

Thèse de doctorat de l'université Paris-V (Paris Descartes)

École doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

Présentée par

Eloi COUTANT-FLEXER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-V (Paris Descartes)

Spécialité : Chimie organique

Synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones originales et leurs évaluations comme substrats de la luciférase mutée d'*Oplophorus gracilirostris* nanoKAZ

Sous la direction du Dr Yves JANIN

Devant le jury composé de :

Dr Sandrine PIGUEL	Université Paris-XI	Rapporteuse
Pr Serge THORIMBERT	Sorbonne Université	Rapporteur
Dr Arielle GENEVOIS-BORELLA	Sanofi	Examinatrice
Dr Martine SCHMITT	Université de Strasbourg	Examinatrice
Pr Philippe BELMONT	Université Paris-V	Examineur
Dr Yves JANIN	Institut Pasteur de Paris	Directeur de thèse

Thèse de doctorat de l'université Paris-V (Paris Descartes)

École doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

Présentée par

Eloi COUTANT-FLEXER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-V (Paris Descartes)

Spécialité : Chimie organique

Synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones originales et leurs évaluations comme substrats de la luciférase mutée d'*Oplophorus gracilirostris* nanoKAZ

Sous la direction du Dr Yves JANIN

Devant le jury composé de :

Dr Sandrine PIGUEL	Université Paris-XI	Rapporteuse
Pr Serge THORIMBERT	Sorbonne Université	Rapporteur
Dr Arielle GENEVOIS-BORELLA	Sanofi	Examinatrice
Dr Martine SCHMITT	Université de Strasbourg	Examinatrice
Pr Philippe BELMONT	Université Paris-V	Examineur
Dr Yves JANIN	Institut Pasteur de Paris	Directeur de thèse

Confidentialité

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse ont fait l'objet, dans leur grande majorité, d'une demande de titre de propriété industrielle auprès de l'Office Européen des Brevets :

« *Imidazopyrazine derivatives, process for preparation thereof and their uses as luciferins* » – EP17168838

Cette demande étant toujours en cours d'examen et l'Institut Pasteur souhaitant étendre prochainement la protection par une demande internationale « PCT », nous prions le lecteur de bien vouloir considérer le contenu de ce document comme *strictement confidentiel*, celui-ci ne devant en aucun cas être considéré comme une divulgation publique des résultats, et ce jusqu'au dépôt de la demande internationale.

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury ayant accepté d'examiner les résultats de ce projet doctoral, les Drs Arielle Genevois-Borella, Sandrine Piguel, Martine Schmitt et les Prs Philippe Belmont et Serge Thorimbert.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance au Dr Daniel Larzul pour son soutien indéfectible aux projets de chimie à l'Institut Pasteur et pour avoir permis avec la *Global Care Initiative* le financement de ces trois années de thèse.

Merci au Dr Sylvie Pochet de m'avoir accueilli dans son unité de Chimie et Biocatalyse de l'Institut Pasteur où j'aurais finalement passé près de cinq inoubliables années.

Je remercie également le Dr Yves Janin pour sa patience et son enthousiasme tout au long de ce projet, pour avoir supporté mes sautes d'humeur avec indulgence et contribué à la si bonne ambiance dans notre laboratoire, et pour sa passion contagieuse pour les défis aussi bien de chimie que de bricolage, voire de bidouillage, nous ayant menés d'énigmatiques résultats en accomplissements exaltants.

"That is what you risk, Grasshopper: great pain, or great joy." – Kung Fu

Merci aussi à nos collègues biologistes et biochimistes : Yves Jacob dont la requête initiale a été à l'initiative de ce projet, Sophie Goyard et Thierry Rose pour leurs efforts constants de production de protéines, d'évaluation de bioluminescences et de développement de nouvelles applications, Valérie Choumet, Essia Belarbi et Vincent Legros pour leurs tests *in vivo*.

Toutes mes pensées vont aux étudiants en thèse, master et licence, passés et présents de notre groupe qui ont participé à ce projet : Glwadys (bon courage, plus qu'un an et demi de mécanismes à six centres douteux et de chélation obscures), Vincent, Racha, Sarah, Candice, Mathilde, Paul et Victor.

Un grand merci à tous les membres des unités de Chimie et Biocatalyse et de Chimie des Biomolécules pour avoir supporté mes blagues hasardeuses et mon tempérament changeant, avec une pensée particulière pour Sophie et les longues heures passées à faire de la plomberie dans la joie et la bonne humeur (vraiment), Hélène pour avoir répondu avec mansuétude à mes (nombreuses) interrogations biochimiques, Valérie pour sa gentillesse inaltérable et Frédéric, d'une part pour les analyses HRMS, mais aussi pour nos débats télévisuels et cinématographiques passionnés. Merci également à tous les valeureux pâtisseries ayant rempli nos panses constamment affamées et étouffé par là même contrariétés et chagrins.

Un grand merci aux membres de l'atelier de fabrication mécanique, du service de maintenance interne et de la reprographie, qui nous aident tant au jour le jour au sein de l'Institut Pasteur et nous ont parfois permis de concrétiser nos bidouillages les plus fous.

Je remercie mes anciens partenaires caféinomanes et/ou ludophiles et leurs compagnes et compagnons qui m'ont fait l'honneur de leur amitié, en espérant de tout cœur que nous pourrions continuer à la nourrir dans les années à venir : Caroline, Julie, Capucine, Guillaume, Renaud, Marc, Matthias et Yann. Une pensée également pour Irène, chimiste et amie émigrée que le Brexit nous ramènera peut-être. Je vous adore, ne changez (presque) rien !

Je veux bien évidemment exprimer mon immense reconnaissance à mes parents et à ma sœur, qui ont cultivé au fil des dîners, des week-ends et des voyages mon insatiable curiosité et une passion des débats qui ne me quittent jamais, avec une pensée émue pour mon père, docte sans être docteur, qui n'aura jamais pu savoir que j'avais finalement obtenu un financement pour ma thèse.

Pour finir, un gigantesque merci à Margaux, qui me supporte désormais depuis presque une décennie (mais on ne compte pas) malgré les concours, l'éloignement, les déménagements, les travaux, la thèse et, plus difficile encore, la vie quotidienne en ma compagnie. Merci.

Résumé

L'utilisation massive des luciférase d'origine marine comme systèmes rapporteurs reste très limitée par le coût prohibitif de leurs substrats. Ces derniers sont constitués d'un noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, dont les synthèses publiées sont difficiles et dont le stockage et l'utilisation nécessitent des précautions importantes. Nous avons découvert dans le cadre de ce projet une synthèse alternative originale d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones en 5 à 10 étapes ayant permis l'obtention au laboratoire de plus d'une centaine de nouveaux substrats potentiels, ainsi qu'une dérivatisation permettant le stockage de ces composés sans précaution particulière, à température ambiante, pour de longues périodes de temps.

Ces luciférines originales ont ensuite été évaluées sur un variant de la luciférase d'*Oplophorus gracilirostris*, nanoKAZ, afin d'étudier les relations structure-luminescence de ces substrats. Nous avons ainsi obtenu des substrats originaux avec des temps de demi-vie du signal bioluminescent largement accrus (plus de deux heures) ou des rapports signal/bruit cinq à dix fois supérieurs au couple commercial furimazine/nanoKAZ.

Abstract

The large-scale use of marine luciferases as reporter systems is still very impeded by the prohibitive costs of their substrates. These imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones are difficult to synthesize, and their unstability make their storage and use cumbersome. In the course of this project, we have discovered a new synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones in 5 to 10 steps, which allowed us to synthesize more than one hundred original potential substrates of these luciferases, alongside a derivatization method providing shelf-stable precursors of these molecules. The structure-luminescence relationships of these original substrates have been assessed with nanoKAZ, a mutated luciferase of the shrimp *Oplophorus gracilirostris*. This led us to identify original substrates endowed with greatly improved half-life (more than two hours) or with signal-over-noise ratios enhanced five to ten times versus the commercial furimazine/nanoKAZ system.

Table des matières

Confidentialité	i
Remerciements	iii
Résumé	v
Abstract	v
Table des matières	vii
Abréviations et conventions	ix
Partie I : Introduction	1
I - La bioluminescence	3
I.A. Historique et définition(s)	3
I.B. Utilité biologique	5
I.C. Systèmes terrestres et cas particulier de la luciférase de <i>Photinus pyralis</i>	6
I.D. Systèmes marins	7
II - La lumière comme système rapporteur	17
II.A. Fluorescence	18
II.B. Bioluminescence	20
III - Imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones : synthèses et réactivités	23
III.A. Généralités	23
III.B. Mécanisme de luminescence des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones	26
III.C. Réactivité et autoluminescence	28
III.D. Synthèses d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones	29
Partie II : Synthèse d'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones potentiellement bioluminescentes	35
I - Synthèses d'α-aminoesters	39
I.A. Synthèse d'α-aminoesters par alkylation... ..	41
I.B. Synthèse d'α-aminoesters via la formation d'un α-nitroester	44
I.C. Synthèse d'α-aminoesters via la formation d'un α-hydroxyiminoester	50
I.D. De la stabilité des α-aminoesters	60
II - Construction du noyau pyrazine	61
II.A. Voie 1	61
II.B. Voie 2	65
II.C. Activation de la position 2 de la pyrazine	76
III - N-Arylations et cyclisations en imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones	79
III.A. N-arylations	79

III.B. Formation des imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-ones	89
IV - Experimental section.....	99
IV.A. Preparations of molecules described in I.A.....	100
IV.B. Preparations of molecules described in I.B.1.....	103
IV.C. Preparations of α -aminoesters from aldehyde acetals and ethyl nitroacetate (I.B.2)	105
IV.D. Preparations of α -methylaminoesters (I.B.3).....	112
IV.E. Preparations of α -aminoesters from aldehydes and diethyl malonate (1.C.1).....	114
IV.F. Preparations of α -aminoesters via [4+2] cycloaddition with furanes (I.C.2)	127
IV.G. Preparations of 2-hydroxypyrazines, Path 1 (II.A)	128
IV.H. Preparations of 2-hydroxypyrazines, Path 2 (II.B)	130
IV.I. Preparations of 2-chloropyrazines (II.C)	138
IV.J. Preparations of 2-bromopyrazines (II.C).....	141
IV.K. Preparations of <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)aminoesters (III.A.3)	143
IV.L. Preparations of imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3-yl acetates (III.B.2.a).....	161
IV.M. Preparations of imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3-yl acetates bearing free hydroxyls (III.B.2.b)....	177
Partie III : Évaluation des analogues Q	183
I - Méthodes.....	185
I.A. Enzyme	185
I.B. Substrats.....	186
I.C. Choix de la solution tampon	186
I.D. Protocole de comparaison des analogues de luciférines synthétisés au laboratoire	188
I.E. Critères de quantification.....	188
II - Résultats.....	191
II.A. Modifications en α de la position 2 de l'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-one	192
II.B. Modifications sur la position 6 de l'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-one	200
II.C. Modifications en position 8 de l'imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3(7 <i>H</i>)-one	204
III - Discussion.....	215
Conclusion et perspectives.....	219
Bibliographie.....	227
Annexe I : Synthetic Routes to Coelenterazine and Other Imidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3-one Luciferins: Essential Tools for Bioluminescence-Based Investigations.....	253
Annexe II : Synthesis of α -Amino Esters via α -Nitro or α -Oxime Esters: A Review	257

Abréviations et conventions

Les schémas ont été représentés selon les recommandations 2008 de l'UICPA.¹

Les descriptions des analyses rétrosynthétiques sont celles du manuel *Organic Chemistry* (chapitre 28 de la 2^{nde} édition) de Jonathan Clayden, Nick Greeves et Stuart Warren.²

Sauf mention contraire, les abréviations et unités non définies sont considérées comme communes dans le *ACS Style Guide*,³ qui a été suivi autant que possible dans les parties expérimentales.

% éq. : pourcent d'équivalent (utilisé principalement pour les quantités de catalyseurs, à la place de « % mol » qui est l'unité de la fraction molaire)

ATP : adénosine triphosphate

aq. : aqueux ou solution aqueuse

Ar : noyau aromatique ou hétéroaromatique

Boc : *tert*-butoxycarbonyl

CCM : chromatographie sur couche mince

CDI : 1,1'-diimidazolecarbonyl
(acronyme anglais)

CDTA : acide trans-1,2-diaminocyclohexane-
N,N,N',N'-tétraacétique (acronyme anglais)

CL/SM : chromatographie liquide –
spectrométrie de masse (*LC/MS*)

DCM : dichlorométhane (CH_2Cl_2)

DEPT : *distortionless enhanced polarization transfer* (RMN)

diX : addition conjuguée (déconnexion à deux groupes en rétrosynthèse)²

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DPA : 3',5'-diphosphoadénosine

DPPA : azoture de diphenylphosphoryl
(acronyme anglais)

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
(acronyme anglais)

éq. : équivalent(s)

GFP : protéine fluorescente verte (acronyme anglais)

HSQC : *heteronuclear single quantum correlation* (RMN)

MES : acide 2-(*N*-morpholino)-
éthanesulfonique (acronyme anglais)

m.o. : chauffage par irradiation micro-onde

NBS : *N*-bromosuccinimide

NCS : *N*-chlorosuccinimide

NOESY : *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (RMN)

n.i. : non isolé

ox. : oxydant, oxydation

PAPS : 3'-phosphoadénosine
5'-phosphosulfate

ppm : partie par million

q.s.p. (qs) : quantité suffisante pour (*quantum satis*)

Rdt : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

rpm : rotations par minute (vitesse d'agitation)

réd. : réducteur, réduction

t.a. : température ambiante du laboratoire
(17-20 °C)

TFA : acide trifluoroacétique (acronyme anglais)

THF : tétrahydrofurane

TMG : *N,N,N',N'*-tétraméthylguanidine

Tol. : toluène

u. a. : unité arbitraire de mesure d'un signal lumineux

“So much universe, and so little time.”

