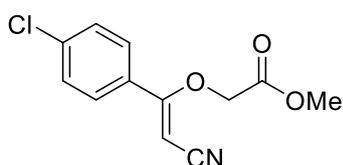
Exact Mass: 231,0895

Molecular Weight: 231,2510

To a solution of triphenylphosphine (1.07 g, 4.08 mmol) in tetrahydrofuran (25 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (2.14 mL, 4.71 mmol) and the solution was stirred for 10 min at 0 °C. 3-(4-methylphenyl)-3-oxopropanenitrile (315 μL, 4.08 mmol) was added dropwise,

followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (0.5 g, 3.14 mmol) and the solution was stirred 16 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 90:10 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl {[*Z*]-2-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl]oxy}acetate as a colourless oil (0.5 g, 61% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.48 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.22 (d, ³J = 8 Hz, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 170.4, 168.2, 142.2, 130.1, 129.7 (2C), 127.1 (2C), 116.8, 73.8, 67.6, 52.7, 21.6.

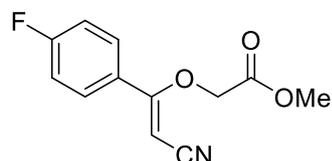
methyl {[*Z*]-1-(4-chlorophenyl)-2-cyanoethenyl]oxy}acetate **121**



Chemical Formula: C₁₂H₁₀ClNO₃
Exact Mass: 251,0349
Molecular Weight: 251,6660

To a solution of triphenylphosphine (1.9 g, 7.24 mmol) in tetrahydrofuran (50 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (3.8 mL, 8.35 mmol) and the solution was stirred 10 min at 0 °C. 3-(4-chlorophenyl)-3-oxopropanenitrile (559 μL, 7.24 mmol) was added dropwise, followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (1 g, 5.57 mmol) and the solution was stirred 24 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 90:10 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl {[*Z*]-1-(4-chlorophenyl)-2-cyanoethenyl]oxy}acetate as a yellowish oil (812 mg, 58% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.59-7.52 (m, 2H), 7.42-7.37 (m, 2H), 5.04 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 168.8, 167.9, 137.9, 131.6, 129.2 (2C), 128.4 (2C), 116.4, 73.9, 67.7, 52.8. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁ClNO₃ [M+H]⁺ 252.0422, found 252.0425.

methyl {[*Z*]-2-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy}acetate **122**

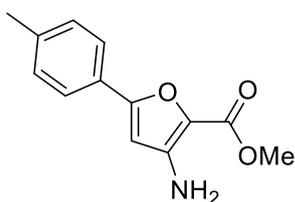


Chemical Formula: C₁₂H₁₀FNO₃
Exact Mass: 235,0645
Molecular Weight: 235,2144

To a solution of triphenylphosphine (2.09 g, 7.97 mmol) in tetrahydrofuran (50 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (4.2 mL, 9.19 mmol) and the solution was stirred 10 min at 0 °C. 3-(4-fluorophenyl)-3-oxopropanenitrile (615 μL, 7.97 mmol) followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (1 g, 5.57 mmol) and the solution was stirred 16 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 80:20 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl {[*Z*]-2-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy}acetate as a transparent oil (740 mg, 51% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400

MHz) δ 7.66-7.59 (m, 2H), 7.14-7.06 (m, 2H). 5.04 (s, 2H), 5.01 (s, 1H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 169.0, 168.0, 164.8 (d, $^1J = 253$ Hz, 1C), 129.4, 129.3 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2C), 116.5, 116.2 (d, $^2J = 21.9$ Hz, 2C), 73.5, 67.7, 52.8. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{FNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 236.0717, found 236.0717.

methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate **123**

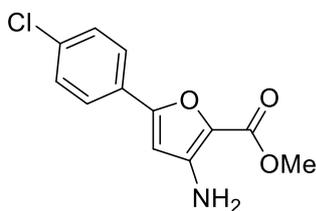


Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3$
Exact Mass: 231,0895
Molecular Weight: 231,2510

To a solution of methyl $\{[(Z)\text{-}2\text{-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl]oxy\}$ acetate (0.5 g, 2.16 mmol) in tetrahydrofuran (25 mL) was added sodium hydride (0.145 g, 6.05 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Water (2 mL) was then added to the reaction mixture and the excess solvent was removed *in vacuo*.

The obtained crude was triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate as a brown solid (0.4 g, 80% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.62 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.20 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 6.32 (s, 1H), 4.63 (bs, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.1, 156.7, 146.0, 139.5, 129.6 (2C), 126.9, 125.2, 125.1 (2C), 99.4, 51.1, 21.5. Mp = 116-118 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 232.0968, found 232.0965.

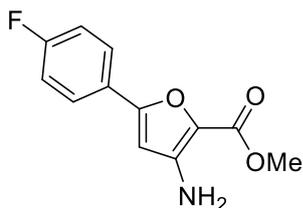
methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate **124**



Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$
Exact Mass: 251,0349
Molecular Weight: 251,6660

To a solution of methyl $\{[(Z)\text{-}1\text{-(4-chlorophenyl)-2-cyanoethenyl]oxy\}$ acetate (0.79 g, 3.14 mmol) in tetrahydrofuran (40 mL) was added sodium hydride (0.211 g, 8.79 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 5 h at room temperature. Water (4 mL) was then added, and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate as a light brown solid (330 mg, 42% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.68-7.62 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.9, 155.2, 145.3, 135.2, 129.2 (2C), 128.1, 126.4 (2C), 125.7, 100.3, 51.2. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 252.0422, found 252.0419.

Methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate **125**



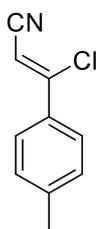
Chemical Formula: C₁₂H₁₀FNO₃
Exact Mass: 235,0645
Molecular Weight: 235,2144

To a solution of methyl {[*(Z)*-2-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy}acetate (0.7g, 2.98 mmol) in tetrahydrofuran (35 mL) was added sodium hydride (0.200 g, 8.33 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 16 h at room temperature. Water (5 mL) was then added and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was

trituated in cyclohexane then purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate as a grey solid (250 mg, 36% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.70 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 5.5 Hz, 2H), 7.09 (t, ³J = 8.6 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.4 (d, ¹J = 250 Hz, 1C), 160.9, 155.5, 145.6, 127.1 (d, ³J = 8.5 Hz, 2C), 125.9 (d, ⁴J = 3.5 Hz, 1C), 125.5, 116.0 (d, ²J = 21.9 Hz, 2C), 99.7, 51.2. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁FNO₃ [M+H]⁺ 236.0717, found 236.0718.

6.7.Synthesis of selenophene aminoester

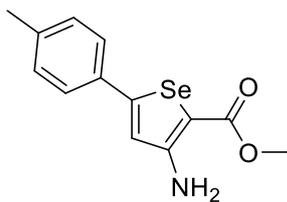
(*Z*)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enenitrile **130**



Chemical Formula: C₁₀H₈ClN
Exact Mass: 177,0345
Molecular Weight: 177,6310

Phosphoryl chloride (1.39 mL, 14.9 mmol) was added dropwise to dimethylformamide (13 mL). The obtained mixture was heated to 45 °C, 1-(4-methylphenyl)ethenone (1 g, 7.45 mmol) was added dropwise while keeping the mixture's temperature below 55 °C then the solution was stirred 30 min at room temperature. 0.5 mL of a solution of hydroxylammonium chloride (2.07 g, 29.8 mmol) in dimethylformamide (10 mL) was added to the reaction mixture which was then heated to 75 °C. The rest of the hydroxylammonium chloride solution was added portion wise and the reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature. The mixture was poured into water (75 mL), filtered and the obtained precipitate was isolated affording (*Z*)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enenitrile as an orange solid (0.715 g, 54% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.55 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 5.98 (s, 1H), 2.41 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 153.4, 142.8, 131.5, 129.7 (2C), 126.9 (2C), 115.7, 95.1, 21.4.

methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate **131**



Chemical Formula: C₁₃H₁₃NO₂Se

Exact Mass: 295,0112

Molecular Weight: 294,2120

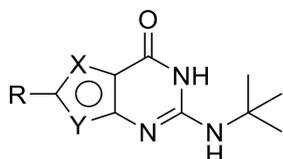
Preparation of sodium selenide: Under nitrogen atmosphere, sodium hydroxide (0.942 g, 23.5 mmol) and rongalite (1.19 g, 10.1 mmol) were dissolved in water (4.3 mL) and metallic selenium (0.332 g, 4.2 mmol) was added. The obtained suspension was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was filtered, and the precipitate was directly engaged in the

following reaction.

To a solution of sodium selenide (0.506 g, 4.05 mmol) in dimethylformamide (4 mL) was added dropwise a solution of (2Z)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enitrile (0.72 g, 4.05 mmol) in dimethylformamide (1.5 mL) and the obtained mixture was stirred for 2 h at 65 °C. Methyl bromoacetate (0.62 g, 4.05 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 2 h at 65 °C. A solution of sodium methanolate (0.219 g, 4.05 mmol) dissolved in methanol (1.5 mL) was added dropwise to the reaction mixture and it was stirred for 1 h at 65 °C. The reaction mixture was poured into water (40 mL), the obtained suspension was filtered and the precipitate was washed with water affording methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate as a khaki green powder (0.878 g, 74% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 6.73 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.0, 157.3, 152.4, 139.0, 131.9, 129.8 (2C), 125.8 (2C), 119.5, 95.1, 51.0, 20.8. Mp = 117-119 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₃H₁₃NO₂Se [M+H]⁺ 296.0185, found 296.0187.

6.8. Cyclisation reactions

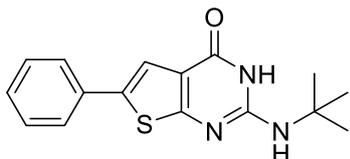
General procedure



To a solution of the appropriate functionalised alkyl 2-aminothiophene-3-carboxylate (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2.25 mL per 100 mg) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (1 eq) and the solution was stirred for 2 h at room temperature. To the reaction mixture was added *tert*-butylamine or isopropylamine (2 eq), triethylamine (3 eq) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.05 eq) and it was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred at 170 °C under microwave irradiation for 2 h. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.
- If no precipitate was obtained, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

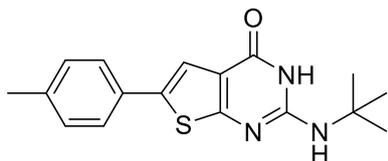
2-*tert*-butylamino-6-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 97



Chemical Formula: C₁₆H₁₇N₃OS
 Exact Mass: 299,1092
 Molecular Weight: 299,3920

Following the general procedure starting from methyl 2-amino-5-phenylthiophene-3-carboxylate (0.3 g, 1.21 mmol) and *tert*-butylamine (250 μ L, 2.42 mmol), the obtained crude was triturated with acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.16 g, 44 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.64 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (t, ³*J* = 7.6 Hz, 2H), 7.28 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 166.9, 157.7, 151.1, 133.5, 132.4, 129.1 (2C), 127.4, 125.0 (2C), 117.1, 117.0, 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₃OS [M+H]⁺ 300.1165, found 300.1165.

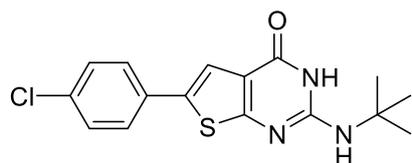
2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 104



Chemical Formula: C₁₇H₁₉N₃OS
 Exact Mass: 313,1249
 Molecular Weight: 313,4190

Following the general procedure starting from crude ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate (1 g, 3.82 mmol) and *tert*-butylamine (802 μ L, 7.64 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2). Fractions of interest were triturated with acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.18 g, 15 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.39 (s, 1H), 7.52 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.21 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H), 6.32 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 166.6, 157.6, 150.9, 136.9, 132.7, 130.7, 129.6 (2C), 124.9 (2C), 116.9, 116.3, 51.2, 28.6 (3C), 20.7. mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃OS [M+H]⁺ 314.1322, found 314.1321.

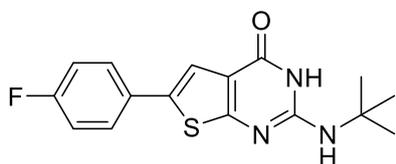
2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 105



Chemical Formula: C₁₆H₁₆ClN₃OS
Exact Mass: 333,0703
Molecular Weight: 333,8340

Following the general procedure starting from ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate (0.278 g, 0.99 mmol) and *tert*-butylamine (207 μ L, 1.97 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.134 g, 41 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.65 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.44 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 167.2, 157.7, 151.2, 132.5, 131.7, 130.9, 129.0 (2C), 126.6 (2C), 117.9, 117.1, 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇ClN₃OS [M+H]⁺ 334.0775, found 334.0775.

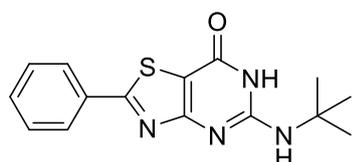
2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 106



Chemical Formula: C₁₆H₁₆FN₃OS
Exact Mass: 317,0998
Molecular Weight: 317,3824

Following the general procedure starting from ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate (0.258 g, 0.97 mmol) and *tert*-butylamine (204 μ L, 1.94 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (65 mg, 21 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.72-7.63 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.28-7.18 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 167.0, 161.5 (d, ¹*J* = 245.0 Hz), 157.8, 151.1, 131.4, 130.2 (d, ⁴*J* = 3.2 Hz), 127.1 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2C), 117.2, 117.1, 116.1 (d, ²*J* = 21.8 Hz, 2C), 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇FN₃OS [M+H]⁺ 318.1071, found 318.1071.

5-*tert*-butylamino-2-phenyl[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one 111

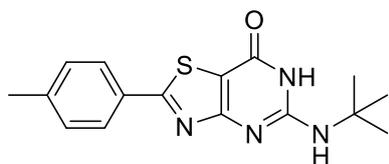


Chemical Formula: C₁₅H₁₆N₄OS
Exact Mass: 300,1045
Molecular Weight: 300,3800

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.28 mmol) and *tert*-butylamine (269 μ L, 2.56 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol 98:2). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 5-*tert*-butylamino-2-phenyl[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one as a beige powder (0.134 g, 35 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.69 (s, 1H), 8.08-8.03 (m, 2H), 7.62-7.52 (m, 3H), 6.31 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100

MHz) δ 172.0, 169.0, 157.9, 153.1, 132.5, 131.9, 129.4 (2C), 126.8 (2C), 105.6, 51.3, 28.5 (3C). mp = 299-301 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{15}H_{17}N_4OS$ $[M+H]^+$ 301.1118, found 301.1117.

5-(*tert*-butylamino)-2-(4-methylphenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one **112**

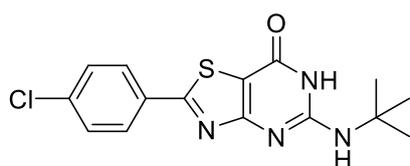


Chemical Formula: $C_{16}H_{18}N_4OS$
Exact Mass: 314,1201
Molecular Weight: 314,4070

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.2 mmol) and *tert*-butylamine (253 μ L, 2.4 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 5-(*tert*-butylamino)-2-(4-methylphenyl)[1,3]thiazolo[4,5-

d]pyrimidin-7(6*H*)-one as a yellow solid (0.173 g, 46 % yield). 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 7.94 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 6.29 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 172.1, 169.0, 157.9, 153.1, 142.1, 129.9 (2C), 126.8 (2C), 105.2, 51.2, 28.5 (3C), 21.1. mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{16}H_{18}N_4OS$ $[M+H]^+$ 315.1274, found 315.1279.

5-*tert*-butylamino-2-(4-chlorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one **113**

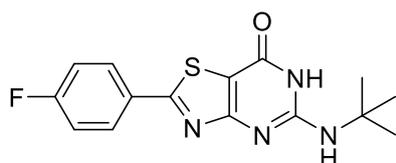


Chemical Formula: $C_{15}H_{15}ClN_4OS$
Exact Mass: 334,0655
Molecular Weight: 334,8220

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.12 mmol) and *tert*-butylamine (236 μ L, 2.24 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile and the obtained solid was purified *via* column chromatography on

silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2) affording 5-*tert*-butylamino-2-(4-chlorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one as a yellow solid (0.171 g, 46 % yield). 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.71 (s, 1H), 8.10-8.05 (m, 2H), 7.64-7.59 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 170.6, 169.0, 157.8, 153.2, 136.5, 131.3, 129.5 (2C), 128.6 (2C), 105.9, 51.3, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{15}H_{16}ClN_4OS$ $[M+H]^+$ 335.0728, found 335.0724.

5-*tert*-butylamino-2-(4-fluorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one **114**



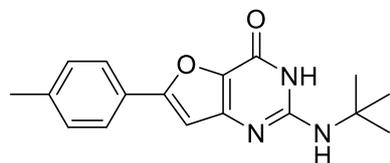
Chemical Formula: $C_{15}H_{15}FN_4OS$
Exact Mass: 318,0951
Molecular Weight: 318,3704

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.19 mmol) and *tert*-butylamine (250 μ L, 2.38 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 5-*tert*-butylamino-2-(4-fluorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-

7(6*H*)-one as a beige solid (0.107 g, 28 % yield). 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.70 (s, 1H),

8.17-8.08 (m, 2H), 7.43-7.35 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 170.7, 169.0, 164.2 (d, $^1J = 250$ Hz, 2C), 157.9, 153.2, 129.4 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2C), 129.2 (d, $^4J = 3.1$ Hz, 2C), 116.5 (d, $^2J = 22.0$ Hz, 2C), 105.6, 51.3, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{FN}_4\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 319.1023, found 319.1024.

2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 126

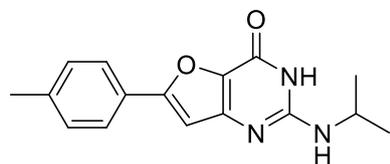


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$
Exact Mass: 297,1477
Molecular Weight: 297,3580

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate (0.4 g, 1.73 mmol) and *tert*-butylamine (363 μL , 3.46 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. Precipitate was filtered and isolated while the filtrate was purified *via* flash

chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (210 mg, 41% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.38 (s, 1H), 7.74 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.9, 151.7, 151.5, 151.3, 139.3, 131.5, 129.6 (2C), 126.6, 124.8 (2C), 102.3, 50.9, 28.6 (3C), 21.0. mp = 298-300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.1550, found 298.1548.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 127

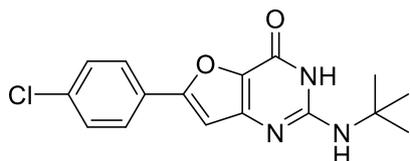


Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$
Exact Mass: 283,1321
Molecular Weight: 283,3310

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate (0.295 g, 1.28 mmol) and isopropylamine (219 μL , 2.55 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were

triturated in diethyl ether affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (53 mg, 15% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.52 (bs, 1H), 7.74 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.31 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.08 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.06-3.90 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.9, 152.0, 151.5, 139.3, 131.4, 129.6 (2C), 126.5, 124.8 (2C), 102.0, 42.3, 22.4 (2C), 21.0. mp = 261-263 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 284.1394, found 284.1390.

2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 128



Chemical Formula: C₁₆H₁₆ClN₃O₂

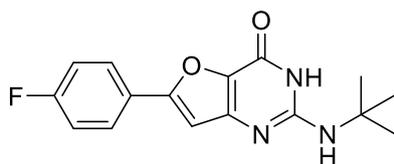
Exact Mass: 317,0931

Molecular Weight: 317,7730

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate (0.3 g, 1.19 mmol) and *tert*-butylamine (251 μL, 2.38 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fraction of interests

were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a light grey solid (170 mg, 45% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.87 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.56 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H) 7.26 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 157.4, 151.7, 151.6, 151.1, 134.0, 132.0, 129.2 (2C), 128.1, 126.5 (2C), 103.7, 50.9, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇ClN₃O₂ [M+H]⁺ 318.1004, found 318.1002.

2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 129



Chemical Formula: C₁₆H₁₆FN₃O₂

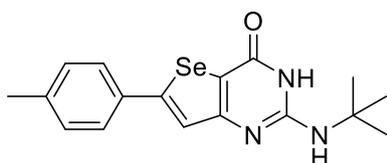
Exact Mass: 301,1227

Molecular Weight: 301,3214

Following the general procedure starting from 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate (0.24 g, 1.02 mmol) and *tert*-butylamine (214 μL, 2.04 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fractions of interest triturated

in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.12 g, 39 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.40 (s, 1H), 7.94-7.86 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.7 (d, ¹*J* = 248 Hz, 1C), 157.7, 151.7, 151.5, 151.2, 131.8, 127.1 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2C), 125.9 (d, ⁴*J* = 2.9 Hz, 1C), 116.2 (d, ²*J* = 22 Hz, 2C), 102.9, 50.9, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇FN₃O₂ [M+H]⁺ 302.1299, found 302.1298.

2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 132



Chemical Formula: C₁₇H₁₉N₃OSe

Exact Mass: 361,0693

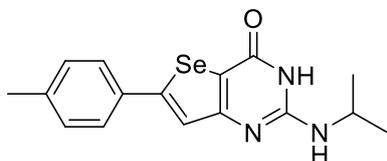
Molecular Weight: 360,3190

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.02 mmol) and *tert*-butylamine (214 μL, 2.04 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-

d]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (220 mg, 60% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 7.66-7.60 (m, 3H), 7.25 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.42 (s, 9H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162.5, 158.7, 154.7, 152.6, 139.1, 132.1, 129.8 (2C), 126.1 (2C), 123.3, 112.4, 51.0, 28.6 (3C), 20.8. Mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{OSe}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.0767, found 362.0766.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 133



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OSe}$
Exact Mass: 347,0537
Molecular Weight: 346,2920

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.02 mmol) and isopropylamine (175 μL , 2.04 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-

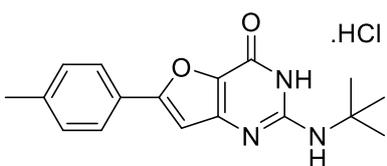
d]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige solid (185 mg, 52% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.56 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.62 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.25 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 6.11 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 163.3, 159.2, 155.3, 153.5, 139.6, 132.7, 130.2 (2C), 126.6 (2C), 123.6, 112.8, 42.6, 22.9 (2C), 21.3. mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OSe}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.0610, found 348.0611.

6.9. Hydrochloride salts synthesis

General procedure

To absolute ethanol (10 mL) was added appropriate 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. The suspension was heated if needed to dissolve the molecule and then allowed to cool down to room temperature. Hydrogen chloride was bubbled through the solution for a short period then the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction mixture was then degassed with nitrogen for 10 min and filtered. The precipitate was washed with diethyl ether affording the desired 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride salt.

2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 126s

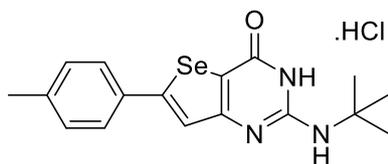


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_2$
Exact Mass: 333,1244
Molecular Weight: 333,8160

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (90 mg, 0.30 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained following the general procedure as a white solid (70 mg, 70% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.76 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.32 (d, $^3J = 7.9$

Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 159.0, 151.4, 151.3, 139.5, 131.2, 129.7 (2C), 126.3, 124.9 (2C), 101.4, 51.3, 28.5 (3C), 21.0. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C 61.17, H 6.04, N 12.59, found C 60.11, H 5.75, N 12.21.

2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **132s**

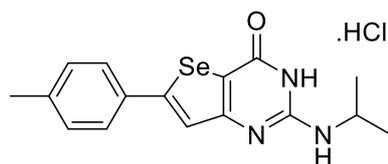


Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{OSe}$
 Exact Mass: 397,0460
 Molecular Weight: 396,7770

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.28 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a white powder (94 mg, 85%

yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.73 (s, 1H), 7.64 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.27 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.7, 155.8, 152.3, 139.4, 131.9, 129.9 (2C), 126.2 (2C), 121.8, 112.5, 51.5, 28.5 (3C), 20.9. mp: degradation observed at 253 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{OSe}$: C 51.46, H 5.08, N 10.59, found C 51.42, H 4.96, N 10.52.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride **133s**



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OSe}$
 Exact Mass: 383,0304
 Molecular Weight: 382,7500

Following the general procedure with 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.29 mmol), 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a yellow powder (90 mg, 82

% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.85 (s, 1H), 7.62 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 4.24-4.10 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.24 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 6H). ^{13}C NMR could not be performed due to solubility problems. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OSe}$: C 50.21, H 4.74, N 10.98, found C 50.07, H 4.80, N 10.85.

Chapitre 5 : Autres modifications ou tentatives de modification du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3H)-one

1. Synthèse de 7-methylthiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)ones

A l'exception des dérivés thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)ones pour lesquels la chaîne latérale a été déplacée de la position 6 à la position 7 (**Tableau 17**), cette position n'a pas été explorée. Le transfert de la chaîne latérale sur cette position 7 entraîne une perte de l'activité antiplasmodiale. C'est pour cela que nous avons souhaité seulement introduire dans un premier temps un substituant de petite taille, comme un groupement méthyle (**Schéma 67**). L'intérêt du groupement méthyle, en remplacement d'un hydrogène, permet aussi d'appréhender son potentiel effet sur les différents paramètres biologiques/physicochimiques.

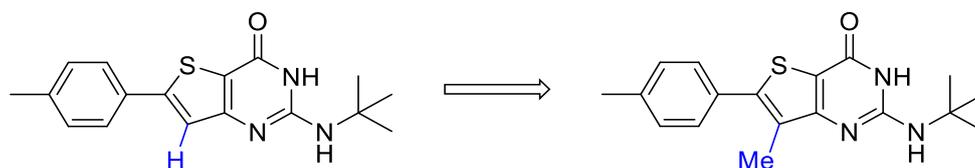


Schéma 67. Passage de la série thiénoypyrimidinone classique à celle méthylée en position 7.

1.1. L'effet magique du méthyle ou « magic methyl effect »

Si, sur un composé biologiquement actif, l'introduction d'un groupement méthyle à la place d'un atome d'hydrogène provoque une amélioration des propriétés biologiques (augmentation de l'affinité pour la protéine ou de l'activité recherchée par exemple) ou physicochimiques/pharmacochimiques (augmentation de la solubilité ou de la stabilité métabolique), on parle alors d'effet magique du méthyle. Cet effet peut avoir trois origines :³⁸³

- La réduction de l'énergie de désolvatation, qui représente la quantité d'énergie requise pour solubiliser un composé dans un milieu aqueux ;
- L'introduction d'une interaction supplémentaire avec une zone hydrophobe d'une protéine ;
- Des modifications dans la conformation de la molécule pouvant favoriser son interaction avec sa cible.

³⁸³ Schönherr, H.; Cernak, T. Profound Methyl Effects in Drug Discovery and a Call for New C-H Methylation Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12256–12267, doi:[10/f2nb48](https://doi.org/10/f2nb48).

Sur ce dernier point, l'exemple du **Schéma 68** montre que l'introduction du groupement méthyle en position *ortho* entraîne une modification conformationnelle avec un angle dièdre passant de 50 à 65°. ³⁸⁴ Ce changement améliore l'affinité du composé pour la protéine cible avec un K_i divisé par un facteur 200.

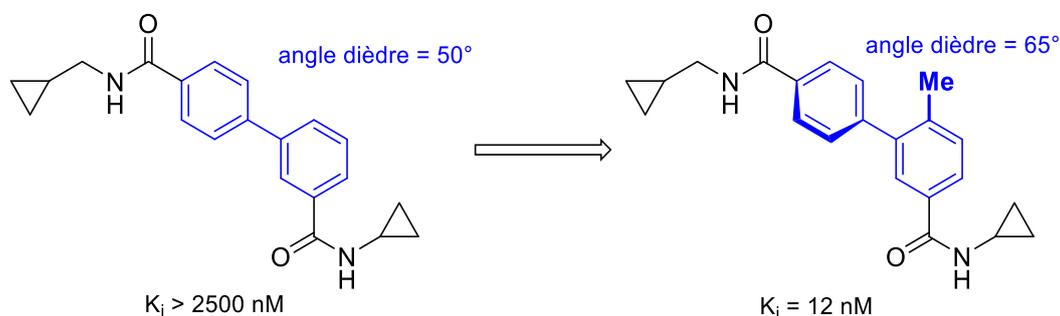


Schéma 68. Exemple de composé pour lequel l'introduction d'un méthyle a permis l'amélioration de son affinité pour sa cible par modification de l'angle dièdre. ³⁸⁴

Les données cristallographiques du composé M1 nous montrent que la structure de celui-ci est complètement plane dans l'espace. La planéité d'une molécule est défavorable pour sa solubilité puisqu'elle favorise les phénomènes de π -stacking (interactions entre des cycles aromatiques) et augmente l'énergie de désolvatation nécessaire pour solubiliser la molécule. Macroscopiquement, on se retrouve avec des couches de molécules difficiles à séparer entre-elles en milieu aqueux. L'introduction du groupement méthyle en position 7 pourrait limiter la rotation du groupement phényle en position 6 et casser cette planéité, permettant ainsi de gagner en solubilité qui constitue un frein à l'évaluation du composé M1.

1.2.Synthèse des dérivés

La voie de synthèse retenue pour obtenir ces analogues méthylés en position 7 débute à partir du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle commercial (**Schéma 69**, molécule **c**). Le groupement méthyle est donc présent dès le départ dans la synthèse : une approche de C-H méthylation, comme souvent utilisée pour la recherche d'un effet magique du méthyle, ^{383, 385} directement en position 7 ne pouvant être réalisée à cause des multiples positions pouvant subir une C-H méthylation sur la molécule. La fonctionnalisation de la position 5 du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle peut être obtenue par

³⁸⁴ Angell, R.; Aston, N.M.; Bamborough, P.; Buckton, J.B.; Cockerill, S.; deBoeck, S.J.; Edwards, C.D.; Holmes, D.S.; Jones, K.L.; Laine, D.I.; et al. Biphenyl Amide P38 Kinase Inhibitors 3: Improvement of Cellular and in Vivo Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4428–4432, doi:[10/fsst7z](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.077).

³⁸⁵ Aynedinova, D.; Callens, M.C.; Hicks, H.B.; Poh, C.Y.X.; Shennan, B.D.A.; Boyd, A.M.; Lim, Z.H.; Leitch, J.A.; Dixon, D.J. Installing the "Magic Methyl" – C–H Methylation in Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5517–5563, doi:[10/gngpbn](https://doi.org/10.1039/d1cs00097a).

une C-H arylation étant donné que la position 4 est bloquée par le méthyle. En effet, sans la présence de ce méthyle, on observe une forte réduction du rendement de la C-H arylation et la formation du dérivé fonctionnalisé en position 4.³⁸⁶

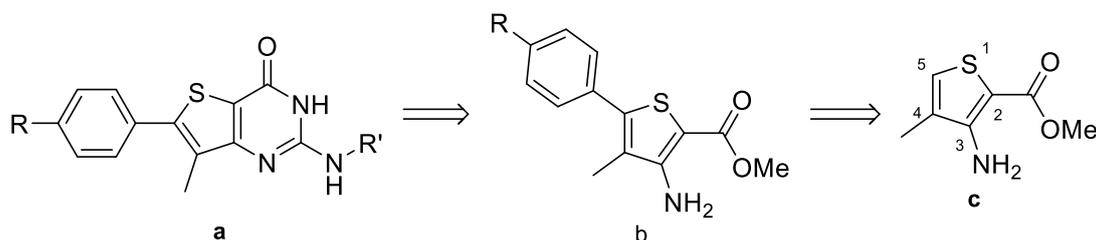


Schéma 69. Schéma rétrosynthétique de la série 7-méthylthiéo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

Les conditions de C-H arylation sur l'ainoester du thiophène méthylé sont déjà décrites dans la littérature.^{386, 387} Celle-ci a été réalisée en présence d'un bromoaryle, d'un catalyseur au palladium ((PdCl(C₃H₅)(dppb)), préparé au préalable car non commercial) et d'acétate de potassium dans le diméthylacétamide à 120 °C pendant 20 h. Cependant, nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité en utilisant ces conditions. Le catalyseur au palladium a été remplacé par de l'acétate de palladium afin d'exclure une mauvaise synthèse du catalyseur, difficile à caractériser une fois synthétisé. L'acétate de palladium est aussi décrit comme pouvant fonctionner pour la réalisation de cette C-H arylation. En utilisant des conditions similaires à celles décrites (en utilisant l'acétate de palladium), 3 aminoesters du thiophène méthylés en position 4 et fonctionnalisés en position 5 ont été synthétisés (**Schéma 70**) avec des rendements modestes ou moyens.

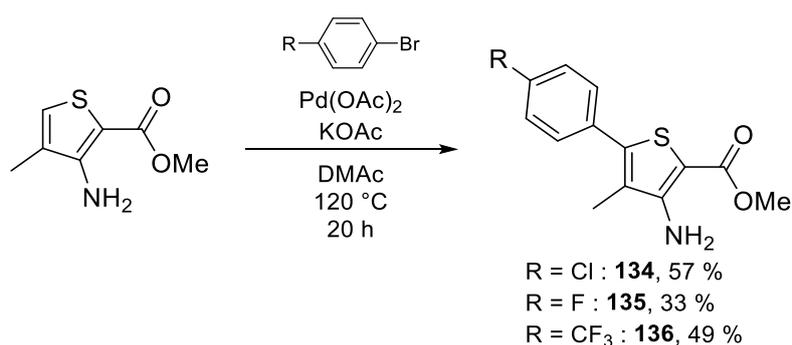


Schéma 70. C-H arylation du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle.

³⁸⁶ Derridj, F.; Si Larbi, K.; Roger, J.; Djebbar, S.; Doucet, H. Palladium-Catalyzed Direct Arylation Using Free NH₂ Substituted Thiophene Derivatives with Inhibition of Amination Type Reaction. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7463–7471, doi:[10/gngpdm](https://doi.org/10/gngpdm).

³⁸⁷ Derridj, F.; Roger, J.; Djebbar, S.; Doucet, H. Palladium-Catalyzed Direct Arylation of Free NH₂ -Substituted Thiophene Derivatives. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4320–4323, doi:[10/cnq5k9](https://doi.org/10/cnq5k9).

La synthèse du dérivé comportant un groupement méthyle en position 4 du cycle phényle a aussi été réalisée. Cependant, le produit réactionnel possède un rapport frontal quasi-identique à celui de la matière première, rendant toute séparation impossible. Cette C-H arylation a aussi été tentée avec un phényle substitué par un groupement isopropoxyyle (pour réaliser un analogue du composé **57**) mais aucune trace du produit d'arylation n'a été observée dans ce cas (**Schéma 71**).

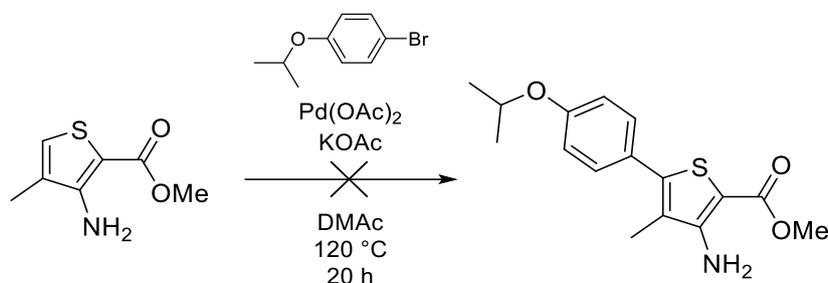


Schéma 71. Résultat de la C-H arylation du 3-amino-4-méthylthiophène-2-carboxylate de méthyle en présence de 1-bromo-4-isopropoxybenzène.

Les trois aminoesters précédemment synthétisés ont ensuite été engagés dans la réaction de cyclisation qui a permis d'obtenir les thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones méthylées en position 7 (**Schéma 72**).

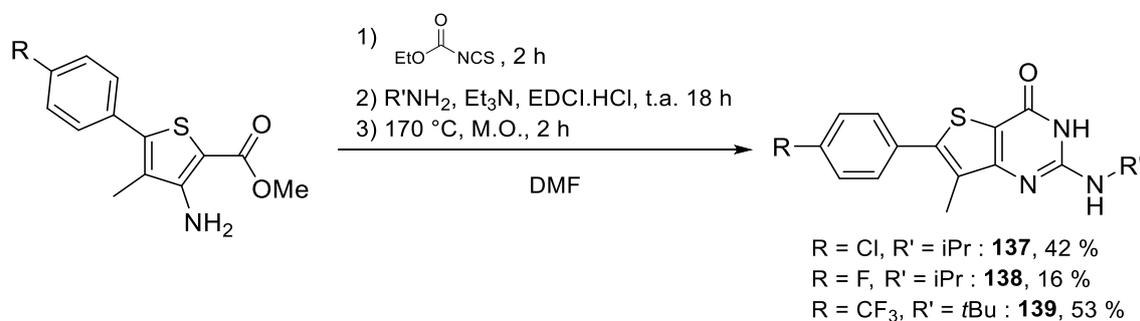
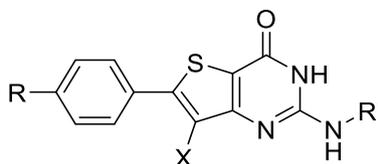


Schéma 72. Cyclisation aboutissant aux 7-méthylthiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones.

1.3. Résultats du criblage primaire

Les trois composés **137** à **139** ont été testés biologiquement et leurs résultats, ainsi que ceux de leurs analogues non-méthylés, figurent dans le **Tableau 41**.

Tableau 41. Résumé des résultats biologiques de la série 7-méthylthiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one par rapport à leurs analogues non-méthylés



N°	R	R'	X	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
137	Cl	iPr	Me	4,4 ± 0,8	> 25	> 5,7
H			H	0,6	15,6	26
138	F	iPr	Me	4,3 ± 0,6	19,7 ± 1,8	4,6
J			H	0,5	> 25	> 66
139	CF ₃	tBu	Me	1,8 ± 0,3	> 25	> 13,9
45			H	0,8 ± 0,2	9,2 ± 3,1	11,5
	M1			0,045	24	533
	Chloroquine			0,5	30	60
	Atovaquone			0,0013	> 15,6	> 12 000
	Doxorubicine			-	0,2	-

Ces résultats montrent malheureusement que l'introduction d'un méthyle en position 7 du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one est délétère pour l'activité antiplasmodiale. Pour deux composés, **137** et **139**, on observe cependant une amélioration de la cytotoxicité mais dont la détermination exacte reste limitée par leur solubilité.