The Last Hero, Terry Pratchett

À Louis-Marie Coutant

Partie I : Introduction

I - LA BIOLUMINESCENCE

I.A. Historique et définition(s)

La bioluminescence est la capacité de certains êtres vivants, uni ou pluricellulaires, à émettre de la lumière. Ce phénomène est connu de longue date, avec des récits d'Aristote mentionnant déjà « la phosphorescence de la mer » et Pline l'Ancien décrivant des lucioles dans son *Naturalis Historia* : « les larapyrides (*Lampyrus noctiluca*) [qui] brillent la nuit comme des feux, par la couleur de leurs flancs et de leur croupe, tantôt resplendissants quand leurs ailes s'entrouvrent, tantôt éclipsés quand elles les ferment ». ⁴ Il y est également déjà mention de la méduse mauve *Pelagia nocticula*, commune dans la baie de Naples.

Plus récemment (au XVII^e siècle), Robert Boyle a démontré avec l'une des premières machines à vide l'importance de l'air dans le processus de bioluminescence du bois, de la viande ou des larves de lucioles. ⁵⁻⁶ La bioluminescence du bois en décomposition a été attribuée plus tardivement à la présence de mycélium de *Rhizomorpha* à sa surface ⁷ et celle de la viande à des bactéries bioluminescentes. Les observations de Boyle ont été confirmées et complétées par Forster et Spallanzani au XVIII^e siècle, le premier montrant la baisse de bioluminescence de la luciole lorsqu'elle était privée d'air, le second montrant que des morceaux de certaines méduses perdaient leur capacité lumineuse lorsqu'ils étaient desséchés, mais la retrouvait en présence d'eau et d'air. Spallanzani démontrera également que les phénomènes de luminescence n'avaient plus lieu sous des gaz inertes (diazote, dihydrogène, dioxyde de carbone), assimilant par conséquent la bioluminescence à une « combustion lente ». ⁸⁻⁹

Une avancée majeure dans la compréhension des phénomènes de bioluminescence a été l'œuvre de Raphaël Dubois, professeur de physiologie à Lyon, à l'orée du XX^e siècle. Celui-ci a montré en chauffant ou non des extraits de *Pholas* (mollusque bivalve), ¹⁰ ou de lucioles, puis en les mélangeant de nouveau, que les réactions de bioluminescence nécessitaient l'action conjuguée d'un composé ne supportant pas la chaleur, supposé être une enzyme et baptisé « luciférase », et d'un composé insensible à la chaleur, supposé organique et dénommé « luciférine ». ¹¹ Ironiquement, la plupart des systèmes bioluminescents identifiés par la suite se sont avérés respecter cette composition luciférine-luciférase, ce qui n'est toutefois pas le cas du système de *Pholas* où la « luciférine » est également une protéine. ¹²

L'étude moderne de la luminescence des organismes vivants et la détermination des mécanismes sous-jacents a été initiée à l'université Princeton durant la première moitié du XX^e siècle par Edmund N. Harvey, devenu une des figures fondatrices du domaine. ¹³⁻¹⁹ Ses étudiants et collaborateurs, F. H. Johnson (puis le lauréat du prix Nobel O. Shimomura), W. D. McElroy, M. J. Cormier ou F. I. Tsuji ont tous poursuivis des travaux sur la bioluminescence, souvent sur des organismes différents, qui mèneront à la caractérisation de nombreux systèmes bioluminescents distincts chez la luciole, les champignons, les bactéries et de nombreux animaux marins. Un historique détaillé de la recherche en bioluminescence a été publié en 2011 par Aldo Roda, ⁹ détaillant l'évolution en parallèle des divers laboratoires créés par les collaborateurs de Harvey.

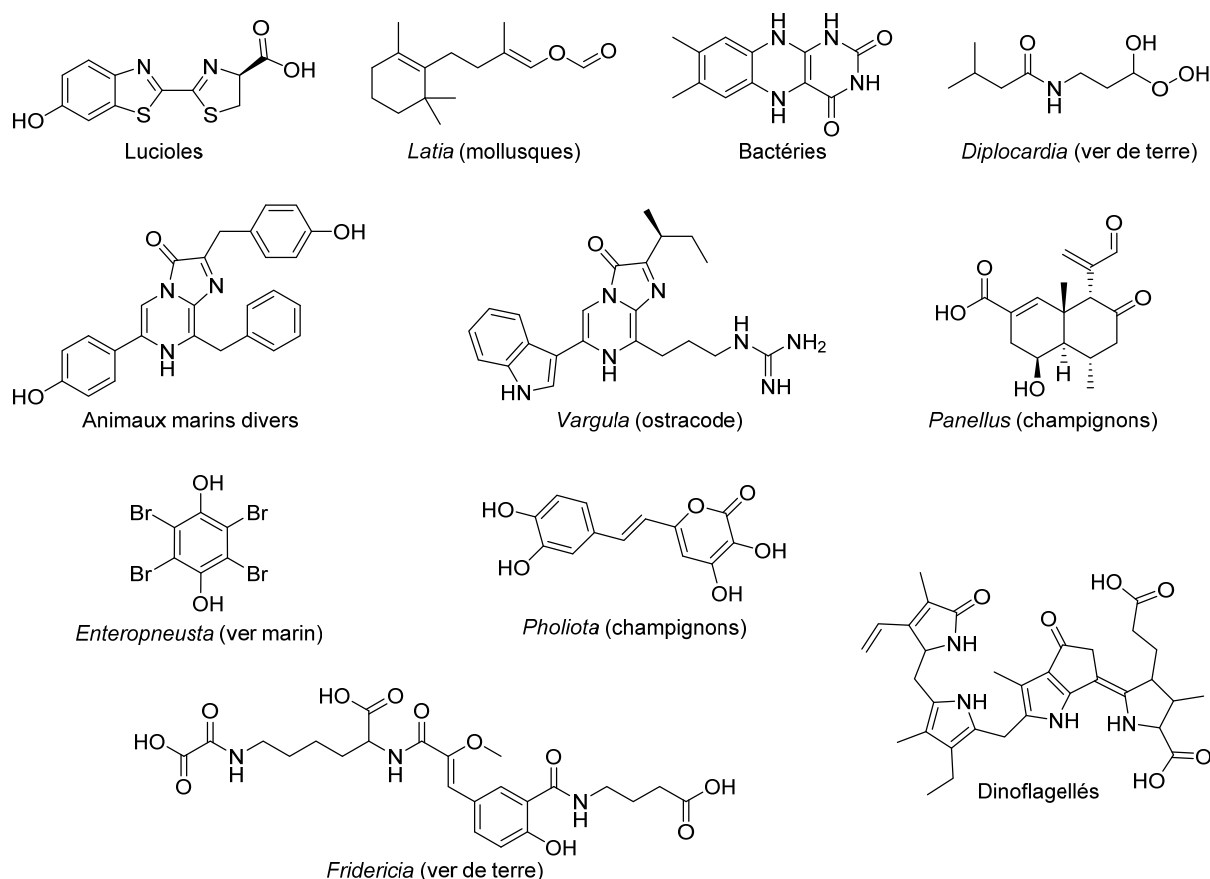


Figure 1 : luciférines de divers organismes eucaryotes ou procaryotes, terrestres ou marins

La bioluminescence est aujourd'hui définie comme l'oxydation entraînant la chimioluminescence d'un composé organique (luciférine) catalysée par une enzyme (luciférase). Ces termes génériques sont utilisés quel que soit l'organisme considéré et ce bien qu'une grande quantité de luciférase et luciférines différentes aient été isolées (Figure 1) ; il convient donc de porter une attention toute particulière à la description des études effectuées dans ce domaine.

I.B. Utilité biologique

Notre compréhension de l'utilité biologique de la bioluminescence est encore aujourd'hui limitée. S'il est aisé de concevoir l'utilité de la lumière pour des animaux, il est plus difficile de l'imaginer pour des bactéries. Cela a mené certains chercheurs à émettre l'hypothèse que les luciférines auraient servi d'antioxydants préalablement à leur rôle de substrats de luciférase.²⁰⁻²¹ De même, chez les animaux, il est toujours délicat de procéder à l'identification formelle du ou des rôles de la bioluminescence : comme souligné par Harvey *et al.* dans une excellente revue sur la bioluminescence marine,²² « les comportements lumineux observés en laboratoire peuvent ne pas refléter leur occurrence dans la nature, comme l'on ne pourrait conclure que la vocalisation humaine est un moyen de lutte contre les prédateurs car nous crions quand on nous pique ».

Quelques comportements sont toutefois établis. Ainsi, les femelles lucioles ont un abdomen lumineux permettant d'attirer les mâles à des fins de reproduction, chaque espèce ayant une fréquence de luminescence propre. Les lucioles femelles du genre *Photuris* sont capables de reproduire les signaux lumineux d'autres espèces afin d'attirer les mâles et de s'en repaître, leur valant en Amérique du Nord le surnom de « *femme fatale fireflies* ». Cette capacité de la lumière à attirer les proies est également valable dans les océans et est utilisée par les poissons-pêcheurs (poissons-lanternes, ordre des Lophiiformes), ceux-ci disposant au-dessus de leur bouche d'un organe lumineux servant de leurre.

Contrairement aux animaux terrestres qui disposent uniquement d'organes luminescents faisant partie intégrante du corps, il est possible pour certains organismes marins d'éjecter des nuages lumineux, leurs permettant de s'enfuir lors de l'attaque de prédateurs. Il semble également que les espèces pouvant émettre un flash lumineux soient capables d'effrayer d'éventuels prédateurs.

Une autre observation commune est la présence d'organes lumineux sous les animaux marins. Ceux-ci sont capables d'adapter la lumière qu'ils émettent vers les profondeurs à la lumière qu'ils reçoivent de la surface, permettant de modifier voire de supprimer l'ombre de leur corps et ainsi être invisible pour les prédateurs nageant sous eux. Inversement, il semble que certains requins soient capables de se faire ainsi passer pour beaucoup plus petits qu'ils ne le sont, se faisant ainsi attaquer par des « prédateurs » qui deviennent proies.

Enfin, il semble que certains organismes marins soient capables d'utiliser la lumière comme moyen de communication, mais cela reste une hypothèse extrêmement difficile à confirmer.

I.C. Systèmes terrestres et cas particulier de la luciférase de *Photinus pyralis*

La bioluminescence terrestre n'est pas extrêmement répandue et n'est l'attribut que de quelques familles d'espèces chez les bactéries, les champignons et les insectes. Si les bactéries sont très représentées dans le domaine marin, le plus souvent en symbiose avec un autre organisme ; sur terre, il semble que les espèces les plus courantes soient réduites aux entérobactéries des genres *Photorhabdus* ou *Xenorhabdus*, vivant en symbiose avec des nématodes pathogènes des insectes. Environ soixante-quinze espèces de champignons ont été identifiées comme bioluminescentes,²³ avec une longueur d'onde maximale d'émission commune aux alentours de 530 nm traduisant potentiellement l'utilisation d'un émetteur commun.^{12, 24-26} Une description plus précise de la bioluminescence de ces organismes est toutefois largement au-delà du spectre de ce manuscrit et nous ne les aborderons pas plus avant.

Les représentants les plus connus des insectes lumineux sont probablement les lucioles (coléoptères de la famille des Lampyridae), dont on peut trouver plus de 2 000 espèces différentes, principalement des genres *Lampyris* en Europe (dont le ver luisant *Lampyris noctulica*), *Photinus* en Amérique du Nord et *Luciola* au Japon. La connaissance du système de bioluminescence des lucioles est principalement l'œuvre de William McElroy et de ses collaborateurs, qui ont successivement purifié la luciférase²⁷ et la luciférine²⁸ de la luciole *Photinus pyralis*.

La luciférase de luciole (appelée FLuc, pour *Firefly Luciferase*) a une masse moléculaire d'environ 62 kDa et sa structure a été élucidée à la fin des années 90.²⁹ Elle émet en présence de D-luciférine (**1**), d'adénosine triphosphate (ATP)³⁰ et d'ions magnésium Mg^{2+} une lumière jaune-verte (λ_{max} 552–582 nm) (Schéma 1).³¹ Il faut noter que, contrairement à ce que nous verrons pour les organismes marins, une grande variété de longueurs d'ondes d'émission lumineuse est observée chez les lucioles, certaines espèces utilisant la même D-luciférine (**1**) comme substrat émettant à plus de 638 nm (rouge).

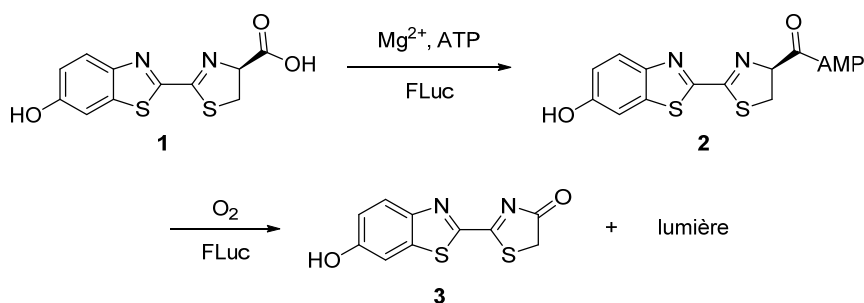


Schéma 1 : structure de la D-luciférine (**1**) et schéma de bioluminescence menant à l'oxyluciférine **3**

La D-luciférine (**1**) nécessite son activation sous forme d'adénylate de luciféryle **2**, avant d'être oxydée par la luciférase pour aboutir à l'oxyluciférine **3** et l'émission de lumière.

Nous avons souhaité aborder ce système bioluminescent car son utilisation massive par les biochimistes, initialement pour les dosages d'ATP puis pour des applications de plus en plus complexes, a rendu les termes « luciférine » et « luciférase » presque synonymes de « D-luciférine » et « *firefly* luciférase ». La découverte puis l'utilisation de plus en plus courante de systèmes bioluminescents d'origines diverses doit nous inciter à systématiquement préciser l'origine de la luciférase utilisée et à négliger les appellations susceptibles d'induire le lecteur en erreur ; l'appellation des gènes codants pour divers variants de FLuc « *luc* » ou « *luc2* »³²⁻³³ ou la réduction à « Luc » du nom de l'enzyme nous paraît ainsi désormais assez peu adaptée.

I.D. Systèmes marins

Alors que seules quelques familles terrestres (au sens taxonomique du terme) sont capables d'émettre de la lumière, dont les représentants les plus connus sont les lucioles et les lampyres, il semble que la bioluminescence marine soit la norme plutôt que l'exception.²² Ainsi, une étude publiée en 2017 par Martini *et al.* se basant sur les données accumulées durant 240 expéditions effectuées par des robots équipés de caméras, jusqu'à 3 900 mètres de profondeur, estime que 75 % des espèces observées ont des capacités de bioluminescence, avec de grosses variations selon les embranchements (phyla).³⁴ Il a également été montré que si la répartition des espèces bioluminescentes peut changer selon la profondeur, celles-ci sont présentes de la surface jusqu'aux fonds marins.

Les dinoflagellés (phytoplancton) peuvent ainsi émettre sous l'effet d'un stress mécanique une lumière à l'origine de marées bleues spectaculaires observables de nuit à Porto Rico ou Bali (malheureusement, ces mêmes organismes sont également à l'origine de marées rouges dues à l'eutrophisation).³⁵⁻³⁶ Certains animaux marins (des calamars ou les « poissons lanternes », par exemple) sont également capables d'émettre de la lumière sans pouvoir la produire ; ils hébergent pour cela des colonies symbiotiques de bactéries bioluminescentes dans des organes dédiés.³⁷⁻³⁸ Les travaux relatifs à ces organismes et leur luminescence ne seront toutefois pas exposés plus avant dans ce manuscrit.

L'extrême majorité des cnidaires pélagiques (c'est-à-dire principalement les méduses « matures » qui nagent dans la colonne d'eau – en opposition à leur forme polype ou aux coraux et anémones de mer – et les siphonophores) sont capables de générer leur propre lumière, ainsi que les membres du proche embranchement des cténophores et un certain nombre de crustacés. Seuls les systèmes bioluminescents d'une infime portion de ces espèces ont déjà été caractérisés, ce qui présage de nombreuses découvertes futures dans ce domaine. Nous détaillerons ci-après quelques-uns d'entre eux ayant trouvé une utilité en dehors des fonds marins, comme outils de biologie moléculaire. Il convient néanmoins auparavant de souligner une particularité étonnante : les systèmes bioluminescents marins isolés depuis des cnidaires, des cténophores ou des crustacés (familles représentant tout de même 50 % des observations dans l'étude de Martini *et al.*³⁴ et rassemblant près de 50 000 espèces) se partagent deux substrats présentant un noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one commun (en vert, Figure 2), la coelentérazine (4) couvrant à elle seule présente dans au moins neuf embranchements taxonomiques.

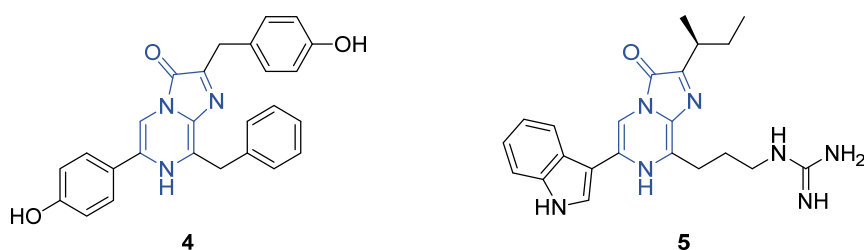


Figure 2 : structure de la coelentérazine (4) et de la varguline (5) avec le noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one commun

La varguline (5) a été cristallisée pour la première fois par Osamu Shimomura en 1957,³⁹ mais sa structure ne sera élucidée que près d'une décennie plus tard, en 1965.⁴⁰ Dans les années 1960, les groupes de recherche de Frank Johnson et de Milton Cormier ont travaillé respectivement à l'élucidation de la structure du chromophore d'une protéine lumineuse trouvée chez *Aequorea*, l'aéqorine, et du substrat de la luciférase de *Renilla reniformis*, sans savoir qu'ils étudiaient la même molécule, identifiée finalement comme la coelentérazine (4) en 1977.⁴¹⁻⁴²

I.D.1. Photoprotéines utilisant la coéluentérazine, cas de l'aéquorine

La méduse *Aequorea* (également nommée *A. victoria*) est un hydrozoaire (classe de cnidaires) mesurant à sa maturité entre 7 et 10 centimètres et présentant sur le pourtour de l'ombrelle des organes bioluminescents émettant une lumière verte. L'étude de la luminescence de cette espèce a été initiée par Harvey dans les années 20, avant d'être reprise par Frank Johnson à l'université Stanford, en compagnie d'Osamu Shimomura, à la fin des années 50.

Les études préliminaires de Harvey et Johnson cherchant à isoler les deux composants *a priori* nécessaires à la bioluminescence, luciférine et luciférase, ont été infructueuses. Johnson décida donc de chercher à isoler avec Shimomura l'entité lumineuse de cette méduse, alors présente en grande quantité dans *Friday Harbor* (île de San Juan, près de l'extrémité nord de la côte Est des États-Unis), quelle qu'elle soit.^{12, 43} La purification de cette « substance lumineuse » a nécessité la pêche de quantités gargantuesques de méduses, entre 50 000 et 80 000 spécimens par an durant 14 années, méduses dont le pourtour était découpé à l'aide d'un montage spécial pour isoler les organes bioluminescents.

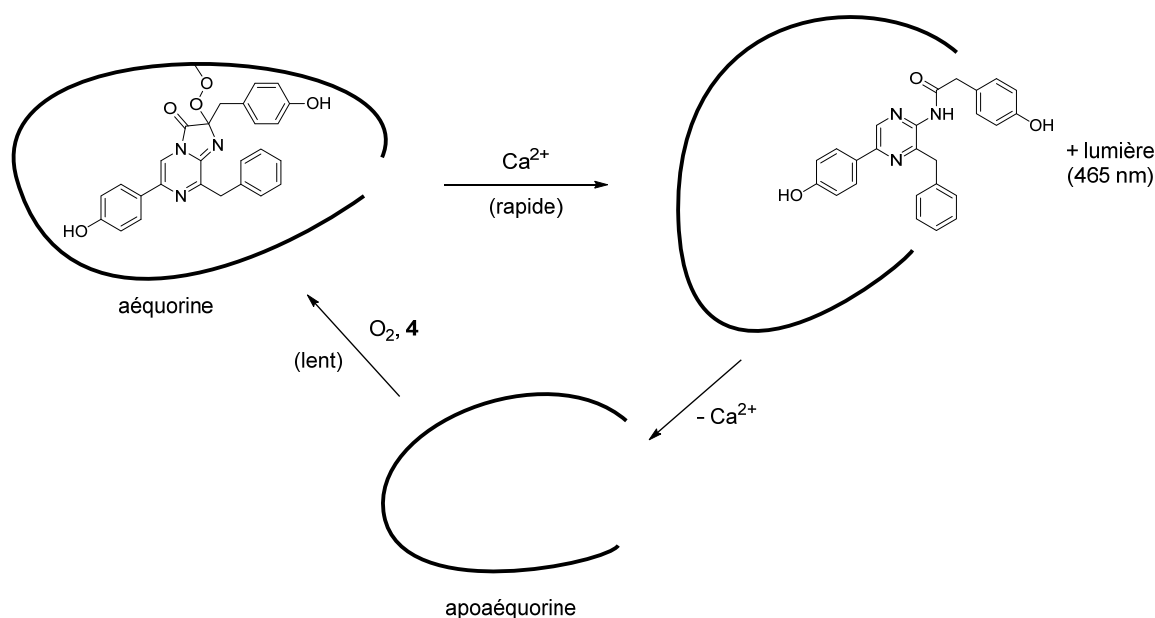


Schéma 2 : aéquorine, émission de lumière et régénération de l'apo-aéquorine par ajout de coéluentérazine (4)
(adapté de Bioluminescence: Chemical Principles and Methods, Shimomura)

Leurs recherches mènèrent à l'identification d'une protéine d'environ 21 kDa (plusieurs isoformes existent) émettant une lumière bleue (λ_{max} 465 nm) en présence d'ions Ca^{2+} , même en milieu anaérobie et qui sera nommée « aéquorine ». ⁴⁴⁻⁴⁵ La bioluminescence des organismes étant le plus souvent soumise à la présence d'oxygène, ainsi que cela avait été démontré par Boyle,⁵ l'aéquorine n'a pas été considérée comme une luciférase (oxygène-dépendante) mais comme une photoprotéine (calcium-dépendante). L'identification du chromophore de l'aéquorine comme étant la coéluentérazine (4) au milieu des années 70,⁴⁶⁻⁴⁸ cependant, tend à remettre en question cette classification : après sa luminescence (cf. mécanisme en Partie I : III.B), l'apo-aéquorine peut être « rechargée » en quelques heures par ajout de coéluentérazine (4) en absence de calcium mais cette fois en présence d'oxygène, ce que l'on pourrait considérer comme un comportement catalytique (certes extrêmement inefficace) proche de celui des luciférases (Schéma 2).

Des photoprotéines ont été isolées chez d'autres organismes, par exemple chez *Obelia longissima* (obéline), *Beroe ovata* (bérovine) ou *Mnemiopsis* sp. (mnémiopsine). La dépendance au calcium des photoprotéines a permis leur étude structurale en présence de leur substrat/cofacteur, ce qui a confirmé le « stockage » de la coelentérazine (**4**) sous une forme peroxydée mais a également apporté de nombreuses informations sur le mécanisme de bioluminescence ou les paramètres importants pour l'élaboration de photoprotéines améliorées.⁴⁹⁻⁵⁸

Incidemment, c'est en étudiant la luminescence d'*Aequorea aequorea* qu'Osamu Shimomura a découvert en combinaison avec l'aéqorine, émettant dans le bleu, une protéine fluorescente absorbant cette lumière bleue et réémettant dans le vert : la protéine fluorescente verte (*Aequorea* GFP), dont la découverte lui vaudra l'attribution du prix Nobel de chimie en 2008.⁴³

I.D.2. Luciférase marines utilisant la coelentérazine ou des analogues

a. *Renilla*

Les pensées de mer du genre *Renilla* sont des cnidaires vivant en colonies, mesurant de quelques centimètres à quelques dizaines de centimètres et possédant un pied permettant leur accroche aux fonds marins, sortes de coraux mous se nourrissant principalement de plancton. Elles peuvent parfois être trouvées sur des plages si elles se sont décrochées, mais vivent le plus souvent à quelques dizaines de mètres de profondeur et certains spécimens ont pu être décelées aux alentours de 2 000 m de fond.

Certaines espèces de *Renilla*, telles *Renilla reniformis*, *Renilla mülleri* ou *Renilla kollikeri* peuvent émettre une lumière verte (λ_{\max} 509 nm) intense suite à un stress. Cette luminescence a été étudiée par l'équipe de Milton Cormier à l'Université de Géorgie dès les années 1950.

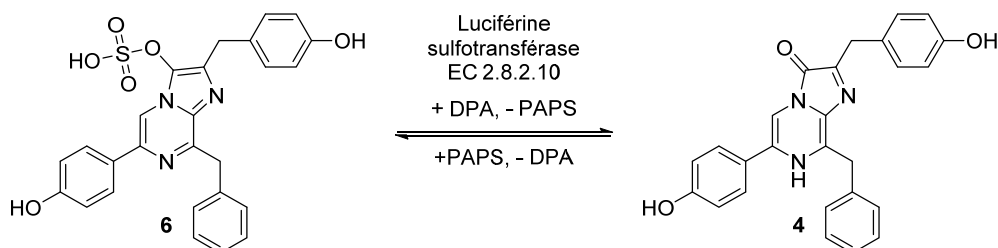


Schéma 3 : stockage de la coelentérazine (**4**) sous sa forme sulfatée **6**

Il a d'abord été cru que cette réaction de luminescence nécessitait la présence d'adénosine mono-, di- ou triphosphate,⁵⁹ avant que la même équipe ne prouve qu'elle nécessitait en fait la présence de 3',5'-diphosphoadénosine (DPA).⁶⁰ Il a par la suite été montré que *Renilla* peut conserver son substrat sous la forme sulfatée **6** (Schéma 3), qui peut être convertie en coelentérazine (**4**) par l'action d'une sulfotransférase^{42, 61-62} ; cette enzyme permet le transfert (réversible) d'un sulfate entre **6** et la DPA pour fournir **4** et la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS). Il est possible que ce mécanisme de stockage des luciférines sous forme sulfatée soit assez courant dans la nature, les sources de coelentérazine (sulfatée ou non) pouvant parfois être échangées entre espèces marines⁶³ ; une publication récente rapportant même l'occurrence de D-luciférine sulfatée chez les lucioles et vers luisants.⁶⁴

Le système bioluminescent complet est composé de trois éléments supplémentaires : une luciférase (RLuc), une protéine sensible aux ions calcium⁶⁵ liant la coelentérazine (n'étant pas à proprement parler une photoprotéine mais un moyen de stocker le substrat avant son transfert vers la luciférase)⁶⁶ et une

protéine fluorescente verte (*Renilla* GFP), propre à cette famille, à l'origine de la lumière verte observée *in vivo*.⁶⁷⁻⁶⁸

i. Luciférase sauvage RLuc

La luciférase sauvage de *Renilla reniformis* RLuc a été purifiée et caractérisée dans les années 1970 par Cormier *et al.*,⁶⁹⁻⁷⁰ avant d'être étudiée comme protéine recombinante dans les années 1990.^{65, 71} Elle a été décrite comme une séquence de 314 résidus, pour une masse d'environ 35 kDa. L'émission de lumière catalysée par RLuc est possible avec de la coérentérazine (4) synthétique et en l'absence de GFP comme de protéine Ca^{2+} -sensible, avec une longueur d'onde maximale d'émission λ_{max} de 480 nm.