2. Synthèse de *N-tert-butyl-6-(4-méthylphényl)-4-(alcynyl)thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amines*

Afin d'étendre brièvement les données RSA en position 4 du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidine, l'introduction d'un groupement alcyne en remplacement du groupement carbonyle a été réalisée (**Schéma 73**).

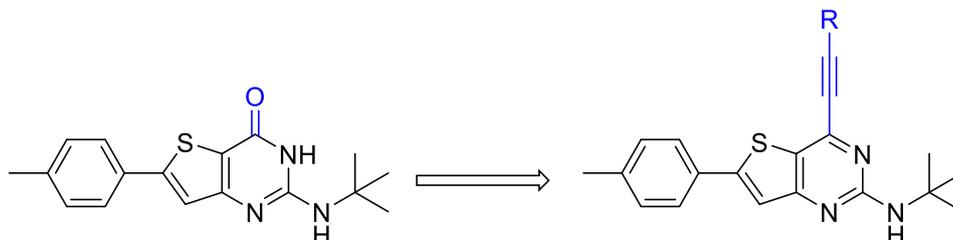


Schéma 73. Passage de la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidinone classique à celle comportant un groupement alcyne en position 4.

2.1.Synthèse des dérivés

Dans un premier temps, afin de pouvoir réaliser un couplage de Sonogashira sur la position 4, le groupement carbonyle du composé **38** a été remplacé par un atome de chlore par une chloration à l'aide de trichlorure de phosphore en présence de *N,N*-diméthylaniline dans de l'acétonitrile. La 4-chlorothiéno[3,2-*d*]pyrimidine **140** a été obtenue avec un rendement de 85 %. Celle-ci a ensuite été engagée dans les conditions de couplage de Sonogashira précédemment utilisées pour fonctionnaliser la position 6 (cf. Chapitre 3 : 3.2.Couplage de Sonogashira en position 6). Ainsi, 3 composés avec un alcyne en position 4 ont été obtenus avec des rendements faibles à modérés (**Schéma 74**).

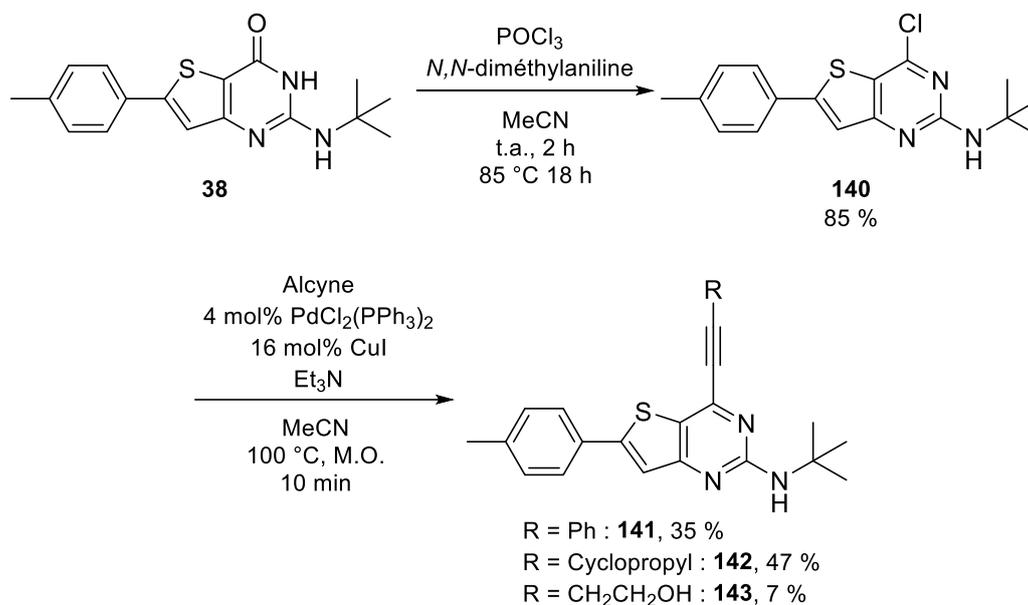


Schéma 74. Voie de synthèse des dérivés comportant une fonction alcyne en position 4.

Pour les composés **141** et **142**, les rendements sont comparables aux couplages de Sonogashira réalisés sur la position 6. Le rendement est fortement diminué pour le composé **143** (47 % pour le même alcyne en position 6, **86**). Ces conditions n'ont pas permis d'obtenir le dérivé avec un triméthylsilyle en position 4. Le passage à des conditions plus douces (24 heures à 50 °C, chauffage classique) a cependant permis de l'obtenir et il a été engagé directement dans une protodésilylation pour obtenir l'alcyne vrai. Malheureusement, les conditions utilisées pour obtenir le composé **89** (Schéma 40) ont aboutie à la formation d'un dérivé diméthoxyéthyle, envisageable lorsqu'un dérivé triméthylsilylалcyne est traité par une base en présence de méthanol.³⁸⁸ L'utilisation d'autres bases (KOH ou TBAF), là encore dans le méthanol, n'a en revanche pas abouti à la formation du produit attendu ou d'un sous-produit. (Schéma 75).

³⁸⁸ Liu, Y.; Xia, Q.; Fang, L. Design and Synthesis of Alkyl Substituted Pyridino[2,3-D]Pyrimidine Compounds as PI3K α /MTOR Dual Inhibitors with Improved Pharmacokinetic Properties and Potent in Vivo Antitumor Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 3992–4000, doi:[10/gd4dsq](https://doi.org/10/gd4dsq).

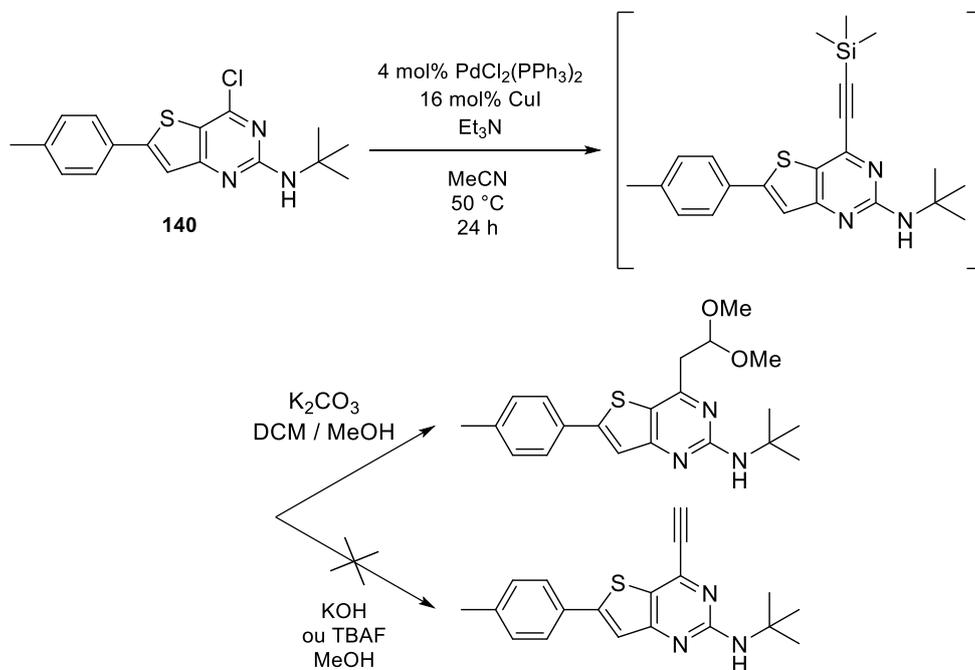
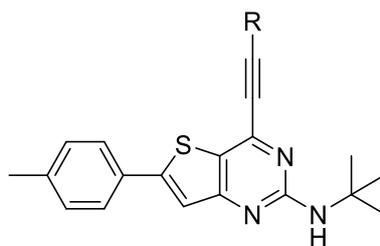


Schéma 75. Voie de synthèse utilisée pour essayer d'obtenir un dérivé avec un alcyne vrai en position 4.

2.2. Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 42** résume les résultats biologiques des 3 composés synthétisés avec une fonction alcyne en position 4.

Tableau 42. Résultats biologiques des composés comportant un alcyne en position 4



N°	R	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
141		20,1 ± 4,1	> 6,25	> 0,3
142		15,7 ± 2,4	> 12,5	> 0,8
143		14,2 ± 2,8	9,1 ± 1,3	0,64
M1		0,045	24	533
Chloroquine		0,5	30	60
Atovaquone		0,0013	> 15,6	> 12 000
Doxorubicine		-	0,2	-

Le remplacement du groupement carbonyle, ou plus largement de la pyrimidin-4(3*H*)-one, par une alcynopyrimidine, provoque une perte majeure de l'activité antiplasmodiale ainsi qu'une baisse de la solubilité des composés dans le milieu de test. La synthèse de dérivés comportant un groupement alcyne en position 4 n'a donc pas été poursuivie.

3. Dérivés comportant une cyclobutylamine en position 2

Afin de poursuivre les études RSA sur la fonction amine en position 2 de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one nous avons cherché à introduire une amine substituée par un carbocycle, plus spécifiquement la cyclobutylamine.

3.1. Synthèse des dérivés

Pour la synthèse de ces dérivés, il a été simplement nécessaire d'utiliser la cyclobutylamine comme amine durant la réaction de cyclisation. Avec les conditions réactionnelles classiques de cyclisation, 3 dérivés en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et 1 dérivé en série sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one avec un groupement cyclobutylamine en position 2 ont été synthétisés (**Tableau 43**).

Tableau 43. Réaction de cyclisation aboutissant aux dérivés cyclobutylamines.

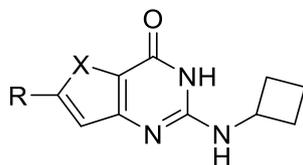


N°	X	R	Rdt (%)
144	S		31
145	S		33
146	S		37
147	Se		54

3.2.Résultats du criblage primaire

Le **Tableau 44** résume les résultats biologiques des 4 composés comportant un groupement cyclobutylamine en position 2.

Tableau 44. Résultats biologiques des dérivés cyclobutylamines.



N°	X	R	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	IS
144	S		2,3 ± 0,4	> 3,125	> 1,4
145	S		2,4 ± 0,8	> 1,563	> 0,7
146	S		5,9 ± 2	5,2 ± 0,4	0,88
147	Se		0,7 ± 0,2	> 6,25	> 8,9
		M1	0,045	24	533
		Chloroquine	0,5	30	60
		Atovaquone	0,0013	> 15,6	> 12 000
		Doxorubicine	-	0,2	-

Les trois dérivés thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones possèdent une activité antiplasmodiale diminuée par rapport à celle de leurs analogues *tert*butylamine ou isopropylamine. De plus, l'introduction du motif cyclobutylamine diminue fortement la solubilité des composés dans le milieu de test. Le composé **147** a, quant à lui, une activité antiplasmodiale légèrement améliorée par rapport à l'analogue *tert*butylamine **132** mais avec une augmentation des problèmes de solubilité limitant la détermination de sa cytotoxicité.

Les chlorhydrates de ces 4 composés ont été synthétisés selon la méthode précédemment décrite (cf. Chapitre 3 : 2.6. Salification des composés). Malheureusement, le passage sous cette forme a aggravé davantage les problèmes de solubilité, rendant ces composés insolubles et donc incompatibles pour la réalisation des tests biologiques.

4. Tentatives de modulations n'ayant pas abouti

4.1. Dérivés 2-aminométhyle

Concernant l'amine en position 2 du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, seule la longueur de la chaîne au bout de l'amine a été explorée. L'idée, en remplaçant cette amine en position 2 par un groupement aminométhyle, était d'observer l'impact sur l'activité de l'allongement de la chaîne entre l'amine et le cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. L'accès à ces dérivés a été envisagé en passant par un intermédiaire 2-chlorométhyle (**Schéma 75**, molécule **b**) sur lequel une réaction de substitution nucléophile permettrait d'obtenir le dérivé 2-aminométhyle désiré. L'intermédiaire 2-chlorométhyle pourrait aussi permettre la réalisation de dérivés éther ou thioéther selon le nucléophile utilisé (**Schéma 76**, molécule **a**).

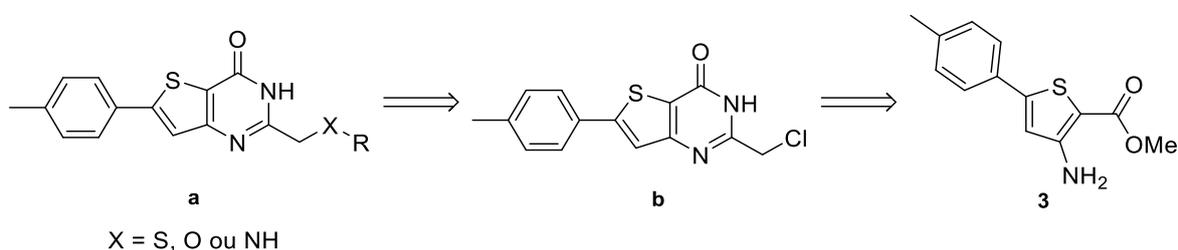


Schéma 76. Schéma rétrosynthétique des composés 2-aminométhyles.

L'intermédiaire 2-chlorométhyle a été synthétisé à partir de l'aminoester du thiophène **3** à l'aide de chloroacétonitrile dans du chlorure d'hydrogène à 4 M dans le dioxane, avec un rendement de 67 % (**Schéma 77**).³⁸⁹ Celui montrait cependant des problèmes de solubilité afin de réaliser les analyses RMN.

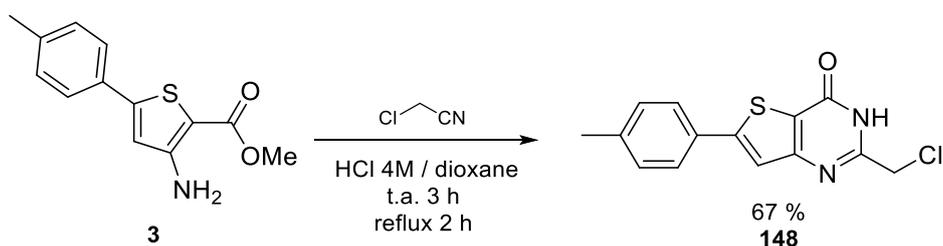


Schéma 77. Synthèse du composé **148**.

La synthèse du dérivé 2-aminométhyle a ensuite été tentée en s'appuyant sur des conditions de la littérature utilisant de l'iodure de sodium en quantité catalytique et du

³⁸⁹ Ekambaram, R.; Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Raidaru, G.; Knapp, S.; Uri, A. Selective Bisubstrate Inhibitors with Sub-Nanomolar Affinity for Protein Kinase Pim-1. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 909–913, doi:[10/f2cgfj](https://doi.org/10.1002/cmdc.201300211).

carbonate de potassium dans le DMF.³⁹⁰ Cependant, ces conditions, utilisées dans la littérature sur un dérivé bromé en position 6, ont abouti à la formation d'un mélange complexe au sein duquel le produit attendu n'a pas été identifié (**Schéma 78**).

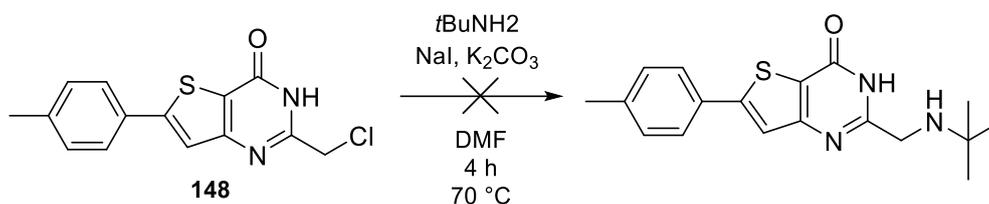


Schéma 78. Tentative de synthèse d'un dérivé 2-*tert*butylaminométhyl.

4.2. Remplacement de l'azote en position 2 par un autre hétéroatome

Dans la même optique visant à introduire un nouvel hétéroatome en position 2, la synthèse potentielle de composés 2-alkoxy ou 2-alkylthiol a été envisagée (**Schéma 79**, molécule **a**). Pour cela, un intermédiaire 2-chlorothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Schéma 79**, molécule **b**) est nécessaire pour pouvoir réaliser les substitutions nucléophiles donnant les dérivés souhaités. Cet intermédiaire peut être obtenu en partant d'un aminoester du thiophène (**Schéma 79**, molécule **e**), transformé en thiéno[3,2-*d*]pyrimidine-2,4-diol puis en 2,4-dichlorothiéno[3,2-*d*]pyrimidine.³⁹¹ Cette dernière serait ensuite oxydée sélectivement en position 4 pour obtenir l'intermédiaire 2-chlorothiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.³⁹²

³⁹⁰ Kurasawa, O.; Homma, M.; Oguro, Y.; Miyazaki, T.; Mori, K.; Uchiyama, N.; Iwai, K.; Ohashi, A.; Hara, H.; Yoshida, S.; et al. 2-Aminomethylthieno[3,2-*d*]Pyrimidin-4(3*H*)-Ones Bearing 3-Methylpyrazole Hinge Binding Moiety: Highly Potent, Selective, and Time-Dependent Inhibitors of Cdc7 Kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3658–3670, doi:[10/gbmv3x](https://doi.org/10/gbmv3x).

³⁹¹ Xiao, Z.; Zhou, Z.; Chu, C.; Zhang, Q.; Zhou, L.; Yang, Z.; Li, X.; Yu, L.; Zheng, P.; Xu, S.; et al. Design, Synthesis and Antitumor Activity of Novel Thiophene-Pyrimidine Derivatives as EGFR Inhibitors Overcoming T790M and L858R/T790M Mutations. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *203*, 112511, doi:[10/gng5mf](https://doi.org/10/gng5mf).

³⁹² Huang, L.; Li, H.; Li, L.; Niu, L.; Seupel, R.; Wu, C.; Cheng, W.; Chen, C.; Ding, B.; Brennan, P.E.; et al. Discovery of Pyrrolo[3,2-*d*]Pyrimidin-4-One Derivatives as a New Class of Potent and Cell-Active Inhibitors of P300/CBP-Associated Factor Bromodomain. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4526–4542, doi:[10/gng5mj](https://doi.org/10/gng5mj).

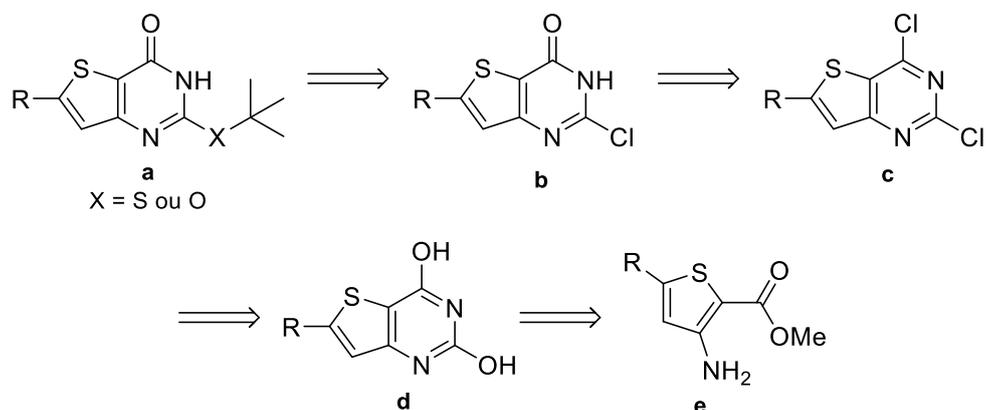


Schéma 79. Voie de synthèse envisagée pour obtenir des composés avec un hétéroatome (X = O ou S) autre que l'azote en position 2.

La première étape a consisté à faire réagir notre aminoester à la fusion de l'urée. Cette réaction est décrite dans la littérature avec un aminoester du thiophène non substitué.³⁹¹ Malgré un chauffage à très forte température (jusqu'à 160 °C par chauffage classique), le produit attendu ne s'est pas formé (**Schéma 80**). La présence de la chaîne latérale contrairement à ce qui est décrit dans la littérature pourrait rendre la matière première non soluble dans l'urée, empêchant ainsi la réaction de se produire.

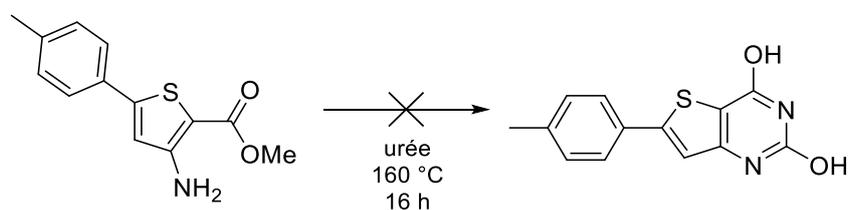


Schéma 80. Tentative de synthèse d'une thiénylpyrimidine-di-ol.

4.3. Synthèse de dérivés comportant un carbocycle saturé en position 6

Parmi les possibles remplacements pour le cycle phényle en position 6, on retrouve les carbocycles saturés.³⁹³ Ces carbocycles permettent de « s'échapper du plat pays » (en référence à la planéité des cycles aromatiques) : Il a été montré qu'augmenter la proportion de carbones sp^3 (appelée aussi fraction sp^3) au sein de composés d'intérêt biologique permet d'améliorer des paramètres comme la solubilité³⁹⁴ ou la toxicité.³⁹⁵ De plus, l'amélioration ou la découverte de nouvelles méthodes de synthèse permettent aussi une introduction

³⁹³ Subbaiah, M.A.M.; Meanwell, N.A. Bioisosteres of the Phenyl Ring: Recent Strategic Applications in Lead Optimization and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 14046–14128, doi:[10/gng554](https://doi.org/10/gng554).

³⁹⁴ Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6752–6756, doi:[10/fg4knf](https://doi.org/10/fg4knf).

³⁹⁵ Lovering, F. Escape from Flatland 2: Complexity and Promiscuity. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 515, doi:[10/gng558](https://doi.org/10/gng558).

simplifiée de ces structures dans des composés d'intérêt. Parmi ces cycles, on peut citer le cyclohexane (isostère le plus proche d'un phényle) mais aussi des cycles plus complexes tels que l'adamantane, le cubane ou le bicyclo[1.1.1]pentane (**Figure 70**).



Figure 70. Principaux carbocycles isostères du phényle.

Nous avons sélectionné l'acétylecyclohexane et l'acétyleadamantane (disponibles commercialement à faible coût) afin de pouvoir synthétiser les aminoesters du thiophène comportant ces carbocycles en position 5 (**Schéma 20**). Malheureusement, la première étape visant à obtenir un β -chloroacrylonitrile à partir de la cétone ne fonctionne pas lorsque le substituant de la cétone n'est pas un cycle aromatique (**Schéma 81**).

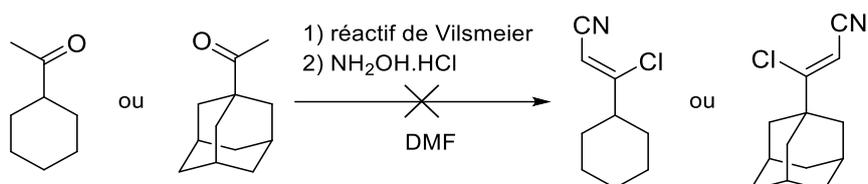


Schéma 81. Tentative de synthèse de β -chloroacrylonitrile sur des carbocycles.

La voie de synthèse obtenir les aminoesters du thiophène ne fonctionnant pas, nous avons alors testé la synthèse des intermédiaires permettant d'obtenir les intermédiaires en série furane. Mais en partant du cyclohexanecarboxylate de méthyle, il n'a pas été possible de former le 3-cyclohexyl-3-oxopropanenitrile (**Schéma 82**), substrat requis pour la synthèse de l'ainoester du furane. Comme précédemment, les conditions étaient décrites sur des substrats possédant un substituant aryle.³⁹⁶

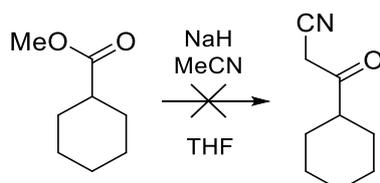


Schéma 82. Tentative de synthèse du 3-cyclohexyl-3-oxopropanenitrile.

³⁹⁶ Havel, S.; Khirsariya, P.; Akavaram, N.; Paruch, K.; Carbain, B. Preparation of 3,4-Substituted-5-Aminopyrazoles and 4-Substituted-2-Aminothiazoles. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 15380–15405, doi:[10/gnhc8j](https://doi.org/10/gnhc8j).

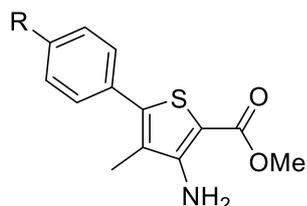
5. Experimental part

5.1. Materials and methods

See Chapitre 3 : 6.1. Materials and methods for details.

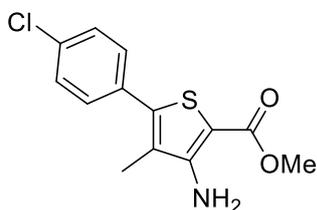
5.2. C-H arylation

General procedure



Methyl 3-amino-4-methylthiophene-2-carboxylate (2 eq), appropriate 4-bromoaryl (1 eq), palladium acetate (1 mol%) and potassium acetate (2 eq) were placed under nitrogen atmosphere then dissolved in dimethylacetamide (1 mL/mmol of thiophene) and the obtained solution was stirred for 18 h at 120 °C. The reaction solution was poured into water (100 mL) then extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic phase was washed with brine (2 x 150 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified with the appropriate method affording the desired product.

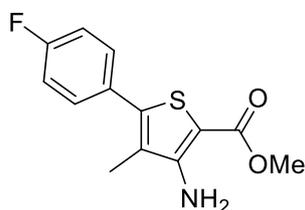
methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate **134**



Chemical Formula: $C_{13}H_{12}ClNO_2S$
Exact Mass: 281,0277
Molecular Weight: 281,7540

Following the general procedure starting from 1-bromo-4-chlorobenzene (0.192 g, 1 mmol), the obtained crude was purified *via* two flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate as an off-white solid (0.160 g, 57 % yield). Analytical data in accordance with literature.^{387, 386}

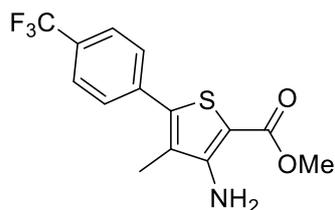
methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate **135**



Chemical Formula: $C_{13}H_{12}FNO_2S$
Exact Mass: 265,0573
Molecular Weight: 265,3024

Following the general procedure starting from 1-bromo-4-fluorobenzene (0.350 g, 2 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % petroleum ether to petroleum ether/ethyl acetate 90:10) affording methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate as a white solid (0.185 g, 33 % yield). Analytical data in accordance with literature.^{387, 386}

methyl 3-amino-4-methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate **136**



Chemical Formula: C₁₄H₁₂F₃NO₂S

Exact Mass: 315,0541

Molecular Weight: 315,3102

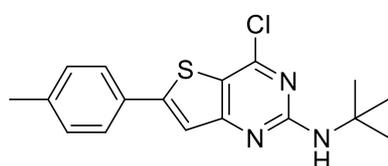
Following the general procedure starting from 1-bromo-4-(trifluoromethyl)benzene (0.450 g, 2 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) and if needed, the fractions of interest were triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-4-methyl-5-[4-

(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a white solid (0.311 g, 49 % yield).

Analytical data in accordance with literature.^{387, 386}

5.3. Sonogashira couplings at position 4

N-*tert*-butyl-4-chloro-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine **140**



Chemical Formula: C₁₇H₁₈ClN₃S

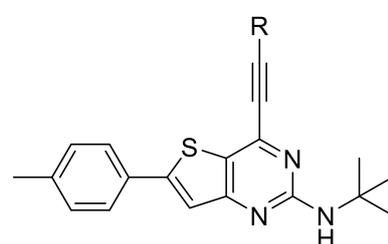
Exact Mass: 331,0910

Molecular Weight: 331,8620

To a solution of 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.7 g, 2.23 mmol) in acetonitrile (35 mL) was added *N,N*-dimethylaniline (198 μL, 1.56 mmol) and the solution was cooled down to 0 °C. Phosphoryl chloride (1.14 mL, 12.3 mmol) was added

dropwise and the solution was stirred 2 h at room temperature then 18 hours at 85 °C. The reaction mixture was put at 40 °C, water (80 mL) was added and the obtained suspension was stirred 2 h at 40 °C. The suspension was filtered affording *N*-*tert*-butyl-4-chloro-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine as a beige solid (0.620 g, 84 % yield) which was used without further purifications.

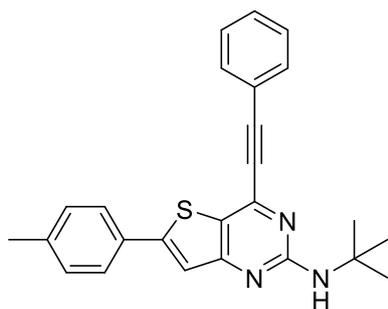
General procedure



Under nitrogen atmosphere, the appropriate 2-amino-6-bromothienopyrimidinone, the appropriate alkyne, copper iodide (16% mol), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (4% mol) and triethylamine (10 eq) were dissolved in dry acetonitrile (1:1 v:v with triethylamine). The obtained

suspension was stirred for 10 min under microwave irradiation at 100 °C. Water (20 times the quantity of acetonitrile) was added to the reaction mixture which was then extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water and the excess was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* the appropriate method.

N-tert-butyl-6-(4-methylphenyl)-4-(phenylethynyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-2-amine 141



Chemical Formula: C₂₅H₂₃N₃S

Exact Mass: 397,1613

Molecular Weight: 397,5400

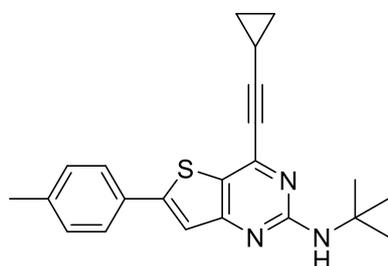
Following the general procedure starting from *N*-tert-butyl-4-chloro-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine (0.26 g, 0.78 mmol) and phenylacetylene (103.2 μ L, 0.94 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and dichloromethane). Fraction of interests were triturated in *n*-pentane affording

N-tert-butyl-6-(4-methylphenyl)-4-

(phenylethynyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine as yellow

solid (109 mg, 35 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.91 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H), 7.73-7.65 (m, 3H), 7.60-7.49 (m, 3H), 7.32 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.1, 160.7, 152.8, 143.6, 140.0, 132.1 (2C), 130.5, 129.9 (2C), 129.8, 129.1 (2C), 126.3 (2C), 120.9, 120.2, 118.8, 94.3, 85.3, 50.3, 28.6, (3C), 20.9. mp = 155-157 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₅H₂₄N₃S [M+H]⁺ 398.1685, found 398.1678.

N-tert-butyl-4-(cyclopropylethynyl)-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-2-amine 142



Chemical Formula: C₂₂H₂₃N₃S

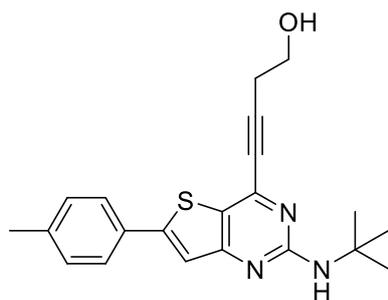
Exact Mass: 361,1613

Molecular Weight: 361,5070

Starting from *N*-tert-butyl-4-chloro-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine (0.32 g, 0.96 mmol) and ethynylcyclopropane (409 μ L, 4.82 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording *N*-tert-butyl-4-(cyclopropylethynyl)-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine as a dark brown solid (165 mg, 47 %

yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.77 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.30 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.76-1.68 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.09-1.01 (m, 2H), 0.91-0.82 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.7, 160.1, 152.4, 144.3, 139.9, 129.9, 129.8 (2C), 126.2 (2C), 118.7, 101.1, 72.4, 50.2, 28.6 (3C), 26.3, 20.9, 9.33 (2C), -0.3. mp = 97-99 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₂₄N₃S [M+H]⁺ 362.1685, found 362.1685.

4-[2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]but-3-yn-1-ol 143



Chemical Formula: C₂₁H₂₃N₃OS
Exact Mass: 365,1562
Molecular Weight: 365,4950

Starting from *N-tert*-butyl-4-chloro-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine (0.32 g, 0.96 mmol) and but-3-yn-1-ol (219 μ L, 2.89 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (one with dichloromethane and methanol and one with cyclohexane and ethyl acetate) affording 4-[2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]but-3-yn-1-ol as a yellow solid (24 mg, 7 % yield). ¹H NMR

(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.77 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.31 (d, ³*J* = 8 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 5.01 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 1H), 3.69-3.61 (m, 2H), 2.71 (t, ³*J* = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.8, 160.7, 152.6, 144.3, 139.9, 129.9 (3C), 126.3 (2C), 120.8, 118.7, 95.8, 77.9, 59.3, 50.2, 28.6 (3C), 23.2, 20.9. mp = 143-145 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₁H₂₄N₃OS [M+H]⁺ 366.1635, found 366.1636.

5.4. Cyclisations

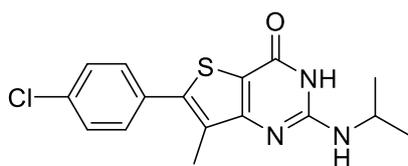
General procedure

To a solution of the appropriate functionalised methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2.25 mL per 100 mg) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (1 eq) and the solution was stirred for 2 h at room temperature. To the reaction mixture was added *tert*-butylamine, isopropylamine or cyclobutylamine (2 eq), triethylamine (3 eq) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.05 eq) and it was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred at 170 °C under microwave irradiation for 2 h. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.
- If no precipitate was obtained, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

6-(4-chlorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

137

Chemical Formula: C₁₆H₁₆ClN₃OS

Exact Mass: 333,0703

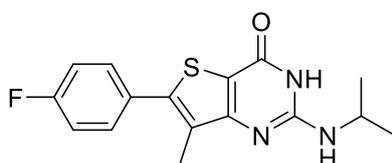
Molecular Weight: 333,8340

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate (0.330 g, 1.17 mmol) and isopropylamine (201 μ L, 2.34 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol)

and the fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 6-(4-chlorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (0.165 g, 42 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.67 (s, 1H), 7.62-7.53 (m, 4H), 6.17 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H), 4.15-4.00 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.20 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.4, 157.9, 152.6, 142.6, 133.4, 132.7, 130.3 (2C), 129.1, 129.0 (2C), 110.8, 42.3, 22.3 (2C), 12.1. mp = 251-253 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇ClN₃OS [M+H]⁺ 334.0775, found 334.0778.

6-(4-fluorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

138

Chemical Formula: C₁₆H₁₆FN₃OS

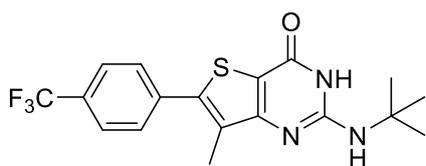
Exact Mass: 317,0998

Molecular Weight: 317,3824

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate (0.180 g, 0.64 mmol) and isopropylamine (110 μ L, 1.28 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording

6-(4-fluorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (29 mg, 16 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 6.16 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H), 4.15-4.01 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.20 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.2 (d, ¹*J* = 247 Hz, 1C), 159.4, 157.9, 152.6, 143.0, 130.8 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2C), 130.3 (d, ⁴*J* = 3.5 Hz, 1C), 128.7, 116.0 (d, ²*J* = 21.8 Hz, 2C), 110.6, 42.3, 22.4 (2C), 12.0. mp = 242-244 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇FN₃OS [M+H]⁺ 318.1071, found 318.1076.

2-*tert*-butylamino-7-methyl-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **139**



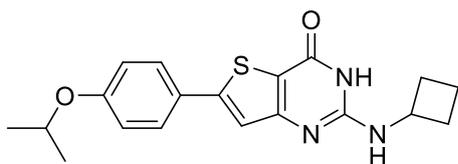
Chemical Formula: C₁₈H₁₈F₃N₃OS

Exact Mass: 381,1123

Molecular Weight: 381,4172

Following the general procedure from methyl 3-amino-4-methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.305 g, 0.97 mmol) and *tert*butylamine (203 μ L, 1.94 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-7-methyl-6-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (0.196 g, 53 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.54 (s, 1H), 7.86 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 7.80 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H), 6.14 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.45 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.2, 157.8, 152.1, 142.0, 137.9, 130.0, 129.3 (2C), 128.7 (q, ²*J* = 32.1 Hz, 1C), 125.9 (q, ³*J* = 3.8 Hz, 2C), 124.1 (q, ¹*J* = 272 Hz, 1C), 111.4, 51.1, 28.5 (3C), 12.1. mp = 264-266 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₁₉F₃N₃OS [M+H]⁺ 382.1195, found 382.1196.

2-cyclobutylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **144**



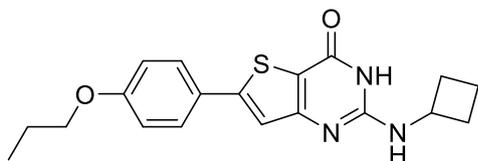
Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₃O₂S

Exact Mass: 355,1354

Molecular Weight: 355,4560

Following the general procedure from methyl 3-amino-5-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.553 g, 1.90 mmol) and cyclobutylamine (324 μ L, 3.80 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) and the fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-cyclobutylamino-6-[4-(propan-2-yloxy)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.212 g, 31 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 7.68 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 6.98 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.53 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 4.73-4.62 (m, 1H), 4.39-4.26 (m, 1H), 2.34-2.21 (m, 2H), 1.93-1.83 (m, 2H), 1.74-1.59 (m, 2H), 1.28 (d, ³*J* = 6.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 158.4, 157.6, 152.3, 150.3, 127.4 (2C), 125.3, 118.8, 116.0 (2C), 110.8, 69.4, 45.5, 30.6 (2C), 21.8 (2C), 14.6. mp = 263-265 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 356.1427, found 356.1420.