Cette luciférase a toutefois été décrite comme s'agrégeant assez aisément lorsqu'elle est conservée à trop forte concentration⁷⁰ et comme étant rapidement inactivée dans du sérum murin, avec un temps de demi-vie entre 30 et 60 minutes.⁷² L'intérêt suscité par cette luciférase non ATP-dépendante et presque deux fois plus petite que la luciférase de luciole (FLuc) a néanmoins mené à la conception de plusieurs mutants, décrits ci-après.

ii. Variants de RLuc

Une unique mutation d'une cystéine par une alanine (RLuc-C124A) a été rapportée par Liu et Escher⁷³ comme apportant une meilleure stabilité à l'enzyme, avec une multiplication par six du temps de demi-vie en présence de sérum murin.

D'autres mutants dotés de propriétés bioluminescentes améliorées ont par la suite été découverts par Loening, Gambhir *et al.* à l'université Stanford. En étudiant les séquences similaires de protéines, ils ont ainsi exprimé des mutants de RLuc où les acides aminés divergeant clairement de la séquence consensus ont été restaurés.⁷² Un mutant comportant huit substitutions d'acides aminés – A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L et S287L –, dénommé RLuc8, a ainsi montré une stabilité dans le sérum murin 200 fois plus importante que la luciférase sauvage et une intensité de bioluminescence 4 fois plus grande, avec une longueur d'onde d'émission maximale λ_{max} de 487 nm.

Par la suite, Loening, Gambhir *et al.* ont de nouveau muté RLuc8 afin d'obtenir de nouvelles luciférases avec une longueur d'onde d'émission décalée vers le rouge, plus adaptée pour un usage *in vivo* chez les mammifères.⁷⁴ Ils ont pour cela tout d'abord effectué des mutations dirigées dans le site actif supposé de la luciférase, permettant l'identification de huit mutations avec un effet bathochrome, au détriment toutefois de l'intensité lumineuse. Une seconde étape de mutagenèse aléatoire a ensuite été menée afin de restaurer l'activité catalytique de la luciférase, pour aboutir finalement à l'identification de trois variants prometteurs, dont le plus connu RLuc8.6-535 possède six mutations supplémentaires par rapport à RLuc8 – A123S, D154K, E155N, D162E, I163L et F261W –, un temps de demi-vie aussi important que RLuc8 et une longueur d'onde d'émission maximale λ_{max} de 535 nm. Cette longueur d'onde de 535 nm est plus importante que celle obtenue en présence de RLuc et de sa GFP (λ_{max} 502 nm) ; il est toutefois important de noter que cette première valeur est la longueur d'onde maximale d'un spectre d'émission dont la largeur à mi-hauteur est d'environ 100 nm, quand la distribution d'émission de la GFP présente une largeur à mi-hauteur inférieure à 25 nm.

Ironiquement, RLuc8.6-535 s'est avérée trop stable pour étudier *in vivo* des variations éphémères de l'expression de gènes, amenant la même équipe de recherche à développer un nouveau mutant de RLuc, RLuc7-521, décalé vers le rouge mais conservant une faible stabilité.⁷⁵

b. Copépodes, plus particulièrement *Gaussia princeps* et *Metridia longa*

La sous-classe des copépodes (Copepoda) rassemble un grand nombre de petits crustacés, de taille généralement inférieure à 15 mm. Les copépodes de l'ordre Calanoida peuvent représenter jusqu'à 60 % du plancton océanique (devant le *krill*) dans les zones épipélagique et mésopélagique (entre 0 et 1 000 mètres de profondeur), dont une grande partie présente des facultés de bioluminescence.⁷⁶⁻⁷⁷

À notre connaissance, et contrairement aux autres espèces plus « massives », les luciféras de copépodes n'ont jamais été directement purifiées depuis leurs organismes respectifs, probablement à cause de la difficulté à obtenir puis trier des quantités importantes d'une unique espèce. Il est toutefois désormais possible à partir de quelques spécimens isolés de procéder à un criblage fonctionnel du protéome pour identifier d'éventuelles enzymes bioluminescentes. Ainsi, les luciféras recombinantes des copépodes *Gaussia princeps* (GLuc)⁷⁸⁻⁷⁹ et *Metridia longa* (MLuc, parfois MetLuc)⁸⁰⁻⁸² ont pu être exprimées et caractérisées, parfois sous plusieurs isoformes.

Ces luciférasés sont sécrétées dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont exprimées par des cellules eucaryotes et ont de faibles masses moléculaires – 19 kDa pour GLuc, 24 kDa pour MLuc164 et 16,5 kDa pour MLuc7 –, deux propriétés très intéressantes pour leur utilisation comme systèmes rapporteurs. Elles utilisent toutes la coelentérazine (**4**) comme substrat et la luciférase sauvage GLuc a été rapportée comme étant, à quantité égale, plus de 10 fois plus lumineuse que RLuc.⁸³ Les séquences protéiques de ces luciférasés (Figure 3) montrent une homologie importante entre ces luciférasés, avec la conservation de dix cystéines pouvant former des ponts disulfure, ce qui rend l'expression de luciférasés fonctionnelles plus difficile en bactéries.

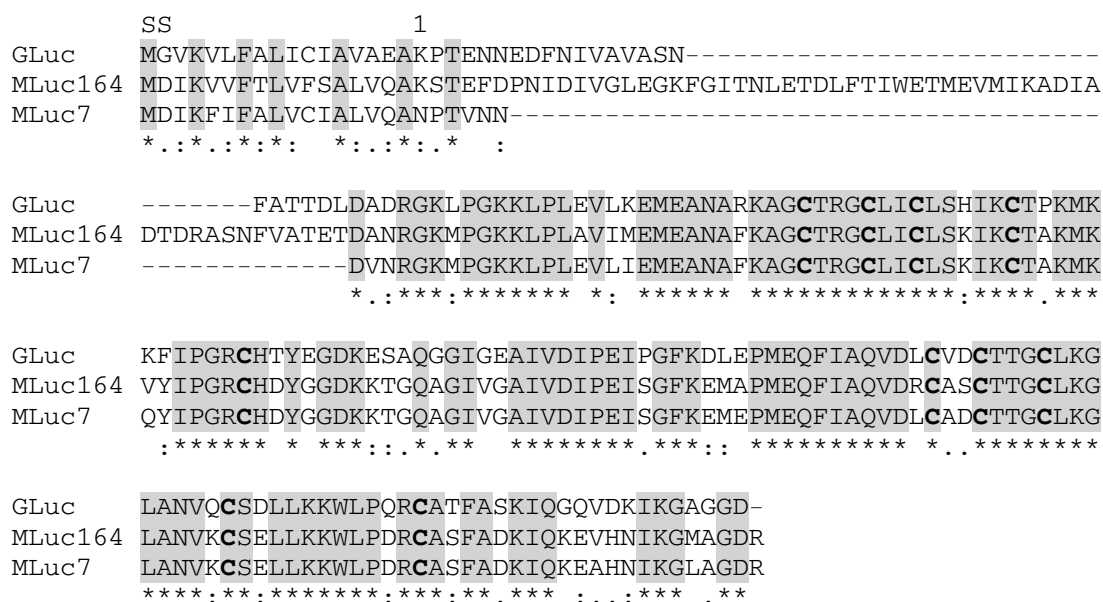


Figure 3 : alignement des séquences protéiques[‡] des luciféras clonées de *Gaussia princeps* (GenBank AAG54095.1) et des isoformes MLuc164 (AAR17541.1) et MLuc7 (AJC98141.1) de *Metridia longa*. Les 17 premiers acides aminés correspondent à la séquence signal de sécrétion.

* Les « * » correspondent aux positions parfaitement conservées (également surlignés en gris), les « : » correspondent aux positions où l'acide aminé a été remplacé par un autre très similaire (score > 0,5 sur la matrice de similarité Gonnet PAM 250), les « . » correspondent aux positions où l'acide aminé a été remplacé par un autre ayant une plus faible similarité (score < 0,5).

Le clonage relativement récent de ces luciférase explique peut-être le nombre restreint de mutants développés, avec GLuc-M43I possédant une meilleure stabilité du signal lumineux en présence de tensioactif⁸⁴ et un triple-mutant GLuc4 (L30S, L40P, M43V) montrant une luminosité moins importante mais plus stable dans le temps.⁸⁵ L'homologie très importante entre les espèces de copépodes (détectable dans la Figure 3, mais étendue à 25 luciférase)⁸⁶ a toutefois été mise à profit pour définir une séquence consensus à partir de laquelle des luciférase artificielles (nommées ALuc) ont été créées.⁸⁷⁻⁹⁰

c. *Oplophorus gracilirostris*

Oplophorus gracilirostris est une crevette décapode marine, présente dans la zone mésopélagique (entre 200 et 1 000 mètres de profondeur) ou bathypélagique (1 000 – 4 000 m), qui est capable de sécréter un nuage bioluminescent depuis la base de ses antennes et possède également des organes lumineux sur ses pattes.⁹¹

i. Luciférase sauvage OLuc

La luciférase d'*Oplophorus gracilirostris*, OLuc, a été partiellement purifiée en 1966 par Johnson *et al.* qui ont pu montrer qu'elle utilise la coérentérazine (**4**) comme substrat,⁹² puis a été réétudiée en 1978 lorsque l'équipe put obtenir des quantités importantes de coérentérazine synthétique permettant une caractérisation plus approfondie de ses capacités de bioluminescence.⁹³ Une première estimation avait permis de déterminer une masse autour de 130 kDa, valeur corrigée par la suite à 108 kDa,⁹⁴ une température optimale de bioluminescence aux alentours de 40 °C (ce qui est remarquable pour une enzyme provenant des fonds marins) et une longueur d'onde d'émission maximale λ_{max} entre 454 et 460 nm.

L'évaluation d'une vingtaine de substrats artificiels en combinaison avec OLuc par Nakamura, Inouye et Shimomura⁹⁵⁻⁹⁶ a également mis en évidence une grande permissivité de cette luciférase sur les substitutions de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, et donc la possibilité d'utiliser cette enzyme avec un substrat moins « fragile » que la coérentérazine (voir Partie I : III.C).

Ces avantages ont mené à une caractérisation plus précise de cette luciférase en 2000 par Inouye *et al.*⁹⁴ Ils ont alors démontré qu'OLuc était un ensemble tétramérique composé de deux couples de sous-unités de 35 kDa et 19 kDa, et que l'activité bioluminescente n'était le fait que de cette dernière (nommée dans la littérature 19kOLase, OLuc-19 ou KAZ) qui contient le domaine catalytique de la luciférase. La séquence primaire de KAZ, longue de 169 acides aminés, a été publiée en 2007 avec une méthode permettant sa surexpression, mais il a été montré en même temps que la sous-unité KAZ recombinante n'était pas aussi stable en l'absence de son partenaire de 35 kDa et était majoritairement exprimée sous forme de corps d'inclusion (agrégats de protéines dénaturées dans le milieu intracellulaire).⁹⁷

ii. Variants de la sous-unité catalytique d'OLuc, KAZ

Les excellentes propriétés d'OLuc sauvage comparées à l'expression décevante et aux conditions plus restreintes d'utilisation de KAZ ont menées à la recherche de mutants de cette dernière, dans l'espoir de restaurer l'intensité lumineuse et la stabilité de ce domaine catalytique et, à terme, de l'utiliser comme système rapporteur (voir ci-après « La lumière comme système rapporteur »).