2-cyclobutylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **145**



Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₃O₂S

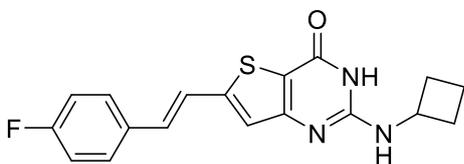
Exact Mass: 355,1354

Molecular Weight: 355,4560

Following the general procedure from methyl 3-amino-5-(4-propoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.740 g, 2.54 mmol) and cyclobutylamine (434 μ L, 5.08 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and

methanol) and the fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-cyclobutylamino-6-(4-propoxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.300 g, 33 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.66 (s, 1H), 7.69 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.00 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 6.53 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 4.39-4.27 (m, 1H), 3.97 (t, ³*J* = 6.5 Hz, 2H), 2.34-2.22 (m, 2H), 1.97-1.83 (m, 2H), 1.80-1.60 (m, 4H), 0.98 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 159.6, 157.6, 152.3, 150.3, 127.3 (2C), 125.4, 118.8, 115.1 (2C), 110.8, 69.1, 45.5, 30.6 (2C), 22.0, 14.6, 10.4. mp = 238-240 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 356.1427, found 356.1419.

2-cyclobutylamino-6-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **146**



Chemical Formula: C₁₈H₁₆FN₃OS

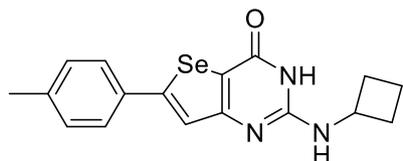
Exact Mass: 341,0998

Molecular Weight: 341,4044

Following the general procedure from methyl 3-amino-5-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thiophene-2-carboxylate (0.705 g, 2.54 mmol) and cyclobutylamine (434 μ L, 5.09 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and

methanol) and the fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-cyclobutylamino-6-[(*E*)-2-(4-fluorophenyl)ethenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (0.320 g, 37 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.69 (s, 1H), 7.72-7.64 (m, 2H), 7.43 (d, ³*J* = 16.2 Hz, 1H), 7.28-7.11 (m, 4H), 6.54 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H), 4.39-4.24 (m, 1H), 2.34-2.21 (m, 2H), 1.97-1.83 (m, 2H), 1.75-1.59 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.1 (d, ¹*J* = 246 Hz, 1C), 159.9, 157.6, 152.3, 148.7, 132.6 (d, ⁴*J* = 3.3 Hz, 1C), 130.2, 128.9 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2C), 122.6, 121.6 (d, ⁵*J* = 2.7 Hz, 1C), 115.8 (d, ²*J* = 21.7 Hz, 2C), 111.1, 45.5, 30.6 (2C), 14.6. mp = 265-267 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₁₇FN₃OS [M+H]⁺ 342.1071, found 342.1072.

2-cyclobutylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **147**



Chemical Formula: C₁₇H₁₇N₃OSe

Exact Mass: 359,0537

Molecular Weight: 358,3030

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate (0.260 g, 0.88 mmol) and cyclobutylamine (151 μ L, 1.77 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol)

affording 2-cyclobutylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige solid (0.170 g, 54 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.67 (bs, 1H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.25 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 2H), 4.39-4.25 (m, 1H), 2.38-2.23 (m, 5H), 1.97-1.84 (m, 2H), 1.75-1.60 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.3, 158.8, 154.9, 152.7, 139.2, 132.1, 129.8 (2C), 126.1 (2C), 122.9, 112.7, 45.5, 30.6 (2C), 20.8, 14.6. mp = 262-264 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₁₈N₃OSe [M+H]⁺ 360.0610, found 360.0614.

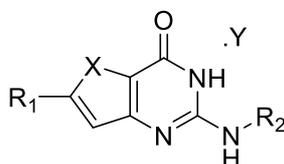
Chapitre 6 : Résultats biologiques supplémentaires et étude RSA

1. Criblage secondaire : Activité sur le stade hépatique

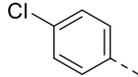
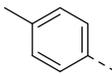
1.1. Molécules testées

Parmi les composés synthétisés, 7 des 19 composés possédant une CE_{50} inférieure à $1 \mu\text{M}$ sur le stade sanguin de *P. falciparum* ont été testés pour déterminer leur activité sur le stade hépatique du paludisme (**Tableau 45**). Ce choix s'est fait sur la cytotoxicité ou la solubilité dans les milieux de test ainsi que les résultats de molécules structuralement proches.

Tableau 45. Récapitulatif des molécules possédant une activité antiplasmodiale inférieure à $1 \mu\text{M}$. Les composés en vert ont été testés sur le stade hépatique.



N°	R ₁	R ₂	X	.Y	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
43		tBu	S	-	0,09 ± 0,01	20,7 ± 4,1
44		iPr	S	-	0,2 ± 0,03	3,3 ± 1,8
45		tBu	S	-	0,8 ± 0,2	9,2 ± 3,1
45s		tBu	S	HCl	0,9 ± 0,2	10,8 ± 1,8
49		iPr	S	-	0,5 ± 0,03	23,6 ± 3,3
49s		iPr	S	-	0,5 ± 0,03	18,1 ± 4,6
52		iPr	S	-	0,4 ± 0,01	13,6 ± 0,1
57		tBu	S	-	0,7 ± 0,3	> 12,5
57s		tBu	S	HCl	0,5 ± 0,06	> 25
59		tBu	S	-	0,8 ± 0,5	> 12,5
59s		tBu	S	HCl	0,9 ± 0,6	> 25
63		tBu	S	-	0,8 ± 0,4	6,1 ± 1,7
96		tBu	S	-	0,77 ± 0,13	33,9 ± 1,4
126		tBu	O	-	0,8 ± 0,3	10,9
126s		tBu	O	HCl	0,3 ± 0,02	21,7 ± 0,5
127		iPr	O	-	0,09 ± 0,02	20,4 ± 3,2

128		tBu	O	-	0,4 ± 0,1	> 6,25
133		iPr	Se	-	0,8 ± 0,2	> 25
133s				HCl	0,77 ± 0,13	> 10

Les composés **96**, **127** et **133** n'ont pas encore, suite à leur récente synthèse et évaluation biologique lors du criblage primaire, été testé. La solubilité dans le milieu de test de **128** et la cytotoxicité de **44** et **63** nous ont poussés à ne pas les tester. Enfin des choix ont été faits entre les différents composés *versus* leur chlorhydrate en privilégiant leur valeur CE₅₀ puis leur valeur CC₅₀ (par exemple **49** vs **49s**).

1.2.Principe du test sur le stade hépatique

1.2.1. Modèles employés

Le test d'activité sur le stade hépatique est effectué sur deux modèles biologiques différents.³⁹⁷ En première intention, ce sont des hépatocytes de macaque (*Macaca fascicularis*) infectés par *P. berghei* qui ont été utilisés. Il peut sembler troublant d'utiliser une espèce murine de *Plasmodium* pour infecter des hépatocytes simiens. Ces derniers sont utilisés à la place d'hépatocytes murins car ils sont plus robustes et simples à cultiver alors que l'utilisation d'hépatocytes murins nécessite le sacrifice d'un nombre important de souris, posant ainsi des problèmes d'ordre éthique. En revanche, le modèle a comme inconvénient d'avoir des parasites qui sont nettement plus difficiles à tuer par rapport à *P. berghei* dans des hépatocytes murins ou *P. falciparum* dans des hépatocytes humains. A titre de comparaison, le composé M1 possède une activité de 0,45 µM sur hépatocytes murins infectés par *P. yoelii* et hépatocytes humains infectés par *P. falciparum* alors que celle-ci monte à 17,56 µM sur hépatocytes murins infectés par *P. berghei*. Les meilleurs composés seront ensuite testés sur hépatocytes humains cryopréservés infectés par *P. falciparum*, modèle de référence pour l'activité *in vitro* sur le stade hépatique.

³⁹⁷ Ashraf, K.; Tajeri, S.; Arnold, C.-S.; Amanzougaghene, N.; Franetich, J.-F.; Vantaux, A.; Soulard, V.; Bordessoulles, M.; Cazals, G.; Bousema, T.; van Gemert, G.-J.; Le Grand, R.; Dereuddre-Bosquet, N.; Barale, J.-C.; Witkowski, B.; Snounou, G.; Duval, R.; Botté, C.Y.; Mazier, D. Artemisinin-Independent Inhibitory Activity of *Artemisia* Sp. Infusions against Different *Plasmodium* Stages Including Relapse-Causing Hypnozoites. *Life Sci. Alliance* **2022**, *5*, e202101237, doi:[10/gnsmv5](https://doi.org/10/gnsmv5).

1.2.2. Déroulement du test

Les hépatocytes sont placés 24 heures en culture dans une plaque 96 puits afin qu'ils puissent adhérer au fond des puits, puis sont infectés par des sporozoïtes. Les hépatocytes infectés sont ensuite incubés en présence de la molécule testée (ou du DMSO pour le témoin négatif) pendant 2 jours pour *P. berghei* ou 6 jours pour *P. falciparum*. Ce temps d'incubation correspond au temps de développement nécessaire du parasite au sein d'hépatocytes pour voir apparaître les premiers mérozoïtes hors des hépatocytes. Une fois ce temps d'incubation passé, la culture est fixée et un immunomarquage est réalisé.

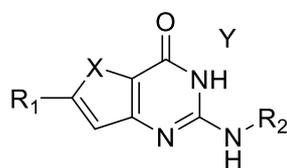
L'immunomarquage est une méthode employant des anticorps afin de pouvoir marquer des protéines. Dans notre test sur le stade hépatique de *Plasmodium*, un premier anticorps est utilisé pour se fixer sur la protéine PfHSP70. Puis, un second anticorps, sur lequel est greffé une molécule fluorescente, va venir se fixer sur le premier anticorps employé. On parle d'immunomarquage indirect par fluorescence. En plus de cet immunomarquage, un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), composé fluorescent se fixant à l'adénine et à la thymine, permet de marquer les noyaux des hépatocytes et des parasites. Des photos sont prises du puit (sous UV pour permettre la fluorescence) et un traitement informatique (comptage, prise en compte de la forme des parasites, détection des faux positifs) est réalisé.

Deux paramètres vont ainsi être mesurés : le nombre de formes exoérythrocytaires (FEE) et la taille des FEE. Ce premier paramètre va permettre de définir la CE₅₀ pour le composé testé : concentration pour laquelle on observe une réduction de 50 % du nombre de FEE par rapport au contrôle. Il est aussi possible de déterminer la CC₅₀ sur les hépatocytes en cas de toxicité observé du composé sur ceux-ci.

1.1. Résultats des tests sur le stade hépatique

Six composés ont ainsi été testés sur des hépatocytes de singes infectés par *P. berghei* (Tableau 46 et Annexe 4).

Tableau 46. Activité plasmodiale sur hépatocytes simiens infectés par *P. berghei*.



N°	R ₁	R ₂	X	Y	CE ₅₀ <i>Pb</i> (hépatocytes simiens, μM)
45		<i>t</i> Bu	S	-	Entre 5,5 et 16
49		<i>i</i> Pr	S	-	> 16
52		<i>i</i> Pr	S	-	> 20
57s		<i>t</i> Bu	S	HCl	Entre 10 et 20
59s		<i>t</i> Bu	S	HCl	> 20
126s			O	HCl	> 20
	M1				17,56

Pour **49**, **52** et **126s**, on observe seulement un effet sur la taille des FEE à 16 ou 20 μM. Le composé **59s** a lui une activité sur le nombre de FEE mais bien plus réduite que celle de **57s**. Ce dernier et le composé **45** possèdent des activités améliorées par rapport au composé M1 sur ce modèle. De plus, pour tous les composés, aucune cytotoxicité n'a été observée sur les hépatocytes aux concentrations testées. Cela est important à noter surtout pour le composé **45** qui possède une cytotoxicité moyenne sur les cellules HepG2 (CC₅₀ = 9,2 μM). **45** et **57s** sont en cours de test sur le modèle de référence : hépatocytes humains infectés par *P. falciparum*. À la vue des résultats prometteurs de **43** et puisque le test sur hépatocytes humains permettait de tester 3 composés simultanément, celui-ci a directement été testé sur ce modèle.

2. Criblage secondaire : mesure de la stabilité métabolique

2.1.Principe du test

Pour mesurer la stabilité métabolique de nos composés, ceux-ci ont été incubés en présence de microsomes hépatiques de souris femelles. Ce test est réalisé par la plateforme ADMET de l'Institut Pasteur de Lille.

Ces microsomes sont des fragments sous forme de vésicules du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes de souris, isolés par ultracentrifugation. Ces microsomes vont simuler le métabolisme hépatique de phase I (réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse etc...) ciblant le composé testé. Celui-ci est incubé en présence de microsomes pendant 40 minutes et la mesure de la concentration du produit testé à plusieurs moments permet ensuite de réaliser une analyse statistique permettant de déterminer deux paramètres : le temps de demi-vie et la clairance intrinsèque.

Le temps de demi-vie représente le temps nécessaire (exprimé en minutes) pour faire diminuer la quantité de produit de 50 %. Au bout de 5 fois ce temps, on considère le produit comme étant éliminé. La clairance intrinsèque (exprimée en $\mu\text{L}/\text{min}$ par mg de microsome) est une autre valeur permettant d'évaluer la rapidité avec laquelle une molécule est éliminée par le métabolisme.

2.2.Résultats

Cinq produits ont vu leur stabilité microsomale être évaluée.

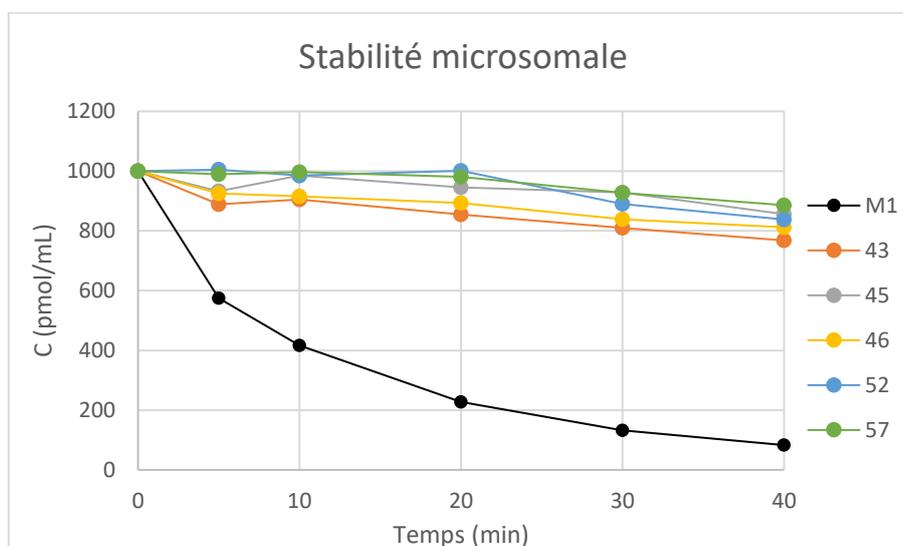
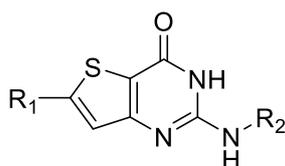


Figure 71. Evolution de la concentration du composé testé incubé en présence de microsomes hépatiques de souris femelles.

Tableau 47. Récapitulatif des valeurs de demi-vie et de clairance intrinsèque pour les composés testés.

N°	R ₁	R ₂	t _{1/2} (min)	CL _{int} (μL/min/mg de protéine) ^a	% restant après 40 min
43		tBu	> 40	19	77
45		tBu	> 40	15,9	86
46		iPr	> 40	16	81
52		iPr	> 40	25,1	84
57		tBu	> 40	15,7	89
	M1		11	240	8
	Chloroquine		-	-	75 ³⁹⁸ (après 30 min)

a) La clairance est considérée faible si < 20 μL/min/mg et forte si > 100 μL/min/mg.³⁹⁹

Les résultats nous montrent que la modification du substituant en position *para* du cycle phényle nous a permis d'améliorer grandement la stabilité métabolique de nos composés avec des t_{1/2} supérieures à 40 minutes pour **43**, **45** et **57**. Le substituant *tert*-butyle en position 2 n'est pas très sensible au métabolisme. La comparaison entre **45** et **46** nous permet de conclure qu'il n'y a pas de différence majeure concernant la sensibilité au métabolisme oxydatif en la *tert*-butylamine et l'*isopropylamine*. Bien que la t_{1/2} soit supérieure à 40 minutes pour le composé **52**, sa CL_{int} supérieur à 20 laisse à penser que linker alcène est relativement sensible au métabolisme.

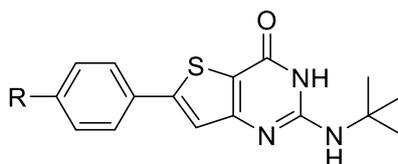
³⁹⁸ Basilio, N.; Parapini, S.; Sparatore, A.; Romeo, S.; Misiano, P.; Vivas, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Habluetzel, A.; Lucantoni, L.; Renia, L.; Russell, B.; Suwanarusk, R.; Nosten, F.; Dondio, G.; Bigogno, C.; Jabes, D.; Taramelli, D. In Vivo and In Vitro Activities and ADME-Tox Profile of a Quinolizidine-Modified 4-Aminoquinoline: A Potent Anti-P. Falciparum and Anti-P. Vivax Blood-Stage Antimalarial. *Molecules* **2017**, *22*, 2102, doi:[10/gmjh2n](https://doi.org/10/gmjh2n).

³⁹⁹ Brian Houston, J. Utility of in Vitro Drug Metabolism Data in Predicting in Vivo Metabolic Clearance. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *47*, 1469–1479, doi:[10/c9k5np](https://doi.org/10/c9k5np).

- **73** avec son groupement thiométhyle possède une activité améliorée par rapport à l'analogue méthoxy ($CE_{50} > 5 \mu M$)²⁶¹ mais une solubilité dans le milieu de test diminuée ;
- L'introduction d'une sulfoximine sur le composé **80** améliore grandement la solubilité dans le milieu de test de celui-ci dans le test de cytotoxicité.

Le blocage du métabolisme oxydatif avec le remplacement des atomes d'hydrogène du groupement méthyle par des atomes de fluor sur le composé **45** a été une approche concluante et a permis : de conserver l'activité antiplasmodiale sur le stade sanguin et le stade hépatique, d'améliorer fortement la stabilité métabolique (**Tableau 47**) en conservant une bonne cytotoxicité (valeur moyenne sur lignée HepG2 mais absence de cytotoxicité sur hépatocytes simiens).

Tableau 48. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec un substituant *para* du cycle phényle modifié par rapport au composé M1.



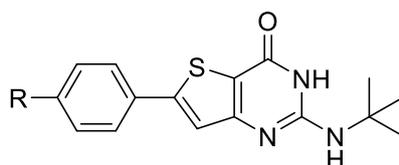
N°	R	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
V ^a	H	1	12,5
A ^a	Me	0,2	25,6
37	MeO ₂ C-	2,5 ± 0,9	> 12,5
45	F ₃ C-	0,8 ± 0,2	9,2 ± 3,1
73	MeS-	1,0 ± 0,3	> 12,5
74	MeO ₂ S-	3,0 ± 0,6	> 25
75	H ₂ NO ₂ S-	> 12,5	> 6,25
77	H ₂ N-	3,5 ± 1,2	2,5 ± 1
79		3,9 ± 1,1	0,16 ± 0,04
80		> 12,5	63,3 ± 14,6

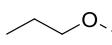
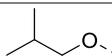
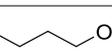
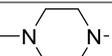
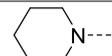
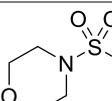
a) voir réf. 261

L'étude de l'encombrement stérique sur la position *para* du cycle phényle s'est faite par la synthèse d'éthers avec des chaînes de longueur variée et des dérivés comportant des hétérocycles saturés (**Tableau 49**). Avec les éthers (**56** à **63**), on observe que l'activité

antiplasmodiale tolère un certain encombrement (entre 2 et 3 atomes de carbone) ; elle est même fortement améliorée avec l'allongement de la chaîne par rapport à un simple groupement méthoxy. L'allongement de la chaîne diminue cependant la solubilité dans le milieu de test et la cytotoxicité des composés mais permet cependant de conserver une activité sur le stade hépatique de *P. falciparum* (**Tableau 46**). Enfin, la chaîne isopropyle de **57** rend ce composé beaucoup moins sensible au métabolisme hépatique (**Tableau 47**) : l'encombrement stérique aurait donc en plus un effet de bouclier stérique vis-à-vis du métabolisme oxydatif. L'introduction d'hétérocycles saturés (**64** à **66** et **76**) est délétère pour l'activité et la cytotoxicité. Un encombrement est donc toléré en *para* du cycle phényle tant que le groupe introduit est de taille moyenne et possède un degré de liberté important dans l'espace.

Tableau 49. Activités antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec des substituants de type éther ou hétérocycle saturé.



N°	R	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
A ^a	Me-	0,2	25,6
K ^a	MeO-	> 5	32,3
56	EtO-	1,0 ± 0,4	> 6,25
57	iPrO-	0,7 ± 0,3	> 12,5
59		0,8 ± 0,5	> 12,5
61		1,1 ± 0,4	> 12,5
62		1,3 ± 0,3	8,5 ± 1,9
63	PhO-	0,8 ± 0,4	6,1 ± 1,7
64		2,4 ± 0,9	7,9 ± 1,3
65		4,1 ± 0,7	5,8 ± 0,5
66		4,1 ± 1,2	> 6,25
76		5,1 ± 2,6	> 12,5

a) voir réf. 261

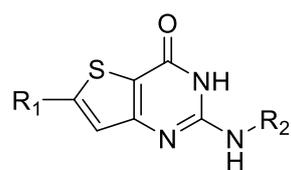
Ces travaux ont aussi permis de confirmer le lien étroit existant entre la substitution sur le cycle phényle et l'amine en position 2 du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, déjà observé dans les travaux aboutissant au composé M1. D'un point de vue des paramètres biologiques du criblage primaire, il est difficile de dire laquelle, entre l'isopropylamine et la *tert*-butylamine, est meilleure. En effet, on observe des composés avec des propriétés diminuées en passant de l'une à l'autre. De plus, leur sensibilité au métabolisme hépatique est similaire *in vitro*. Enfin, la disubstitution ne semble pas être bénéfique pour la série mais il faudrait synthétiser davantage de dérivés, en explorant aussi la position *ortho* du cycle phényle.

La position *para* du cycle phényle semble donc se prêter à des substituants de petite taille (chaîne de 4 atomes de long max). Ces substituants doivent posséder une faible polarité (halogène, méthoxy ou éther plus long).

3.2. Effet sur la nature du cycle en position 6

Le cycle présent à la position 6 du cycle thiénoypyrimidinone est très important pour l'activité antiplasmodiale et la cytotoxicité (**Tableau 50**). Le remplacement du phényle (présent sur les composés **A** et **V**) par des cycles aromatiques azotés non substitués entraîne une perte d'activité antiplasmodiale dans tous les cas explorés. Pour la cytotoxicité, on observe d'un côté soit une forte augmentation (4-pyridines **41** et **42** et pyrazole **70**), soit une nette amélioration (3-pyridines **39** et **40**, et pyrimidine **69**). Devant l'amélioration notable de la cytotoxicité de ces derniers, l'hypothèse retenue a été qu'il manquait un substituant sur le cycle pour obtenir l'activité antiplasmodiale. Cette activité a été retrouvée avec l'introduction d'un groupement méthoxy aboutissant au composé **43**. On retrouve au passage une différence notable, comme évoqué précédemment entre le dérivé *tert*-butyl **43** et le dérivé isopropyl **44**. L'introduction d'hétérocycles saturés (morpholine et *N*-méthylpipérazine) sur le composé **69**, aboutissant à **67** et **68**, ne permet pas d'améliorer l'activité et est délétère pour la cytotoxicité, résultats en accord avec ce qui a été observé pour les composés **64** à **66** (**Tableau 49**). L'introduction directement en position 6 d'hétérocycles saturés par couplage de Buchwald-Hartwig a donné des composés peu cytotoxiques. La présence d'une tête polaire chez le dérivé **95** (avec l'oxygène de la morpholine) est cependant délétère pour l'activité antiplasmodiale, en comparaison de la pipéridine présente sur le composé **96**.

Tableau 50. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec des cycles en position 6 de nature variée.



N°	R ₁	R ₂	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
V ^a		tBu	1	12,5
A ^a		tBu	0,2	25,6
B ^a		iPr	0,8	49,4
39		tBu	5,7 ± 1,7	52,4 ± 11,3
40		iPr	9,7 ± 1,2	> 50
41		tBu	4,3 ± 1,1	4,1 ± 1,3
42		iPr	> 5	4 ± 1,6
43		tBu	0,09 ± 0,01	20,7 ± 4,1
44		iPr	0,2 ± 0,03	3,3 ± 1,8
67		tBu	2,1 ± 0,6	26,4 ± 4,6
68		tBu	4,4 ± 1	11,2 ± 1,3
69		tBu	> 12,5	> 62,5
70		tBu	5,5 ± 2,1	6,1 ± 3,8
95		tBu	4,5 ± 1,1	> 50
96		tBu	0,77 ± 0,13	33,9 ± 1,4

a) voir réf. 261

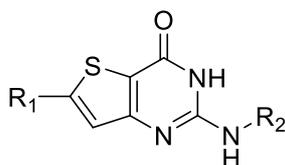
En conclusion, le remplacement du cycle phényle par des hétérocycles azotés aromatiques ou saturés est possible. La substitution de ces cycles est cependant nécessaire pour montrer une activité antiplasmodiale. Ces résultats rendent encore plus nécessaire la synthèse de dérivés avec des carbocycles saturés en position 6.

3.3.Effet du linker entre le cycle phényle et le cycle thiénylpyrimidinone

Trois linkers différents entre ces deux éléments structuraux ont été utilisés : Z-alcène et alcyne (2 atomes) et amine (1 atome).

Pour le linker alcyne (composés **82** et **83**), on a une perte d'activité antiplasmodiale et une hausse de la cytotoxicité, tandis que pour les *Z*-alcènes (composés **48** et **49**), les propriétés biologiques testées lors du criblage primaire sont conservées (**Tableau 51**). L'allongement de la distance entre le phényle et la thiényrimidinone n'est donc pas au premier abord une modification défavorable, à condition de ne pas imposer une configuration dans l'espace comme avec un alcyne. Cependant, on observe une perte d'activité au stade hépatique avec l'introduction de ce linker alcène.

Tableau 51. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés comportant un linker alcyne ou *trans*-alcène.

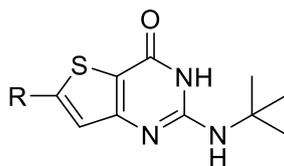


N°	R ₁	R ₂	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
A ^a		<i>t</i> Bu	0,2	25,6
B ^a		<i>i</i> Pr	0,8	49,4
82		<i>t</i> Bu	2,35 ± 0,38	> 12,5
83		<i>i</i> Pr	4,6 ± 1,0	3,1 ± 0,6
48		<i>t</i> Bu	1,1 ± 0,2	29,7 ± 2,1
49		<i>i</i> Pr	0,5 ± 0,03	23,6 ± 3,3

a) voir réf. 261

L'introduction d'un linker comportant une amine secondaire n'a pas non plus été une stratégie positive puisque l'on observe une baisse d'une ou des valeurs biologiques testées (**Tableau 52**). En l'absence de données avec un autre linker (-CH₂-, -O- ou -S-), il est difficile de définir clairement si ces changements sont dûs à la nouvelle orientation de la chaîne latérale ou bien à l'introduction de l'atome d'azote à cette position.

Tableau 52. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés avec ou sans un linker -NH-.



N°	R ₁	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
A ^a		0,2	25,6
M ^a		3,6	14,1
N ^a		1,7	4
90		10,3 ± 0,2	21,7 ± 2,1
91		1,1 ± 0,3	5,3 ± 0,4
92		4,3 ± 0,2	14,1 ± 0,3
K ^a		> 5	32,3
I ^a		> 5	5,1
93		7,2 ± 2,0	24 ± 3,1
94		7,1 ± 1,4	21,3 ± 1,6

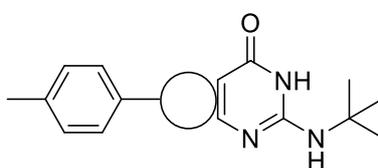
a) voir réf. 261

3.4.Effet de la modification du cycle thiophène

La modification du cycle thiophène en un autre cycle aromatique à 5 chaînons, est une modification de choix pour étudier l'effet sur les paramètres biologiques (**Tableau 53**). Le changement d'orientation du thiophène, amenant au composé **104**, entraîne une perte complète de l'activité antiplasmodiale. C'est bien l'absence d'un hétéroatome en position 5 qui provoque cette perte ; comme l'indiquent les données des autres composés. L'introduction d'un atome d'azote en position 7 réduit l'activité antiplasmodiale mais surtout diminue fortement la solubilité des composés obtenus dans le milieu de test (**Tableau 37**). Le

remplacement de l'atome de soufre par un autre chalcogène (O ou Se) est une alternative possible mais moins intéressante de CE₅₀ et de CC₅₀ légèrement moins bonnes. La série furane notamment semble perdre l'activité sur le stade hépatique (**Tableau 46**) mais cela doit encore être confirmé par le test d'un autre composé, notamment le composé **127**. Les quelques composés en série sélénophène sont capables d'atteindre des activités antiplasmodiales submicromolaires (**132s** et **133s**) mais ceux-ci souffrent d'un manque de solubilité important. La synthèse de dérivés sélénophènes avec des hétérocycles aromatiques azotés pourrait améliorer ce paramètre.

Tableau 53. Activité antiplasmodiale et cytotoxicité pour des composés issus de la stratégie de « *scaffold hopping* ».



N°	Cycle	CE ₅₀ Pfk1 (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)
A ^a		0,2	25,6
104		32,4 ± 5,2	20,5 ± 2,1
112		4,6 ± 1,6	> 5
126		0,8 ± 0,3	10,9 ± 1,1
132		1,3 ± 0,5	> 7,8

a) voir réf. 261

3.5.Effet des autres modifications

L'introduction d'un groupement méthyle en position 7 du cycle thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one n'a pas permis d'obtenir un « effet magique du méthyle » et a entraîné des baisses importantes de l'activité antiplasmodiale (**Tableau 41**). Il s'agit cependant de la première modification effectuée sur la position 7. L'introduction d'autres groupements simples (halogène, OH, MeO etc...) pourrait être une possibilité mais risque de se heurter à des difficultés en termes d'accès synthétique.

Le remplacement de la fonction carbonyle en position 4 par des alcynes, beaucoup plus encombrants, a entraîné une perte importante d'activité plasmodiale (**Tableau 42**).

L'intermédiaire chloropyrimidine **140** est un possible intermédiaire clé pour permettre la modulation de la position 4 de manière plus intensive.

Le remplacement de la *tert*-butylamine par une cyclobutylamine confirme l'influence majeur de la nature de l'amine en position 2 sur l'activité (**Tableau 44**), déjà observé dans les travaux aboutissant au composé M1.²⁶¹

3.6. Bilan RSA de la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one

Tous ces travaux de chimie et de biologie font que désormais nous avons à disposition des données RSA couvrant la quasi-totalité de la structure du composé M1 et sont résumées dans le **Schéma 84**.

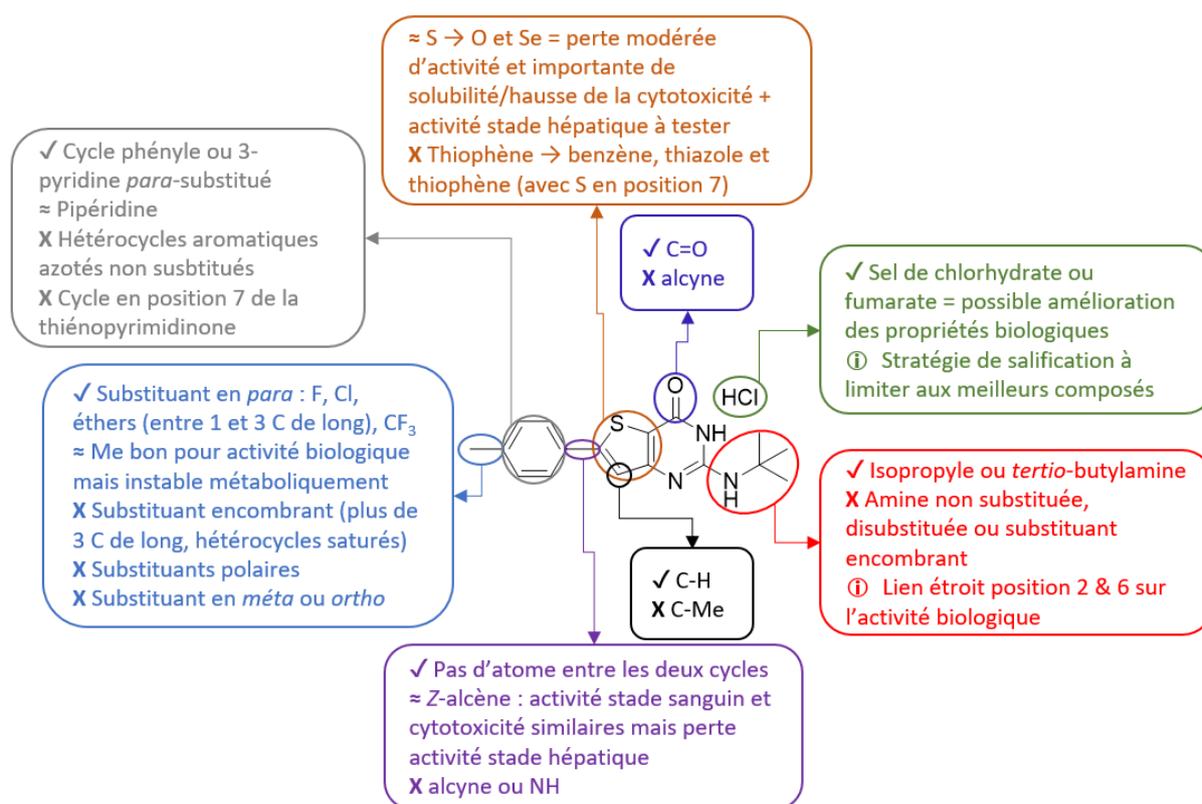


Schéma 84. Données RSA de la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one basées sur ces travaux et les précédents.^{261, 263}

Conclusion générale et perspectives

Le paludisme est la première parasitose en nombre de cas et de décès dans le monde. Malgré un arsenal thérapeutique efficace à disposition, avec principalement les thérapies combinées à base d'artémisinine, *Plasmodium falciparum* a su développer des résistances à ces médicaments. Ce problème et d'autres (impact du covid-19, anophèles résistants aux insecticides, TDR moins efficace, apparition d'anophèles urbains) rendent nécessaire le développement de nouvelles thérapies médicamenteuses pour éliminer le paludisme du continent africain. Les travaux de cette thèse se sont basés sur le composé M1, hit antipaludique possédant une activité sur tous les stades du paludisme mais souffrant d'une forte sensibilité vis-à-vis du métabolisme hépatique et possédant une faible solubilité aqueuse.

Dans le but de trouver un nouveau composé ne possédant pas ces inconvénients majeurs, les pharmacomodulations sur le composé M1, présentées dans cette thèse, ont permis d'obtenir 94 composés qui ont ensuite été testés biologiquement. Ainsi, 67 composés ont été obtenus à partir de réactions de couplages pallado-catalysés : Suzuki-Miyaura, Sonogashira et Buchwald-Hartwig. Ces modulations ont permis d'explorer largement la position 6 du noyau thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Pour le couplage de Buchwald-Hartwig, la mise au point de conditions réactionnelles a été nécessaire afin de réaliser, pour la première fois, ce couplage sur la position 6 de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. L'autre approche majeure dans ces travaux, l'approche « *scaffold hopping* », a permis d'obtenir 17 composés sur 4 séries différentes : thiéno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, séléno-phéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et [1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one.

Ces composés ont été testés dans un premier temps pour mesurer leur activité antiplasmodiale (stade sanguin de *P. falciparum*) et leur cytotoxicité (lignée cellulaire HepG2). Ce criblage primaire a permis d'isoler 19 composés possédant une activité antiplasmodiale inférieure à 1 μ M, la majorité alliée à une bonne cytotoxicité. Certains de ces composés ont été testés sur hépatocytes simiens infectés par *P. berghei* pour mesurer leur activité sur ce stade. La stabilité métabolique pour les meilleurs composés a aussi été déterminée. Ce criblage secondaire nous a permis de retenir 3 composés d'intérêt (**43**, **45** et **57s**, **Schéma 85**) pour lesquels l'activité sur hépatocytes humains infectés par *P. falciparum* est en cours de détermination. Si cette activité est similaire à celle du composé M1, l'objectif de la thèse

d'obtenir un composé avec un profil d'activité similaire mais plus stable métaboliquement et plus soluble en milieu aqueux sera en passe d'être réussi.

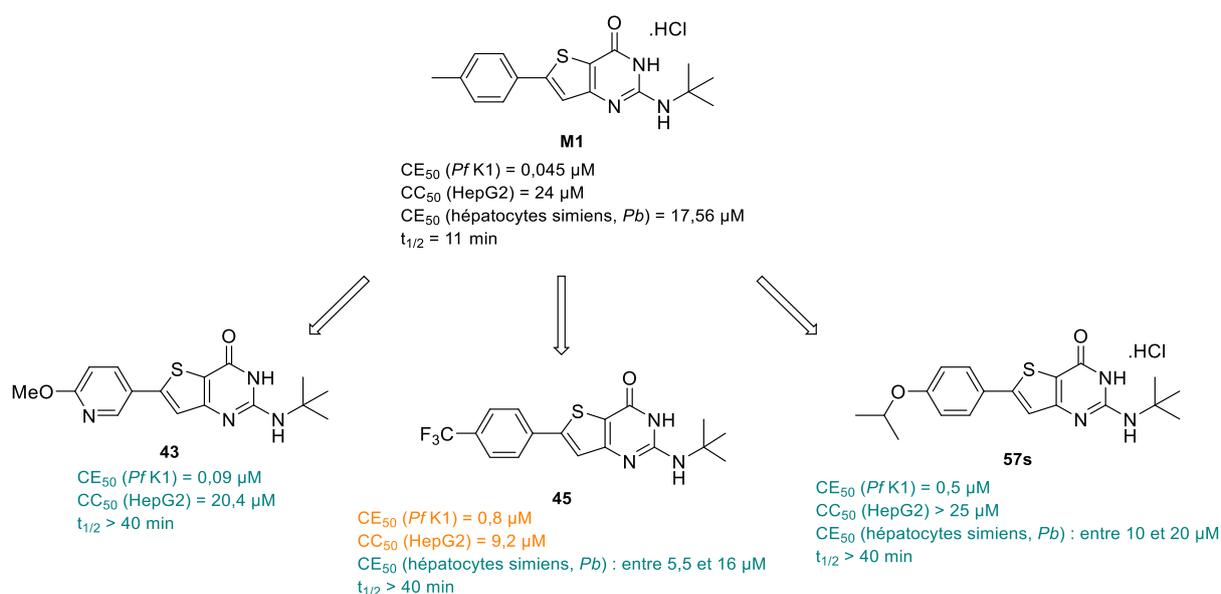


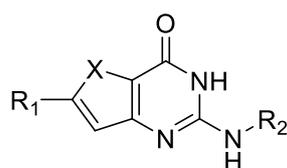
Schéma 85. Meilleurs composés obtenus durant ces travaux de pharmacomodulation.