	1	10	20	30	40	50	60
KAZ	FTLAD	FDVGDW	QQTAGYN	QDQVLE	QGGGLSS	LFQALGV	SVTP
N166R	FTLAD	FDVGDW	QQTAGYN	QDQVLE	QGGGLSS	LFQALGV	SVTP
C1A4E	FTL	EDFVGDW	RQTAGYN	QDQVLE	QGGGLSS	LFQKLGV	SVTP
C1A4E*	FTL	EDFVGDW	RQTAGYN	QDQVLE	QGGGLSS	LFQKLGV	SVTP
NLuc	FTL	EDFVGDW	RQTAGYN	LDQVLE	QGGVSS	LFQNLGV	SVTP
eKAZ	FTLAD	FDVGDW	QQTAGYN	QDQVLE	QGGGLSS	LFQALGV	SVTP
	61	70	80	90	100	110	120
KAZ	PYEG	LSGFQ	MGLIEM	IFKV	VYPV	DDH	HF
N166R	PYEG	LSGFQ	MGLIEM	IFKV	VYPV	DDH	HF
C1A4E	PYEG	LSGFQ	MGLIEM	IFKV	VYPV	DDH	HF
C1A4E*	PYEG	LSG	YQMG	QIEK	IFKV	VYPV	DDH
NLuc	PYEG	LSG	DQMG	QIEK	IFKV	VYPV	DDH
eKAZ	PYEG	LSGFQ	MGLIEM	IFKV	VYPV	DDH	HF
	121	130	140	150	160	169	
KAZ	DGKQ	ITVT	GTLW	NGNK	IYDER	LINPD	G
N166R	DGKQ	ITVT	GTLW	NGNK	IYDER	LINPD	G
C1A4E	DGK	KITV	TGTL	WNGNK	IIDER	LINPD	G
C1A4E*	DGK	KITV	TGTL	WNGNK	IIDER	LINPD	G
NLuc	DGK	KITV	TGTL	WNGNK	IIDER	LINPD	G
eKAZ	DGKQ	ITVT	GTLW	NGNK	IIDER	LINPD	G

Figure 4 : alignement des séquences protéiques du composant catalytique d'OLuc (KAZ) et des mutants développés par Hall *et al.*⁹⁸⁻⁹⁹ et Inouye *et al.*¹⁰⁰. Les mutations successives sont indiquées en rouge

(a) nanoKAZ

Promega Corporation a breveté en 2010^{98, 101} et divulgué en 2012⁹⁹ leurs travaux sur la mutation du domaine catalytique de la luciférase d'*Oplophorus gracilirostris*, KAZ. La séquence protéique de KAZ (UniProt Q9GV45, Figure 4) s'est avérée n'avoir que peu de similarité avec des protéines connues, mais la prédiction des repliements à partir de la séquence a permis d'identifier des similarités avec certaines protéines liant des acides gras (FABPs, *Fatty-Acids Binding Proteins*).⁹⁹ Une première optimisation a été de restaurer dans KAZ une interaction entre un tryptophane et une arginine hautement conservée dans cette famille de FABPs, en remplaçant l'asparagine-166 par une arginine (mutant N166R, nommé Oluc-N166R dans Hall *et al.*, 2012).⁹⁹ Cette « simple » mutation avait dès lors permis une stabilisation supplémentaire de 50 % du mutant à 37 °C et une luminescence triplée avec la cœlentérazine (4) comme substrat. Une campagne de mutagenèse aléatoire a ensuite mené à une combinaison de huit mutations bénéfiques supplémentaires permettant une stabilisation du mutant résultant C1A4E, ce dernier étant par ailleurs exprimé beaucoup plus efficacement que KAZ ou KAZ-N166R, mais ayant toutefois tendance à former des agrégats.

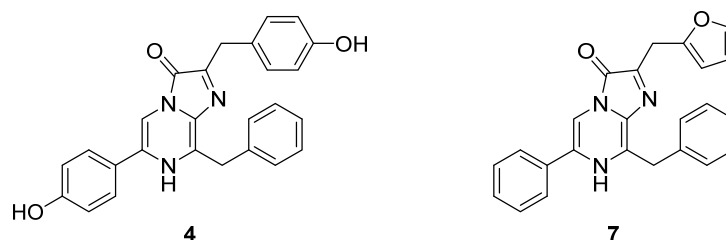


Figure 5 : structures du substrat naturel d'OLuc, la cœlentérazine (4), et du substrat artificiel furimazine (7)

Hall *et al.* ont ensuite criblé leur bibliothèque de mutants avec une dizaine de substrats potentiels, puis ont conservé les mutations augmentant la stabilité de l'enzyme tout en conservant un signal de bioluminescence intense, pour fournir le mutant C1A4E*, dix fois plus stable que C1A4E et possédant

une affinité particulière pour un substrat artificiel, la furimazine (7, Figure 5). Enfin, six nouvelles mutations ont été introduites afin de maximiser le signal lumineux obtenu avec la furimazine (7), pour aboutir finalement à la luciférase NLuc, possédant 16 mutations (presque 10 % de la séquence) par rapport à KAZ. Une certaine confusion concernant le nom de cette luciférase peut émerger : elle a ainsi été nommée par Hall *et al.* NanoLuc et abrégée en NLuc, NanoLuc® étant aujourd'hui une marque déposée de Promega Corporation. Par ailleurs, Inouye *et al.*¹⁰² ont publié en 2013 la séquence d'un gène codon-optimisé codant pour NanoLuc, qu'ils ont nommé *nanoKAZ* et dont la protéine exprimée est référencée comme nanoKAZ bien qu'identique à NanoLuc. Nous avons néanmoins choisi dans la suite de ce manuscrit d'utiliser le nom « nanoKAZ » pour cette enzyme afin d'éviter l'emploi d'une marque déposée, bien que cette appellation perde malheureusement la référence « Luc » propre aux luciférases.

Cette luciférase possède d'après Hall *et al.*⁹⁹ des caractéristiques extrêmement intéressantes, avec une bonne expression en cellules et sans agrégation, une bioluminescence avec la furimazine (7) extrêmement intense (30 fois plus que nanoKAZ/4 et 145 fois que RLuc/4) et prolongée dans le temps, une stabilité sur une vaste gamme de pH (6–9) et de température (4–55 °C), ainsi qu'en présence de quantités importantes d'urée ou d'ions chlorures.

Les intensités relatives de bioluminescence sensationnelles rapportées par Hall *et al.* en 2012 sont toutefois à considérer avec précaution : il a ainsi été décrit que le couple nanoKAZ/furimazine (7) émet un signal bioluminescent 2,5 millions de fois plus intense que KAZ/cœlentérazine (4) et que nanoKAZ/4 est déjà 80 000 fois plus intense que KAZ/4. Il est important de souligner que ces valeurs ont été obtenues à partir de lysats de cellules humaines (HEK293) exprimant nanoKAZ ou KAZ de manière transitoire et que ces valeurs relatives sont potentiellement « normalisées » par rapport à l'enzyme KAZ très peu ou très mal exprimée et potentiellement insoluble.⁹⁴ Ces valeurs traduisent donc la stabilité et/ou la solubilité accrue de nanoKAZ par rapport à la KAZ recombinante, ainsi que sa capacité à être exprimée sous forme soluble, sans pouvoir présumer *a priori* de différences d'activités spécifiques.

Ces dernières ont par la suite été déterminées par Inouye *et al.*¹⁰² sur les enzymes exprimées sous une forme soluble¹⁰³⁻¹⁰⁴ puis purifiées, montrant alors une activité spécifique « seulement » 100 fois plus importante pour nanoKAZ que pour KAZ avec la cœlentérazine. De même, ils rapportent dans leurs conditions (différentes de celles de Hall *et al.*) une intensité maximale de luminescence avec nanoKAZ 5 à 6 fois plus importante pour la furimazine (7) que pour la cœlentérazine (4), à comparer au facteur 30 évoqué ci-dessus.

(b) eKAZ

Les seize mutations de nanoKAZ ont été étudiées plus avant par Inouye *et al.*,¹⁰⁰ avec l'expression des seize « monovariants » de KAZ. Ils ont ainsi pu montrer que les mutations individuelles V44I, A54I et Y138I permettaient chacune une augmentation d'un facteur 6 à 9 de la luminescence en présence de cœlentérazine (4), mais aussi que ces mutations étaient en synergie dans le triple-mutant avec une luminescence près de 70 fois plus importante que KAZ/4. Cette augmentation est alors similaire à celle mesurée entre nanoKAZ/furimazine (7) et KAZ/4 dans leurs conditions. Le variant KAZ-V44I/A54I/Y138I a été nommé eKAZ par ses inventeurs et ses vecteurs d'expression sont commercialisés par JNC Corporation (jPhoton®).

À la différence de nanoKAZ, toutefois, l'adjonction d'un peptide signal de sécrétion GLsp provenant de la luciférase de *Gaussia princeps* ne permet pas la sécrétion efficace de ces mutants (eKAZ compris) dans des cellules de hamster (CHO-K1). De plus, ces mutants nécessitent l'utilisation d'un système de transfection particulier¹⁰³⁻¹⁰⁵ pour permettre leur expression sous une forme fonctionnelle.

Les nombreux travaux publiés depuis 2010 sur les luciférases dérivées d'OLuc montrent l'intérêt des chercheurs pour des luciférases de petite taille, stables et lumineuses, permettant leur utilisation dans des constructions de plus en plus complexes comme systèmes rapporteurs (voir la partie suivante). La concurrence sur ce sujet de deux sociétés, Promega Corporation (Hall *et al.*) et JNC Corporation (Inouye *et al.*), ayant chacune protégé par des brevets tout ou partie des travaux, ne rend toutefois pas toujours aisée la comparaison des données publiées dans la littérature, avec une mise en exergue ciblée des avantages de chaque système, quitte parfois à omettre les conditions fondamentalement différentes dans lesquelles les différentes études ont pu être menées.

Plus généralement, il est intéressant de mettre en perspective les très nombreux travaux ayant découlé de l'identification d'une poignée de systèmes bioluminescents (et fluorescents) et le nombre gigantesque d'espèces bioluminescentes présentes dans la nature qui n'ont jamais été étudiée et qui pourraient mener à la découverte de systèmes originaux. Nous avons ainsi vu qu'un certain nombre de variants protéiques des luciférases ont pour but de changer la longueur d'onde de bioluminescence vers le rouge, quand il existe des animaux marins capables d'émettre directement dans le jaune et dont les luciférases (si tant est que ces systèmes soient basés sur des luciférases) n'ont pas été à ce jour identifiées.¹⁰⁶

II - LA LUMIÈRE COMME SYSTÈME RAPPORTEUR

Les techniques de génie génétique, et plus particulièrement les recombinaisons génétiques provoquées artificiellement, ont permis sur les cinquante dernières années des avancées technologiques majeures, avec par exemple la production d'insulines humaines par des bactéries *Escherichia coli* génétiquement modifiées ou la production de végétaux résistants à certains insectes ou champignons. Parallèlement à ces applications commerciales, le génie génétique a été (et est toujours) un outil extraordinaire pour les biologistes du monde entier, permettant l'étude facilitée de l'influence de l'ajout ou de la suppression d'un gène, la production par des organismes hôtes de protéines exogènes (c'est-à-dire ne faisant pas partie du protéome de l'hôte dans la nature) etc.

Toutefois, il a été nécessaire de développer dans le même temps des outils permettant de visualiser à notre échelle macroscopique des changements induits à l'échelle microscopique n'ayant pas forcément d'influence sur le phénotype de l'organisme étudié. Dans le cas d'une transfection dont l'efficacité est relativement faible, il est également nécessaire de pouvoir trier les organismes ayant intégré le nouveau matériel génétique de ceux dont la transfection a échoué. Pour cela, il est possible d'adjoindre à la séquence voulue un gène codant pour une protéine (souvent une enzyme) qui permettra de différencier les organismes ayant intégré le vecteur, appelé gène rapporteur. Le gène *lacZ*¹⁰⁷ d'*Escherichia coli* codant pour la β -galactosidase fait probablement partie des plus connus, en utilisant conjointement le substrat chromogénique X-gal (**8**) qui colore en bleu les cellules lorsqu'il est hydrolysé par l'enzyme (Schéma 4).[‡] D'autres systèmes rapporteurs peuvent également consister en l'introduction d'un gène de résistance à un antibiotique permettant la survie en présence de ce dernier des cellules transfectées avec succès.

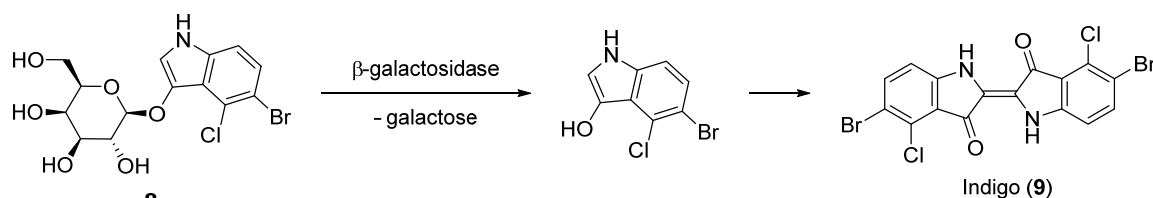


Schéma 4 : coupure de la liaison glycosidique de X-gal (**8**) par la β -galactosidase, menant à la formation d'indigo (**9**)

L'existence dans la nature de protéines fluorescentes et de systèmes bioluminescents a ainsi suscité l'intérêt des chercheurs, qui ont rapidement envisagé leur utilisation comme systèmes rapporteurs ne nécessitant pas dans le premier cas l'adjonction de substrats ou cofacteurs supplémentaires, mais permettant également la surveillance « en direct » de la production ou de la localisation de protéines d'intérêt, voire même leurs interactions.

[‡] Les travaux sur l'opéron lactose dont *lacZ* est l'un des trois constituants vaudront d'ailleurs à trois chercheurs de l'Institut Pasteur, François Jacob, André Lwoff et Jacques Monod le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1965 « pour leurs découvertes concernant le contrôle génétique des synthèses enzymatiques et virales ».

II.A. Fluorescence

L'utilisation de la fluorescence comme système rapporteur est étroitement liée à la découverte des protéines fluorescentes vertes (*Green Fluorescent Protein*, *GFP*) par l'équipe d'Osamu Shimomura conjointement à l'étude de la bioluminescence d'*Aequorea*.⁴⁴ Après avoir observé que la lumière émise par la méduse (508 nm) ne correspondait pas à la longueur d'onde de la lumière émise par l'aéqurine (470 nm), ils ont pu prouver que l'aéqurine transmet *in vivo* l'énergie à la GFP de manière non radiative¹⁰⁸ (c'est-à-dire sans émission de photon), mécanisme qui est également à l'œuvre avec le coelentéré *Obelia* et le cnidaire *Renilla reniformis* (pensée de mer).¹⁰⁹⁻¹¹⁰ Toutefois, l'intérêt majeur de cette protéine fluorescente est apparu de manière plus tardive, quand il a été démontré que la GFP recombinante (c'est-à-dire qui a été exprimé par un autre organisme) était toujours fluorescente et, par conséquent, que la formation de son chromophore par oxydations successives était spontanée à partir de la séquence protéique, sans nécessiter de modifications post-traductionnelles.¹¹¹⁻¹¹²

De nombreux mutants de la GFP ont par la suite été développés, avec le remplacement de certains acides aminés permettant l'ajustement des propriétés acido-basiques du chromophore ou des interactions de ce dernier, ce qui influence la longueur d'onde d'excitation ou la longueur d'onde de la fluorescence (aboutissant par exemple à l'YFP, *Yellow Fluorescent Protein*, ou la CFP, *Cyan Fluorescent Protein*). D'autres mutations ont pu être introduites afin d'accélérer la formation du chromophore après l'expression de la protéine ou encore pour stabiliser la GFP à plus haute température ou dans une gamme de pH plus étendue. Ces influences diverses ont été étudiées de près par Roger Tsien,¹¹³ coréceptiendaire avec Osamu Shimomura et Martin Chalfie du prix Nobel de chimie en 2008 « pour la découverte et le développement de la GFP ».