Enfin, ces travaux nous ont permis d'étoffer grandement les données de relation structure-activité sur la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Schéma 84**). En l'absence de cible définie pour cette série, ces données sont primordiales pour la synthèse d'analogues. Il en ressort principalement que : 1) le substituant *para* du cycle en position 6 de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one est fondamental pour l'activité et les autres données biologiques, 2) la présence d'un hétéroatome en position 5 de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one est nécessaire pour l'activité, et 3) la salification n'est forcément liée à une amélioration significative des paramètres biologiques contrairement au composé M1.

Ces travaux ouvrent des perspectives que ce soit du côté de la synthèse chimique ou bien du côté de l'évaluation des composés déjà synthétisés.

Sur l'aspect chimie, les résultats biologiques intéressants du composé **43** montrent l'intérêt de passer d'un cycle phényle à un hétérocycle azoté en position 6 de la thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. A partir d'un calcul *in silico* du log $D_{7,4}$ et de la solubilité, une chaîne latérale 5-méthoxypyrazin-2-yl offrirait les meilleures valeurs pour ces paramètres, encore plus en série furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (**Tableau 54**).

Tableau 54. Log $D_{7,4}$ et solubilité aqueuse calculés pour divers composés comportant un azahétérocycle aromatique en position 6.



Entrée	R ₁	R ₂	X	Log $D_{7,4}$ ^a	Solubilité aqueuse (pH 7,4, μ M) ^a
M1		tBu	S	4,42	1,2 Valeur expérimentale : 1,6
43			S	3,12	16
43-O		tBu	O	1,67	58
43-Se			Se	1,38	141
MeO-Pyrimidine			S	2,50	15
		tBu	O	1,57	55
			Se	1,72	135
MeO-Pyrazine			S	2,29	309
		tBu	O	0,84	1172
			Se	1,65	2754
			S	2,01	437
		iPr	O	0,56	1585
	Se	1,57	3802		

a) calculé avec le logiciel MarvinSketch

Les dérivés pyrazines semblent donc très intéressants au regard de leur solubilité. La synthèse de ces composés en série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one est une priorité pour confirmer leur activité antiplasmodiale rapidement. Les valeurs du **Tableau 54** nous montrent aussi deux perspectives importantes :

1. La poursuite de la synthèse de dérivés en série furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one et sélénophéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. Bien que pour la première, une baisse d'activité au niveau du stade hépatique a été observée pour le composé **126s** par rapport au M1 (**Tableau 46**) et une baisse de solubilité dans le milieu de test pour les dérivés halogénés **128** et **129** (**Tableau 39**) ; ces deux séries pourraient nous permettre d'obtenir des composés biologiquement intéressants en se servant des meilleures chaînes latérales de la série thiéno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one.

2. A l'heure actuelle, à activité biologique et cytotoxicité comparable, il est impossible de dire quel substituant en position 2, entre la *tert*-butylamine et l'isopropylamine, est le meilleur. En effet, les résultats de stabilité métabolique à disposition ne nous permettent pas de discriminer un groupe meilleur que l'autre. Les calculs *in silico* du **Tableau 54** laissent à penser que l'isopropylamine serait meilleure pour la solubilité du composé. Il sera donc nécessaire de tester la solubilité de l'analogue isopropylamine du M1 pour confirmer cette hypothèse.

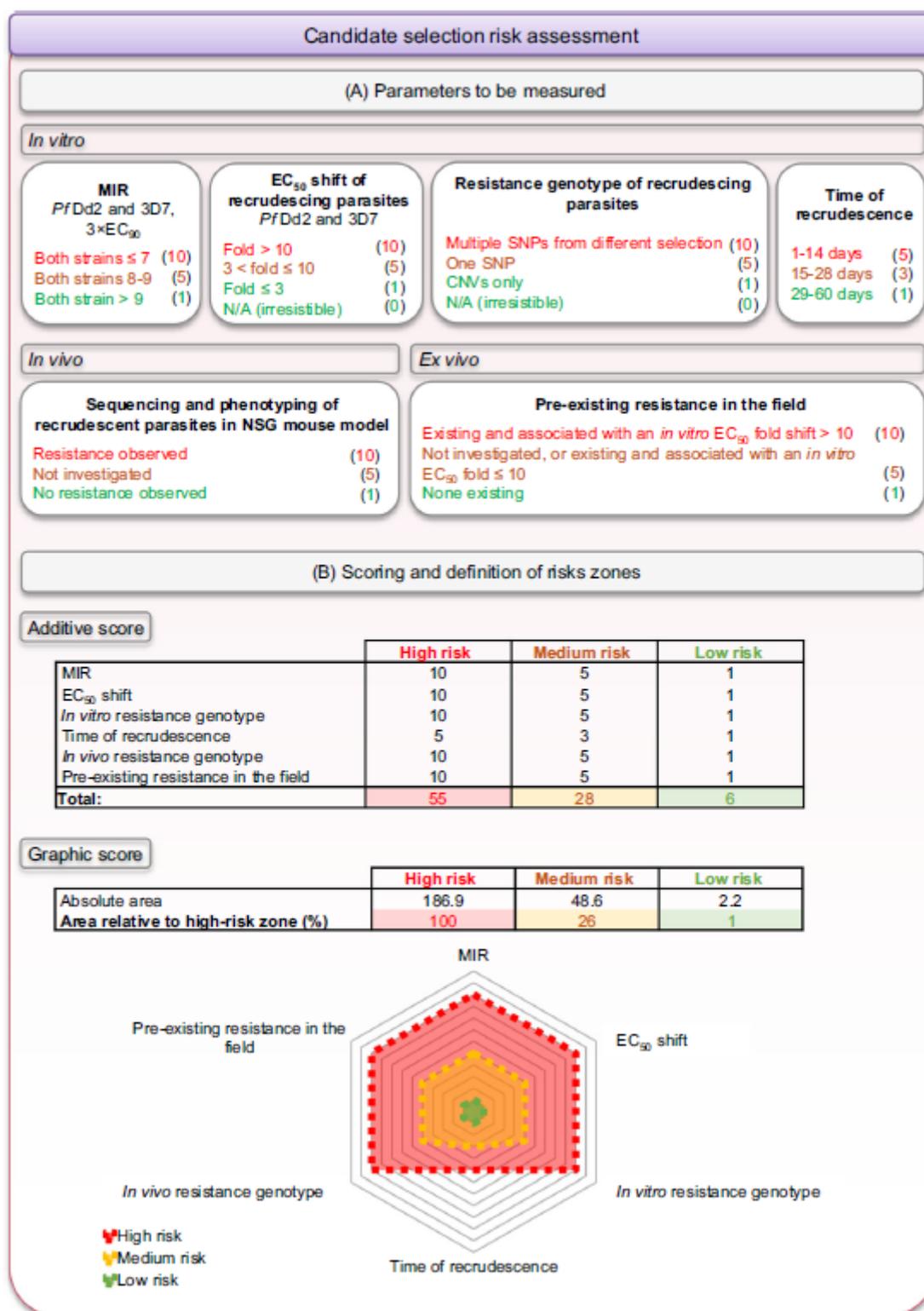
Enfin, parmi les dérivés issus du couplage de Buchwald-Hartwig, le dérivé **96** comportant une pipéridine possède des valeurs biologiques intéressantes nous poussant à envisager la synthèse de dérivés possédant un substituant en position 4 de cette pipéridine. Pour cela, il faudra cependant passer par une nouvelle phase d'optimisation des conditions réactionnelles.

Concernant les 3 composés les plus intéressants à l'heure actuelle (**Schéma 85**), si leur activité sur le stade hépatique de *P. falciparum* est similaire à celle du M1 ($CE_{50} = 0,45 \mu\text{M}$), ces composés pourront être envoyés pour des tests supplémentaires. Tout d'abord, des tests RSA et QSA seront effectués sur la souche F32-ART5 de *P. falciparum* (résistante à l'artémisinine) ainsi que des tests pour mesurer l'activité des composés sur le stade sexué de *P. falciparum* : inhibition de l'induction et du développement des gamétocytes, inhibition de l'exflagellation et inhibition de la transmission aux moustiques. Ensuite, au niveau pharmacochimique, il faudra déterminer les valeurs de solubilité aqueuse et de perméabilité (test PAMPA et Caco-2) des composés. Enfin, il faudra effectuer des tests de mutagénicité (test d'Ames), de génotoxicité (test de coloration de l'ADN au vert de méthyle, test des comètes et test des micronoyaux) ainsi que mesurer l'affinité des composés vis-à-vis des canaux hERG. Dans l'hypothèse où tous ces tests seraient satisfaisant pour un des composés, celui-ci pour alors être testé *in vivo* sur modèle murin (comme le M1).²⁶³ Si un composé venait à montrer une preuve d'activité *in vivo*, celui-ci pourrait alors être proposé pour rejoindre le portfolio de MMV lors de l'appel à projet annuel de l'organisation, visant à développer de futures molécules antipaludiques.⁴⁰⁰

⁴⁰⁰ Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/research-development/information-scientists/call-proposals> (consulté le 09/12/21).

Annexes

Annexe 1. Paramètres permettant de définir le risque de résistance pour un composé antiplasmodial.
D'après Duffey *et al.*¹⁹⁰



ARTICLE

Palladium-catalyzed reactions for antiplasmodial pharmacomodulation in 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series.

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Romain Mustière,^a Prisca Lagardère,^b Sébastien Hutter,^c Céline Deraeve,^d Florian Schwalen,^d Dyhia Amrane,^a Nicolas Masurier,^b Nadine Azas,^c Vincent Lisowski,^b Pierre Verhaeghe,^{d,e} Dominique Mazier,^f Patrice Vanelle^{a,g} and Nicolas Primas^{a,g,*}

In 2015, we identified gamhepathiopine (M1): a 2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one antiplasmodial hit targeting all development stages of the human malaria parasite *P. falciparum*. However, this hit compound suffers from sensibility to hepatic oxidative metabolism. Here we describe the synthesis of 33 new compounds in 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series, modulated at position 6 of this scaffold. The modulations were performed using three palladium-catalyzed cross coupling reactions: Suzuki-Miyaura, Sonogashira and Buchwald-Hartwig. For the latter, we developed the reaction conditions. Then, we evaluated the synthesized compounds for their antiplasmodial activity on the K1 *P. falciparum* strain and their cytotoxicity on the human HepG2 cell line. Although we didn't obtain a compound better than M1 in terms of antiplasmodial activity, we identified compound **1g**, bearing a piperidine at position 6 of the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one ring with an improved cytotoxicity and metabolic stability. **1g** is an interesting new starting point for further pharmacomodulation works. This work also provided valuable antiplasmodial SAR data regarding the nature of the ring at position 6, the possible substituent on this ring and the introduction of a spacer between this ring and the thienopyrimidinone moiety.

1. Introduction

Malaria is a heavy burden for endemic countries, mainly in Africa, with an estimated 241 million cases and 627,000 deaths in 2020, according to the World Health Organization.¹ Seventy seven percent of the victims were children under 5 years old. The disease is caused by parasites of the *Plasmodium* genus transmitted by the bite of an infected female mosquito belonging to the *Anopheles* genus. Of the five species causing malaria in humans, *P. falciparum* is responsible for most of the deaths. Along the spread of long-lasting insecticide-treated bed nets, the introduction of artemisinin-based combined therapies (ACT) as first line treatments against severe *P. falciparum* infections were key to the fight against malaria.²

However, the emergence of artemisinin-resistant *P. falciparum* in South-East Asia, first reported in 2009,³ mediated by *Pfkelch13* mutations,⁴ and its spread in the greater Mekong subregion is currently limiting the clinical effectiveness of ACT in this area.⁵ While combination of ganaplacide (Figure 1) and lumefantrine is the most promising drug combination currently being investigated by Medecine for Malaria Venture (MMV),⁶ the recent withdrawal of MMV048, P218 and DSM265 in clinical trials (for teratogenicity, low half-time *in vivo* and high selection of resistances respectively; Figure 1)^{7, 8} increases the urgent need for new antimalarial compounds with novel mechanisms of action.

In 2015, we described the synthesis and activity of a new molecule called gamhepathiopine (also M1, Scheme 1), active on all stages of *P. falciparum*, including quiescent parasites of the artemisinin-resistant strain F32-ART5, with an unknown mechanism of action.⁹ We later discovered that the *in vivo* activity of M1 was limited by its sensibility to mouse hepatic metabolism. Indeed, *in vivo* activity in *P. berghei* infected mice was only achieved with the addition of 1-aminobenzotriazole, a pan-CYP450 inhibitor.¹⁰ Therefore, the synthesis of new thieno[3,2-*d*]pyrimidines, to afford a new hit compound with improved metabolic stability and similar activity profile, was initiated. We also expected to obtain new antiplasmodial SAR data on the thieno[3,2-*d*]pyrimidine series. Indeed, we observed important modifications to the biological values with minors modifications on the molecular scaffold during the first round of pharmacomodulations leading to compound M1.⁹

^a Aix Marseille Université, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicale, Faculté de Pharmacie, Marseille, France.

^b Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Montpellier, France.

^c Aix Marseille Université, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Marseille, France.

^d LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS UPR 8241, UPS, Toulouse, France.

^e CHU de Nîmes, service de pharmacie, Nîmes, France.

^f Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), INSERM, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France.

^g Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques, AP-HM, Hôpital Conception, Marseille, France.

E-mail: nicolas.primas@univ-amu.fr

Electronic Supplementary Information (ESI) available: NMR spectra. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

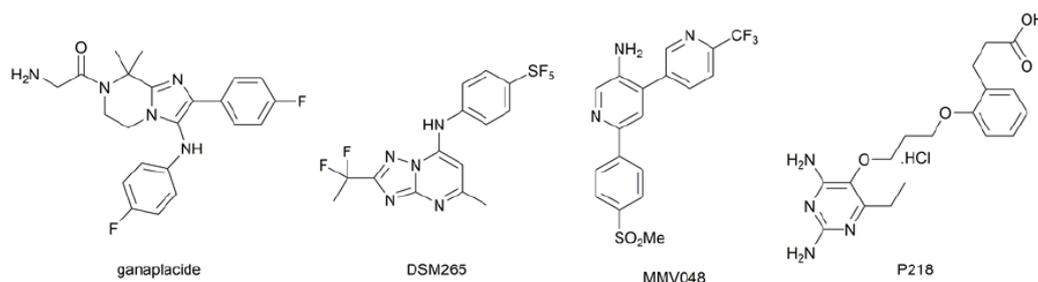
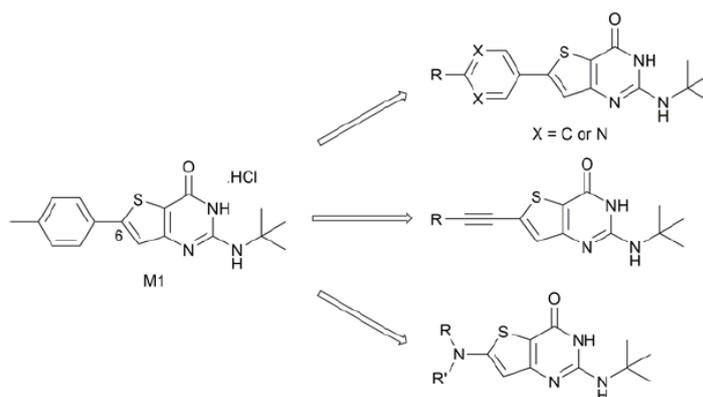


Figure 1. Chemical structures of antimalarial compounds in clinical trial or recently withdrawn from them.



Scheme 1. Chemical structure of compound M1 and general structures for the compounds presented in this work.

Previously explored substituents on the phenyl ring at position 6 of the thienopyrimidinone scaffold were simple, i.e. halogen atoms or methoxy group. Thus, we decided to explore more diverse substituents with the help of palladium-catalyzed cross-coupling reactions. Here we describe the synthesis of 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones, structurally modulated on the west part of the scaffold, at position 6 (Scheme 1), by Buchwald-Hartwig, Sonogashira or Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions along with their antiplasmodial and cytotoxicity evaluations.

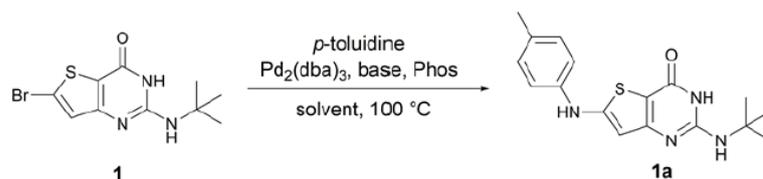
2. Results and discussion

2.1. Buchwald-Hartwig coupling

To our knowledge, no examples of Buchwald-Hartwig coupling on a thienopyrimidine cycle are reported in the literature to date and there is only a few examples of this coupling on a thiophene ring.^{11, 12, 13} Therefore, we first explored the reaction conditions between the 6-bromo-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one **1** and *para*-toluidine in order to determine the best reaction conditions (Table 1). During the different experiments, we used LC-MS to estimate the yield of product **1a**.

First, we used conditions described in the literature involving a thiophene ring (entry 1,¹¹ entry 2¹² and entries 3-4,¹³ Table 1). We did not observe any reaction with these conditions. From the conditions of entry 4, we then decided to study the

influence of the phosphine ligand using SPhos instead of RuPhos (entry 5, Table 1). While we observed **1a** for the first time, the main product of the reaction resulted from the dehalogenation of the starting material. Also from entry 4, we decided to improve the solubility of starting material **1** by changing the reaction solvent from toluene to dioxane (entry 6, Table 1). We observed the formation of **1a** in an estimated 4 % yield. By combining the conditions of entries 5 and 6, the estimated yield increased to 46 % (entry 7, Table 1). Using the closely related XPhos phosphine, instead of SPhos, the same estimated yield was maintained (entry 8, Table 1). However, *t*BuXPhos, a less hindered version of XPhos, did not allow forming **1a**. From entry 7, we tried to explore changes in the base and the solvent, using LiHMDS instead of NaOtBu (entry 10, Table 1) and using DME instead of dioxane (entry 11, Table 1). The use of LiHMDS was unsuccessful to afford **1a** while DME caused a significant dehalogenation of **1**. From entries 7 and 8, we decided to increase the load of *p*-toluidine in the reaction (entries 12 and 13, Table 1). We observed an increase in the estimated yield with full conversion in 1 hour when XPhos was used. From these conditions, we reduced the load of *p*-toluidine or phosphine/palladium duo (entries 14 and 15, Table 1) and we observed only an increase in reaction time, from 1 to 2 hours. We finally decided to use the conditions of entry 15 thereafter since amines are mainly cheap starting materials compared to the palladium and phosphine.

Table 1. Optimization of Buchwald-Hartwig cross-coupling reaction between **1** and *p*-toluidine.

Entry	Equiv. <i>p</i> -toluidine	mol% Pd	Phosphine	mol% Phos	Base	Equiv. Base	Solvent	Estimated yield ^a of 1a (%)
1	1.2	2	Rac-BINAP	4	Cs ₂ CO ₃	3	Dioxane	0
2	1.2	10 ^b	Rac-BINAP	10	Cs ₂ CO ₃	1.4	Toluene	0
3	1.2	2	RuPhos	8	NaOtBu	1.4	Toluene	0
4	1.2	5	RuPhos	10	NaOtBu	3	Toluene	0
5	1.2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Toluene	Traces ^c
6	1.2	5	RuPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	4
7	1.2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	46
8	1.2	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	47
9	1.2	5	<i>t</i> BuXPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	0
10	1.2	5	SPhos	10	LiHMDS	3	Dioxane	0
11	1.2	5	SPhos	10	NaOtBu	3	DME	Traces ^c
12	5	5	SPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	66
13	5	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	100 (1 h)
14	3	5	XPhos	10	NaOtBu	3	Dioxane	100 (2 h)
15	5	4	XPhos	8	NaOtBu	3	Dioxane	100 (2 h)

^ausing LCMS; ^bPd(dba)₃; ^cDehalogenation of starting material mainly observed

The Ullman reaction, a possible alternative to the Buchwald-Hartwig coupling reaction, was also tried on compound **1** or its precursor **2**. In both cases, no reaction was observed after 24 hours at 100 °C with the following tested conditions: *para*-toluidine (3 eq.), dimethylglycine (20 mol%), CuI (10 mol%) and Cs₂CO₃ (3 eq.).

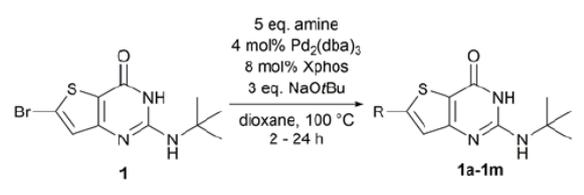
Therefore, the conditions of entry 15 (Table 1) were then applied on various substrates to explore the scope of the operating procedure and obtain a new series of functionalized 2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (Table 2).

Purifications, using flash chromatography, were challenging for the whole series, thus leading to a moderate isolated yield of 55 % for compound **1a**. The isolated yields for the other compounds were decreased by two additional factors: the low conversion rates and the dehalogenation of **1**. When moving the methyl substituent from *para* position to *meta* (**1b**) and *ortho* (**1c**) positions, the yield decreased because of steric hindrance and, for **1c**, the conversion was not complete after 24 hours. Conversion was also incomplete after 24 hours of heating when the methyl group was replaced by an electron-donating (**1d**) or electron-withdrawing (**1e**) group. When performing the reaction with morpholine (**1f**) or piperidine (**1g**), we also observed moderate dehalogenation of the starting material in addition to the incomplete conversion after 24 hours, both reasons being responsible for the low reaction yields. For *N*-methylpiperazine (**1h**), we observed a complete and rapid (less than 2 hours) dehalogenation of the starting material. The same

result was observed with aliphatic amines such as cyclopropylamine (**1i**) and ethanolamine (**1m**). This dehalogenation could be caused by the choice of our catalyst ligand.¹⁴ Finally, heteroaromatic amines, such as pyrazole, imidazole, and 3-aminopyridine did not react using the same conditions. Although our conditions seemed to work for a simple substrate like *para*-toluidine, they are strongly impacted by the modification of the *para*-substituent and the nature of the amine used.

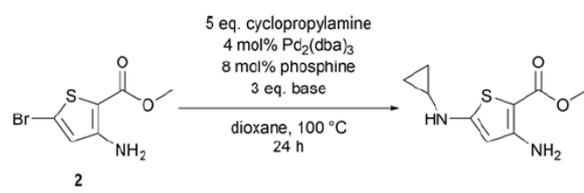
We applied these Buchwald-Hartwig conditions to compound **2**, the synthetic precursor of compound **1**, to possibly overcome the dehalogenation problem encountered with aliphatic amines and *N*-methylpiperazine (Table 3). While our conditions properly functionalized the position 5 of the thiophene aminoester, we also observed a partial saponification of the methyl ester group. The corresponding carboxylic acid derivative could not be isolated because of its high polarity. We hypothesized that sodium *tert*butoxyde could saponify the ester at position 2 of the thiophene. We decided to explore other bases to observe the behaviour of the ester: caesium carbonate promoted the homo-coupling of compound **2** while LiHMDS led to the formation of a cyclopropylamide derivative. The replacement of the phosphine ligand with caesium carbonate did not provide any change and the homo-coupling product was still formed.

Table 2. Scope of the Buchwald-Hartwig cross-coupling reaction on compound 1.



Compound	R	Isolated yield (%) or observed outcome
1a	4-Me-Ph-NH-	55
1b	3-Me-Ph-NH-	31
1c	2-Me-Ph-NH-	15
1d	4-MeO-Ph-NH-	14
1e	4-F-Ph-NH-	23
1f	Morpholinyl-	35
1g	Piperidinyl-	15
1h	N-Methylpiperazinyl-	Complete dehalogenation of 1
1i	Pyrazole	No reaction
1j	Imidazole	No reaction
1k	Pyrimidinyl-3-amine	Traces of 1k and dehalogenated byproduct
1l	Cyclopropylamine	Complete dehalogenation of 1
1m	Ethanolamine	Complete dehalogenation of 1

Table 3. Optimization attempts for Buchwald-Hartwig cross-coupling reaction on compound 2.



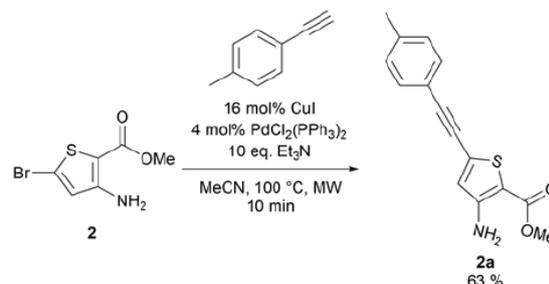
Entry	Base	Phosphine	Putative outcome ^a
1	tBuONa	XPhos	Cyclopropylamine introduced at position 5 – saponification of the methyl ester
2	Cs ₂ CO ₃	XPhos	Homocoupling of 2
3	LiHMDS	XPhos	Conversion of the methyl ester into cyclopropylamide
4	Cs ₂ CO ₃	BrettPhos	Homocoupling of 2

^afrom LCMS observations

2.2. Sonogashira coupling

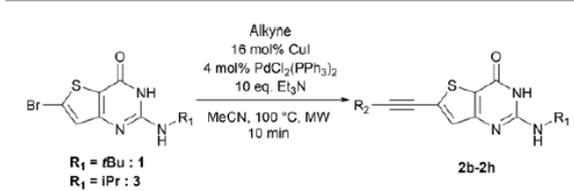
From reaction conditions found in the literature,¹⁵ we performed a conclusive test on compound 2 (Scheme 3). We then used these reaction conditions on compound 1 and its isopropylamine analog 3, leading to seven 2-aminothieno[3,2-

d]pyrimidin-4(3H)-ones bearing an alkyne substituent at position 6 in yields ranging from 23 to 85 % (Table 4). The poor yields are due either to purification's difficulties (compound 2c and 2g) or to the volatile behaviour of some alkynes (compound 2e). Depending on the boiling point of the alkyne, we tried to improve low yields by increasing the load of the alkyne in the reaction, but we still observed low yields. Compound 2f was obtained after the protodesilylation of the trimethylsilyl alkyne, using potassium carbonate in a mixture of methanol and dichloromethane.



Scheme 2. Sonogashira reaction on compound 2.

Table 4. Synthesis of 6-alkynyl-2-aminothieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-ones 2b-2h.



Compound	R1	R2	Yield (%)
2b	tBu	4-Me-Ph-	60
2c	iPr	4-Me-Ph-	23
2d	tBu	HO(CH ₂) ₂ -	47
2e	tBu	Cyclopropyl-	23
2f	tBu	H-	57 ^a
2g	tBu	N-Methylpiperazinyl-CH ₂ -	35
2h	iPr	Ph-	85

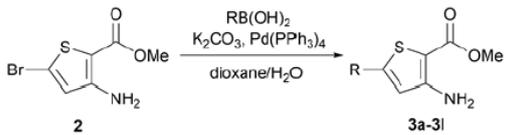
^aTwo steps

2.3. Suzuki-Miyaura coupling

When the Suzuki-Miyaura couplings were performed on compound 1 or 3, applying the reaction conditions used for the synthesis of M1 metabolites,¹⁰ we observed the dehalogenation of the starting material which complicated the purification. Therefore, we decided to perform the Suzuki-Miyaura coupling on 2 with conditions from the literature and previously used in our lab.¹⁶ Eleven thiophene aminoesters functionalized at position 5, were synthesized in yields above 50 % except for compound 3l (Table 5). In this specific case, we removed water from the reaction medium to avoid substitution of the chlorine atom contained in the chloroimine moiety. The chlorine atom

of compound **3l** was then engaged in a S_NAr reaction with morpholine or *N*-methylpiperazine (Scheme 4).

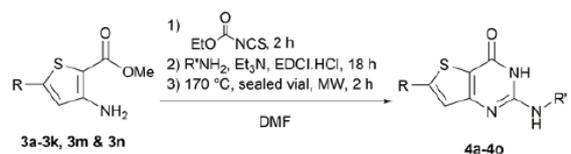
Table 5. Synthesis of 5-functionalized thiophene aminoesters 3a-3l.



Compound	R	Isolated yield (%)
3a	4-CO ₂ Me-Ph-	55
3b	4-NO ₂ -Ph-	65
3c	4-HO-Ph-	64
3d	3-Cl-4-F-Ph-	82
3e	4-Morpholinyl-Ph-	73
3f	4-(<i>N</i> -Methylpiperazinyl)-Ph-	71
3g	4-Piperidinyl-Ph-	71
3h	4-MeS-Ph-	72
3i	4-MeSO ₂ -Ph-	62
3j	4-(H ₂ N-SO ₂)-Ph-	47
3k	4-(Morpholinyl-SO ₂)-Ph-	88
3l	2-Chloropyrimidin-5-yl-	44

The functionalized thiophene aminoesters (**3a-3k**, **3m** and **3n**) were then engaged in a cyclisation reaction to form the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one core. This three step one-pot reaction afforded 15 compounds, 13 including a *tert*butylamine group and 2 bearing an isopropyl group at position 2 (Table 6). The 4-nitrophenyl-containing compounds **4b** and **4c** were then engaged in a reduction reaction to afford the 4-aminophenyl compounds **4p** and **4q** in poor yields (Scheme 5). We initially performed this reduction at 120 °C for 30 minutes but this led to the formation of compound **4r**, resulting from the acylation of compound **4p**, which was isolated. Compound **4j** was used to synthesize the sulfoximine derivate **4s** (Scheme 5) using a one-step reaction with ammonium carbamate and (diacetoxyiodo)benzene (PIDA).

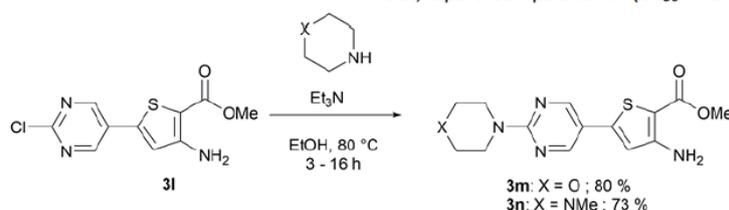
Table 6. Cyclization reaction leading to compounds 4a-4o.



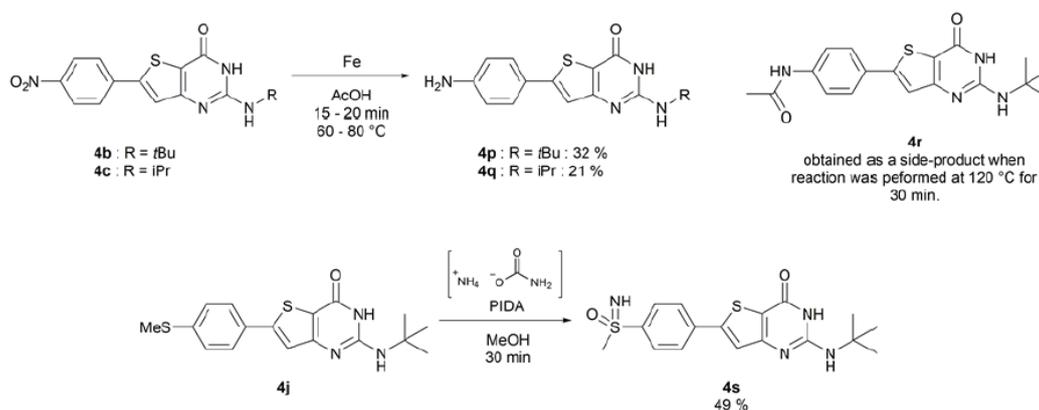
Compound	R	R'	Isolated yield (%)
4a	4-CO ₂ Me-Ph-	<i>t</i> Bu	55
4b	4-NO ₂ -Ph-	<i>t</i> Bu	55
4c	4-NO ₂ -Ph-	<i>i</i> Pr	33
4d	4-HO-Ph-	<i>t</i> Bu	13
4e	4-HO-Ph-	<i>t</i> Bu	49
4f	3-Cl-4-F-Ph-	<i>i</i> Pr	37
4g	4-Morpholinyl-Ph-	<i>t</i> Bu	69
4h	4-(<i>N</i> -Methylpiperazinyl)-Ph-	<i>t</i> Bu	23
4i	4-Piperidinyl-Ph-	<i>t</i> Bu	51
4j	4-MeS-Ph-	<i>t</i> Bu	65
4k	4-MeSO ₂ -Ph-	<i>t</i> Bu	44
4l	4-(H ₂ N-SO ₂)-Ph-	<i>t</i> Bu	56
4m	4-(Morpholinyl-SO ₂)-Ph-	<i>t</i> Bu	33
4n	2-Morpholinopyrimidin-5-yl-	<i>t</i> Bu	57
4o	2-(<i>N</i> -Methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl-	<i>t</i> Bu	19

2.4. Biological evaluation

The synthesized compounds were evaluated for their antiparasmodial activity (EC₅₀) on the multi-resistant K1 strain of *P. falciparum* (resistant to chloroquine, sulfadoxine and pyrimethamine) and their cytotoxicity (CC₅₀) on the human HepG2 cell-line, in order to determine their selectivity index (SI, EC₅₀/CC₅₀) and to compare them to reference drugs (chloroquine, atovaquone and doxycycline for activity and doxorubicine for cytotoxicity ; Table 7). Of the 33 tested compounds, 16 displayed aqueous solubility problems in the test medium limiting the determination of precise values for EC₅₀, CC₅₀ or both. Such behaviour for the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series was already seen during the pharmacomodulation leading to compound M1.⁹ The thienopyrimidinone scaffold is found in cytotoxic compounds¹⁷ but, apart compound **4r** (CC₅₀ = 0.16 μM, more toxic than



Scheme 3. S_NAr reaction on compound **3l**.



Scheme 4. Synthesis of compounds 4p-4s.

doxorubicine), the CC_{50} of the compounds ranged widely from 2.1 to 89.1 μ M. While the EC_{50} ranged from 0.77 to 43.2, 18 compounds showed an antiplasmodial activity below 5 μ M. Compound **1g** was the best of all the synthesized compounds with submicromolar antiplasmodial activity (0.77 μ M), still far from M1 potency (0.045 μ M), but with improved cytotoxicity (33.9 μ M) compared to M1 (24 μ M).⁹ These results provided valuable data regarding the SAR of the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one core.

The introduction of an amine spacer between the thienopyrimidinone core and the C6-substituent (**1a**) significantly reduced the antiplasmodial activity. The cytotoxicity value was worsened when the methyl was moved on the phenyl ring (*para* **1a** < *ortho* **1c** < *meta* **1b**). The replacement of the methyl group by an electron-donating (**1d**) or withdrawing (**1e**) group moderately improved the antiplasmodial activity. The introduction of an alkyne spacer in M1 structure (**2b**) reduced the antiplasmodial activity and aqueous solubility, in the test medium, of the compound. Among the different alkyne substituents, only cyclopropylalkyne **2e** showed a decent combination of biological values. Therefore, conformational changes of the C6-sidechain induced by the amine spacer or sidechain elongation following the introduction of an alkyne are not effective strategies to obtain an antiplasmodial hit compound in the thienopyrimidinone series.

We also investigated the *para*-substituent on the phenyl ring at position 6 of the thienopyrimidinone core. The replacement of the methyl substituent by a more polar group to potentially improve aqueous solubility (methyl ester **4a**, phenol **4d**, anilines **4p** and **4q** and acetamide **4r**, and sulphur-containing functions **4j-4m** and **4s**) was not in favour of neither antiplasmodial activity nor cytotoxicity. While the replacement of the methyl by a fluorine atom was interesting in our previous work,⁹ the addition of a chlorine atom at position 3 of the 4-fluorophenyl cycle induced a loss of activity and aqueous solubility in test medium (**4e** and **4f**) compared to M1. We also replaced the methyl substituent by different saturated heterocycles (**4g**, **4h** and **4i**) but this was associated with an increased cytotoxicity and a reduced antiplasmodial activity. Cytotoxicity values were

improved when the phenyl ring was replaced by a pyrimidine (**4n** and **4o**).

Finally, Buchwald-Hartwig cross-couplings gave us the opportunity to replace the phenyl ring at position 6 by saturated heterocycles. When the phenyl ring is replaced by a piperidine (**1g**), we observed a moderated loss of activity and an improved cytotoxicity. The addition of an oxygen atom in the cyclic amine, leading to the morpholine **1f**, significantly decreased the antiplasmodial activity.

With this observation and the biological results of compounds bearing a polar substituent (**4a**, **4d**, **4g**, **4h**, and **4k-4s**), we concluded that a polar head (linked to $clogD_{7.4}$ decrease) at this position is detrimental to antiplasmodial activity (Figure 2). We also concluded that a ring-type structure (aromatic or saturated) is required at position 6 since compounds lacking one of these structures (**1**, **3**, **2d** and **2f**) displayed a lack of antiplasmodial activity.

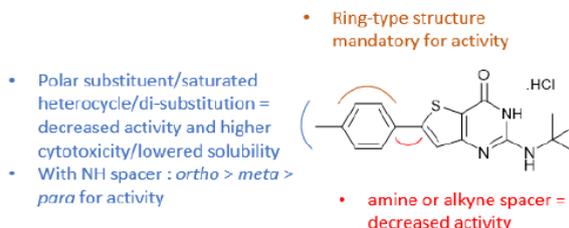


Figure 2. RSA data obtained from biological results.

Considering **1g** good biological results, it was evaluated *in vitro* for its mouse microsomal stability. We observed a more than 3-fold improvement for the half-time between the tolyl moiety (M1, $t_{1/2}$ = 11 min, Cl_{int} = 240 μ L/min/mg) and the piperidine moiety (**1g**, $t_{1/2}$ = 40 min, Cl_{int} = 42 μ L/min/mg). This important improvement shows that the piperidine moiety is stable.