L'utilisation de la GFP comme système rapporteur du niveau d'expression de gènes (par exemple pour mesurer l'efficacité d'une transfection avec un plasmide) a été l'une des premières applications rapportées de la GFP,¹¹¹ mais a été plus décevante que prévu. En effet, la GFP nécessite l'utilisation de promoteurs d'expression très efficaces et n'est généralement pas assez exprimée pour pouvoir observer une fluorescence conséquente (chaque protéine produite ne possédant au mieux qu'un chromophore) significativement supérieure à l'auto fluorescence des cellules.¹¹⁴ Une fluorescence importante est cependant atteignable si la GFP est concentrée dans des sous-structures particulières de la cellule, ce qui en a fait un outil important pour la localisation de protéines : au lieu d'exprimer la GFP en parallèle d'une protéine d'intérêt pour vérifier son expression, ces deux protéines sont rassemblées en une chimère (protéine de fusion) conservant la fonction de la protéine d'intérêt mais qui sera détectable par fluorescence. Depuis sa caractérisation dans les années 90, la GFP a ainsi pu être utilisée dans des études de localisation dans les plantes,¹¹⁵ les bactéries,¹¹⁶ les champignons,¹¹⁷ et même *in vivo*¹¹⁸ ; ou encore pour l'étude de voies de communication¹¹⁹ ou l'étude des récepteurs cellulaires.¹²⁰

L'une des plus importantes limitations de la GFP, cependant, est commune à la majorité des techniques utilisant des sondes fluorescentes : le photoblanchiment (*photobleaching*). Les chromophores fluorescents peuvent se désexciter non pas en émettant un photon (comportement attendu) mais en réagissant avec l'oxygène de l'air ou des résidus environnants, perdant alors leur caractère fluorescent. Si cela a peu d'influence dans un organisme où la GFP est exprimée en permanence, cela empêche son utilisation lorsque le *pool* de marqueurs est en quantité limitée et sera désactivé très rapidement. De même, l'utilisation prolongée de sources lumineuses pour exciter le chromophore est susceptible de

généraliser dans les organismes des radicaux pouvant être délétères.¹²¹ La nécessité d'éclairer les rapporteurs fluorescents pour obtenir une réponse nécessite également l'utilisation de matériel coûteux permettant une excitation monochromatique (laser) mais aussi la lecture du signal fluorescent à des longueurs d'ondes précises (monochromateur ou filtres), ce qui est susceptible d'être un frein dans certaines études. Enfin, la formation du chromophore au sein de la GFP ne nécessite certes pas l'intervention d'autres protéines, mais n'est néanmoins pas immédiate et nécessite un temps de maturation variable selon les mutants ; ceci peut également freiner l'adoption de ces systèmes si les phénomènes à observer sont susceptibles d'advenir peu de temps après l'expression.

II.B. Bioluminescence

Au contraire des systèmes rapporteurs basés sur la fluorescence où l'énergie nécessaire à l'émission de lumière est apportée par une source extérieure, les systèmes bioluminescents génèrent l'énergie grâce à l'oxydation par la luciférase de son substrat, la luciférine. Cette faculté est à la fois l'avantage et l'inconvénient des systèmes rapporteurs bioluminescents : les luciférases ne sont pas sujettes au photoblanchiment et peuvent être employées dans des situations où la phototoxicité due à l'illumination répétée d'un échantillon est importante, mais elles nécessitent l'ajout au milieu réactionnel de leur substrat et d'éventuels cofacteurs. Les systèmes bioluminescents d'origine marine, et plus particulièrement ceux utilisant la coelentérazine (4) ou des analogues — tels GLuc, RLuc ou nanoKAZ —, peuvent être plus intéressants que la luciférase de luciole FLuc car ils ne nécessitent pas l'adjonction d'ATP en plus du substrat.

II.B.1. Caractéristiques du signal bioluminescent

Comme nous avons déjà pu l'évoquer brièvement dans notre description des luciférases marines (Partie I : I.D), plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de la conception de tests se basant sur la bioluminescence.

Un des paramètres évidents est le spectre d'émission du système considéré et plus particulièrement sa longueur d'onde maximale d'émission λ_{max} . Ce paramètre va déterminer d'une part le matériel à utiliser pour la détection du signal (capteurs à utiliser, besoin ou non d'utiliser des filtres) mais également le domaine d'application : il sera ainsi presque impossible de détecter *in vivo* chez les mammifères les lumières bleues, qui sont absorbées par l'hémoglobine ; il pourra cependant être possible d'observer la portion des longueurs d'ondes plus longues du spectre d'émission si celui est suffisamment large et l'intensité lumineuse assez élevée.

Un second paramètre est la durée de vie de la luciférase considérée, qui peut varier considérablement selon l'espèce ou les conditions des tests (pH, température, tampons etc.). Ainsi, l'étude d'événements transitoires nécessitera une durée de vie pas trop importante afin de ne pas saturer le milieu de luciférase, empêchant un suivi cinétique précis, quand une utilisation *in vitro* dans des criblages à haut-débit (HTS, *high-throughput screening*) nécessitera un signal le plus stable possible dans le temps. De même, l'intensité lumineuse du système bioluminescent est cruciale, pouvant faire la différence entre l'utilisation pour l'observation de photomultiplicateurs extrêmement coûteux ou d'un simple microscope couplé à une caméra vidéo.

Les variations importantes observées selon les luciférases ont amené à la classification (parfois abusive) des systèmes bioluminescents en deux catégories *flash* et *glow*, les premières émettant une lumière intense mais s'atténuant rapidement (quelques secondes à quelques minutes), les secondes pouvant émettre un signal lumineux quasi-constant durant des périodes prolongées (quelques dizaines de minutes). Il est à noter que ces comportements dépendent de l'enzyme mais également de son substrat, des améliorations des systèmes bioluminescents pouvant par conséquent provenir de l'un comme de l'autre.

II.B.2. Utilisations

Les systèmes bioluminescents peuvent être utilisés à la détection de divers analytes avec une grande sensibilité. Ainsi, la photoprotéine calcium-dépendante aéquorine a été employée¹²²⁻¹²³ pour la mesure de la concentration en ions Ca^{2+} et la luciférase de luciole FLuc, ATP-dépendante, est couramment utilisée pour la détection et la quantification des micro-organismes dans l'industrie alimentaire,¹²⁴ via la détection de l'ATP qu'ils contiennent. En couplant l'utilisation de luciférase de luciole à des techniques d'amplification de l'adénosine triphosphate, Satoh *et al.* ont ainsi pu détecter des concentrations attomolaires d'ATP.¹²⁵

La possibilité d'effectuer des protéines de fusion avec une luciférase a permis l'observation non-invasive de processus biologiques *in cellulo* comme *in vivo*. Ainsi, il a été par exemple possible de suivre l'évolution de cellules T dans un organisme,¹²⁶ d'observer l'efficacité d'antibiotiques sur une infection par *S. aureus* chez le rat¹²⁷ ou même de suivre en temps réel l'infection de furets par le virus de la grippe.¹²⁸

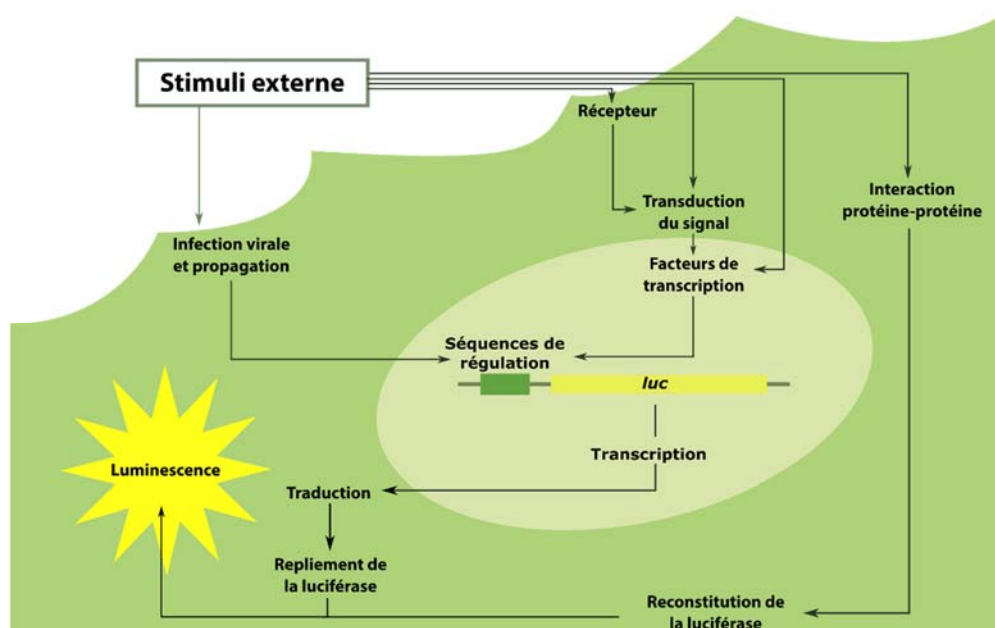


Figure 6 : étude de la physiologie des cellules grâce à un gène rapporteur bioluminescent (adapté de Wood, 1998)¹²⁹

La bioluminescence a également permis l'étude de nombreux mécanismes cellulaires, en conditionnant l'expression de la luciférase à une grande diversité de stimuli différents (par exemple, l'infection de l'organisme par un virus ou l'activation de récepteurs particuliers) (Figure 6).¹²⁹ De même, il est possible comme avec la fluorescence d'évaluer l'efficacité de la transfection d'un organisme par quantification de sa bioluminescence.

Les criblages à haut-débit ont également profité de l'essor de la bioluminescence.^{33, 130} Par exemple, des virus ont été génétiquement modifiés pour faire exprimer une luciférase par l'hôte infecté, la quantification de la lumière après lyse des hôtes étant en relation directe avec le nombre d'organismes infectés ; cela permet de tester de manière simple l'efficacité de molécules comme antiviraux.¹³¹

De même, l'étude à grande échelle des interactions protéine-protéine a beaucoup profité de l'introduction de luciférases « coupées » (*split luciferase*) : la séquence de la luciférase est séparée en deux parties et exprimée à l'extrémité d'un grand nombre de protéines différentes ; seules les protéines interagissant entre elles permettant la reconstitution de l'activité luciférase et l'émission subséquente de lumière (Figure 7).¹³²⁻¹³⁵

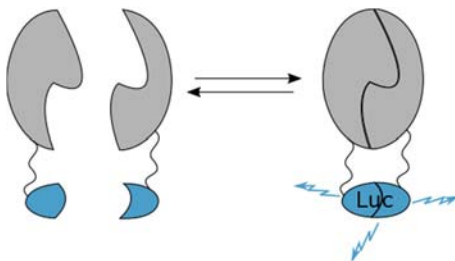


Figure 7 : reconstitution d'une activité luciférase par interaction protéine-protéine

Enfin, le mécanisme de fluorescence induite par la « bioluminescence » qui peut être observée dans la nature avec les systèmes luciférase-GFP (chez *Renilla* ou *Aequorea*, par exemple) a été reproduit et utilisé dans bien des constructions biochimiques,¹³⁶⁻¹⁴⁰ sous le nom de systèmes BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) : une luciférase peut transmettre l'énergie de son chromophore excité (théoriquement de manière non radiative) à un fluorochrome s'il est à proximité immédiate (moins de 10 nanomètres). Ce système peut ici encore être utilisé pour l'étude d'interactions protéine-protéine (Figure 8).¹⁴¹⁻¹⁴²

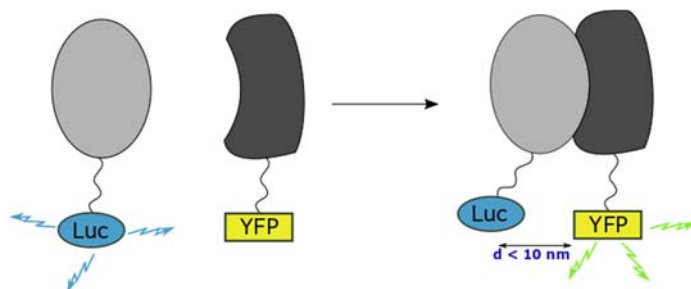


Figure 8 : détection d'une interaction protéine-protéine par BRET

Cette stratégie est particulièrement adaptée pour une utilisation chez les mammifères de luciférases marines, qui émettent pour leur grande majorité une lumière bleue incompatible avec la présence d'hémoglobine. L'adjonction à la luciférase d'un fluorochrome (qui peut être protéique ou non) permet d'effectuer un décalage de longueur d'onde important. Cette stratégie a récemment été appliquée avec succès avec la luciférase nanoKAZ (NanoLuc®) et de nombreux fluorochromes, permettant le déplacement « à l'envie » de la longueur d'onde observée.¹⁴³

Bien d'autres constructions ont été développées par les biochimistes et biologistes afin d'étudier *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* le vivant et il est difficile de résumer ici l'entendue des possibles.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Il est certain toutefois que les systèmes rapporteurs ont par le passé permis une avancée sans précédent de la biologie à l'échelle moléculaire et il est probable que la généralisation de techniques aussi simples que la bioluminescence combinée aux améliorations apportées par les chercheurs à ces systèmes permettra de nombreuses nouvelles découvertes.

III - IMIDAZO[1,2-a]PYRAZIN-3(7H)-ONES : SYNTHÈSES ET RÉACTIVITÉS

III.A. Généralités

Les luciférase d'origine marines sauvages (GLuc, RLuc, OLuc) ou mutées (nanoKAZ, eKAZ, RLuc8.6-535) utilisent toutes des substrats possédant un noyau imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one diversement substitué. Le substrat naturel commun à *Gaussia*, *Renilla* et *Oplophorus* est la coérentérazine (4), présentant deux radicaux hydroxyles sur les groupes en position 2 et 6 (Figure 9). D'autres luciférase que nous n'avons pas détaillées dans cette introduction utilisent également des luciférines comportant ce noyau imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one. Par exemple, la luciférine de *Vargula* (autrefois *Cypridina*), la varguline (5), affiche des substituants radicalement différents de la coérentérazine (4), avec un indole et une guanidine.

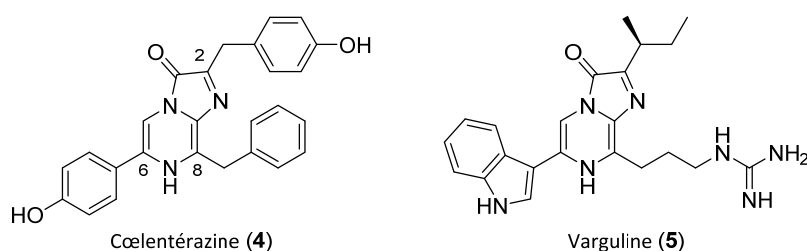


Figure 9 : substrats naturels de luciférase marines

III.A.1. Biosynthèse des imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones

Des études chez plusieurs espèces de *Vargula*¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ ont montré que la biosynthèse de la varguline (5) est effectuée à partir de trois acides aminés dont les radicaux sont facilement identifiables sur la structure du substrat : la L-arginine (guanidine), le L-tryptophane (indole) et la L-isoleucine (*sec*-butyle). Le mécanisme de formation de l'imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one est à ce jour toujours inconnu, mais provient vraisemblablement de la cyclisation du tripeptide Arg-Trp-Ile, suivie d'une décarboxylation ou de l'assemblage non ribosomal d'acides aminés libres. De même, il a été montré que la coérentérazine (4) est synthétisée chez *Metridia pacifica* à partir de L-phénylalanine et de deux L-tyrosines, mais toujours sans que le mécanisme exact ne soit connu.¹⁵¹

De manière assez étonnante, il a été prouvé très tardivement que la méduse luminescente *Aequorea victoria* n'était pas capable de produire la coérentérazine[‡] et devait l'acquérir dans son alimentation.¹⁵² Des travaux plus récents montrent qu'un certain nombre de cténophores[‡] (qui sont des proies des cnidaires) possèdent des gènes encodant pour des oxydases à fer non héminique se terminant par les trois résidus Phe-Tyr-Tyr potentiellement nécessaires à la synthèse de coérentérazine ; de plus, cette catégorie d'enzyme est similaire à d'autres (telle l'isopénicilline N synthase) capables de générer des hétérocycles complexes à partir de peptides.¹⁵³ Il est encore trop tôt pour dire avec certitude si tous les organismes bioluminescents d'origine marine produisant la coérentérazine (4) partagent cette enzyme

[‡] Les espèces du genre *Aequorea* sont membres de l'embranchement des cnidaires (Cnidaria). Une ancienne classification regroupait dans les coelentérés (Coelentera) les cnidaires mais aussi les cténophores (Ctenophora) voisins. La découverte d'un substrat bioluminescent commun chez *Aequorea* et *Renilla* mènera à son appellation « coérentérazine », appellation qui pourrait s'avérer trompeuse si l'impossibilité des cnidaires à la produire venait à être généralisée.

ou si tous les cnidaires obtiennent leur coelentérazine de la consommation de cténophores, mais la détermination de la biosynthèse de ces substrats et le clonage des enzymes correspondantes seraient une avancée majeure dans le développement de systèmes rapporteurs bioluminescents ne nécessitant pas l'adjonction de substrat synthétisé par d'autres moyens.

III.A.2. Substrats artificiels

L'utilisation de la bioluminescence comme système rapporteur a stimulé d'une part le développement de luciférase mutantes possédant des propriétés de bioluminescence variées (plus intenses, plus stables, avec une longueur d'onde décalée vers le rouge...), mais aussi l'étude de l'influence du substrat utilisé sur le signal émis.

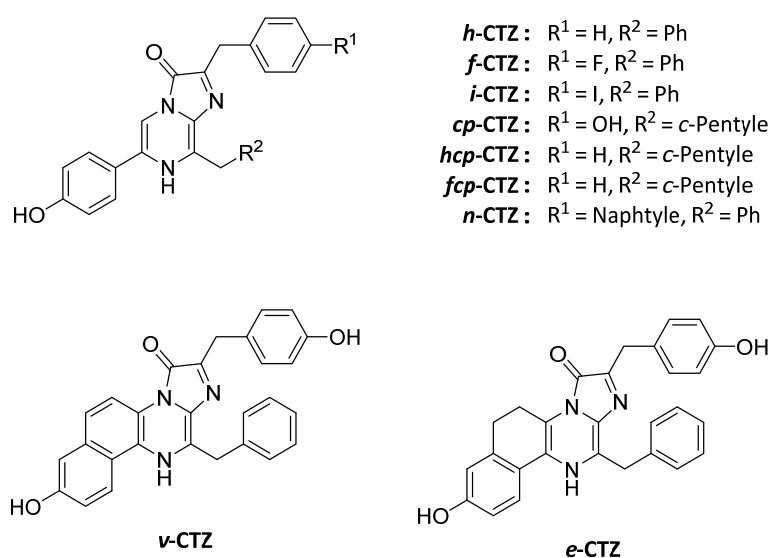


Figure 10 : sélection de substrats artificiels de luciférase marines développés par Shimomura et Inouye

Les premiers analogues synthétiques ont été développés par Shimomura *et al.*, originalement dans le laboratoire du Dr Johnson à Princeton University, pour l'étude de la luminescence de la photoprotéine aéquorine et l'influence du substrat sur la sensibilité de celle-ci à la présence d'ions calcium.¹⁵⁴ Parmi eux, la *e*-coelentérazine (**e-CTZ**) et la *v*-coelentérazine (**v-CTZ**) possèdent un pont entre la position 5 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one et le noyau en position 6 qui rigidifie la structure de ces substrats, augmentant la vitesse de réaction lors de l'ajout de calcium pour l'aéquorine,¹⁵⁴ mais modifiant également leur chimioluminescence comme rapporté par un autre groupe.¹⁵⁵ La plupart de ces substrats (Figure 10) ont été par la suite testés en combinaison avec RLuc, OLuc ou l'aéquorine, sans montrer toutefois d'avantage évident par rapport au substrat naturel.⁹⁵

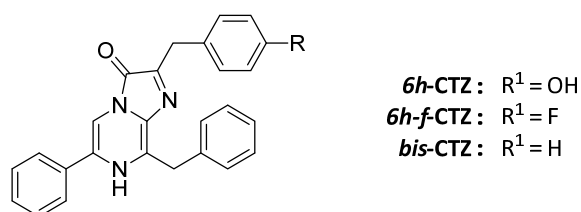


Figure 11 : sélection de substrats artificiels présentant un phényle en position 6

Un autre substrat dérivé de coelentérazine, la bisdésoxycoelentérazine (**bis-CTZ**, commercialisé également sous le nom DeepBlueC ou 400a), a été synthétisé dans le groupe concurrent du Dr Cormier

à l'université de Géorgie, travaillant majoritairement sur la luminescence de *Renilla*.^{41, 156} Si ce substrat était moins intéressant sur *Renilla* que la coérentérazine, son utilisation a été décuplée avec l'arrivée des tests BRET², la longueur d'onde légèrement plus courte (400 nm) émise par ce substrat avec RLuc n'interférant pas avec l'émission de la GFP et permettant une déconvolution aisée des signaux dus à la luminescence ou à la fluorescence.¹³⁶⁻¹³⁷ Les luminescences de la **bis-CTZ** et de la **6h-f-CTZ** ont également été étudiées par Inouye *et al.* sur nanoKAZ et rapportées comme *glow*, ce sur quoi nous reviendrons dans la troisième partie de ce manuscrit.¹⁰²

Le nombre de substrats artificiels est resté assez limité jusqu'il y a peu, de par la difficulté d'accès à ces composés. L'utilisation accrue des systèmes rapporteurs bioluminescents a toutefois entraîné depuis le début de la décennie une augmentation nette du nombre d'analogues de coérentérazine (Figure 12).

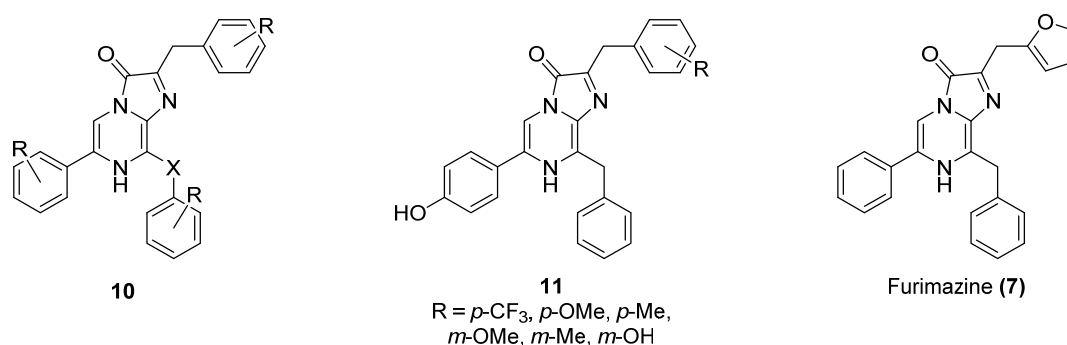


Figure 12 : sélection d'analogues de coérentérazine publiés depuis 2010

Ainsi, Giuliani *et al.* ont divulgué en 2011 et 2012¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ des composés **10** présentant un soufre à la place du pont méthylène en position 8 afin de provoquer un décalage vers le rouge de la longueur d'onde d'émission, idée reprise depuis par deux autres groupes avec l'oxygène¹⁵⁹ ou le sélénium.¹⁶⁰ Des chercheurs de l'institut de technologie de Tokyo associés à JNC Corporation ont pour leur part développé à partir de 2012 des substrats **11** conservant en position 6 un groupe *para*-hydroxyphényle, mais étant modifiés en position 2.¹⁶¹⁻¹⁶² Parallèlement, les chercheurs de Promega Corporation ont synthétisé la furimazine (**7**), qui faisait partie du panel d'analogues testés comme substrats des mutants de KAZ lors du développement de nanoKAZ/NanoLuc.^{99, 163-164} Ce substrat est plus stable dans les tampons de tests que la coérentérazine ou les analogues hydroxylés et montre avec nanoKAZ une luminescence trente fois supérieure à celle de la coérentérazine. Plus récemment, en 2016 et 2017, Promega Corporation a publié de nouvelles voies de synthèse, que nous exposerons ci-après, permettant un accès à près d'une centaine de nouvelles molécules originales, dans l'espoir d'améliorer la solubilité du substrat, l'intensité de luminescence ou la longueur d'onde d'émission.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸

Malgré les nombreuses imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones synthétisées (et publiées) à ce jour, seule une petite portion est à notre connaissance réellement utilisée par les biologistes, soit car elles ne sont pas commercialement disponibles, soit car elles sont extrêmement coûteuses ou tout simplement peu intéressantes. Ainsi, GLuc est utilisée exclusivement avec la coérentérazine (**4**) car elle n'accepte presque aucun analogue comme substrat,⁸³ RLuc avec la coérentérazine (**4**) ou la *bis*-coérentérazine (**bis-CTZ**) dans ses applications BRET² et nanoKAZ avec la furimazine (**7**).