3. Conclusion

We synthesized 33 original compounds in the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series using three different palladium-

catalyzed cross-couplings: Buchwald-Hartwig, Sonogashira and Suzuki-Miyaura. For the first, we developed reaction conditions to directly functionalize the position 6 of the thienopyrimidinone core with anilines and saturated heterocycles. However, additional work on this reaction is required to extend the scope of usable substrates and to improve the reaction yields. Sonogashira coupling provided compounds with side chains of various nature. However, introduction of the alkyne spacer reducing the antiplasmodial activity, led us to stop further synthesis of 6-alkynyl-thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. Seventeen compounds were obtained using Suzuki-Miyaura couplings with various substituents on the phenyl ring, and there is still a lot of possibilities to explore with this coupling. The synthesized compounds were tested on the

blood-stage of *PfK1* and the human HepG2 cell-line to measure their antiplasmodial activity and cytotoxicity. This work led us to the discovery of compound **1g** which has: a submicromolar antiplasmodial activity, associated with a better cytotoxicity value than compound M1 and, an improved *in vitro* metabolic stability compared to M1. Moreover, this work provided valuable RSA data on the thienopyrimidinone series (Figure 2). Considering the microsomal stability of the piperidine moiety, **1g** is an interesting starting point to synthesize new thieno[3,2-*d*]pyrimidines bearing, at position 6, a substituted piperidine. Substitution on this piperidine could provide us compounds with biological values on par with M1 antiplasmodial profile and further improve the metabolic stability of the compounds.

Table 7. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of synthesized 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones.

Entry	R ₁	R ₂	EC ₅₀ <i>PfK1</i> (μM)	CC ₅₀ HepG2 (μM)	SI	clogD _{7.4} ^b
1	Br	tBu	43.2 ± 2.6	38.2 ± 3.5	0.9	3.19
3		iPr	> 50	89.1 ± 9.7	< 1.8	2.91
1a	4-Me-Ph-NH-	tBu	10.3 ± 0.2	21.7 ± 2.1	2.1	4.38
1b	3-Me-Ph-NH-	tBu	1.1 ± 0.3	5.3 ± 0.4	4.8	4.38
1c	2-Me-Ph-NH-	tBu	4.3 ± 0.2	14.1 ± 0.3	3.3	4.38
1d	4-MeO-Ph-NH-	tBu	7.2 ± 2.0	24.0 ± 3.1	3.3	3.71
1e	4-F-Ph-NH-	tBu	7.1 ± 1.4	21.3 ± 1.6	3.0	4.01
1f	Morpholinyl-	tBu	4.5 ± 1.1	> 50	> 11.1	2.31
1g	Piperidinyl-	tBu	0.77 ± 0.13	33.9 ± 1.4	44.0	3.38
2b	4-Me-Ph-	tBu	2.35 ± 0.38	> 12.5	> 5.3	5.03
2c		iPr	4.6 ± 1.0	3.1 ± 0.6	0.7	4.75
2d	HO(CH ₂) ₂ -	tBu	> 10	> 50	-	2.39
2e	Cyclopropyl-	tBu	1.9 ± 0.6	20.8 ± 1.4	10.9	3.65
2f	H-	tBu	> 12.5	4.7 ± 1.0	< 0.4	2.54
2g	<i>N</i> -Methylpiperazine-CH ₂ -	tBu	> 5	41.6 ± 5.2	< 8.3	2.20
2h	Ph-	iPr	2.8 ± 1.0	> 12.5	> 4.5	4.23
4a	4-CO ₂ Me-Ph-	tBu	2.5 ± 0.9	> 12.5	> 5.0	3.91
4d	4-HO-Ph-	tBu	7.5 ± 1.0	12.2 ± 0.3	1.6	3.60
4e	3-Cl-4-F-Ph-	tBu	2.0 ± 0.9	> 12.5	> 6.3	4.65
4f		iPr	3.6 ± 1.2	> 6.25	> 1.7	4.37
4g	4-Morpholinyl-Ph-	tBu	2.4 ± 0.9	7.9 ± 1.3	3.3	3.79
4h	4-(<i>N</i> -Methylpiperazinyl)-Ph-	tBu	4.1 ± 0.7	5.8 ± 0.5	1.4	3.29
4i	4-Piperidinyl-Ph-	tBu	4.1 ± 1.2	> 6.25	> 1.5	4.86
4j	4-MeS-Ph-	tBu	1.0 ± 0.3	> 12.5	> 12.5	4.53
4k	4-MeSO ₂ -Ph-	tBu	3.0 ± 0.6	> 25	> 8.3	2.74

4l	4-(H ₂ N-SO ₂)-Ph-	tBu	> 12.5	> 6.25	-	2.51
4m	4-(Morpholinyl-SO ₂)-Ph-	tBu	5.1 ± 2.6	> 12.5	> 2.5	2.74
4n	2-Morpholinopyrimidin-5-yl-	tBu	2.1 ± 0.6	26.4 ± 4.6	12.6	2.55
4o	2-(N-Methylpyperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl-	tBu	4.4 ± 1.0	11.2 ± 1.3	2.5	2.40
4p	4-NH ₂ -Ph-	tBu	3.5 ± 1.2	2.5 ± 1.0	0.7	3.07
4q	4-NH ₂ -Ph-	iPr	6.0 ± 1.1	11.3 ± 3.5	1.9	2.79
4r	4-(CH ₃ -CO-NH)-Ph-	tBu	3.9 ± 1.1	0.16 ± 0.04	< 0.1	3.14
4s	4-(CH ₃ -SONH)-Ph-	tBu	> 12.5	63.3 ± 14.6	< 5.1	2.76
	M1^a		0.045	24	533	4.42
	M1 (free base)^a		0.2	25.6	128	4.42
	Chloroquine^a		0.5	30	60	0.88
	Atovaquone^a		0.0013	> 15.6	> 12,000	4.37
	Doxycycline^a		5	20	4	-0.80
	Doxorubicine^a		-	0.2	-	0.04

^a Values from reference 9. ^b See experimental part for details.

4. Experimental part

4.1. Chemistry

4.1.1. Materials and methods

Starting materials were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) or Fluorochem (Derbyshire, UK). NMR spectra were recorded on Bruker Avance 250 MHz or a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the "Faculté de Pharmacie" of Marseille. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: CDCl₃ δ = 7.26 ppm for ¹H and 77.16 for ¹³C and DMSO-*d*₆ δ = 2.50 ppm for ¹H and 39.52 ppm for ¹³C. Data for ¹H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet; m, multiplet), coupling constants (*J*) in Hertz (Hz) and integration. Data for ¹³C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm). Melting points were determined on a Köfler melting point apparatus (Wagner & Munz GmbH, München, Germany) and are uncorrected. HRMS spectra (ESI) were recorded on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) and were performed at the "Faculté des Sciences" of Marseille (St Jérôme campus). Silica Gel 60 (Merk 70–230) was used for column chromatography. Flash chromatography were performed on a puriFlash® 5.020 apparatus (Interchim, Montluçon, France). TLC were performed on aluminium plates coated with silica gel 60F-254 (Merk) in an appropriate eluent. Visualisation was made with ultraviolet light (254 or 365 nm). Reactions using microwave heating were performed with a Biotage® Initiator or Initiator+ apparatus (Biotage, Uppsala, Sweden).

4.1.2. Procedure for the screening of Buchwald-Hartwig coupling conditions

6-Bromo-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (50 mg, 0.17 mmol), 4-methylaniline,

tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0), appropriate phosphine ligand and appropriate base were put under nitrogen atmosphere and appropriate dried solvent (0.01M) was added.

The obtained suspension was stirred at 100 °C and the reaction's progress was followed using LC-MS (typically 1, 2, 18 and 48 hours after the beginning of the reaction).

4.1.3. General procedure A for synthesis of compounds through Buchwald-Hartwig coupling

In a sealed microwave vial, 6-bromo-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.3 g, 1 mmol), appropriate amine (5 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (36 mg, 4% mol), XPhos (38 mg, 8% mol) and sodium *tert*-butoxyde (0.286 g, 3 mmol) were put under nitrogen atmosphere and dried dioxane (0.01 M) was added. The obtained suspension was stirred at 100 °C up to 24 hours (reaction progress followed by LC-MS). The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was dissolved in ethyl acetate (40 mL). The organic phase was washed with brine (2 x 40 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified with appropriate method.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1a): Following procedure A with 4-methylaniline (0.532 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown powder (173 mg, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.06 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 7.17-7.07 (m, 4H), 6.22 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 156.8, 155.4, 152.3, 139.4, 130.7, 129.8 (2C), 117.5 (2C), 101.5, 98.5, 50.8, 28.7 (3C), 20.3. mp = 204-206 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂ [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1429.

2-*tert*-butylamino-6-[(3-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1b): Following procedure A with 3-

methylaniline (0.532 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[(3-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (0.1 g, 31 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.09 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 7.04-6.99 (m, 2H), 6.78 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.98 (bs, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 156.9, 154.9, 152.3, 141.9, 138.8, 129.3, 122.4, 117.6, 114.3, 102.3, 98.9, 50.9, 28.7 (3C), 21.1. mp = 225-227 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1428.

2-*tert*-butylamino-6-[(2-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1c): Following procedure A with 2-methylaniline (0.532 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in cyclohexane affording 2-*tert*-butylamino-6-[(2-methylphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown powder (50 mg, 15 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.02 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.36 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27-7.17 (m, 2H), 7.04 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.37 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.8, 156.8, 152.2, 140.2, 131.1, 130.4, 126.8, 124.1, 121.4, 100.9, 98.6, 50.8, 28.7 (3C), 17.7. mp = 159-161 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 329.1431, found 329.1429.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-methoxyphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1d): Following procedure A with 4-methoxyaniline (0.611 g, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-methoxyphenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (49 mg, 14 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.02 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 7.20-7.13 (m, 2H), 6.96-6.90 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.6, 156.7, 156.7, 154.8, 152.3, 135.1, 120.1 (2C), 114.7 (2C), 100.2, 97.9, 55.3, 50.8, 28.7 (3C). mp = 205-207 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 345.1380, found 345.1381.

2-*tert*-butylamino-6-[(4-fluorophenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1e): Following procedure A with 4-fluoroaniline (0.470 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[(4-fluorophenyl)amino]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (77 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.10 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 7.26-7.20 (m, 2H), 7.20-7.13 (m, 2H), 6.24 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 157.2 (d, ¹*J* = 238 Hz, 1C), 156.8, 155.3, 152.3, 138.4 (d, ⁴*J* = 2.8 Hz, 1C), 119.2 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2C), 116.0 (d, ²*J* = 22.5 Hz, 2C), 101.8, 98.8, 50.8, 28.7 (3C). mp = 195-197 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈FN₄O₂S [M+H]⁺ 333.1180, found 333.1182.

2-*tert*-butylamino-6-(morpholin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1f): Following procedure A with morpholine (0.434

mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* two successive flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(morpholin-4-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow solid (106 mg, 35 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.04 (bs, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.75-3.68 (m, 4H), 3.25-3.17 (m, 4H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.6, 160.8, 156.8, 152.3, 99.5, 99.0, 65.3 (2C), 50.8, 49.1 (2C), 28.6 (3C). mp = 264-266 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 309.1380, found 309.1379.

2-*tert*-butylamino-6-(piperidin-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1g): Following procedure A with piperidine (0.490 mL, 5 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(piperidin-1-yl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a pale-yellow powder (45 mg, 15 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 9.95 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.28-3.20 (m, 4H), 1.65-1.51 (m, 6H), 1.37 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.7, 161.3, 156.8, 152.2, 98.5, 98.2, 50.8, 50.2 (2C), 28.7 (3C), 24.5 (2C), 23.2. mp = 171-173 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₂₃N₄O₂S [M+H]⁺ 307.1587, found 307.1590.

4.1.4. General procedure B for the synthesis of compounds through Sonogashira coupling

In a sealed microwave vial under nitrogen atmosphere, the appropriate 2-amino-6-bromothienopyrimidinone, the

appropriate alkyne, copper iodide (16% mol), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (4% mol) and triethylamine (10 eq) were dissolved in dry acetonitrile (1:1 v:v with triethylamine). The obtained suspension was stirred for 10 min under microwave irradiation at 100 °C. Water (20 times the quantity of acetonitrile) was added to the reaction mixture which was then extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water and the excess was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* the appropriate method.

3-amino-5-[(4-methylphenyl)ethynyl]thiophene-2-carboxylate (2a): Methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.27 mmol), 1-ethynyl-4-methylbenzene (0.155 g, 1.33 mmol), copper (I) iodide (39 mg, 0.2 mmol) triethylamine (1.76 mL, 12.7 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (4 mol%) and dried acetonitrile (0.5 mL) were put under nitrogen atmosphere. The obtained reaction mixture was stirred 10 min under microwave irradiation at 100 °C. Water (10 mL) was added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 30 mL), dried over anhydrous sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained residue was purified *via* column chromatography on silica gel (90:10 cyclohexane/ethyl acetate). The desired fractions were combined, the excess solvent removed *in vacuo* and the obtained solid was triturated in cyclohexane affording ethyl 3-amino-5-[(4-methylphenyl)ethynyl]thiophene-2-carboxylate as a brown powder (217 mg, 63 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.40 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 7.16 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 5.42 (bs, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.5,

153.2, 139.5, 131.7 (2C), 129.4 (2C), 128.7, 123.3, 119.3, 102.1, 95.7, 81.9, 51.1, 21.7. mp = 156-158 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₄NO₂S [M+H]⁺ 272.0740, found 272.0743.

2-tert-butylamino-6-[(4-methylphenyl)ethynyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2b): Following procedure B with 6-bromo-2-(tert-butylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and 1-ethynyl-4-methylbenzene (151 μL, 1.19 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined, the excess solvent was removed *in vacuo* and the solid triturated in diethyl ether affording 2-tert-butylamino-6-[(4-methylphenyl)ethynyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a yellow/brown powder (200 mg, 60 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.49 (d, ³J = 10.8 Hz, 2H), 7.30-7.24 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.4, 157.7, 152.8, 140.2, 131.9 (2C), 130.0 (2C), 129.2, 129.1, 118.5, 113.7, 97.0, 82.3, 51.6, 29.0 (3C), 21.6. mp = 235-237 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₉H₂₀N₃OS [M+H]⁺ 338.1322, found 338.1319.

6-[(4-methylphenyl)ethynyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2c): Following procedure B with 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.172 g, 0.60 mmol) and 1-ethynyl-4-methylbenzene (91 μL, 0.72 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (cyclohexane and ethanol) affording 6-[(4-methylphenyl)ethynyl]-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a yellow solid (44 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.78 (s, 1H), 7.48 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.30-7.23 (m, 3H), 6.22 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H), 4.08-3.94 (m,

1H), 2.35 (s, 3H), 1.17 (d, ³J = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.2, 157.3, 152.8, 139.7, 131.4 (2C), 129.5 (2C), 128.7, 128.5, 118.0, 113.2, 96.4, 81.9, 42.2, 22.4 (2C), 21.1. mp = 277-279 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₁₇N₃OS [M+H]⁺ 324.1165, found 324.1163.

2-tert-butylamino-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2d): Following procedure B with 6-bromo-2-(tert-butylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and but-3-yn-1-ol (90 μL, 1.19 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. Precipitate was filtered and isolated while the filtrate was purified *via* column chromatography over silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 97:3 dichloromethane/methanol) affording 2-tert-butylamino-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a brown powder (137 mg, 47 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.53 (bs, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.95 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H), 3.58 (q, ³J = 6.4 Hz, 2H), 2.63 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.9, 157.1, 152.3, 129.6, 128.0, 112.4, 97.2, 74.2, 59.2, 51.0, 28.5 (3C), 23.6. mp = 215-217 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₈N₃O₂S [M+H]⁺ 292.1114, found 292.1115.

2-tert-butylamino-6-(cyclopropylethynyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2e): Following procedure B with 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and ethynylcyclopropane (336 μL, 3.97 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethanol). Fractions of interest were triturated in cyclohexane affording 2-tert-

butylamino-6-(cyclopropylethynyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a beige powder (66 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.53 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 1.68-1.59 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.98-0.91 (m, 2H), 0.83-0.77 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.9, 157.1, 152.3, 129.7, 128.0, 112.3, 102.0, 68.9, 51.0, 28.5 (3C), 8.8 (2C), 0.0. mp = 158-160 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₁₇N₃OS [M+H]⁺ 288.1165, found 288.1166.

2-tert-butylamino-6-ethynylthieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2f): Following procedure B with 6-bromo-2-(tert-butylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and ethynyltrimethylsilane (550 μL, 3.97 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-tert-butylamino-6-[(trimethylsilyl)ethynyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a yellow solid (198 mg) which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.22(s, 1H), 6.11 (s, 1H), 1.39 (s, 9H), 0.25 (s, 9H).

To a solution of 2-(tert-butylamino)-6-[(trimethylsilyl)ethynyl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.183 g, 0.57 mmol) in a mixture of dichloromethane and methanol (1:1 v:v, 0.2 M) was added potassium carbonate (0.396 g, 2.86 mmol) and reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature. The reaction mixture was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% dichloromethane to 97:3 dichloromethane/methanol) affording

2-tert-butylamino-6-ethynylthieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a grey powder (150 mg, 92 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.60 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.6, 157.1, 152.4, 129.7, 127.7, 113.2, 88.5, 76.6, 51.1, 28.5 (3C). mp = 195-197 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₄N₃O [M+H]⁺ 248.0852, found 248.0854.

2-tert-butylamino-6-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)prop-1-yn-1-yl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2g): Following procedure B with 6-bromo-2-(tert-butylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 0.99 mmol) and 1-methyl-4-(prop-2-yn-1-yl)piperazine (0.36 g, 2.60 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-tert-butylamino-6-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)prop-1-yn-1-yl]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as an orange solid (135 mg, 35 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.58 (bs, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 3.57 (s, 2H), 2.34 (bs, 4H), 2.16 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 4H presumably situated below DMSO signal. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.8, 157.1, 152.4, 128.7, 128.6, 112.7, 93.7, 77.9, 54.5, 51.2 (2C), 51.1 (2C), 46.8, 45.6, 28.5 (3C). mp = 109-111 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₂₆N₅O [M+H]⁺ 360.1853, found 360.1853.

6-(phenylethynyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (2h): Following procedure B with 6-bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one (0.3 g, 1.04 mmol) and ethynylbenzene (137.2 μL, 1.25 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether affording 6-

(phenylethynyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a brown solid (285 mg, 85 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.94 (bs, 1H), 7.64-7.56 (m, 2H), 7.51-7.42 (m, 3H), 7.32 (s, 1H), 6.41 (bs, 1H), 4.08-3.95 (m, 1H), 1.17 (d, ³J = 6.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.1, 157.3, 153.1, 131.5 (2C), 129.7, 128.9 (2C), 128.7, 128.2, 121.0, 113.4, 96.0, 82.4, 42.1, 20.8 (2C). mp = 276-278 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₁₆N₃OS [M+H]⁺ 310.1009, found 310.1003.

4.1.5. General procedure C for the synthesis of thiophene aminoesters functionalized at position 5 through Suzuki-Miyaura coupling

To a mixture of dioxane (0.5 mL per 100 mg) and water (0.25 mL per 100 mg), in a sealed microwave vial, was added methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (1 eq), appropriate boronic acid (1.6 eq) and potassium carbonate (2 eq). The mixture was then put under nitrogen atmosphere and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.05% mol) was added and the mixture was stirred at 75 °C for the appropriate time. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.
- If no precipitate was formed, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

methyl 3-amino-5-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3a): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.5 g, 2.12 mmol) and 4-methoxycarbonylphenylboronic acid (0.610, 3.39 mmol) with a reaction time of 6 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (deactivated with 3 % triethylamine, using 80:20 cyclohexane/dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow solid (340 mg, 55 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 8.05 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.64 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 5.49 (bs, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ 166.6, 164.9, 154.3, 147.5, 137.6, 130.4 (2C), 130.3, 125.9 (2C), 116.7, 101.7, 52.4, 51.6. mp = 190-192 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₄NO₄S [M+H]⁺ 292.0638, found 292.0637.

methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate (3b): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and 4-nitrophenylboronic acid (0.453 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 18 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 75:25 cyclohexane/ethyl acetate to 50:50 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate as an orange solid (316 mg, 65 % yield) which was used without further purifications. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 8.32-8.23 (m, 2H), 7.95-7.87 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 3.76 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 163.8, 155.3, 147.2, 144.3, 138.8, 126.6 (2C), 124.5 (2C), 118.7, 98.8, 51.2. mp = 212-214 °C.

methyl 3-amino-5-(4-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (3c): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.8 g, 3.39 mmol) and 4-hydroxyphenylboronic acid (0.748 g, 5.42 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylate as a light brown solid (540 mg, 64 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 9.86 (s, 1H), 7.45 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.54 (bs, 2H), 3.71 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.0, 158.6, 155.8, 148.4, 127.1 (2C), 123.8, 115.9 (2C), 114.3, 95.3, 50.8. mp = 175-177 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁NO₃SNa [M+Na]⁺ 272.0352, found 272.0352.

methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate (3d): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.8 g, 3.39 mmol) and (3-chloro-4-fluorophenyl)boronic acid (0.945 g, 5.42 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 80:20 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate as a beige solid (790 mg, 82 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.61 (dd, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H), 7.42 (ddd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 4.4 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H), 7.15 (t, ³J = 8.6 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.85 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.9, 158.5 (d, ¹J = 252 Hz, 1C), 154.3, 146.4, 130.9 (d, ³J = 4.3

Hz, 1C), 128.6, 128.3, 125.9 (d, ³J = 7.3 Hz, 1C), 121.9 (d, ²J = 18.2 Hz, 1C), 117.3 (d, ²J = 21.7 Hz, 1C), 116.2, 51.5. mp = 161-163 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₀ClFNO₂S [M+H]⁺ 286.0099, found 286.0102.

methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3e): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-(morpholin-4-yl)phenyl)boronic acid (0.561 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.395 g, 73 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.50 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.46 (bs, 2H), 3.90-3.85 (m, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.25-3.17 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 154.7, 151.7, 149.6, 127.1 (2C), 124.9, 115.4 (2C), 114.1, 99.4, 66.8, 51.3 (2C), 48.8 (2C). mp = 208-210 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₉NO₃S [M+H]⁺ 319.1111, found 319.1110.

methyl 3-amino-5-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3f): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)boronic acid (0.597 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.4 g, 71 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.47 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz,

2H), 6.64 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.30-3.23 (m, 4H), 2.60-2.53 (m, 4H), 2.35 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 154.7, 151.7, 149.8, 127.0 (2C), 124.3, 115.5 (2C), 113.9, 99.1, 55.0 (2C), 51.3, 48.4 (2C), 46.3. mp = 191-193 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₂N₃O₂S [M+H]⁺ 332.1427, found 332.1427.

methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3g): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-(piperidin-1-yl)phenyl)boronic acid (0.556 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate). Fractions of interest were combined and triturated in diethyl ether affording methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.38 g, 71 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.63 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.29-3.18 (m, 4H), 1.76-1.53 (m, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.2, 154.8, 152.4, 150.1, 127.0 (2C), 123.5, 115.7 (2C), 113.6, 98.9, 51.3 (2C), 49.8, 25.7 (2C), 24.4. mp = 191-193 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₂O₂S [M+H]⁺ 317.1318, found 317.1319.

methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3h): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.8 g, 3.39 mmol) and [4-(methylsulfonyl)phenyl]boronic acid (0.911 g, 5.42 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as pale-yellow solid (0.678 g, 72 % yield). ¹H NMR

(CDCl₃, 400 MHz) δ 7.52-7.46 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.50 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.1, 154.5, 148.8, 140.2, 130.1, 126.6 (2C), 126.3 (2C), 115.2, 100.2, 51.4, 15.6. mp = 173-175 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₃H₁₄NO₂S₂ [M+H]⁺ 280.0460, found 280.0460.

methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3i): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(methylsulfonyl)phenyl]boronic acid (0.542 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 4 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate a yellow solid (0.325 g, 62 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.96 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.07 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.8, 154.2, 146.1, 140.4, 138.8, 128.4 (2C), 126.7 (2C), 117.4, 102.4, 51.6, 44.7. mp = 213-214 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₄NO₄S₂ [M+H]⁺ 312.0359, found 312.0359.

methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate (3j): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and (4-sulfamoylphenyl)boronic acid (0.545, 2.71 mmol) with a reaction time of 16 h, the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.249 g, 47 %) which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.90-7.79 (m, 4H), 7.44 (s, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.64 (s, 2H), 3.75 (s, 3H). ¹³C

NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 155.4, 145.5, 144.1, 135.7, 126.6 (2C), 126.0 (2C), 117.6, 97.7, 51.1. mp = 225-227 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₃N₂O₄S₂ [M+H]⁺ 313.0311, found 313.0312.

methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (3k): Following procedure C starting from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.69 mmol) and [4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]boronic acid (0.734 g, 2.71 mmol) with a reaction time of 24 h, the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 50:50 (cyclohexane/ethyl acetate to 100% ethyl acetate) affording methyl

3-amino-5-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate as an orange powder (570 mg, 88 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.90 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.67-3.60 (m, 4H), 2.94-2.86 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 155.3, 145.0, 137.2, 134.4, 128.6 (2C), 126.4 (2C), 118.1, 98.2, 65.3 (2C), 51.2, 45.9 (2C). mp = 272-274 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₉N₂O₅S₂ [M+H]⁺ 405.0549, found 405.0546.

methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (3l): To a solution of methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (0.5 g, 2.12 mmol) in dioxane (3.75 mL) was added (2-chloropyrimidin-5-yl)boronic acid (0.537 g, 3.39 mmol) and potassium carbonate (0.585 g, 4.24 mmol) and the solution was deoxygenated with nitrogen during 5 min. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.05% mol) was added, the mixture was putted under nitrogen atmosphere and

stirred at 85 °C for 24 h. The reaction mixture was poured into water (75 mL) and extracted with ethyl acetate (3x75 mL). The combined organic phases were washed with brine (3x150 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 100% dichloromethane) affording methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (0.25 g, 44 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.79 (s, 2H), 6.84 (s, 1H), 5.55 (bs, 2H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 164.6, 161.0, 156.2 (2C), 154.1, 139.2, 126.7, 117.7, 102.6, 51.8. mp = 176-178 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₀H₉ClN₃O₂S [M+H]⁺ 270.0099, found 270.0097.

4.1.6. Substitution reactions on methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate

methyl 3-amino-5-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate (3m): To a solution of methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.25 g, 0.93 mmol) in ethanol (10 mL) was added morpholine (77.3 μL, 0.88 mmol) and triethylamine (0.33 mL, 2.38 mmol). The reaction mixture was stirred for 3 h at 80 °C. After being allowed to cool to room temperature, the reaction mixture was filtered and the obtained precipitate was washed with ethanol, brine and water affording methyl 3-amino-5-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate as a white solid (0.225 g, 80 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.66 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.60 (s, 2H), 3.79-3.74 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 3.69-3.64 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 163.8, 160.7,

155.6, 155.0 (2C), 142.4, 116.2, 114.9, 95.6, 65.9 (2C), 50.9, 44.0 (2C). mp = 170-172 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₇N₄O₃S [M+H]⁺ 321.1016, found 321.1017.

methyl 3-amino-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate (3n): To a solution of methyl 3-amino-5-(2-chloropyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.25 g, 0.93 mmol) in ethanol (10 mL) was added *N*-methylpiperazine (97.4 μL, 0.88 mmol) and triethylamine (0.33 mL, 2.38 mmol). The reaction mixture was stirred for 16 h at 80 °C. The reaction mixture was poured into water (100 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 200 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo* affording methyl 3-amino-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thiophene-2-carboxylate as a yellow powder (215 mg, 73 % yield) which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.63 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.60 (s, 2H), 3.82-3.75 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 2.41-2.34 (m, 4H), 2.22 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 164.3, 161.1, 156.1, 155.5 (2C), 143.0, 116.4, 115.2, 95.9, 54.7 (2C), 51.4, 46.2, 43.8 (2C). mp = 148-150 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₅H₂₀N₅O₂S [M+H]⁺ 334.1332, found 334.1331.

4.1.7. General procedure D for cyclisation reactions

To a solution of the appropriate functionalized methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2.25 mL per 100 mg) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (1 eq) and the solution was stirred for 2 h at room temperature. To the reaction mixture was added *tert*-butylamine or isopropylamine (2 eq), triethylamine (3 eq) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-

ethylcarbodiimide hydrochloride (1.05 eq) and it was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred at 170 °C under microwave irradiation for 2 h. The reaction mixture was poured into cold water:

- If a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method.
- If no precipitate was obtained, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

6-Bromo-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (1): Following procedure D with methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (2 g, 8.47 mmol) and with *tert*-butylamine (1.78 mL, 16.9 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 6-Bromo-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (1.3 g, 51 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.53 (bs, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 159.3, 156.5, 152.4, 127.8, 121.9, 113.4, 51.1, 28.5 (3C). mp: degradation observed at 162-164 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₀H₁₃BrN₃OS [M+H]⁺ 301.9957, found 301.9954.

6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (3): Following procedure D with methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate (1 g, 4.24 mmol) and with

isopropylamine (0.728 mL, 8.47 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. The precipitate was isolated and the filtrate was further purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 6-Bromo-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (0.695 g, 57 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 10.72 (bs, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.21 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 1.16 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 62.5 MHz) δ 161.2, 156.7, 152.9, 127.5, 122.0, 113.3, 42.2, 22.3 (2C). mp = 240-242 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₉H₁₁BrN₃OS [M+H]⁺ 287.9801, found 287.9801.

methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate (4a): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.69 mmol) and with *tert*-butylamine (144 μL, 1.37 mmol), the obtained crude was triturated in methanol affording methyl 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzoate as a beige powder (0.134 mg, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.54 (bs, 1H), 8.01 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.94 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 165.7, 160.0, 157.6, 152.3, 148.1, 137.2, 130.0 (2C), 129.7, 126.1 (2C), 122.3, 112.6, 52.3, 51.0, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₂₀N₃O₃S [M+H]⁺ 358.1220, found 358.1216.

2-*tert*-butylamino-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4b): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.41 g, 1.47 mmol) and with *tert*-butylamine (313 μL, 2.95 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel

(starting from 60:40 to 50:50 cyclohexane/ethyl acetate) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an orange solid (0.277 g, 55 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.56 (s, 1H), 8.26 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H), 8.06 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 159.9, 157.5, 152.3, 147.2, 146.7, 139.1, 126.8 (2C), 124.3 (2C), 123.5, 113.5, 51.0, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₆H₁₇N₄O₃S [M+H]⁺ 345.1016, found 345.1016.

6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4c): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(4-nitrophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.4 g, 1.44 mmol) and with isopropylamine (244 μL, 2.88 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 70:30 to 50:50 dichloromethane/ethyl acetate) affording 6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an orange solid (0.156 g, 33 % crude yield) which was used without further purifications. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.79 (s, 1H), 8.31-8.25 (m, 2H), 8.09-8.02 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 6.26 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 1H), 4.08-3.98 (m, 1H), 1.19 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 6H).

2-(*tert*-butylamino)-6-(4-hydroxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4d): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(4-hydroxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.44 g, 1.77 mmol) and with *tert*-butylamine (371 μL, 3.53 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-(*tert*-butylamino)-

6-(4-hydroxyphenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a light brown solid (70 mg, 13 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.39 (bs, 1H), 9.89 (bs, 1H), 7.61 (d, 3J = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 6.83 (d, 3J = 8.7 Hz, 2H), 6.05 (s, 1H), 1.42 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.9, 159.1, 157.9, 152.6, 151.2, 127.9 (2C), 124.5, 118.9, 116.4 (2C), 110.6, 51.4, 29.1. mp = 276-278 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₃O₂S [M+H]⁺ 316.1120, found 316.1123.

2-*tert*-butylamino-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4e): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.05 mmol) and with *tert*-butylamine (220 μL, 2.1 mmol), the obtained crude was triturated in diethyl ether then purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (180 mg, 49 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.51 (s, 1H), 8.07 (dd, ⁴J = 7 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (ddd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 4.6 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.50 (t, ³J = 9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.5 (d, ¹J = 250 Hz, 1C), 157.5, 152.3, 147.0, 130.9 (d, ³J = 3.7 Hz, 1C), 127.9, 126.7 (d, ³J = 7.5 Hz, 1C), 121.9, 120.6 (d, ²J = 18.1 Hz, 1C), 117.7 (d, ³J = 21.6 Hz, 1C), 112.1, 51.0, 28.6 (3C). mp = 259-261 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₆ClFN₃OS [M+H]⁺ 352.0681, found 352.0681.

2-(propan-2-ylamino)-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4f): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(3-chloro-4-fluorophenyl)thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.05 mmol) and with isopropylamine (180 μL, 2.1 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest

were triturated in diethyl ether affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(3-chloro-4-fluorophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a grey solid (130 mg, 37 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.67 (s, 1H), 8.04 (dd, ⁴J = 7 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (ddd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 4.6 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.51 (t, ³J = 8.9 Hz, 1H), 6.15 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 4.09-3.94 (m, 1H), 1.18 (d, ³J = 6.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.4, 157.6, 157.5 (d, ¹J = 250 Hz, 1C), 152.7, 147.1, 131.0 (d, ³J = 3.9 Hz, 1C), 127.9, 126.7 (d, ³J = 7.5 Hz, 1C), 121.6, 120.6 (d, ²J = 18.1 Hz, 1C), 117.7 (d, ²J = 21.5 Hz, 1C), 112.0, 42.2, 22.4 (2C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₄ClFN₃OS [M+H]⁺ 338.0525, found 338.0522.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4g): Following procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.36 g, 1.13 mmol) and with *tert*-butylamine (238 μL, 2.26 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a pale-yellow powder (0.3 g, 69 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.41 (s, 1H), 7.64 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 6.99 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.74 (s, 4H), 3.18 (s, 4H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.6, 150.7, 126.8 (2C), 123.4, 118.2, 114.8 (2C), 110.0, 65.9 (2C), 50.9, 47.6 (2C),

28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₅N₄O₂S [M+H]⁺ 385.1683, found 385.1689.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4h): Following procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.325 g, 0.98 mmol) and with *tert*-butylamine (200 μL, 1.96 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (90 mg, 23 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.39 (s, 1H), 7.62 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.97 (d, ³J = 9.2 Hz, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.27-3.18 (m, 4H), 2.47-2.41 (m, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.4, 150.8, 126.8 (2C), 122.9, 118.1, 114.9 (2C), 109.9, 54.4 (2C), 50.9, 47.2 (2C), 45.7, 28.6 (3C). mp = 282-284 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₁H₂₈N₅OS [M+H]⁺ 398.2009, found 398.2006.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4i): Following procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.350 g, 1.11 mmol) and with *tert*-butylamine (232 μL, 2.21 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (216 mg, 51 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.37 (s, 1H), 7.60 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.95 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 3.29-3.20 (m, 4H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.45-1.36 (m, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.5, 157.5, 152.2, 151.7, 150.9, 126.8 (2C), 122.2, 117.8, 115.0 (2C), 109.7, 50.9, 48.5 (2C), 28.6 (3C), 24.9 (2C), 23.9. mp = 289-291 °C. HRMS (ESI)

m/z calculated for C₂₁H₂₇N₄OS [M+H]⁺ 383.1900, found 383.1898.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4j): Following procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.65 g, 2.45 mmol) and with *tert*-butylamine (515 μL, 4.9 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as an off-white solid (547 mg, 65 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.46 (s, 1H), 7.73 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.32 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H), 6.09 (s, 1H), 2.52 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.3, 157.6, 152.3, 149.6, 140.0, 129.4, 126.3 (2C), 126.1 (2C), 120.0, 111.1, 51.0, 28.6 (3C), 14.4. mp = 272-274 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃OS₂ [M+H]⁺ 346.1042, found 346.1039.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4k): Following general procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 0.96 mmol) and with *tert*-butylamine (200 μL, 1.93 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (160 mg, 44 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400

MHz) δ 10.56 (s, 1H), 8.08 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.98 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H), 3.26 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.5, 140.8, 137.6, 127.9 (2C), 126.6 (2C), 122.9, 112.9, 51.1, 43.4, 28.6 (3C). mp = 294–296 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378.0941, found 378.0934.

4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)benzenesulfonamide (4l): Following general procedure D with methyl 3-amino-5-(4-sulfamoylphenyl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.64 mmol) and with *tert*-butylamine (135 μL , 1.28 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (from 100% dichloromethane to 97:3 dichloromethane/methanol) affording 4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-

yl)benzenesulfonamide as a yellow powder (135 mg, 56 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.55 (s, 1H), 8.00 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.87 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 6.14 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.9, 144.2, 136.0, 126.5 (2C), 126.3 (2C), 122.3, 112.5, 51.0, 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 379.0893, found 379.0893.

2-*tert*-butylamino-6-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4m): Following procedure D with methyl 3-amino-5-[4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylate (0.3 g, 0.78 mmol) and with *tert*-butylamine (170 μL , 1.57 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-

(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (117 mg, 33 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.57 (s, 1H), 8.09 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.80 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.68–3.61 (m, 4H), 2.96–2.87 (m, 4H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.0, 157.6, 152.3, 147.4, 137.4, 134.5, 128.6 (2C), 126.7 (2C), 122.8, 112.9, 62.3 (2C), 51.1, 45.9 (2C), 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 449.1312, found 449.1305.

2-*tert*-butylamino-6-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4n): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.2 g, 0.62 mmol) and with *tert*-butylamine (131 μL , 1.25 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[2-(morpholin-4-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a yellow powder (138 mg, 57 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 8.80 (s, 2H), 6.09 (s, 1H), 3.81–3.74 (m, 4H), 3.70–3.64 (m, 4H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.7, 160.2, 157.4, 155.2 (2C), 152.3, 144.7, 119.1, 116.5, 110.4, 65.9 (2C), 51.0, 44.0 (2C), 28.6 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.1598, found 387.1597.

2-*tert*-butylamino-6-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4o): Following procedure D with methyl 3-amino-5-(2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl)thiophene-2-carboxylate (0.195 g, 0.58 mmol) and with

tert-butylamine (122 μL , 1.17 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (45 mg, 19 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 8.77 (s, 2H), 7.43 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 3.84–3.75 (m, 4H), 2.41–2.32 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.6, 160.3, 157.4, 155.2 (2C), 152.3, 144.8, 119.0, 116.1, 110.3, 54.3 (2C), 51.0, 45.8, 43.4 (2C), 28.6 (3C). mp = 289–291. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 400.1914, found 400.1914.

4.1.8. Reduction of nitro derivatives

6-(4-aminophenyl)-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4p): To a solution of 2-(*tert*-butylamino)-6-(4-nitrophenyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.227 g, 0.66 mmol) in acetic acid (6.9 mL) was added iron powder (0.368 g, 6.59 mmol) and the mixture was stirred at 80 °C for 15 min. Excess solvent was removed *in vacuo* and crude product was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 95:5 dichloromethane/methanol). Fractions of interest were purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol) affording 6-(4-aminophenyl)-2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige solid (66 mg, 32 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.31 (s, 1H), 7.45 (d, 3J = 8.4 Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.60 (d, 3J = 8.4 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.56 (s, 2H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.5, 157.4, 152.1, 151.9, 150.2, 126.9 (2C), 120.3, 116.7, 113.8 (2C), 109.0, 50.9, 28.6 (3C). mp = 259–261 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 315.1274, found 315.1274.

6-(4-aminophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (4q): To a solution of 6-(4-nitrophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.156 g, 0.47 mmol) in acetic acid (4.7 mL) was added iron powder (0.264 g, 4.72 mmol) and the mixture was stirred at 60 °C for 20 min. The reaction mixture was filtered through celite, the filtrate was isolated, and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to 90:10 dichloromethane/isopropanol). Fractions of interest were recrystallized in isopropanol affording 6-(4-aminophenyl)-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as light brown powder (30 mg, 21 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.47 (s, 1H), 7.44 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.60 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H), 6.07 (d, 3J = 7.3 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 4.08–3.94 (m, 1H), 1.17 (d, 3J = 6.55 Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 160.8, 157.5, 152.6, 152.0, 150.2, 126.9 (2C), 120.3, 116.4, 113.8 (2C), 109.0, 42.0, 22.4 (2C). Mp = 296–298 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 301.1118, found 301.1117.

***N*-[4-(2-*tert*-butylamino-4-oxo-3,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-6-yl)phenyl]acetamide (4r):** isolated as a side product from the purification of 6-(4-aminophenyl)-2-(*tert*-butylamino)thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one when the reaction was stirred at 120 °C for 30 min (brown powder). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.43 (bs, 1H), 10.12 (s, 1H), 7.73 (d, 3J = 11.6 Hz, 2H), 7.66 (d, 3J = 12 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 6.07 (s,

1H), 2.07 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 168.5, 160.3, 157.5, 152.2, 150.0, 140.3, 127.5, 126.4 (2C), 119.5, 119.2 (2C), 110.8, 51.0, 28.6 (3C), 24.1. mp > 300 °C HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₂₁N₄O₂S [M+H]⁺ 357.1380, found 357.1377.

4.1.9. 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonimidoyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3H)-one (4s)

To a suspension of 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfanyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3H)-one (0.15 g, 0.43 mmol) and ammonium carbamate (51 mg, 0.65 mmol) in methanol (868 μL) was added (diacetoxyiodo)benzene (0.293 g, 0.91 mmol) and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on neutral alumina gel (starting from 100 % dichloromethane to 95:5 dichloromethane/methanol) affording 2-*tert*-butylamino-6-[4-(methylsulfonimidoyl)phenyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3H)-one as a yellow powder (80 mg, 49% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.55 (bs, 1H), 8.05-7.94 (m, 4H), 7.69 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.10 (s, 3H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 160.1, 157.6, 152.3, 147.9, 144.3, 136.6, 128.2 (2C), 126.3 (2C), 122.4, 112.7, 51.0, 45.6, 28.6 (3C). mp = 251-253 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₂₁N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 377.1100, found 377.1094.

4.1.10. clogD_{7.4} calculations

clogD_{7.4} were calculated for all compounds using MarvinSketch software (developed by ChemAxon). The following calculations options were used: consensus (logP method), 0.1 mol/dm³ Cl⁻ concentration and 0.1 mol/dm³ Na⁺ K⁺ concentration.

4.2. Biology

4.2.1. Antiplasmodial evaluation

In this study, a K1 culture-adapted *P. falciparum* strain resistant to chloroquine, pyrimethamine, and proguanil was used in an *in vitro* culture. It was maintained in continuous culture, as described previously by Trager and Jensen.¹⁸ Cultures were maintained in fresh A+ human erythrocytes at 2.5% hematocrit in complete medium (RPMI 1640 with 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 10% of A+ human serum) at 37 °C under reduced O₂ atmosphere (gas mixture 10% O₂, 5% CO₂, and 85% N₂). Parasitemia was maintained daily between 1 and 3%. The *P. falciparum* drug susceptibility test was carried out by comparing quantities of DNA in treated and control cultures of parasite in human erythrocytes according to a SYBR Green I fluorescence-based method¹⁹ using a 96-well fluorescence plate reader. Compounds, previously dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), were incubated in a total assay volume of 200 μL (RPMI, 2% hematocrit and 0.4% parasitemia) for 72 h in a humidified atmosphere (10% O₂ and 5% CO₂) at 37 °C, in 96-well flat bottom plates. Duplicate assays were performed for each sample. After incubation, plates were frozen at 20 °C for 24 h. Then, the frozen plates were thawed for 1 h at 37 °C. Fifteen μL of each sample were transferred to 96-well flat bottom non-sterile black plates (Greiner Bio-one,

Kremsmünster, Austria), already containing 15 μL of the SYBR Green I lysis buffer (2X SYBR Green I, 20 mM Tris base pH 7.5, 20 mM EDTA, 0.008% w/v saponin, 0.08% w/v Triton X-100). Negative control treated by solvents (DMSO or H₂O) and positive controls (chloroquine and doxycycline) were added to each set of experiments. Plates were incubated for 15 min at 37 °C and then read on a TECAN Infinite F-200 spectrophotometer with excitation and emission wavelengths at 485 and 535 nm, respectively. The concentrations of compounds required to induce a 50% decrease in parasite growth (EC₅₀ K1) were calculated from three independent experiments.

4.2.2. Cytotoxic evaluation

The HepG2 cell line was maintained at 37 °C, 5% CO₂, at 90% humidity in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine (200 mM), and penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μg/mL) (complete RPMI medium). The cytotoxicity of the tested molecules on the HepG2 (hepatocarcinoma cell line purchased from ATCC, ref HB-8065) cell line was assessed according to the method of Mosmann²⁰ with slight modifications. Briefly, 5.10³ cells in 100 μL of complete medium were inoculated into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂. After 24 h incubation, 100 μL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Triplicate assays were performed for each sample. Each plate was then microscopically examined for possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. Next, 100 μL of MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) solution (0.5 mg/mL in medium without FBS) was added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 μL) was added to dissolve the

resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (700 rpm) for 10 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader (LabX, Midland, ON, Canada). DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as a percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined from the dose–response curve, using TableCurve software 2D v.5.0. CC₅₀ values to represent the mean value calculated from three independent experiments.

4.2.3. Microsomal stability

The tested product and propranolol, used as a reference, were incubated in duplicate (reaction mixture volume of 0.5 mL) with female mouse microsomes (CD-1, 20 mg/mL; BD Gentest) at 37 °C in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, in the presence of MgCl₂ (5 mM), NADP (1 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (0.4 U/mL), and glucose-6-phosphate (5 mM). For the estimation of the intrinsic clearance, 50-μL aliquots were collected at 0, 5, 10, 20, 30, and 40 min and the reaction was stopped with 4 volumes of acetonitrile (ACN) containing the internal standard. After centrifugation at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C, the supernatants were conserved at 4 °C for immediate analysis or placed at -80 °C in case of

postponement of the analysis. Controls (time zero and final time point) in triplicate were prepared by incubation of the internal standard with microsomes denatured by acetonitrile. The LC-MS system used for this study was a Waters Acquity I-Class/Xevo TQD equipped with a Waters Acquity BEH C₁₈ column, 50 by 2.1 mm, 1.7 μm. The mobile phases were ammonium acetate 10 mM (mobile phase A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (mobile phase B). The injection volume was 1 μL, and the flow rate was 600 μL/min. The chromatographic analysis, with a total duration of 4 min, was made with the following gradient: 0 < t < 0.2 min, 2% mobile phase B; 0.2 < t < 2 min, linear increase to 98% mobile phase B; 2 < t < 2.5 min, 98% mobile phase B; 2.5 < t < 2.6 min, linear decrease to 2% mobile phase B; 2.6 < t < 4 min, 2% mobile phase B. The quantification of each compound was obtained by converting the average of the ratios of the analyte/internal standard surfaces to the percentage of consumed product. The ratio of the control at t₀ corresponded to 0% of product consumed. The calculation of the half-life (t_{1/2}) of each compound in the presence of microsomes was done according to the equation $t_{1/2} = (\ln 2)/k$, where k is the first-order degradation constant (the slope of the logarithm of compound concentration versus incubation time). The intrinsic clearance in vitro (Cl_{int}, expressed in ml/min/mg) was calculated according to the equation $Cl_{int} = (\text{dose}/AUC_{\infty})/[\text{microsomes}]$, where dose is the initial concentration of product in the sample, AUC_∞ is the area under the concentration-time curve extrapolated to infinity, and [microsomes] is the microsome concentration expressed in mg/μL.

Author Contributions

R.M.: conceptualization, investigation, visualization, writing – original draft, writing – review and editing; P.L.: investigation, writing – review and editing; S.H.: formal analysis, investigation, validation; C.D.: investigation, writing – review and editing; F.S.: investigation; D.A.: investigation; N.M.: supervision, writing – review and editing; N.A.: resources, supervision, validation; V.L.: resources, supervision, funding acquisition; P.V.: supervision, writing – review and editing; D.M.: funding acquisition; P.V.: resources, supervision, writing – review and editing; N.P.: conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision, validation, writing – review and editing.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was financed by the grants of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Palukill DMC20181039565) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR Plasmodrug 18-CE18-0009-01).

We want to thank Dr Vincent Remusat (Institut de Chimie Radicale, Marseille) for his help with NMR analysis, Dr Valérie

Monnier and Ms Gaëlle Hisler (Spectropole, Marseille) for performing HRMS analysis and Ms Catherine Piveteau (Institut Pasteur de Lille) for performing microsomal stability studies.

Notes and references

- World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.E.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; Wenger, E.A.; Briët, O.; Penny, M.A.; Smith, T.A.; Bennett, A.; Yukich, J.; Eisele, T.P.; Griffin, J.T.; Fergus, C.A.; Lynch, M.; Lindgren, F.; Cohen, J.M.; Murray, C.L.J.; Smith, D.L.; Hay, S.I.; Cibulskis, R.E.; Gething, P.W. *Nature* **2015**, *526*, 207–211, doi:[10.1038/nature15535](https://doi.org/10.1038/nature15535).
- Dondorp, A.M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A.P.; Tarning, J.; Lwin, K.M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S.J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S.S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N.P.J.; Lindegardh, N.; Socheat, D.; White, N.J. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455–467, doi:[10.1056/NEJMoa0808859](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859).
- Ariey, F.; Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Beghain, J.; Langlois, A.-C.; Khim, N.; Kim, S.; Duru, V.; Bouchier, C.; Ma, L.; Lim, P.; Leang, R.; Duong, S.; Sreng, S.; Suon, S.; Chhoo, C.M.; Bout, D.M.; Ménard, S.; Rogers, W.O.; Genton, B.; Fandeur, T.; Miotto, O.; Ringwald, P.; Le Bras, J.; Berry, A.; Barale, J.-C.; Fairhurst, R.M.; Benoit-Vical, F.; Mercereau-Puijalon, O.; Ménard, D. *Nature* **2014**, *505*, 50–55, doi:[10.1038/nature12876](https://doi.org/10.1038/nature12876).
- van der Pluijm, R.W.; Imwong, M.; Chau, N.H.; Hoa, N.T.; Thuy-Nhien, N.T.; Thanh, N.V.; Jittamala, P.; Hanboonkunupakarn, B.; Chutasmit, K.; Saelow, C.; Runjarern, R.; Kaewmok, W.; Tripura, R.; Peto, T.J.; Yok, S.; Suon, S.; Sreng, S.; Mao, S.; Oun, S.; Yen, S.; Amaratunga, C.; Lek, D.; Huy, R.; Dhorda, M.; Chotivanich, K.; Ashley, E.A.; Mukaka, M.; Waithira, N.; Cheah, P.Y.; Maude, R.J.; Amato, R.; Pearson, R.D.; Gonçalves, S.; Jacob, C.G.; Hamilton, W.L.; Fairhurst, R.M.; Tarning, J.; Winterberg, M.; Kwiatkowski, D.P.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T.T.; Day, N.P.; Miotto, O.; White, N.J.; Dondorp, A.M. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 952–961, doi:[10.1016/S1473-3099\(19\)30391-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30391-3).
- Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects> (accessed on 04/01/22).
- Medicines for Malaria Venture. *Annual report 2020*, 2021. <https://www.mmv-annualreport2020.org/> (accessed on 04/01/22).
- Duffey, M.; Blasco, B.; Burrows, J.N.; Wells, T.N.C.; Fidock, D.A.; Leroy, D. *Trend. Parasitol.* **2021**, *37*, 709–721, doi:[10.1016/j.pt.2021.04.006](https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.006).
- Cohen, A.; Suzanne, P.; Lancelot, J.-C.; Verhaeghe, P.; Lesnard, A.; Basmaciyan, L.; Hutter, S.; Laget, M.; Dumètre, A.; Paloque, L.; Deharo, E.; Crozet, M.D.; Rathelot, P.; Dallemagne, P.; Lorthiois, A.; Sibley, C.H.; Vanelle, P.; Valentin, A.; Mazier, D.; Rault, S.; Azas, N. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 16–28, doi:[10.1016/j.ejmech.2015.03.011](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.011).
- Bosson-Vanga, H.; Primas, N.; Franetich, J.-F.; Lavazec, C.; Gomez, L.; Ashraf, K.; Tefit, M.; Souillard, V.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Grand, R.; Donnette, M.; Mustière, R.; Amanzougaghene, N.; Tajeri, S.; Suzanne, P.; Malzert-Fréon, A.; Rault, S.; Vanelle, P.; Hutter, S.; Cohen, A.; Snounou, G.; Roques, P.; Azas, N.; Lagardère, P.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Nguyen, M.; Paloque, L.; Benoit-Vical, F.; Verhaeghe, P.; Mazier, D. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e00274-21, doi:[10.1128/Spectrum.00274-21](https://doi.org/10.1128/Spectrum.00274-21).

- 11 Heravi, M.M.; Kheilkordi, Z.; Zadsirjan, V.; Heydari, M.; Malmir, M. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *861*, 17–104, doi:[10.1016/j.jorganchem.2018.02.023](https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.02.023).
- 12 Charles, M.D.; Schultz, P.; Buchwald, S.L. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3965–3968, doi:[10.1021/ol0514754](https://doi.org/10.1021/ol0514754).
- 13 Begouin, A.; Hesse, S.; Queiroz, M.-J.R.; Kirsch, G. *Synthesis* **2005**, 2373–2378, doi:[10.1055/s-2005-870014](https://doi.org/10.1055/s-2005-870014).
- 14 Surry, D.S.; Buchwald, S.L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27–50, doi:[10.1039/C0SC00331J](https://doi.org/10.1039/C0SC00331J).
- 15 Wang, L.; Desmoulin, S.K.; Cherian, C.; Polin, L.; White, K.; Kushner, J.; Fulterer, A.; Chang, M.-H.; Mitchell-Ryan, S.; Stout, M.; Romero, M.F.; Hou, Z.; Matherly, L.H.; Gangjee, A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7150–7164, doi:[10.1021/jm200739e](https://doi.org/10.1021/jm200739e).
- 16 Synthesis med (Shanghai) Co Ltd. Method for preparing Chk protein kinase antagonist AZD-7762. CN101967141A, 2011.
- 17 Ali, E.M.H.; Abdel-Maksoud, M.S.; Oh, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1159–1194, doi:[10.1016/j.bmc.2019.02.044](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.044).
- 18 Trager, W.; Jensen, J.B. *Science* **1976**, *193*, 673–675, doi:[10.1126/science.781840](https://doi.org/10.1126/science.781840).
- 19 Guiguemde, W.A.; Shelat, A.A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G.J.; Davis, P.H.; Smithson, D.C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jimenez-Diaz, M.B.; Martinez, M.S.; Wilson, E.B.; Tripathi, A.K.; Gut, J.; Sharlow, E.R.; Bathurst, I.; El Mazouni, F.; Fowble, J.W.; Forquer, I.; McGinley, P.L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P.J.; DeRisi, J.L.; Sullivan, D.J.; Lazo, J.S.; Roos, D.S.; Riscoe, M.K.; Phillips, M.A.; Rathod, P.K.; Van Voorhis, W.C.; Avery, V.M.; Guy, R.K. *Nature* **2010**, *465*, 311–315, doi:[10.1038/nature09099](https://doi.org/10.1038/nature09099).
- 20 Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:[10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Synthesis of 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one analogues using scaffold hopping strategy and evaluation of their antiplasmodial profile.

Mustière, R.;^a Lagardère, P.;^b Hutter, S.;^c Dell'Orco, V.;^a Amanzougaghene, N.;^d Tajeri, S.;^d Franetich, J-F.; Corvaisier, S.;^e Malzert-Fréon, A.;^e Masurier, N.;^b Lisowski, V.;^b Verhaeghe, P.;^{f, g} Mazier, D.;^d Azas, N.;^c Vanelle, P.;^{a, h} Primas N.^{a, h}

^a Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Marseille, France.

^b Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Montpellier, France.

^c Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Marseille, France.

^d Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), INSERM, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France.

^e Normandie Univ, Unicaen, CERMN, Caen, France

^f CHU de Nîmes, service de pharmacie, Nimes, France

^g LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS UPR 8241, UPS, Toulouse, France.

^h Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques, APHM, Hôpital Conception, Marseille, France.

1. Abstract

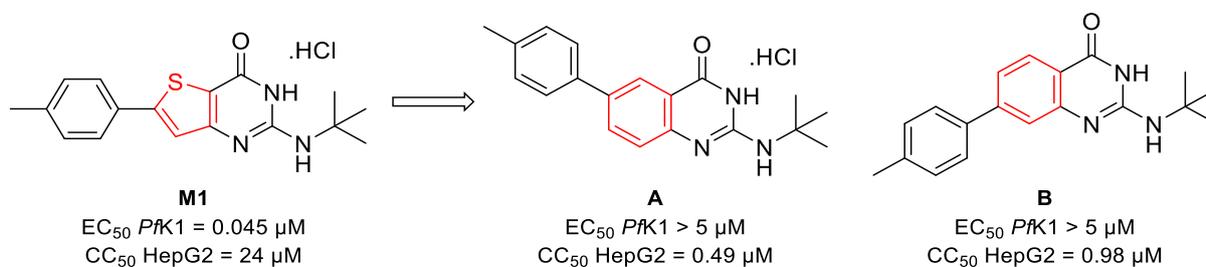
Gamhepathiopine, also called M1, is an antiplasmodial 2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride first described in 2015. This promising compound is active on all development stage of *P. falciparum* with a still unknown mechanism of action. However, development of this compound cannot progress further due to an important sensibility to hepatic oxidative metabolism and poor pharmacokinetics parameters. In an attempt to obtain new antiplasmodial compounds with better profile, we carried out a scaffold hopping strategy on compound M1 resulting in the synthesis of 20 new compounds in six different chemical series: thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one, furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, 3,6-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one and 7-methylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-3(4*H*)-one. All the compounds were then tested on the multi-resistant K1 strain of *Plasmodium falciparum* and the human HepG2 cell-line to evaluate their antiplasmodial activity and their cytotoxicity. Among the different series, we identified the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series as the most promising since we obtained compound **3j**, with a biological profile on par with M1 but with pharmacokinetics parameters substantially improved. Results from other series also highlighted the importance of the position 5 and 7 of the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one core in the antiplasmodial activity of the compounds.

2. Introduction

Malaria, parasitic disease caused by *Plasmodium* (mainly *P. falciparum*) and transmitted by the infectious bite of female *Anopheles* mosquitoes, is a major burden in endemic countries. According to the World Health Organization, malaria affected 241 million people and killed 627,000 of them in 2020, mostly children under 5 years old.¹ First-line treatments consist of the combination of an artemisinin derivative with an antimalarial of another therapeutic class, named artemisinin-based combination therapy (ACT). However, similarly to chloroquine or the sulfadoxine-pyrimethamine combination, *P. falciparum* strains resistant to artemisinin derivatives appeared and quickly spread in the greater Mekong subregion (South-East Asia) since they were first reported in 2009.² These strains limit the clinical efficacy of the artemisinin derivatives but also to the partner drug,³ and are endangering a growing number of people after they were discovered in eastern India⁴ and Rwanda.⁵ Currently, in clinical trials, three compounds are in phase II and four in phase I, under the supervision of Medicine for Malaria Venture (MMV).⁶ But the lack of compounds in phase III shows that the development of new antimalarial compounds is still required, preferably with multistage activity and novel mechanisms of action to limit the emergence and spread of new resistances.

Following a chemical library screening, we discovered in 2015 gamhepathiopine (also called M1), hydrochloride salt of a 2-*tert*-butylaminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one derivative.⁷ This compound is active against every development stages of *P. falciparum* including the quiescent parasites of artemisinin-resistant strain F32-ART5.⁸ Moreover, its mechanism of action is still unknown but differs from the currently approved antimalarial drugs. It also displayed *in vivo* activity on a *P. yoelii* infected mouse model but only when mice were also treated with 1-aminobenzotriazole, a pan-CYP450 inhibitor. We later showed the *in vitro* sensibility to hepatic metabolism of gamhepathiopine with a half-time of 11 minutes on mouse hepatic microsomes. This led us to initiate new pharmacomodulations on gamhepathiopine to discover new 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones with maintained antiplasmodial profile and improved pharmacokinetics properties.

As part of this work, we decided to engage a scaffold hopping strategy on the thienopyrimidinone core, focused on the thiophene moiety, and evaluate its effect on our compounds' biological profile. Scaffold hopping is a well know strategy in drug discovery which consists of identifying a central core of a bioactive compound and modifying it, leading to a new analog core. We previously used this strategy in the work leading to gamhepathiopine where we synthesized two compounds in the 2-*tert*-butylaminoquinazolin-4(3*H*)-one series with the tolyl moiety either at position 6 or 7 of the quinazoline core (compounds **A** and **B**, Scheme 1).⁷ Compared to M1, these two quinazolines showed a total loss of their antiplasmodial activity and a huge increase of their cytotoxicity.



Scheme 1. Biological values of compound M1 and its two quinazoline analogs **A** and **B**

These results guided us to limit our choice of aromatic cycles, able to replace the thiophene moiety, to five-membered rings to keep the original side chain orientation. Moreover, it was important for us to be able to obtain an aminoester of the desired aromatic cycle to realize the cyclization reaction required for the formation of the aminopyrimidinone moiety. These considerations led us to select five heterocycles: thiophene (but with the sulphur atom positioned at position 7 instead of 5 on the thienopyrimidinone M1), thiazole, pyrrole, furane and selenophene. Here, we describe the synthesis or the attempted synthesis of five new chemical series incorporating the previously listed cycles and 7-methylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones to initiate the exploration of position 7 which was never studied before (Figure 1). The synthesized compounds were then evaluated to determine their antiparasmodial activity and their cytotoxicity.

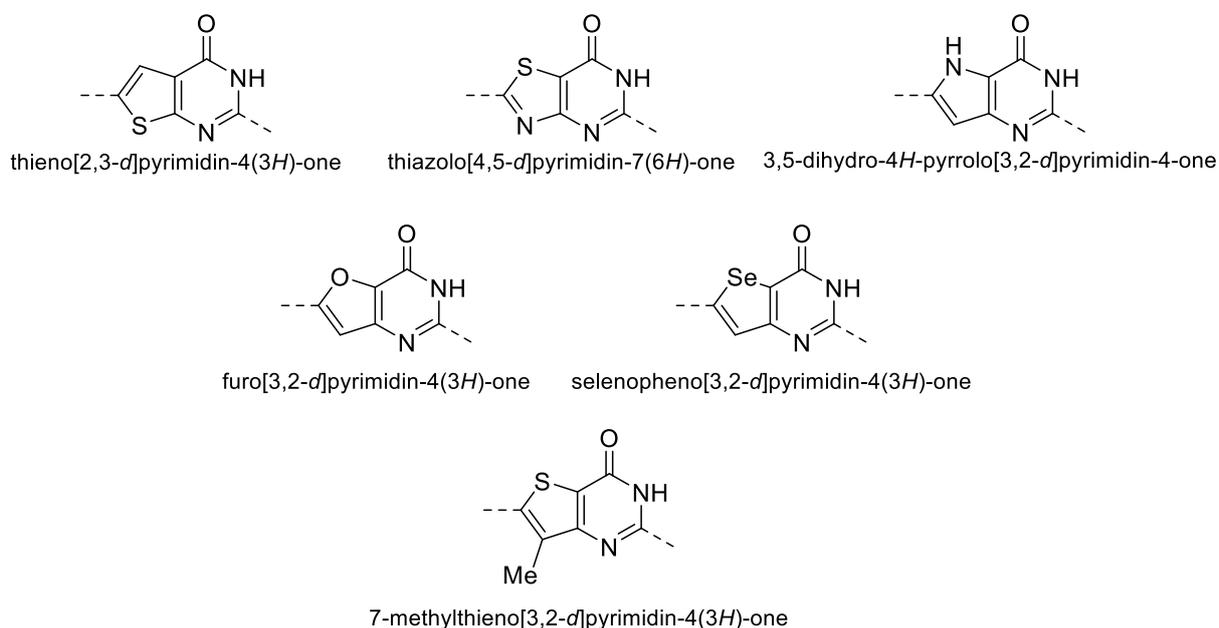


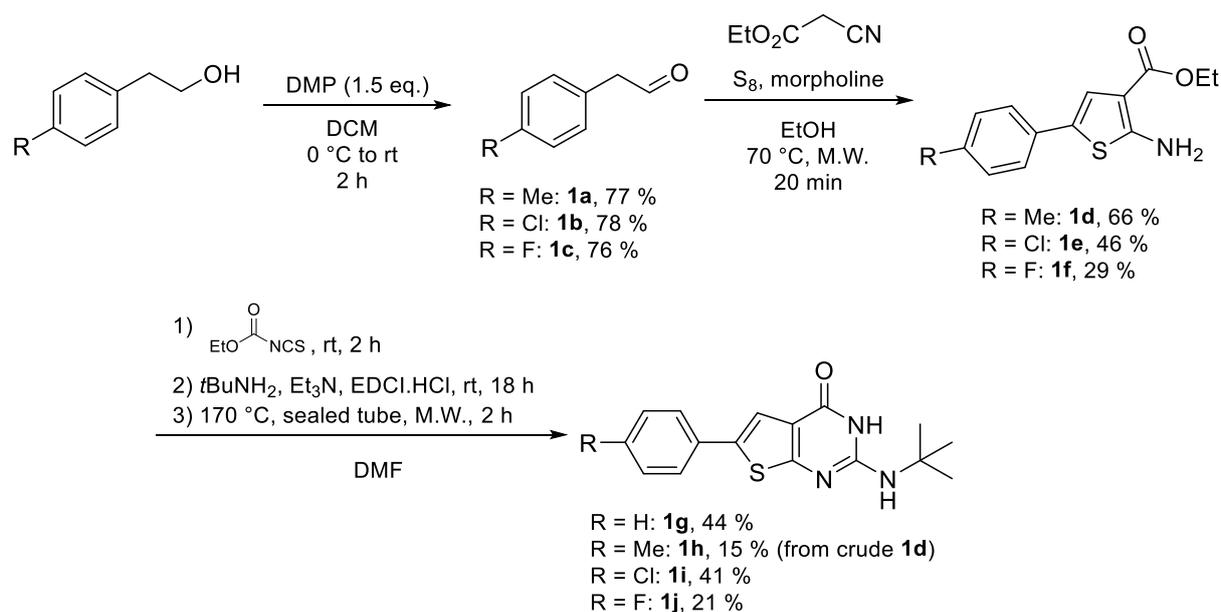
Figure 1. Chemical series studied in this work.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis

For the five different series we choose for the scaffold hopping approach, our synthetic strategy was to first obtain an aminoester of the selected aromatic ring. Following the insertion of a side chain if needed, these aminoesters would then be engaged in the conditions allowing the formation of the aminopyrimidinone moiety.

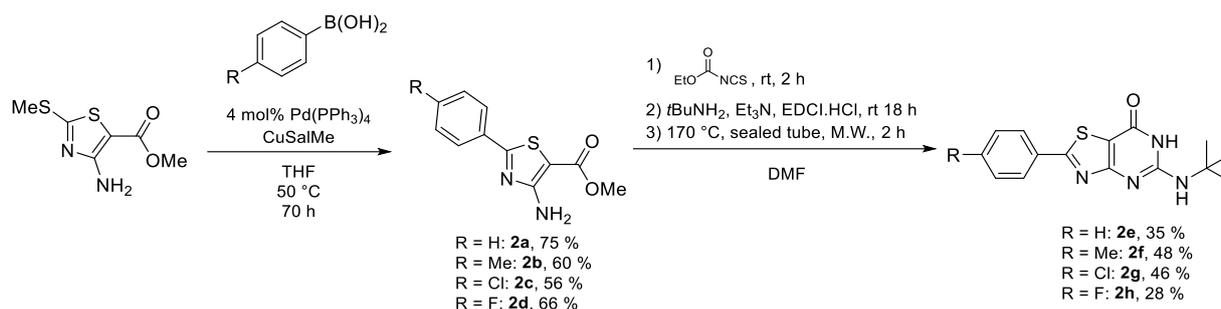
For the thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series, the synthesis started with 2-arylethan-1-ols, oxidized into 2-arylacetaldehydes (**1a** – **1c**) using Dess-Martin periodinane with yields around 75 %.⁹ They were then engaged into a Gewald reaction with ethyl 2-cyanoacetate to form ethyl 2-aminothiophene-3-carboxylates substituted at position 5 (**1d** – **1f**, Scheme 2).¹⁰ We observed a decrease of the isolated yield linked to the insertion of a more electron-withdrawing substituent on the phenyl ring (**1e** and **1f**). These thiophenes were converted into thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones using a cyclisation reaction previously described by our team for the synthesis of gamhepathiopine.⁷ We obtained four thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones (**1g** – **1j**) with yield ranging from 15 to 44 %. The influence of the substituent electronegativity was again observed with yield decreasing as the electronegativity of the substituent increases.



Scheme 2. Synthetic pathway of the thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series.

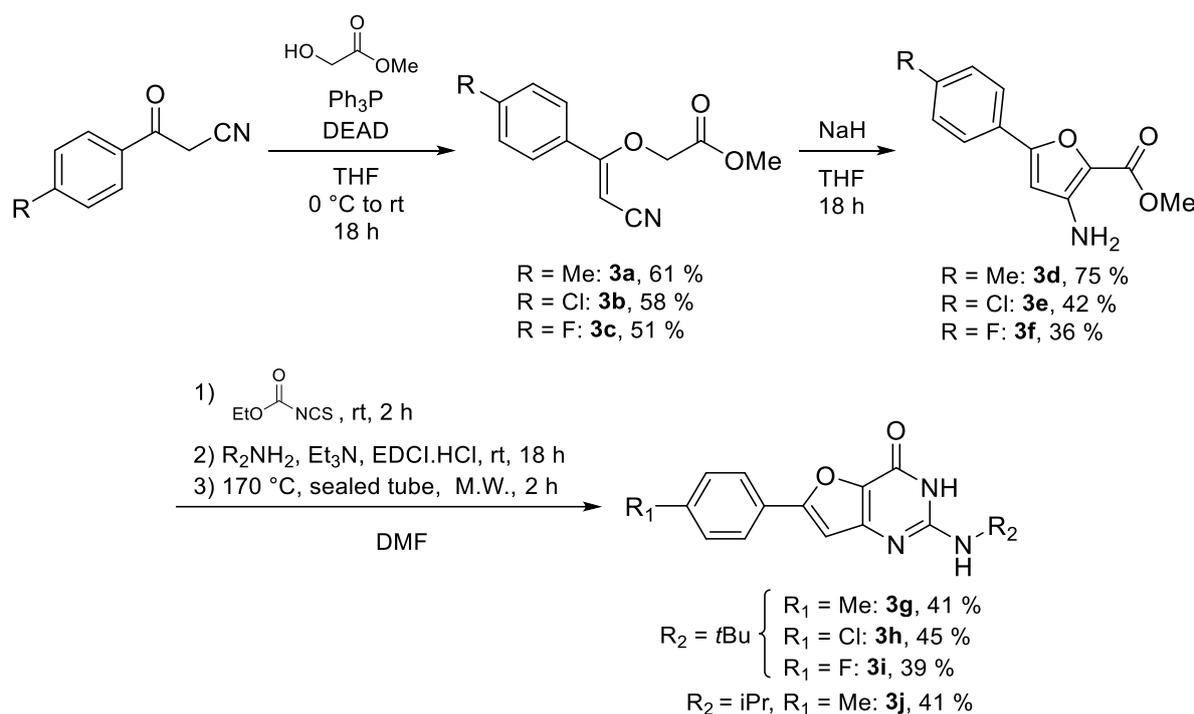
For the thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one series, we started from the commercially available methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate. The thiomethyl group at position 2 allowed us to realize a Liebeskind-Srogl palladium cross-coupling reaction. This reaction, first described in 2000,¹¹ allows the formation of a C-C bond between a thioether derivative and a boronic acid/ester derivative in presence of a palladium catalyst and sulphur-chelating agent (mainly copper-containing compounds). Using previously described conditions,¹² we synthesized four aminoesters of thiazole

with a *para*-substituted phenyl ring at position 2 with good yields (**2a – 2d**, Scheme 3). They were then engaged in the cyclization reaction affording four new thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones (**2e – 2h**).



Scheme 3. Synthetic pathway of the thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one series.

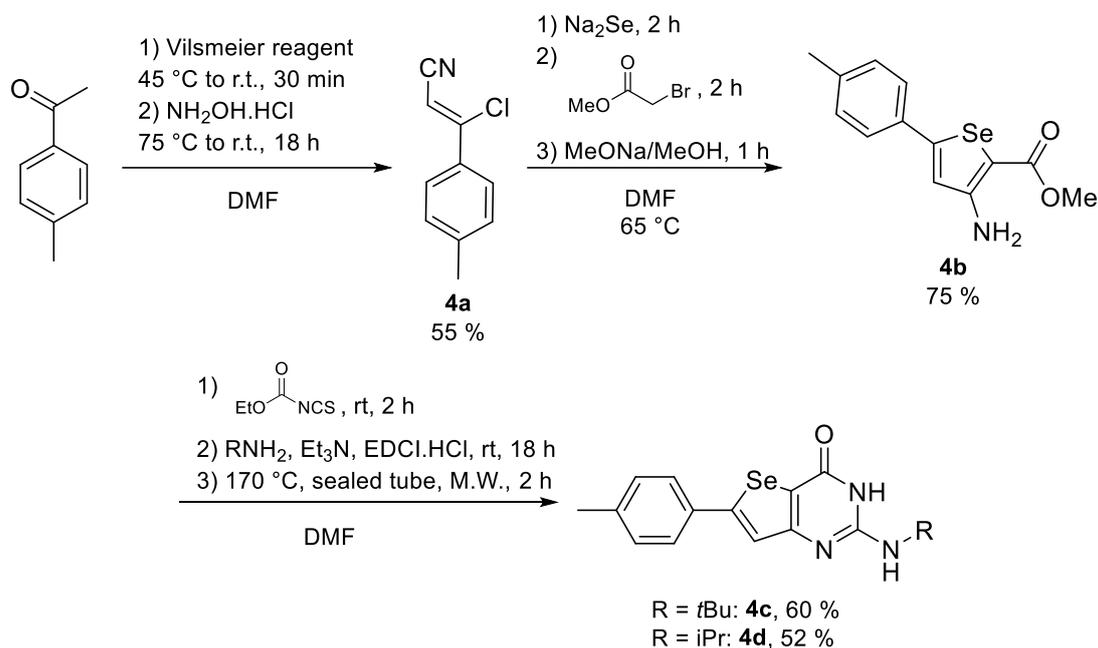
The synthesis of the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series started from 3-oxo-3-arylpropanenitriles engaged in a Mitsunobu-like reaction with methyl glycolate to form methyl {(*Z*)-2-cyano-1-arylethenyl}oxy}acetates (**3a – 3c**), converted into the corresponding aminoesters of furane using sodium hydride (**3d – 3f**, Scheme 4).¹³ Four furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones (**3g – 3j**) were then obtained from these aminoesters of furane using our cyclization conditions.



Scheme 4. Synthetic pathway of the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series.

For the selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series synthesis, the first reaction involved the transformation of 1-(4-methylphenyl)ethanone into the β -chloroacrylonitrile intermediate **4a** using the Vilsemeier reagent and hydroxylamine hydrochloride (Scheme 5).¹⁴ This intermediate was then treated successively with sodium selenide (prepared extemporaneously), methyl bromoacetate and

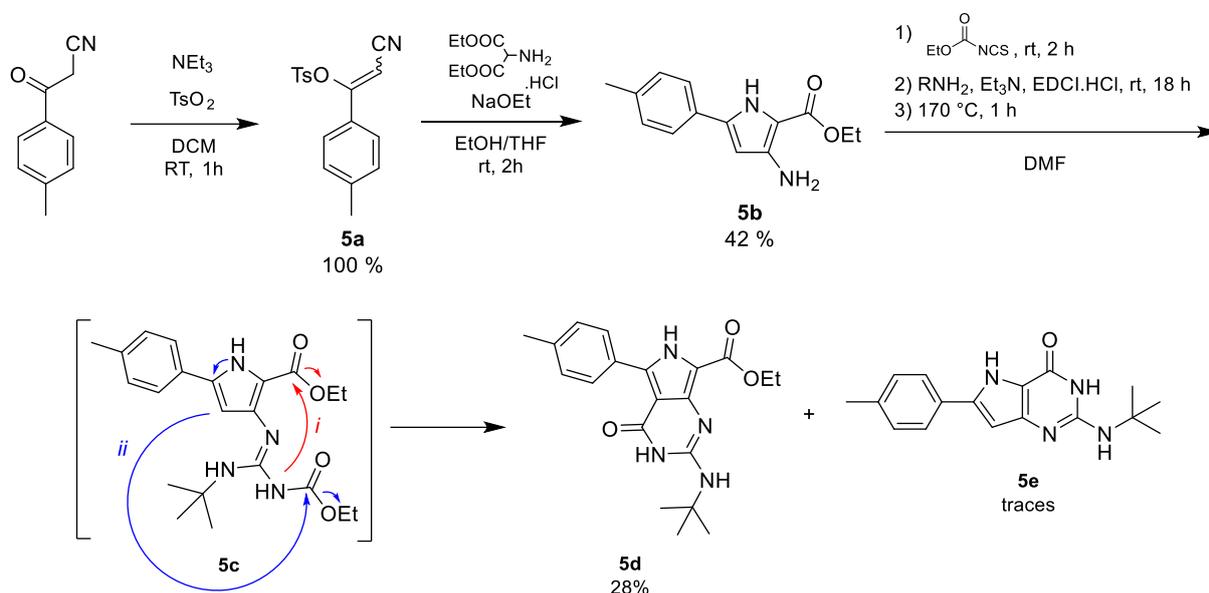
sodium methanoate to afford the selenophene aminoester **4b** with a good yield of 75%. Two selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones (**4c** and **4d**) were synthesized using the previously described cyclisation conditions.



Scheme 5. Synthetic pathway of the selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series.

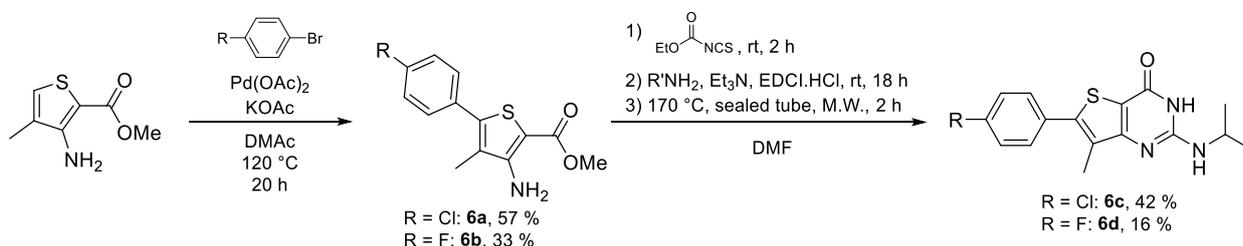
In order to access to the pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinone analogue **5e**, a similar strategy of synthesis described for the thieno[3,2-*d*]pyrimidinones was followed (Scheme 6). First, compound **5a** was obtained from propanenitrile derivative in quantitative yields, according to the literature.¹⁵ Then, **5a** was reacted with diethyl aminomalonate hydrochloride, in presence of a freshly prepared sodium ethoxide solution to promote the cyclization, the pyrrole derivative **5b** was obtained with 42% yield. Compound **5b** was then engaged in the cyclization conditions. Formation of the protected guanidine intermediate **5c** was observed but heating at 170 °C under microwave irradiation led to the degradation of the starting material. When the reaction mixture was heated under conventional thermal heating at 170 °C, a main compound **5d** was formed, which was isolated in 28% yield after chromatography. **5d** possessed a molecular weight of 368 Da instead of 296 Da for the expected compound **5e** and was identified as a pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine by NMR analysis. Notably, the presence of a quadruplet and a triplet at 1.29 and 4.22 ppm in the ¹H NMR spectrum as well as a peak at 161.1 ppm in the ¹³C NMR spectrum attested the presence of an ethyl carboxylate group in the final structure. The disappearance of the signal at 5.95 ppm attributed to the H4 of the pyrrole **5b** confirmed the position of cyclization. Indeed, the delocalization of the non-bonding doublet of the pyrrole nitrogen leads to the formation of an enamine and promotes cyclization at position 4 to offer compound **5d** (way ii, Scheme 6), at the expense of cyclization on the carbonyl in position 2 of the pyrrole (way i, Scheme 6). Several attempts to favor the pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinone **5e** formation was

carried out, but only traces of **5e** were obtained whatever the tested conditions. Each time, the formation of compound **5d** as the exclusive or main compound was obtained. However, this synthetic route resulted in an original pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine scaffold, which was, at our knowledge, never described in the literature.



Scheme 6. Synthetic pathway of the pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinone series.

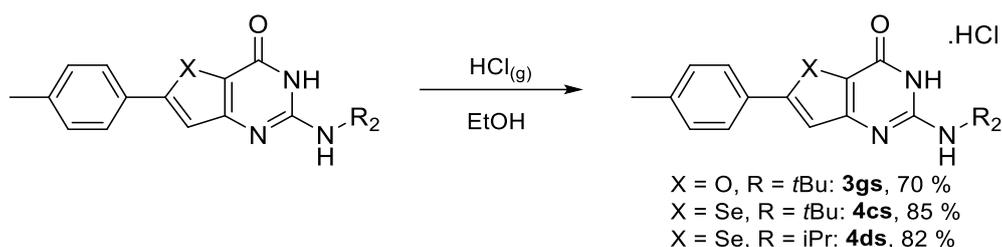
Regarding the synthesis of 7-methylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-3(4*H*)-ones, the synthesis pathway started with the commercially available methyl 3-amino-4-methylthiophene-2-carboxylate. The methyl substituent at position 4 of the thiophene ring allowed us to introduce the substituent at position 5 with a C-H arylation. Following the work carried out by Derridj *et al.*,¹⁶ we synthesized 2 methyl 3-amino-5-aryl-4-methylthiophene-2-carboxylates (**6a** and **6b**) that were then transformed into two 6-aryl-7-methylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones (**6c** and **6d**) with our cyclization reaction (Scheme 7).



Scheme 7. Synthetic pathway of the 7-methyl-thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series.

Three of the previously described compounds were turned into hydrochloride salts to potentially obtain the same improvement of antiplasmodial activity we observed with M1. Compounds were dissolved in absolute ethanol and hydrogen chloride was then bubbled in the solution provoking the precipitation of the desired salts (Scheme 8). For the selenophenopyrimidinone

salts **4cs** and **4ds**, we were able to confirm formation of the desired hydrochloride salt with elemental analysis.



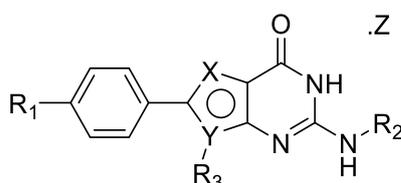
Scheme 8. Salification process of our compounds.

3.2. Abstract

3.2.1. Blood-stage antiplasmodial activity and cytotoxicity

The cyclized compounds were assessed on the multi-resistant *P. falciparum* strain K1 (resistant to chloroquine, sulfadoxine and pyrimethamine) to measure their antiplasmodial activity (EC_{50}) and assessed on the human HepG2 cell-line to measure their cytotoxicity (CC_{50}). The obtained values (Table 1) were used to determine the selectivity index of the compounds ($SI, CC_{50}/EC_{50}$) and were compared to reference drugs (chloroquine, atovaquone and doxycycline for the EC_{50} and doxorubicine for the CC_{50}). Out of **19** tested compounds, we observed solubility problems in the test medium for 14 of them (limiting determination of precise biological values), including two (**2g** and **2h**) that could not be solubilized to realize the tests.

Table 1. Antiplasmodial activity and cytotoxicity values of the synthesized compounds.



Entry	R ₁	R ₂	R ₃	X	Y	Z	EC_{50} <i>PfK1</i> (μM)	CC_{50} HepG2 (μM)	SI
1g	H						33.8 ± 3.7	> 12.5	> 0.4
1h	Me	<i>t</i> Bu	-	C	S	-	32.4 ± 5.2	20.5 ± 2.1	0.6
1i	Cl						> 50	21.4 ± 1.8	< 0.4
1j	F						> 12.5	> 25	-
2e	H						> 12.5	> 25	-
2f	Me	<i>t</i> Bu	-	S	N	-	4.6 ± 1.6	> 5	> 1.1
2g	Cl							n.d.	-
2h	F							n.d.	-
3g	Me	<i>t</i> Bu	H	O	C	-	0.8 ± 0.3	10.9 ± 1.1	13.6

3gs						HCl	0.30 ± 0.02	21.7 ± 0.5	72.3	
3h	Cl					-	0.4 ± 0.1	> 6.25	15.6	
3i	F					-	2.9 ± 2.0	> 3.125	> 1.1	
3j	Me	iPr				-	0.09 ± 0.02	20.4 ± 3.2	227	
4c			tBu			-	1.3 ± 0.5	> 7.8	> 6.0	
4cs	Me			H	Se	C	HCl	0.13 ± 0.05	> 3.125	> 24.0
4d							-	0.8 ± 0.2	> 25	> 31.3
4ds		iPr					HCl	0.77 ± 0.13	> 10	> 13.0
5d	See Scheme 6 for chemical structure							17.1 ± 0,9	7,4 ± 1.2	0.4
6c	F		Me					4.4 ± 0.8	> 25	> 5.7
C^a			H	S	C	-		0.5	> 25	> 50
6d		iPr	Me					4.3 ± 0.6	19.7 ± 1.8	4.6
D^a	Cl		H					0.6	> 15.6	> 26
M1 free base^a		tBu					-	0.2	25.6	128
M1^a	Me		H	S	C		HCl	0.045	24	533
E^a		iPr					-	0.8	49.4	61.8
Chloroquine^a								0.5	30	60
Atovaquone^a								0.0013	> 15.6	> 12,000
Doxycycline^a								5	20	4
Doxorubicine^a								-	0.2	-

a) Values from reference 7

For the four thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones (**1g** - **1j**), we observed a dramatic loss of antiplasmodial activity, from 0.2 μM for the free base of M1 to 32.4 μM for analog **1h**, following the displacement of the sulphur atom from position 5 to 7 on the thienopyrimidinone core. However, the cytotoxicity values for the thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones were on par with M1 values.

Introduction of a nitrogen atom at position 7 of the thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, resulting in the thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one series, had an important effect on the solubility of the resulting compounds resulting in two compounds (**2g** and **2h**) which could not be solubilized and the two others compounds with undefined values. Moreover, EC₅₀ is also decreased when going to the thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one series as shown by the EC₅₀ of compound **2f** at 4.6 μM vs 0.2 μM for M1 free base.

Regarding the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series, we initially synthesized compound **3g**. Considering its interesting submicromolar EC₅₀, we decided to synthesize more compounds in this series, including the hydrochloride salt of **3g**. Replacing the methyl group by a chlorine atom (**3h**) increased the antiplasmodial activity while the replacement with a fluorine atom (**3i**) decreased it.

However, in both cases, we observed an important decrease of the solubility in the cytotoxicity test medium. The isopropyl analog of **3g**, compound **3j** (based on the isopropyl analog of M1, compound **E**), displayed both improved antiplasmodial activity and cytotoxicity. Salification of compound **3g** into compound **3gs** also proved to be a successful strategy as it improved significantly both antiplasmodial activity and cytotoxicity. However, with the presence of the tolyl moiety on **3gs** and **3j**, these compounds are most certainly as sensible to oxidative metabolism as M1.

For the selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series, we observed a loss of potency on **4c** compared to the free base of M1 while the isopropyl derivative **4d** showed similar antiplasmodial activity to its thiophene analog **E**. However, we observed a loss of solubility in the cytotoxicity test medium for the selenophene derivatives that was surprisingly worsened when compounds **4c** and **4d** were converted into hydrochloride salts **4cs** and **4ds**. Therefore, even with a promising antiplasmodial activity, **4cs** could not be further tested (hepatic stage of malaria) because of anticipated solubility problems.

Since we managed to isolate compound **5d** while trying to synthesize the pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinone **5e**, we decided to assess the antiplasmodial activity of this compound. Unfortunately, for this pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine derivative, we observed an important loss of antiplasmodial activity and a moderate cytotoxicity on the HepG2 cell-line.

Finally, the introduction of the methyl substituent at position 7 of thienopyrimidinone core decreased the antiplasmodial activity of compounds **5c** and **5d**, when compared to their non-methylated analogs **C** and **E**.

3.2.2. Hepatic stage activity

Considering its interesting potency on blood stage *P. falciparum*, we decided to evaluate the potency of **3gs** on an *in vitro* hepatic stage model using simian hepatocytes infected by *P. berghei*. Simians hepatocytes were used instead of mouse ones for practical reasons; however, the EC₅₀ values on this model are increased. For example, M1 possesses an EC₅₀ of 0.45 μM on mouse hepatocytes infected by *P. yoelii* and 17.56 μM on simian hepatocytes infected by *P. berghei*. Simian hepatocytes were infected with *P. berghei* sporozoites and were incubated during two days with different concentrations (from 1.25 to 20 μM) of compound **3gs** for 48 hours. At the tested concentrations, we did not observed effect of **3gs** on the number of exo-erythrocytic forms (EEF) after the incubation; we only observed a decrease on the size of these EEF at the concentration of 20 μM (Figure 2). Testing more furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones, including on other models, will be needed before being able to conclude on the absence or not of activity the hepatic-stage of malaria for this series.

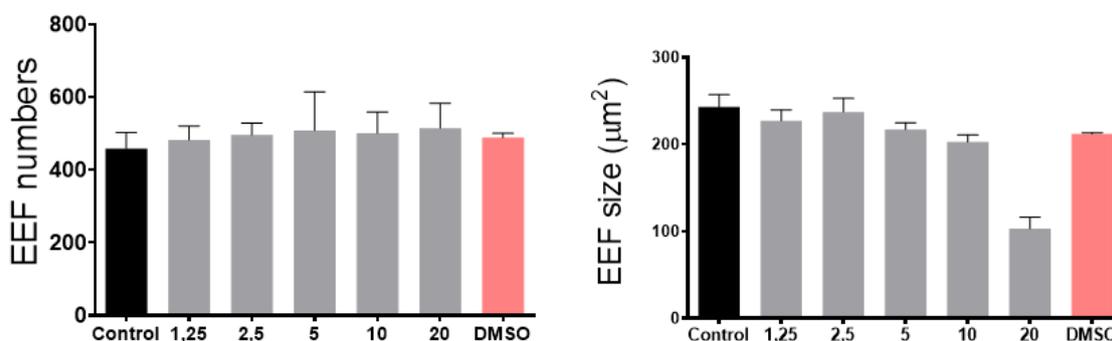
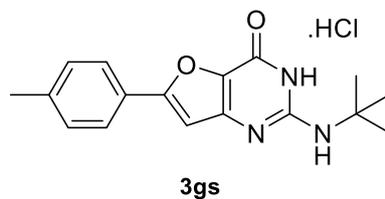


Figure 2. Effect of compound **3gs** on *P. berghei* infected simian hepatocytes. Graphs displays the EEf (Exo-erythrocytic form) numbers and size at given concentrations of **3gs**.

3.2.3. Pharmacokinetics assays

Because of **3j** excellent biological values on blood stage *P. falciparum*, we decided to measure some pharmacokinetics properties of this compound (Table 2): gastro-intestinal permeability (PAMPA-GIT test) and thermodynamic solubility. On top of suffering from metabolic liabilities, M1 is close to be totally non permeable in the PAMPA-GIT experience. With compound **3j**, we observed an impressive improvement of the permeability values at all tested pH going from 411.0 at pH 5 to 768.6 nm/s at pH 7.4. Moreover, **3j** also displayed a thermodynamic solubility value at 11.5 μM, improved by 45 % from M1 value and by 637 % from M1 free base.

Table 2. Gastro-intestinal permeability and thermodynamic solubility of **3g**, M1 and M1 free base.

Compound	Pe (nm/s) pH 5	Pe (nm/s) pH 6	Pe (nm/s) pH 7.4	Thermodynamic solubility pH 7.4 (μM)
3j	411.0 ± 35.0	643.2 ± 47.9	768.6 ± 169.7	11.5 ± 0.6
M1	0	0	4.6 ± 7.2	7.92 ± 0.83
M1 free base	-	-	-	1.56 ± 0.63

4. Conclusion

Starting from the chemical structure of M1, we synthesized a total of 20 analogs, distributed into 6 different chemical series, and assessed their activity on blood-stage *P. falciparum* K1 strain and their cytotoxicity on the human HepG2 cell-line. For the thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one, thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one and 7-methylthieno[3,2-*d*]pyrimidin-3(4*H*)-one series, we observed a loss of antiplasmodial activity (important in the case of the first one). The significant structural differences on the pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine **5d** also led to a loss of antiplasmodial activity.

However, for the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one and selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series, we observed only a minor loss of potency and similar cytotoxicity values. Therefore, regarding position 5 of the thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one core, a heteroatom appears to be mandatory at this position for the antiplasmodial activity of the compounds. At position 7, the replacement of the carbon atom by a nitrogen atom or the introduction of a methyl group at this position are both detrimental for the antiplasmodial activity.

Among all the compounds, the best ones came from the furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one series. Permeability and solubility results of **3j** (Table 2) indicate that this series would be much better in term of pharmacokinetics parameters. But this series could also lack hepatic stage activity as indicated by the results of furopyrimidinone analog of M1, **3gs** (Figure 2). Moreover, the tolyl moiety at position 6 of the furopyrimidinone core of **3gs** and **3j** could be responsible for metabolic liabilities. Thus, synthesis of new furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones with diverse substituents at position 6 will be required to further explore this new series and potentially obtain promising new antiplasmodial compounds.

5. Experimental Part

5.1. Chemistry

5.1.1. Material and methods

Starting materials were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) or Fluorochem (Derbyshire, UK). NMR spectra were recorded on Bruker Avance 250 MHz or a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the "Faculté de Pharmacie" of Marseille. The residual proton signal of the deuterated solvent was used as an internal reference: CDCl₃ δ = 7.26 ppm for ¹H and 77.16 for ¹³C and DMSO-*d*₆ δ = 2.50 ppm for ¹H and 39.52 ppm for ¹³C. Data for ¹H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet; m, multiplet), coupling constants (*J*) in Hertz (Hz) and integration. Data for ¹³C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm). Melting points were determined on a Köfler melting point apparatus (Wagner & MunzGmbH, München, Germany) and are uncorrected. HRMS spectra (ESI) were recorded on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) and were performed at the "Faculté des Sciences" of Marseille (St Jérôme campus). Silica Gel 60 (Merk 70–230) was used for column chromatography. Flash chromatography were performed on a puriFlash® 5.020 apparatus (Interchim, Montluçon, France). TLC were performed on aluminium plates coated with silica gel 60F-254 (Merck) in an appropriate eluent. Visualisation was made with ultraviolet light (254 or 365 nm). Reactions using microwave heating were performed with a Biotage® Initiator or Initiator+ apparatus (Biotage, Uppsala, Sweden).

5.1.2. Previously described compounds

Synthesis and analytical data of compounds **A** to **E** and M1 can be found in reference 7.

5.1.3. Synthesis of 2-arylaldehydes

To a solution of appropriate alcohol (1 eq) in dichloromethane (0.2 M) at 0 °C was added Dess-Martin periodinane (1.5 eq) and the suspension was stirred 2 h at room temperature. The mixture was washed with a mixture (5:1 v/v) of saturated aqueous NaHCO₃ and 2M aqueous Na₂S₂O₃ and the obtained aqueous layer was

extracted three times with diethyl ether. The organic phases were combined, washed with 0.1 M HCl aqueous solution and brine, dried over sodium sulfate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 50:50 cyclohexane/dichloromethane) affording the desired compound.

(4-Methylphenyl)acetaldehyde 1a

Following the general procedure starting from 2-(4-methylphenyl)ethanol (0.8 g, 5.8 mmol), (4-methylphenyl)acetaldehyde was isolated as a yellowish oil (0.6 g, 77 % yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.73 (s, 1H), 7.19 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 7.11 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 3.65-3.62 (m, 2H), 2.36 (s, 3H).

(4-Chlorophenyl)acetaldehyde 1b

Following the general procedure starting from 2-(4-chlorophenyl)ethanol (0.6 g, 3.8 mmol), (4-chlorophenyl)acetaldehyde was isolated as a yellow oil (0.457 g, 78 % yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.75 (s, 1 H), 7.36-7.32 (m, 2H), 7.17-7.12 (m, 2H), 3.69-3.68 (m, 2H).

(4-Fluorophenyl)acetaldehyde 1c

Following the general procedure starting from 2-(4-fluorophenyl)ethanol (0.8 g, 5.7 mmol), (4-fluorophenyl)acetaldehyde was isolated as a yellow oil (0.6 g, 76 % yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.74 (s, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 7.09-7.03 (m, 2H), 3.69- 3.68 (m, 2H).

5.1.4. Synthesis of ethyl 2-amino-5-arylthiophene-3-carboxylates

A mixture of the appropriate 2-arylacetaldehyde (1 eq), ethyl cyanoacetate (1 eq), S_8 (1.1 eq) and morpholine (1.15 eq) in EtOH (0.2 M) was stirred under microwave irradiation for 20 min at 70 °C in a sealed vial. After cooling, the reaction was filtered, and the filtrate was extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified by column chromatography on silica gel (starting from 70:30 to 50:50 cyclohexane/dichloromethane) affording the desired compound.

Ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate 1d

Following the general procedure starting from (4-methylphenyl)acetaldehyde (0.5 g, 3.7 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as an orange solid (0.637 g, 66 % yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.45 (s, 2H), 7.35 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.05 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 4.19 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.22 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.4, 162.3, 132.7, 132.3, 129.0 (2C), 125.9 (2C), 123.6, 121.9, 108.2, 60.1, 21.5, 14.7. mp = 87-89 °C.

Ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate 1e

Following the general procedure starting from (4-chlorophenyl)acetaldehyde (0.16 g, 0.94 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as a brown solid (0.123 g, 47 % yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.35 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.28 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 6.02 (s, 2H), 4.30 (q, $^3J = 7.0$ Hz,

2H), 1.37 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.4, 162.3, 132.7, 132.3, 129.0 (2C), 125.9 (2C), 123.6, 121.9, 108.2, 60.1, 14.7. mp = 99-101 °C.

Ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate 1f

Following the general procedure starting from (4-fluorophenyl)acetaldehyde (0.6 g, 4.34 mmol), ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate was isolated as a yellow solid (0.33 g, 29 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.41-7.38 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.05-7.02 (m, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.30 (q, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 1.37 (t, $^3J = 8.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 165.5, 162.1, 161.9 (d, $^1J = 240.0$ Hz, 1C), 130.4 (d, $^4J = 3.1$ Hz, 1C), 126.5 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2C), 123.9, 121.3, 115.9 (d, $^2J = 21.9$ Hz, 2C), 108.1, 60.0, 14.68. mp = 94-96 °C.

5.1.5. Synthesis of methyl 4-amino-2-aryl-1,3-thiazole-5-carboxylates

Methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (1 eq), appropriate phenylboronic acid (1.1 eq), copper(I) 2-hydroxy-3-methylbenzoate (1.5 eq) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium (4 mol%) were put under nitrogen atmosphere and dissolved in tetrahydrofuran (0.6 M). The obtained suspension was stirred at 50 °C for 72 h. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was dissolved in ethyl acetate (100 mL). The organic phase was washed sequentially with saturated aqueous NaHCO_3 (3x 10 mL), water (10 mL), and brine (10 mL). The organic phase was dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from cyclohexane/ethyl acetate 95:5 to 80:20). If needed, fractions of interest were triturated in cyclohexane to afford the desired product.

Methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 2a

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.6 g, 2.9 mmol) and phenylboronic acid (0.39, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.53 g, 77 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.96-7.89 (m, 2H), 7.51-7.40 (m, 3H), 5.93 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170.7, 164.7, 163.2, 132.9, 131.5, 129.2 (2C), 126.8 (2C), 93.8, 51.8. mp = 107-109 °C.

Methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate 2b

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.600 g, 2.9 mmol) and (4-methylphenyl)boronic acid (0.434 g, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.440 g, 60 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.81 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.24 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 5.94 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.40 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.0, 164.7, 163.2, 142.1, 130.2, 129.9 (2C), 126.7 (2C), 93.3, 51.7, 21.7. mp = 130-132 °C.

Methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate 2c

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (1.25 g, 6.12 mmol) and (4-chlorophenyl)boronic acid (1.05 g, 6.73 mmol), methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as yellow solid (0.925 g, 56 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.85 (d,

$^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.41 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 5.91 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 169.3, 164.6, 163.2, 137.6, 131.4, 129.4 (2C), 128.0 (2C), 94.2, 51.8. mp = 182-184 °C.

Methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate 2d

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(methylthio)thiazole-5-carboxylate (0.600 g, 2.9 mmol) and (4-fluorophenyl)boronic acid (0.941 g, 3.2 mmol), methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate was obtained as a yellow solid (0.49 g, 66 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.87-7.81 (m, 2H), 7.08-7.01 (m, 2H), 5.91 (bs, 2H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 169.4, 164.8 (d, $^1J = 252$ Hz, 1C), 164.6, 163.2, 129.2 (d, $^4J = 3.3$ Hz, 1C), 128.9 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2C), 116.3 (d, $^2J = 22.4$ Hz, 2C), 93.8, 51.8. mp = 167-169 °C.

5.1.3. Synthesis of methyl $\{[(Z)\text{-}2\text{-cyano-1-arylethenyl]oxy\}$ acetate

Methyl $\{[(Z)\text{-}2\text{-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl]oxy\}$ acetate 3a

To a solution of triphenylphosphine (1.07 g, 4.08 mmol) in tetrahydrofuran (25 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (2.14 mL, 4.71 mmol) and the solution was stirred for 10 min at 0 °C. 3-(4-methylphenyl)-3-oxopropanenitrile (315 μL , 4.08 mmol) was added dropwise, followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (0.5 g, 3.14 mmol) and the solution was stirred 16 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using 90:10 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl $\{[(Z)\text{-}2\text{-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl]oxy\}$ acetate as a colourless oil (0.5 g, 61% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.48 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H), 7.22 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170.4, 168.2, 142.2, 130.1, 129.7 (2C), 127.1 (2C), 116.8, 73.8, 67.6, 52.7, 21.6.

Methyl $\{[(Z)\text{-}1\text{-}(4\text{-chlorophenyl})\text{-}2\text{-cyanoethenyl]oxy\}$ acetate 3b

To a solution of triphenylphosphine (1.9 g, 7.24 mmol) in tetrahydrofuran (50 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (3.8 mL, 8.35 mmol) and the solution was stirred 10 min at 0 °C. 3-(4-chlorophenyl)-3-oxopropanenitrile (559 μL , 7.24 mmol) was added dropwise, followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (1 g, 5.57 mmol) and the solution was stirred 24 h at room temperature. The excess solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 90:10 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl $\{[(Z)\text{-}1\text{-}(4\text{-chlorophenyl})\text{-}2\text{-cyanoethenyl]oxy\}$ acetate as a yellowish oil (812 mg, 58% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.59-7.52 (m, 2H), 7.42-7.37 (m, 2H), 5.04 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 168.8, 167.9, 137.9, 131.6, 129.2 (2C), 128.4 (2C), 116.4, 73.9, 67.7, 52.8. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 252.0422, found 252.0425.

Methyl $\{[(Z)\text{-}2\text{-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy\}$ acetate 3c

To a solution of triphenylphosphine (2.09 g, 7.97 mmol) in tetrahydrofuran (50 mL) at 0 °C was added dropwise a 40% diethyl azodicarboxylate in toluene solution (4.2 mL, 9.19 mmol) and the solution was stirred 10 min at 0 °C. 3-(4-fluorophenyl)-3-oxopropanenitrile (615 μL , 7.97 mmol) followed by the addition portion wise of methyl hydroxyacetate (1 g, 5.57 mmol) and the solution was stirred 16 h at room temperature. The excess

solvent was removed *in vacuo* and the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100% cyclohexane to 80:20 cyclohexane/ethyl acetate) affording methyl {[[(Z)-2-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy}acetate as a transparent oil (740 mg, 51% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.66-7.59 (m, 2H), 7.14-7.06 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 5.01 (s, 1H), 3.84 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 169.0, 168.0, 164.8 (d, ¹J = 253 Hz, 1C), 129.4, 129.3 (d, ³J = 8.7 Hz, 2C), 116.5, 116.2 (d, ²J = 21.9 Hz, 2C), 73.5, 67.7, 52.8. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁FNO₃ [M+H]⁺ 236.0717, found 236.0717.

5.1.7. Synthesis of methyl 3-amino-5-aryl-furan-2-carboxylates

Methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate 3d

To a solution of methyl {[[(Z)-2-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl]oxy}acetate (0.5 g, 2.16 mmol) in tetrahydrofuran (25 mL) was added sodium hydride (0.145 g, 6.05 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Water (2 mL) was then added to the reaction mixture and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate as a brown solid (0.4 g, 80% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.62 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.20 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.32 (s, 1H), 4.63 (bs, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 160.1, 156.7, 146.0, 139.5, 129.6 (2C), 126.9, 125.2, 125.1 (2C), 99.4, 51.1, 21.5. Mp = 116-118 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₃H₁₄NO₃ [M+H]⁺ 232.0968, found 232.0965.

Methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate 3e

To a solution of methyl {[[(Z)-1-(4-chlorophenyl)-2-cyanoethenyl]oxy}acetate (0.79 g, 3.14 mmol) in tetrahydrofuran (40 mL) was added sodium hydride (0.211 g, 8.79 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 5 h at room temperature. Water (4 mL) was then added, and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was triturated in cyclohexane affording methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate as a light brown solid (330 mg, 42% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.68-7.62 (m, 2H), 7.40-7.34 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 160.9, 155.2, 145.3, 135.2, 129.2 (2C), 128.1, 126.4 (2C), 125.7, 100.3, 51.2. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁ClNO₃ [M+H]⁺ 252.0422, found 252.0419.

Methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate 3f

To a solution of methyl {[[(Z)-2-cyano-1-(4-fluorophenyl)ethenyl]oxy}acetate (0.7g, 2.98 mmol) in tetrahydrofuran (35 mL) was added sodium hydride (0.200 g, 8.33 mmol) portion wise and the obtained mixture was stirred for 16 h at room temperature. Water (5 mL) was then added and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was triturated in cyclohexane then purified *via* flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate as a grey solid (250 mg, 36% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.70 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 5.5 Hz, 2H), 7.09 (t, ³J = 8.6 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.4 (d, ¹J = 250 Hz, 1C), 160.9, 155.5, 145.6, 127.1 (d, ³J = 8.5 Hz, 2C), 125.9 (d, ⁴J = 3.5 Hz, 1C), 125.5, 116.0 (d, ²J = 21.9 Hz, 2C), 99.7, 51.2. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₁FNO₃ [M+H]⁺ 236.0717, found 236.0718.

5.1.8. Synthesis of (Z)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enenitrile 4a

Phosphoryl chloride (1.39 mL, 14.9 mmol) was added dropwise to dimethylformamide (13 mL). The obtained mixture was heated to 45 °C, 1-(4-methylphenyl)ethenone (1 g, 7.45 mmol) was added dropwise while

keeping the mixture's temperature below 55 °C then the solution was stirred 30 min at room temperature. 0.5 mL of a solution of hydroxylammonium chloride (2.07 g, 29.8 mmol) in dimethylformamide (10 mL) was added to the reaction mixture which was then heated to 75 °C. The rest of the hydroxylammonium chloride solution was added portion wise and the reaction mixture was stirred 16 hours at room temperature. The mixture was poured into water (75 mL), filtered and the obtained precipitate was isolated affording (2Z)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enitrile as an orange solid (0.715 g, 54% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.55 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 5.98 (s, 1H), 2.41 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 153.4, 142.8, 131.5, 129.7 (2C), 126.9 (2C), 115.7, 95.1, 21.4.

5.1.9. Synthesis of methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate 4b

Preparation of sodium selenide: Under nitrogen atmosphere, sodium hydroxide (0.942 g, 23.5 mmol) and rongalite (1.19 g, 10.1 mmol) were dissolved in water (4.3 mL) and metallic selenium (0.332 g, 4.2 mmol) was added. The obtained suspension was stirred at 50 °C for 1 h. The mixture was filtered, and the precipitate was directly engaged in the following reaction.

To a solution of sodium selenide (0.506 g, 4.05 mmol) in dimethylformamide (4 mL) was added dropwise a solution of (2Z)-3-chloro-3-(4-methylphenyl)prop-2-enitrile (0.72 g, 4.05 mmol) in dimethylformamide (1.5 mL) and the obtained mixture was stirred for 2 h at 65 °C. Methyl bromoacetate (0.62 g, 4.05 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 2 h at 65 °C. A solution of sodium methanolate (0.219 g, 4.05 mmol) dissolved in methanol (1.5 mL) was added dropwise to the reaction mixture and it was stirred for 1 h at 65 °C. The reaction mixture was poured into water (40 mL), the obtained suspension was filtered and the precipitate was washed with water affording methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate as a khaki green powder (0.878 g, 74% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 6.73 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 165.0, 157.3, 152.4, 139.0, 131.9, 129.8 (2C), 125.8 (2C), 119.5, 95.1, 51.0, 20.8. Mp = 117-119 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₃H₁₃NO₂Se [M+H]⁺ 296.0185, found 296.0187.

5.1.10. Synthesis of ethyl 3-amino-5-(p-tolyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate 5b

Sodium ethoxide was prepared freshly from Na (552 mg, 23 mmol) and absolute EtOH (14 mL) in a 100 mL, roundbottomed flask equipped with a positive flow of N₂ gas.

To the above solution was added dropwise through an addition funnel a solution of 2-cyano-1-(4-methylphenyl)ethenyl 4-methylbenzenesulfonate **5a** (2.06 g, 6.57 mmol, prepared according to reference 15) and diethyl aminomalonate hydrochloride (1.70 g, 7.89 mmol) in a mixture of EtOH (20 mL) and THF (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The crude was partitioned between water (20 mL) and EtOAc (15 mL), and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulphate, filtered and the excess solvent was removed *in vacuo*. The crude was purified *via* column chromatography on silica gel (using Hexane/EtOAc, 6:1) to afford ethyl 3-amino-5-(p-tolyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate as an off-white solid (674 mg, 42%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.65 (bs, 1H), 7.64 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz), 7.17 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 5.95 (d, 1H, ⁴J = 2.8 Hz), 5.08 (bs, 2H), 4.22 (q, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.29 (t, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.1, 143.9, 136.7, 136.3, 129.1, 128.7, 125.1, 105.5, 95.6, 58.4, 20.8, 14.8.

5.1.11. Synthesis of methyl 3-amino-5-aryl-4-methylthiophene-2-carboxylates

Methyl 3-amino-4-methylthiophene-2-carboxylate (2 eq), appropriate 4-bromoaryl (1 eq), palladium acetate (1 mol%) and potassium acetate (2 eq) were placed under nitrogen atmosphere then dissolved in dimethylacetamide (1 mL/mmol of thiophene) and the obtained solution was stirred for 18 h at 120 °C. The reaction solution was poured into water (100 mL) then extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The combined organic phase was washed with brine (2 x 150 mL), dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. The obtained crude was purified with the appropriate method affording the desired product.

Methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate 6a

Following the general procedure starting from 1-bromo-4-chlorobenzene (0.192 g, 1 mmol), the obtained crude was purified *via* two flash chromatography (using cyclohexane and ethyl acetate) affording methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate as an off-white solid (0.160 g, 57 % yield). Analytical data in accordance with literature.¹⁶

Methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate 6b

Following the general procedure starting from 1-bromo-4-fluorobenzene (0.350 g, 2 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % petroleum ether to petroleum ether/ethyl acetate 90:10) affording methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate as a white solid (0.185 g, 33 % yield). Analytical data in accordance with literature.¹⁶

5.1.12. Cyclizations reactions

To a solution of the appropriate functionalised alkyl 2-aminothiophene-3-carboxylate (1 eq) in *N,N*-dimethylformamide (2.25 mL per 100 mg) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (1 eq) and the solution was stirred for 2 h at room temperature. To the reaction mixture was added *tert*-butylamine or isopropylamine (2 eq), triethylamine (3 eq) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.05 eq) and it was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred at 170 °C under microwave irradiation for 2 h. The reaction mixture was poured into cold water and if a precipitate was formed, this precipitate was filtered, washed with water and dried *in vacuo*. If needed, the precipitate was then purified with the appropriate method. Otherwise, if no precipitate was obtained, the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the excess solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified with the appropriate method.

2-tert-butylamino-6-phenylthieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one 1g

Following the general procedure starting from methyl 2-amino-5-phenylthiophene-3-carboxylate (0.3 g, 1.21 mmol) and *tert*-butylamine (250 μ L, 2.42 mmol), the obtained crude was triturated with acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.16 g, 44 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.64 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (t, ³*J* = 7.6 Hz, 2H), 7.28 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 166.9, 157.7, 151.1, 133.5, 132.4, 129.1 (2C), 127.4, 125.0 (2C), 117.1, 117.0, 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₃OS [M+H]⁺ 300.1165, found 300.1165.

2-tert-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one 1h

Following the general procedure starting from crude ethyl 2-amino-5-(4-methylphenyl)thiophene-3-carboxylate (1 g, 3.82 mmol) and *tert*-butylamine (802 μ L, 7.64 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2). Fractions of interest were triturated with acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3H)-one as a white solid (0.18 g, 15 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.39 (s, 1H), 7.52 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.21 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 6.32 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 166.6, 157.6, 150.9, 136.9, 132.7, 130.7, 129.6 (2C), 124.9 (2C), 116.9, 116.3, 51.2, 28.6 (3C), 20.7. mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃OS [M+H]⁺ 314.1322, found 314.1321.

2-tert-butylamino-6-(4-chlorophenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one 1i

Following the general procedure starting from ethyl 2-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-3-carboxylate (0.278 g, 0.99 mmol) and *tert*-butylamine (207 μ L, 1.97 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3H)-one as a white solid (0.134 g, 41 %). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.65 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.44 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 167.2, 157.7, 151.2, 132.5, 131.7, 130.9, 129.0 (2C), 126.6 (2C), 117.9, 117.1, 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇ClN₃OS [M+H]⁺ 334.0775, found 334.0775.

2-tert-butylamino-6-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one 1j

Following the general procedure starting from ethyl 2-amino-5-(4-fluorophenyl)thiophene-3-carboxylate (0.258 g, 0.97 mmol) and *tert*-butylamine (204 μ L, 1.94 mmol), the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2) affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3H)-one as a yellow solid (65 mg, 21 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.72-7.63 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.28-7.18 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 1.41 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 167.0, 161.5 (d, $^1J = 245.0$ Hz), 157.8, 151.1, 131.4, 130.2 (d, $^4J = 3.2$ Hz), 127.1 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2C), 117.2, 117.1, 116.1 (d, $^2J = 21.8$ Hz, 2C), 51.3, 28.6 (3C). mp > 260 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇FN₃OS [M+H]⁺ 318.1071, found 318.1071.

5-tert-butylamino-2-phenyl[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6H)-one 2e

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.28 mmol) and *tert*-butylamine (269 μ L, 2.56 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol 98:2). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 5-*tert*-butylamino-2-phenyl[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6H)-one as a beige powder (0.134 g, 35 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.69 (s, 1H), 8.08-8.03 (m, 2H), 7.62-7.52 (m, 3H), 6.31 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.0, 169.0, 157.9, 153.1, 132.5, 131.9, 129.4 (2C), 126.8 (2C), 105.6, 51.3, 28.5 (3C). mp = 299-301 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₇N₄OS [M+H]⁺ 301.1118, found 301.1117.

5-(*tert*-butylamino)-2-(4-methylphenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one 2f

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-methylphenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.2 mmol) and *tert*-butylamine (253 μ L, 2.4 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 5-(*tert*-butylamino)-2-(4-methylphenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one as a yellow solid (0.173 g, 46 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 7.94 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 6.29 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.1, 169.0, 157.9, 153.1, 142.1, 129.9 (2C), 126.8 (2C), 105.2, 51.2, 28.5 (3C), 21.1. mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₄OS [M+H]⁺ 315.1274, found 315.1279.

5-(*tert*-butylamino)-2-(4-chlorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one 2g

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.12 mmol) and *tert*-butylamine (236 μ L, 2.24 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile and the obtained solid was purified *via* column chromatography on silica gel (starting from 100 % dichloromethane to dichloromethane/methanol 98:2) affording 5-(*tert*-butylamino)-2-(4-chlorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one as a yellow solid (0.171 g, 46 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.71 (s, 1H), 8.10-8.05 (m, 2H), 7.64-7.59 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 170.6, 169.0, 157.8, 153.2, 136.5, 131.3, 129.5 (2C), 128.6 (2C), 105.9, 51.3, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₆ClN₄OS [M+H]⁺ 335.0728, found 335.0724.

5-(*tert*-butylamino)-2-(4-fluorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one 2h

Following the general procedure starting from methyl 4-amino-2-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole-5-carboxylate (0.3 g, 1.19 mmol) and *tert*-butylamine (250 μ L, 2.38 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 5-(*tert*-butylamino)-2-(4-fluorophenyl)[1,3]thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-one as a beige solid (0.107 g, 28 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.70 (s, 1H), 8.17-8.08 (m, 2H), 7.43-7.35 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 170.7, 169.0, 164.2 (d, $^1J = 250$ Hz, 2C), 157.9, 153.2, 129.4 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2C), 129.2 (d, $^4J = 3.1$ Hz, 2C), 116.5 (d, $^2J = 22.0$ Hz, 2C), 105.6, 51.3, 28.5 (3C). mp > 300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₅H₁₆FN₄OS [M+H]⁺ 319.1023, found 319.1024.

2-(*tert*-butylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one 3g

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate (0.4 g, 1.73 mmol) and *tert*-butylamine (363 μ L, 3.46 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile. Precipitate was filtered and isolated while the filtrate was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 2-(*tert*-butylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (210 mg, 41% yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.38 (s, 1H), 7.74 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H), 6.04 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.9, 151.7, 151.5, 151.3, 139.3, 131.5, 129.6 (2C), 126.6, 124.8 (2C), 102.3, 50.9, 28.6 (3C), 21.0. mp = 298-300 °C. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺ 298.1550, found 298.1548.

2-tert-butylamino-6-(4-chlorophenyl)furo[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 3h

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)furan-2-carboxylate (0.3 g, 1.19 mmol) and *tert*-butylamine (251 μ L, 2.38 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fraction of interests were triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-chlorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a light grey solid (170 mg, 45% yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.43 (s, 1H), 7.87 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.56 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 157.4, 151.7, 151.6, 151.1, 134.0, 132.0, 129.2 (2C), 128.1, 126.5 (2C), 103.7, 50.9, 28.6 (3C). mp > 300 $^{\circ}\text{C}$. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇ClN₃O₂ [M+H]⁺ 318.1004, found 318.1002.

2-tert-butylamino-6-(4-fluorophenyl)furo[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 3i

Following the general procedure starting from 3-amino-5-(4-fluorophenyl)furan-2-carboxylate (0.24 g, 1.02 mmol) and *tert*-butylamine (214 μ L, 2.04 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane/methanol). Fractions of interest triturated in diethyl ether affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-fluorophenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white solid (0.12 g, 39 % yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.40 (s, 1H), 7.94-7.86 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 1.40 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.7 (d, $^1J = 248$ Hz, 1C), 157.7, 151.7, 151.5, 151.2, 131.8, 127.1 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2C), 125.9 (d, $^4J = 2.9$ Hz, 1C), 116.2 (d, $^2J = 22$ Hz, 2C), 102.9, 50.9, 28.6 (3C). mp > 300 $^{\circ}\text{C}$. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇FN₃O₂ [M+H]⁺ 302.1299, found 302.1298.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 3j

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)furan-2-carboxylate (0.295 g, 1.28 mmol) and isopropylamine (219 μ L, 2.55 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol). Fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a white powder (53 mg, 15% yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.52 (bs, 1H), 7.74 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.31 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 6.08 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H), 4.06-3.90 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 158.9, 152.0, 151.5, 139.3, 131.4, 129.6 (2C), 126.5, 124.8 (2C), 102.0, 42.3, 22.4 (2C), 21.0. mp = 261-263 $^{\circ}\text{C}$. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺ 284.1394, found 284.1390.

2-tert-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 4c

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.02 mmol) and *tert*-butylamine (214 μ L, 2.04 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one as a beige powder (220 mg, 60% yield). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 7.66-7.60 (m, 3H), 7.25 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 162.5, 158.7, 154.7, 152.6, 139.1, 132.1, 129.8 (2C), 126.1 (2C), 123.3, 112.4, 51.0, 28.6 (3C), 20.8. Mp > 300 $^{\circ}\text{C}$. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₂₀N₃OSe [M+H]⁺ 362.0767, found 362.0766.

2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 4d

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-methylphenyl)selenophene-2-carboxylate (0.3 g, 1.02 mmol) and isopropylamine (175 μ L, 2.04 mmol), the obtained crude was triturated in acetonitrile affording 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a beige solid (185 mg, 52% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.56 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.62 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.25 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 6.11 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.17 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 163.3, 159.2, 155.3, 153.5, 139.6, 132.7, 130.2 (2C), 126.6 (2C), 123.6, 112.8, 42.6, 22.9 (2C), 21.3. mp > 300 $^\circ\text{C}$. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OSe}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.0610, found 348.0611.

ethyl 2-(tert-butylamino)-4-oxo-5-(p-tolyl)-4,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidine-7-carboxylate 5d

To a solution of ethyl 3-amino-5-(p-tolyl)-1H-pyrrole-2-carboxylate (100 mg, 0.41 mmol) in DMF (5 mL) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (49 μ L, 0.41 mmol) and the solution was stirred at room temperature for 2h. Then, triethylamine (170 μ L, 1.23 mmol), tert-butylamine (87 μ L, 0.82 mmol) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (94 mg, 0.49 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18h then heated under reflux (170 $^\circ\text{C}$) for 1h. The excess solvent was removed *in vacuo*. Water (20 mL) was then added to the reaction mixture and the precipitate was filtered and washed with water. The crude product was purified *via* column chromatography on silica gel (from 8:2 Hexane/EtOAc to 100% EtOAc). The isolated product was obtained as a purple solid (42 mg, 28%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.24 (bs, 1H), 9.88 (bs, 1H), 7.88 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz), 7.21 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz), 5.86 (bs, 1H) 4.22 (2H, $^3J = 7.1$ Hz), 2.34 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 160.8, 159.4, 149.9, 145.3, 138.0, 135.2, 129.1, 128.3, 127.1, 110.0, 103.5, 60.0, 50.8, 28.6, 20.9, 14.4. HR-MS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 369.1921, found 369.1924.

6-(4-chlorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 6c

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate (0.330 g, 1.17 mmol) and isopropylamine (201 μ L, 2.34 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) and the fractions of interest were triturated in diethyl ether affording 6-(4-chlorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a white powder (0.165 g, 42 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.67 (s, 1H), 7.62-7.53 (m, 4H), 6.17 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1H), 4.15-4.00 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.20 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 159.4, 157.9, 152.6, 142.6, 133.4, 132.7, 130.3 (2C), 129.1, 129.0 (2C), 110.8, 42.3, 22.3 (2C), 12.1. mp = 251-253 $^\circ\text{C}$. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.0775, found 334.0778.

6-(4-fluorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one 6d

Following the general procedure starting from methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-4-methylthiophene-2-carboxylate (0.180 g, 0.64 mmol) and isopropylamine (110 μ L, 1.28 mmol), the obtained crude was purified *via* flash chromatography (using dichloromethane and methanol) affording 6-(4-fluorophenyl)-7-methyl-2-(propan-2-ylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one as a white powder (29 mg, 16 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.65 (s, 1H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 6.16 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1H), 4.15-4.01 (m, 1H), 2.24 (s,

3H), 1.20 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162.2 (d, $^1J = 247$ Hz, 1C), 159.4, 157.9, 152.6, 143.0, 130.8 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2C), 130.3 (d, $^4J = 3.5$ Hz, 1C), 128.7, 116.0 (d, $^2J = 21.8$ Hz, 2C), 110.6, 42.3, 22.4 (2C), 12.0. mp = 242-244 °C. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.1071, found 318.1076.

5.1.13. Hydrochloride salts synthesis

To absolute ethanol (10 mL) was added appropriate 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one. The suspension was heated if needed, up to 70 °C, to dissolve the molecule and then allowed to cool down to room temperature. Hydrogen chloride was bubbled through the solution for a short period then the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction mixture was then degassed with nitrogen for 10 min and filtered. The precipitate was washed with diethyl ether affording the desired 2-aminothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride salt.

*2-tert-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 3gs*

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (90 mg, 0.30 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)furo[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained following the general procedure as a white solid (70 mg, 70% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.76 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.32 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.42 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 159.0, 151.4, 151.3, 139.5, 131.2, 129.7 (2C), 126.3, 124.9 (2C), 101.4, 51.3, 28.5 (3C), 21.0. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C 61.17, H 6.04, N 12.59, found C 60.11, H 5.75, N 12.21.

*2-tert-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 4cs*

Following the general procedure with 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.28 mmol), 2-*tert*-butylamino-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a white powder (94 mg, 85% yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.73 (s, 1H), 7.64 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.27 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 158.7, 155.8, 152.3, 139.4, 131.9, 129.9 (2C), 126.2 (2C), 121.8, 112.5, 51.5, 28.5 (3C), 20.9. mp: degradation observed at 253 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{OSe}$: C 51.46, H 5.08, N 10.59, found C 51.42, H 4.96, N 10.52.

*2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride 4ds*

Following the general procedure with 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one (0.1 g, 0.29 mmol), 2-(propan-2-ylamino)-6-(4-methylphenyl)selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one hydrochloride was obtained as a yellow powder (90 mg, 82 % yield). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.85 (s, 1H), 7.62 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H), 4.24-4.10 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.24 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 6H). ^{13}C NMR could not be performed due to solubility problems. mp > 300 °C. Elemental analysis calculated (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OSe}$: C 50.21, H 4.74, N 10.98, found C 50.07, H 4.80, N 10.85.

5.2. Biology and pharmacokinetic

5.2.1. Blood stage antiplasmodial evaluation

In this study, a K1 culture-adapted *P. falciparum* strain resistant to chloroquine, pyrimethamine, and proguanil was used in an in vitro culture. It was maintained in continuous culture, as described previously by Trager and Jensen.¹⁸ Cultures were maintained in fresh A+ human erythrocytes at 2.5% hematocrit in complete medium (RPMI 1640 with 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 10% of A+ human serum) at 37 °C under reduced O₂ atmosphere (gas mixture 10% O₂, 5% CO₂, and 85% N₂). Parasitemia was maintained daily between 1 and 3%. The *P. falciparum* drug susceptibility test was carried out by comparing quantities of DNA in treated and control cultures of parasite in human erythrocytes according to a SYBR Green I fluorescence-based method¹⁹ using a 96-well fluorescence plate reader. Compounds, previously dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), were incubated in a total assay volume of 200 µL (RPMI, 2% hematocrit and 0.4% parasitemia) for 72 h in a humidified atmosphere (10% O₂ and 5% CO₂) at 37 °C, in 96-well flat bottom plates. Duplicate assays were performed for each sample. After incubation, plates were frozen at 20 °C for 24 h. Then, the frozen plates were thawed for 1 h at 37 °C. Fifteen µL of each sample were transferred to 96-well flat bottom non-sterile black plates (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria), already containing 15 µL of the SYBR Green I lysis buffer (2X SYBR Green I, 20 mM Tris base pH 7.5, 20 mM EDTA, 0.008% w/v saponin, 0.08% w/v Triton X-100). Negative control treated by solvents (DMSO or H₂O) and positive controls (chloroquine and doxycycline) were added to each set of experiments. Plates were incubated for 15 min at 37 °C and then read on a TECAN Infinite F-200 spectrophotometer with excitation and emission wavelengths at 485 and 535 nm, respectively. The concentrations of compounds required to induce a 50% decrease in parasite growth (EC₅₀ K1) were calculated from three independent experiments.

5.2.2. Cytotoxic evaluation

The HepG2 cell line was maintained at 37 °C, 5% CO₂, at 90% humidity in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine (200 mM), and penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (complete RPMI medium). The cytotoxicity of the tested molecules on the HepG2 (hepatocarcinoma cell line purchased from ATCC, ref HB-8065) cell line was assessed according to the method of Mosmann²⁰ with slight modifications. Briefly, 5.10³ cells in 100 µL of complete medium were inoculated into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C in humidified 5% CO₂. After 24 h incubation, 100 µL of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Triplicate assays were performed for each sample. Each plate was then microscopically examined for possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. Next, 100 µL of MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) solution (0.5 mg/mL in medium without FBS) was added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 µL) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (700 rpm) for 10 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader (LabX, Midland, ON, Canada). DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as a percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined from the dose–response curve, using TableCurve software 2D v.5.0. CC₅₀ values to represent the mean value calculated from three independent experiments.

5.2.3. Hepatic stage antiplasmodial activity

Plasmodium parasite: *P. berghei* sporozoites expressing green fluorescent protein (*Pb*-GFP, ANKA strain) (Franke-Fayard et al., 2004) were obtained by dissection of salivary glands from infected *Anopheles stephensi* mosquitoes bred and infected in the insectary facilities of UMR-S 1135 (CIMI, Paris, France). Infected salivary glands were removed by hand dissection, crushed in a potter, and filtered through a 40µm filter for sporozoite isolation (Cell Strainer, BD BioSciences). The sporozoites were counted using a disposable plastic microscope slide (KOVA).

Primary hepatocytes culture: Primary simian hepatocytes were isolated from liver segments collected from healthy *Macaca fascicularis* obtained from CEA, Fontenay aux Roses, France. The hepatocytes were isolated using collagenase perfusion as previously described (Dembélé et al., 2011) and were immediately cryopreserved. One day before infection the cryopreserved hepatocytes were thawed at 37°C and were seeded into collagen coated (5 µg/cm² rat tail collagen I, Invitrogen, USA) 96-well plates (Falcon by Becton Dickinson Labware Europe, France) at a density of 80 000 cells per well. They are cultured at 37 °C in 5% CO₂ in William's E medium (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% of Foetal Bovine Serum FCIII, 5x10⁻⁵ M hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn Laboratoires SERB, France), 5 µg per ml Insulin (Sigma Aldrich, USA), 2 mM L-glutamine, and 0.02 U per ml – 0.02 µg per ml penicillin – streptomycin (Life Technologies) until infection with sporozoites.

In vitro infection and drug assays: Sporozoites of *P. berghei* were re-suspended in the above complete medium used for hepatocytes culture. The primary hepatocytes were inoculated in 50 µl of complete media with 20,000 *P. berghei*-sporozoites/well in 96 well plates. The infected culture plates were centrifuged 10 min at 900 g to allow fast parasite sedimentation onto the target cells and further incubated with serial dilution of drugs that were prepared in advance. After 3 hours incubation, cultures were washed and further incubated in fresh medium containing the appropriate drug concentration which were changed every 24 hours during the study period.

Parasite immunostaining, enumeration and toxicity assessment: Cultured hepatocytes were fixed at 48-hpi using 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature. To visualize nuclei, parasites were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). GFP-expressing *P. berghei* parasites were then imaged in order to determine the number and size of the parasites using a CellInsight High Content Screening platform equipped with the Studio HCS software (Thermo Fisher Scientific). The parasite size reduction was calculated on the average object area using the total surface area of each selected object (µm²). To assess cell toxicity of drugs for hepatic cultures, fixed plates were further scanned for the DAPI signal representing host nuclei. The analysis was based on counting of total cell nuclei.

Data analysis: GraphPad Prism 7 statistical Software (GraphPad. Software, San Diego, CA, USA) were used for data analysis and graphing. All values were expressed as means and standard deviations (SD). A p-value of 0.05 or less was considered as statistically significant.

5.2.4. Solubility assay

Thermodynamic solubility at pH 7.4 of the compound was determined according to the classical shake-flask method (Organisation for Economic Cooperation and Development guideline n°105) and a miniaturized

procedure. Phosphate Buffer solutions (pH 7.4, 10 μ M, ionic strength 150 μ M) were prepared from Na₂HPO₄, KH₂PO₄ and KCl (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). 10 μ L of 25 mM stock solution was added to 5 mL glass tube containing 990 mL buffer (n = 3). Tubes were briefly sonicated and shaken by inversion during 24 h at room temperature. Then, microtubes were centrifuged at 12,225 \times g for 10 min. 100 μ L supernatant was mixed with 100 μ L acetonitrile in a Greiner UV microplate. Standard solutions were prepared extemporaneously diluting 25-50 mM DMSO stock solutions at 1/5th and 1/10th. 5 μ L each working solution was diluted with 995 μ L buffer and 100 μ L was then mixed in microplate with 100 μ L acetonitrile to keep unchanged the final proportions of each solvent in standard solutions and samples. Determination of solubility at pH 7.4 was made with an Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suisse) microplate reader in spectrophotometric mode (230 to 450 nm) from the specific λ_{max} of each compound. The calibration curve obtained from the three standard solutions of tested compounds in a 50:50 (vol/vol) mixture of buffer with acetonitrile/DMSO (99:1; vol/vol). Calibration curves were linear with $R^2 > 0.99$.

5.2.5. Permeability assay

The Parallel Artificial Membrane Permeability (PAMPA)-GIT experiments were conducted using the Pampa Explorer Kit (Pion Inc) according to manufacturer's protocol. Briefly, each stock compound solution (20 mM in DMSO) were diluted in Prisma HT buffer pH 7.4, 6.0 or 5.0 (Pion Inc) to 100 μ M. 200 μ L of these solutions (n = 4) were added to donor plate (P/N 110243). GIT-0 Lipid (5 μ L, P/N 110669) was used to coat the membrane filter of the acceptor plate (P/N 110243). Acceptor Sink Buffer (200 μ L, P/N 110139) was added to each well of the acceptor plate. The sandwich was incubated at room temperature for 4h, without stirring. After the incubation the UV-visible spectra were measured with the microplate reader (Tecan infinite M200), and the permeability value (P_e) was calculated by the PAMPA Explorer software v.3.7 (pION) for each compound. The antipyrine and the Ketoprofen were used as references.

6. Authors contributions

R.M.: conceptualization, investigation, visualization, writing – original draft, writing – review and editing; P.L.: investigation, visualization, writing – original draft, writing – review and editing; S.H.: formal analysis, investigation, validation; V.D.: investigation; N.A.: formal analysis, investigation, visualization; S.T.: formal analysis, investigation, visualization; J.-F.F.: investigation, validation; S.C.: formal analysis, investigation; A.M.-F.: resources, supervision, validation; N.M.: supervision, writing – review and editing; V.L.: resources, supervision, funding acquisition; P.V.: supervision, writing – review and editing; D.M.: resources, funding acquisition, supervision; N.A.: resources, supervision, validation; P.V.: resources, supervision, writing – review and editing; N.P.: conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision, validation, writing – review and editing.

7. Acknowledgements

This work was financed by the grants of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Palukill DMC20181039565) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR Plasmodrug 18-CE18-0009-01).

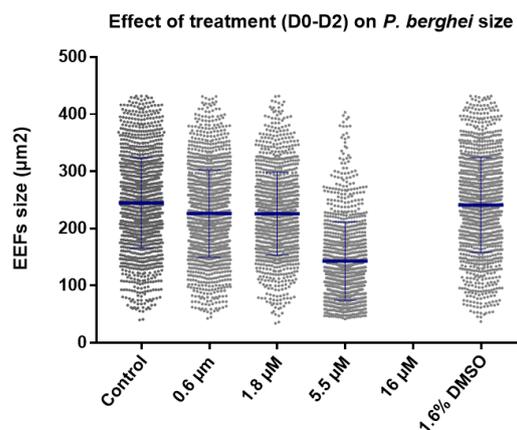
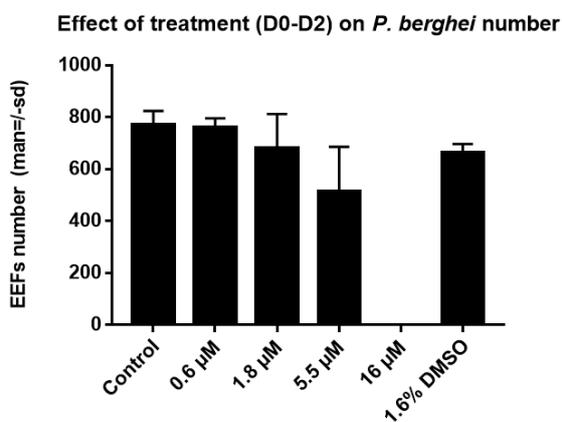
We want to thank Dr Vincent Remusat (Institut de Chimie Radicalaire, Marseille) for his help with NMR analysis and Dr Valérie Monnier and Ms Gaëlle Hisler (Spectropole, Marseille) for performing HRMS analysis.

8. Bibliography

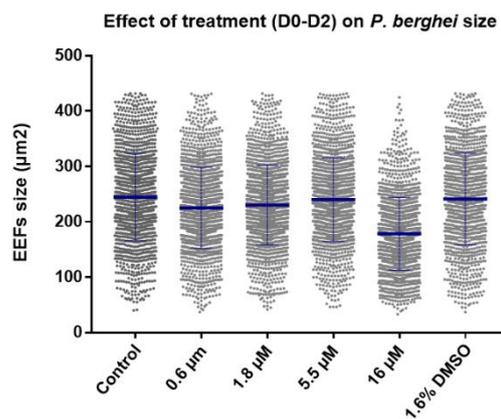
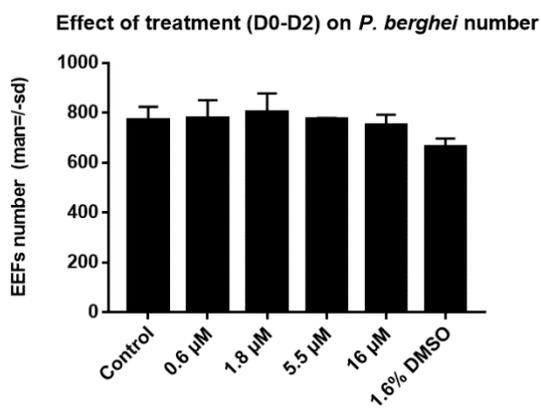
1. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; **2021**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Dondorp, A.M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyo, A.P.; Tarning, J.; Lwin, K.M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S.J.; Ringwald, P.; Silamut, K.; Imwong, M.; Chotivanich, K.; Lim, P.; Herdman, T.; An, S.S.; Yeung, S.; Singhasivanon, P.; Day, N.P.J.; Lindergardh, N.; Socheat, D.; White, N.J. Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455–467, doi:[10.1056/NEJMoa0808859](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859).
3. van der Pluijm, R.W.; Imwong, M.; Chau, N.H.; Hoa, N.T.; Thuy-Nhien, N.T.; Thanh, N.V.; Jittamala, P.; Hanboonkunupakarn, B.; Chutasmit, K.; Saelow, C.; Runjarern, R.; Kaewmok, W.; Tripura, R.; Peto, T.J.; Yok, S.; Suon, S.; Sreng, S.; Mao, S.; Oun, S.; Yen, S.; Amaratunga, C.; Lek, D.; Huy, R.; Dhorda, M.; Chotivanich, K.; Ashley, E.A.; Mukaka, M.; Waithira, N.; Cheah, P.Y.; Maude, R.J.; Amato, R.; Pearson, R.D.; Gonçalves, S.; Jacob, C.G.; Hamilton, W.L.; Fairhurst, R.M.; Tarning, J.; Winterberg, M.; Kwiatkowski, D.P.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T.T.; Day, N.P.; Miotto, O.; White, N.J.; Dondorp, A.M. Determinants of Dihydroartemisinin-Piperaquine Treatment Failure in *Plasmodium Falciparum* Malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: A Prospective Clinical, Pharmacological, and Genetic Study. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 952–961, doi:[10.1016/S1473-3099\(19\)30391-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30391-3).
4. Das, S.; Manna, S.; Saha, B.; Hati, A.K.; Roy, S. Novel *pfkelch13* Gene Polymorphism Associates With Artemisinin Resistance in Eastern India. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 7, 1144–1152, doi:[10.1093/cid/ciy1038](https://doi.org/10.1093/cid/ciy1038).
5. Uwimana, A.; Legrand, E.; Stokes, B.H.; Ndikumana, J.-L.M.; Warsame, M.; Umulisa, N.; Ngamije, D.; Munyaneza, T.; Mazarati, J.-B.; Munguti, K.; Campagne, P.; Criscuolo, A.; Ariey, F.; Murindahabi, M.; Ringwald, P.; Fidock, D.A.; Mbituyumuremyi, A.; Menard, D. Emergence and Clonal Expansion of in Vitro Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Kelch13 R561H Mutant Parasites in Rwanda. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1602–1608, doi :[10.1038/s41591-020-1005-2](https://doi.org/10.1038/s41591-020-1005-2).
6. *Medicines for Malaria Venture*. <https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects> (accessed on 04/01/22).
7. Cohen, A.; Suzanne, P.; Lancelot, J.-C.; Verhaeghe, P.; Lesnard, A.; Basmaciyan, L.; Hutter, S.; Laget, M.; Dumètre, A.; Paloque, L.; Deharo, E.; Crozet, M.D.; Rathelot, P.; Dallemagne, P.; Lorthiois, A.; Sibley, C.H.; Vanelle, P.; Valentin, A.; Mazier, D.; Rault, S.; Azas, N. Discovery of New Thienopyrimidinone Derivatives Displaying Antimalarial Properties toward Both Erythrocytic and Hepatic Stages of *Plasmodium*. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 16–28, doi:[10.1016/j.ejmech.2015.03.011](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.011).
8. Bosson-Vanga, H.; Primas, N.; Franetich, J.-F.; Lavazec, C.; Gomez, L.; Ashraf, K.; Tefit, M.; Soulard, V.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Grand, R.; Donnette, M.; Mustière, R.; Amanzougaghene, N.; Tajeri, S.; Suzanne, P.; Malzert-Fréon, A.; Rault, S.; Vanelle, P.; Hutter, S.; Cohen, A.; Snounou, G.; Roques, P.; Azas, N.; Lagardère, P.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Nguyen, M.; Paloque, L.; Benoit-Vical, F.; Verhaeghe, P.; Mazier, D. A New Thienopyrimidinone Chemotype Shows Multistage Activity against *Plasmodium Falciparum*, Including Artemisinin-Resistant Parasites. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e00274-21, doi:[10.1128/Spectrum.00274-21](https://doi.org/10.1128/Spectrum.00274-21).
9. Dess, D.B.; Martin, J.C. A Useful 12-I-5 Triacetoxypiperidinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277–7287, doi: [10.1021/ja00019a027](https://doi.org/10.1021/ja00019a027).
10. Revelant, G.; Dunand, S.; Hesse, S.; Kirsch, G. Microwave-Assisted Synthesis of 5-Substituted 2-Aminothiophenes Starting from Arylacetaldehydes. *Synthesis* **2011**, *2011*, 2935–2940, doi: [10.1055/s-0030-1261032](https://doi.org/10.1055/s-0030-1261032).
11. Liebeskind, L.S.; Srogl, J. Thiol Ester–Boronic Acid Coupling. A Mechanistically Unprecedented and General Ketone Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11260–11261, doi: [10.1021/ja005613q](https://doi.org/10.1021/ja005613q).
12. McCoull, W.; Barton, P.; Broo, A.; Brown, A.J.H.; Clarke, D.S.; Coope, G.; Davies, R.D.M.; Dossetter, A.G.; Kelly, E.E.; Knerr, L.; MacFaul, P.; Holmes, J.L.; Martin, N.; Moore, J.E.; Morgan, D.; Newton, C.; Österlund, K.; Robb, G.R.; Rosevere, E.; Selmi, N.; Stokes, S.; Svensson, T.S.; Ullah, V.B.K.; Williams, E.J. Identification of Pyrazolo-Pyrimidinones as GHS-R1a Antagonists and Inverse Agonists for the Treatment of Obesity. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 456, doi: [10.1039/C2MD20340E](https://doi.org/10.1039/C2MD20340E).
13. Redman, A.M.; Dumas, J.; Scott, W.J. Preparation of 5-Substituted 3-Aminofuran-2-Carboxylate Esters. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2061–2063, doi: [10.1021/ol0059652](https://doi.org/10.1021/ol0059652).
14. Thomae, D.; Kirsch, G.; Seck, P. Synthesis of Selenophene Analogues of the Tacrine Series: Comparison of Classical Route and Microwave Irradiation. *Synthesis* **2008**, *2008*, 1600–1606, doi: [10.1055/s-2008-1067001](https://doi.org/10.1055/s-2008-1067001).
15. Chen, N.; Lu, Y.; Gadamasetti, K.; Hurt, C. R.; Norman, M. H.; Fotsch, C. A Short, Facile Synthesis of 5-Substituted 3-Amino-1 H -Pyrrole-2-Carboxylates. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2603–2605, doi: [10.1021/jo9917902](https://doi.org/10.1021/jo9917902).
16. Derridj, F.; Si Larbi, K.; Roger, J.; Djebbar, S.; Doucet, H. Palladium-Catalyzed Direct Arylation Using Free NH₂ Substituted Thiophene Derivatives with Inhibition of Amination Type Reaction. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7463–7471, doi: [10.1016/j.tet.2012.06.053](https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.06.053).

Annexe 4. Résultats des différents composés testés sur hépatocytes siemens infectés par *P. berghei*.
 EEF : *Exo-Erythrocytic Form*

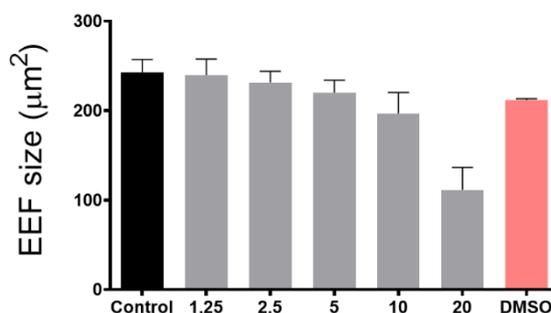
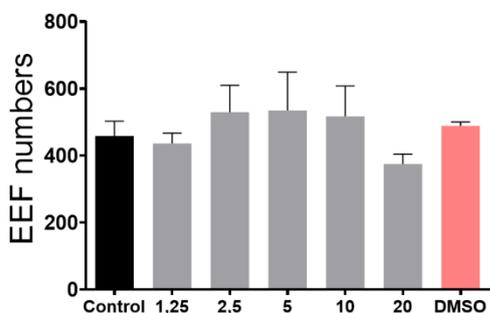
Composé **45** :



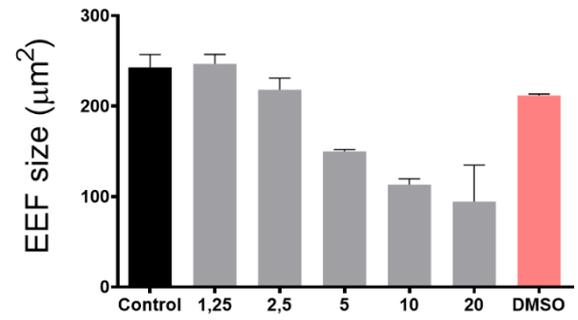
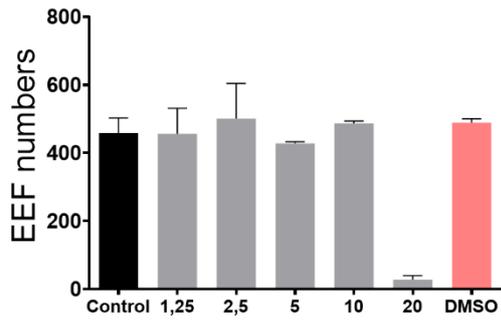
Composé **49** :



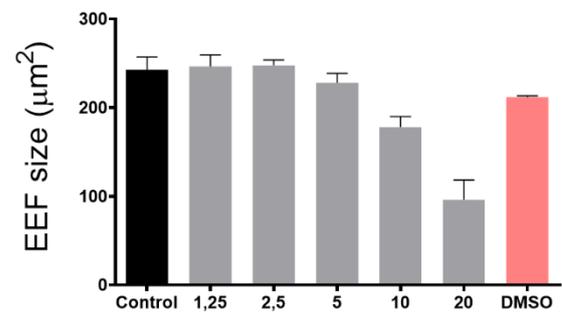
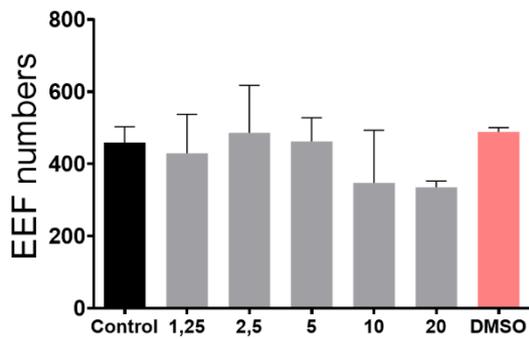
Composé **52** :



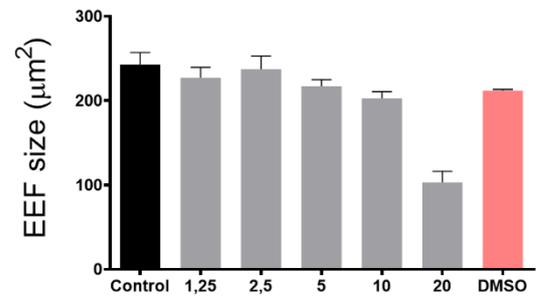
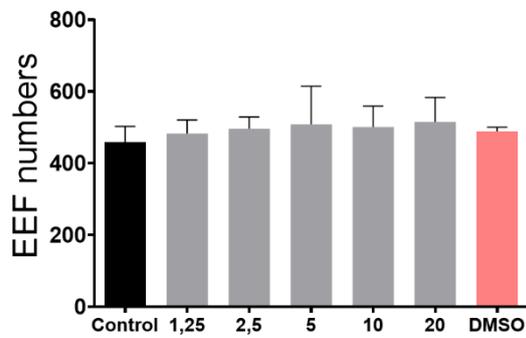
Composé 57s :



Composé 59s :



Composé 126s :

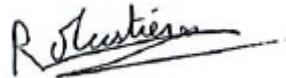


Affidavit

Je soussigné, Romain Mustière, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Prof. Patrice Vanelle et du Dr Nicolas Primas, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 2 décembre 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Mustière', with a horizontal line underneath it.

RÉSUMÉ

Le paludisme est une parasitose causée par des protozoaires du genre *Plasmodium* et transmise par la piqûre infectieuse de moustiques femelles du genre *Anopheles*. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le paludisme a atteint 241 millions de personnes et tué 627 000 d'entre-elles en 2020. Les traitements se basent sur les thérapies combinées à base d'artémisinine mais dont l'efficacité décline depuis l'émergence de souches de *Plasmodium* résistantes en Asie du Sud-Est. De nouveaux antipaludiques capables d'agir sur les différents stades du parasite avec des mécanismes d'action innovants sont donc nécessaires rapidement. Le composé M1, en série thiénopyrimidinone, agissant sur tous les stades parasitaires de *P. falciparum* avec un mécanisme d'action inconnu a été découvert en 2015 au laboratoire. Mais, son activité *in vivo*, chez la souris, est limitée par une forte sensibilité au métabolisme hépatique et une faible solubilité aqueuse. Pour améliorer ces paramètres et compléter les données de relations structure-activité, des travaux de chimie médicinale ont été engagés sur le composé M1. Les travaux de cette thèse sont concentrés sur deux axes : la modulation de la position 6 du cycle thiénopyrimidinone à l'aide de couplages pallado-catalysés et la synthèse d'analogues par stratégie de variation de cycle. Les composés obtenus ont été évalués *in vitro* pour mesurer leur activité antiplasmodiale au stade sanguin et leur cytotoxicité. L'activité sur le stade hépatique pour les meilleurs composés a été mesurée ainsi que leur stabilité métabolique afin d'identifier une molécule éligible pour une évaluation *in vivo* sur modèle animal infecté.

Mots clés : Paludisme, Chimie médicinale, Chimie hétérocyclique, *Plasmodium falciparum*, Thiénopyrimidine

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by protozoan of the *Plasmodium* genus and transmitted by the infective bite of female mosquitoes of the *Anopheles* genus. According to the World Health Organization in 2019, malaria reached 241 million cases of malaria and 627,000 deaths. Treatments are based on artemisinin-based combination therapies, but their effectiveness is declining since the emergence of resistant strains of *Plasmodium* in South-East Asia. New antimalarial drugs capable of acting on the different stages of the parasite with innovative mechanisms of action are therefore rapidly needed. Compound M1, in thienopyrimidinone series, acting on all parasite stages of *P. falciparum* with an unknown mechanism of action was discovered in 2015 in the laboratory. However, its *in vivo* activity in mice is limited by high sensitivity to hepatic metabolism and low aqueous solubility. To improve these parameters and complete the structure-activity relationship data, medicinal chemistry work was done on compound M1. The work of this thesis is focused on two axes: the modulation of position 6 of the thienopyrimidinone ring using palladium-catalyzed couplings and the synthesis of analogues by scaffold hopping strategy. The synthesized compounds were evaluated *in vitro* for their antiplasmodial activity (blood stage) and cytotoxicity. The best compounds were tested for their activity on the hepatic stage of malaria and their metabolic stability to identify a molecule suitable for the *in vivo* evaluation in an infected animal model.

Keywords: Malaria, Medicinal chemistry, Heterocyclic chemistry, *Plasmodium falciparum*, Thienopyrimidine