III.B. Mécanisme de luminescence des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones

Le mécanisme de bioluminescence des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones a été séparément établi à la fin des années 1970 par les groupes de Cormier, travaillant sur *Renilla reniformis*,¹⁶⁹ et Johnson, travaillant sur les aéquorines.^{47-48, 93}

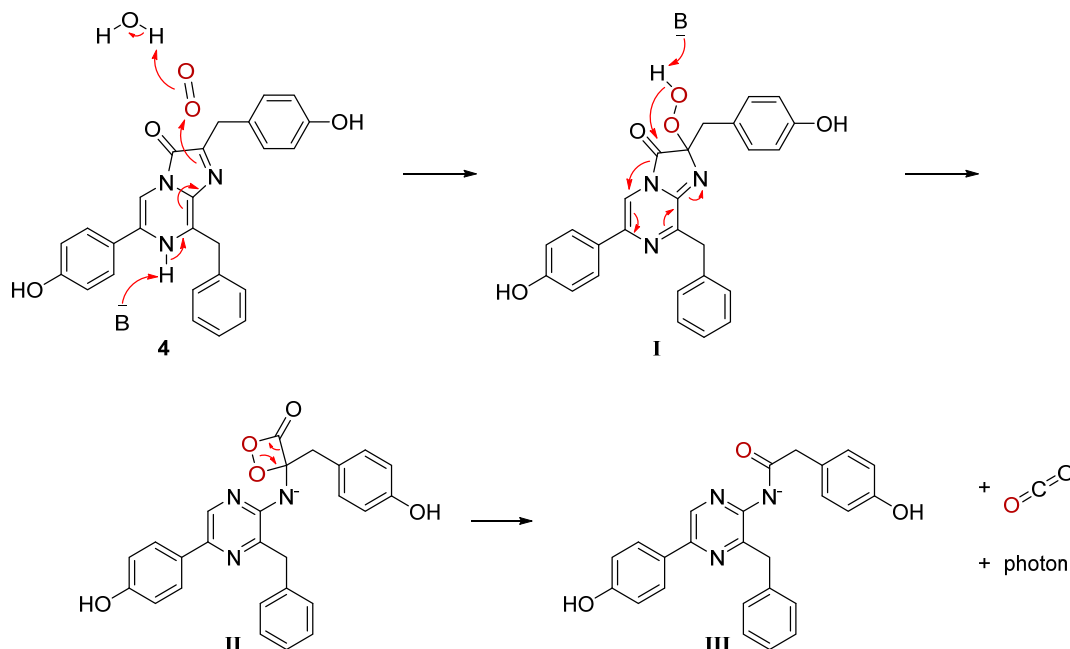


Schéma 5 : mécanisme de bioluminescence des enzymes utilisant la coéluentérazine (4)

Nous avons représenté ce mécanisme dans le cas de la coéluentérazine et d'une luciférase dans le Schéma 5. Après être entrée dans le site actif de la luciférase, une cascade électronique permet l'attaque d'une molécule de dioxygène et la formation subséquente d'un peroxyde **I** (nous avons représenté en rouge les atomes du dioxygène afin de suivre le cheminement de ceux-ci, comme cela avait été réalisé dans les expériences originales à l'aide de $^{17}\text{O}_2$). Une nouvelle cascade électronique permet le réarrangement du peroxyde **I** en un endoperoxyde « dioxétanone » **II**, puis ce dernier peut éliminer une molécule de dioxyde de carbone pour former l'anion coéluentéramide excité **III**, qui peut finalement se désexciter. Cette désexcitation peut se produire de manière radiative (en émettant un photon), par transfert d'énergie non-radiatif¹⁵⁶ (par exemple en transmettant son énergie à une protéine fluorescente verte) ou par d'autres moyens. L'efficacité de la bioluminescence d'un couple luciférine/luciférase est déterminée notamment par son rendement quantique,¹⁷⁰⁻¹⁷² correspondant à la probabilité que la désexcitation se fasse par émission de photon plutôt que d'une autre manière. Il est toutefois à noter qu'à notre connaissance l'ensemble des rendements quantiques publiés dans la littérature sont établis par comparaisons aux mesures originales effectuées en 1962 par Shimomura et Johnson¹⁷⁰ et mériteraient peut-être d'être réexplorés, raison pour laquelle ils n'ont pas été mentionnés dans ce manuscrit.

Le mécanisme de bioluminescence décrit ci-dessus est désormais communément admis, grâce notamment à l'observation de la formation de dioxyde de carbone contenant en moyenne un atome de ^{17}O . Par ailleurs, le peroxyde **I** a été observé à plusieurs reprises en cristallographie par diffraction des rayons X dans le cas des photoprotéines, où la transformation du peroxyde en endoperoxyde ne peut s'effectuer qu'en présence de calcium.^{49-50, 55, 173}

Des questions subsistent néanmoins sur la nature de l'émetteur, qui a pu être identifié selon les cas comme l'anion coéltéramide excité **III**¹⁷⁴ (dont la durée de vie doit être très courte) ou son homologue reprotoné **12**, ou encore, dans le cas de la coéltérazine, comme l'anion phénolate **IV**¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ ou encore l'anion pyrazine **V** (Schéma 6).^{174, 178}

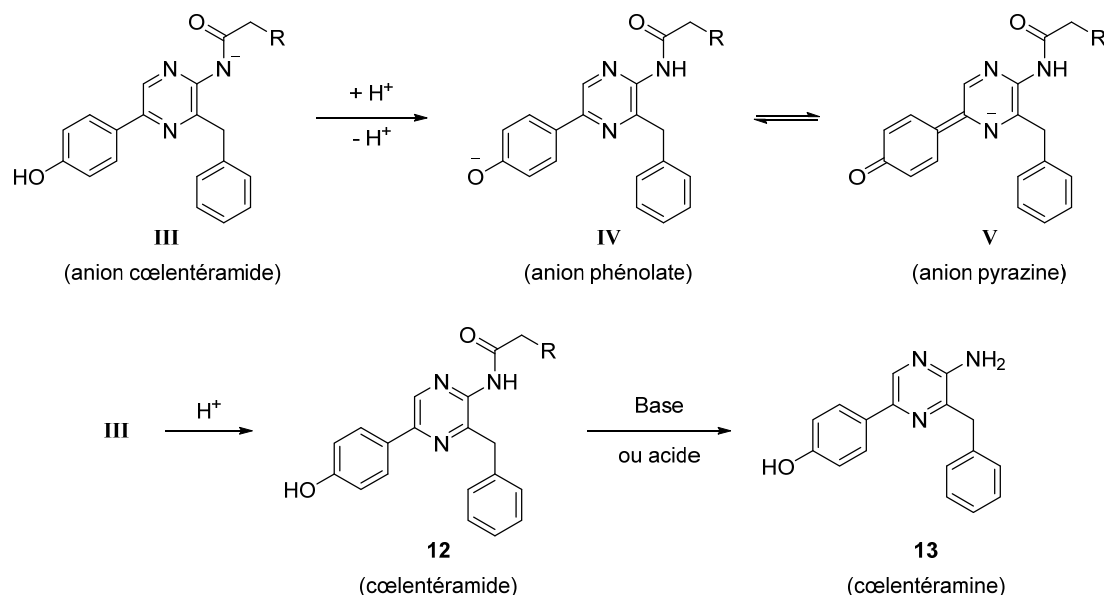


Schéma 6 : émetteurs potentiels et sous-produits des réactions de bioluminescence
(R = *p*-hydroxyphényle pour la coéltérazine (**4**))

Une grande partie des travaux sur ce sujet a consisté à synthétiser puis évaluer les spectres de fluorescence des intermédiaires potentiels, qui « se doivent » d'être comparables au spectre de luminescence du système luciférine/luciférase étudié. Toutefois, il a été prouvé par ailleurs que les conditions dans lesquelles ces mesures sont effectuées (principalement les propriétés électroniques du solvant ou le pH) ont une influence considérable sur le résultat,^{174, 179} et il reste encore aujourd'hui difficile de prévoir ou mesurer les caractéristiques réelles de la poche enzymatique dans laquelle a lieu la réaction. Les techniques évoluant, de nouveaux horizons s'ouvrent avec la modélisation du comportement énergétique des dioxétanones qui pourra peut-être un jour déterminer l'émetteur naturel véritable.¹⁸⁰⁻¹⁸⁴

III.C. Réactivité et autoluminescence

La capacité des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones à émettre de la lumière sans avoir recours à une enzyme a été décrite très tôt par Johnson *et al.* dans le diméthylsulfoxyde pur (DMSO)¹⁸⁵, puis par Goto dans le diglyme¹⁸⁶⁻¹⁸⁷ (di(2-méthoxyéthyl)éther) et McCapra dans le diméthylsulfoxyde avec l'adjonction d'une base.¹⁸⁸ La chimioluminescence a longtemps été la technique privilégiée pour la détermination de la structure des substrats, en comparant les spectres des luciférines traitées en milieu basique avec ceux d'analogues synthétisés.^{178, 189} Le mécanisme de chimioluminescence des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones en milieu basique est supposé être très proche du mécanisme de bioluminescence, même si la nature de l'émetteur lumineux et que le mécanisme exact de son excitation est toujours sujet à controverses.^{182, 190-193}

La luminescence non catalysée par une luciférase de ces composés, que nous appellerons « autoluminescence » (en opposition à une chimioluminescence volontairement provoquée par l'action d'un réactif),¹⁹⁴⁻¹⁹⁵ est un des inconvénients majeurs de ces molécules. En effet, les précautions à prendre pour la conservation de ces composés sont importantes : sous forme solide (généralement lyophilisées), elles doivent être stockées sous argon à -20 °C ou à -80 °C à l'abri de la lumière, et les solutions doivent être gelées après avoir été dégazées, si possible en présence d'un antioxydant ou de petites quantités d'acide chlorhydrique.* Ces conditions restreintes de conservation est d'ailleurs probablement à l'origine du coût extrêmement élevé de ces substrats et un frein à leur utilisation à (très) grande échelle.

Par ailleurs, ce signal d'autoluminescence (bruit de fond, non spécifique) est important à prendre en compte lors de l'élaboration d'un test biochimique utilisant un système luciférine/luciférase. Il a ainsi été montré que le sérum de veau fœtal entraîne une augmentation significative du bruit de fond,¹⁹⁶ ce qui pourrait s'expliquer par la présence importante d'albumine qui a montré par ailleurs des capacités de catalyse de l'oxydation de la coérentérazine.¹⁹⁷ Nous avons également montré au laboratoire que le pH de la solution tampon avait une influence considérable sur le bruit de fond mesuré, avec une augmentation d'un facteur 50 entre pH 6 et 8,5. Toutes ces données doivent donc être prises en considération afin de pouvoir élaborer des tests significatifs.^{130, 196, 198}

* Précautions préconisées par le fournisseur de coérentérazine (et d'analogues) NanoLight™ Technology.

III.D. Synthèses d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones

La synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones a été initialement étudiée afin de confirmer la structure des luciférines découvertes, ainsi que pour déterminer les émetteurs de bio- ou chimioluminescences. Par la suite, l'utilisation de plus en plus commune des luciférase d'origine marine ou de mutants assimilés comme systèmes rapporteurs a stimulé la recherche de nouvelles voies d'accès permettant la synthèse de nouveaux analogues de luciférines, potentiels substrats de ces enzymes bioluminescentes, possédant de meilleures propriétés (intensité, longueur d'onde d'émission, solubilité, capacité de pénétration dans les organismes...) que les substrats naturels.

C'est dans cette optique d'amélioration des propriétés des systèmes rapporteurs bioluminescents par la découverte de nouveaux substrats que ce projet de thèse a été mené, ce qui nécessitait la maîtrise au laboratoire de leur synthèse. Nous avons publié en 2015 une revue des voies d'accès aux imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones,¹⁹⁹ jointe en Annexe I de ce manuscrit. Nous détaillerons ci-après les stratégies les plus utilisées, ainsi que les voies d'accès originales publiées après l'écriture de cette revue.

III.D.1. Synthèses par cyclisation d'un pseudo-polypeptide

McCapra *et al.* ont étudié dans les années 1970 la possibilité de synthétiser des analogues de luciférines de manière « biomimétique » à partir de pseudo-tripeptides,^{189, 200} en se basant sur les hypothèses initiales de formation de la varguline (**5**) à partir d'un tripeptide Arg-Trp-Ile (cf. Partie I : III.A.1).⁴⁰

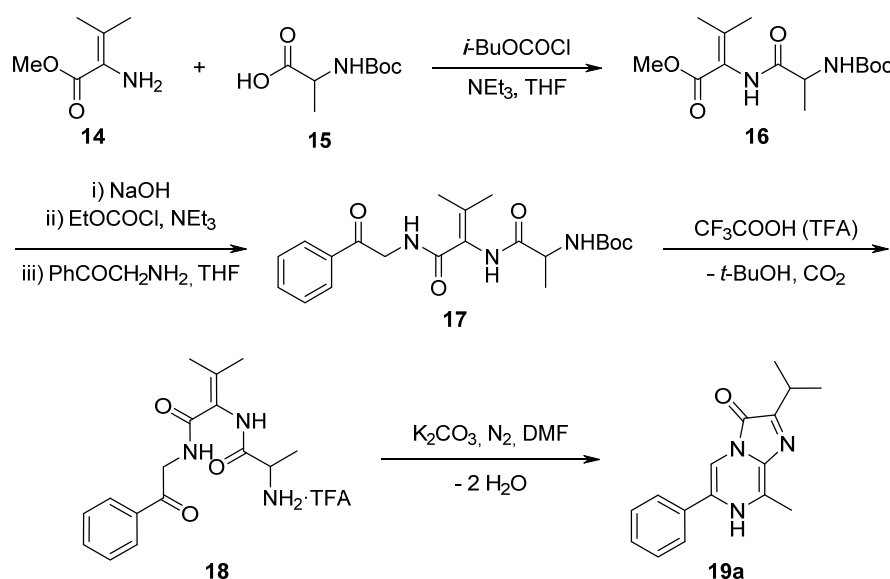


Schéma 7 : synthèse d'un analogue de luciférines par formation et cyclisation d'un pseudo-tripeptide

Le couplage peptidique de l'ester méthylique de déshydrovaline (**14**) avec la *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)alanine (**15**, Boc-Ala-OH) permet dans un premier temps l'obtention du pseudo-dipeptide **16** (Schéma 7). L'hydrolyse de l'ester méthylique est suivie d'un nouveau couplage peptidique avec l' ω -aminoacétophénone, puis de la déprotection du tripeptide **17** par élimination du *tert*-butoxycarbonyl pour fournir le trifluoroacétate du pseudo-tripeptide **18**. Enfin, la cyclisation sous atmosphère inerte en milieu basique (à 135 °C) permet, après acidification et purification sur alumine l'obtention de l'analogue **19a** avec un rendement de 15 %.²⁰⁰ McCapra et Manning ont par la suite utilisé cette méthode pour synthétiser de nouveaux analogues dans le but de déterminer le cofacteur de la photoprotéine aéquorine (la cœlentérazine).¹⁸⁹

Cette voie de synthèse a été réexplorée plus récemment dans le cadre de recherches où l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one joue le rôle d'antioxydant,²⁰¹ mais a été considérée par les auteurs comme décevante, la dernière étape de cyclisation ne permettant pas d'obtenir les analogues souhaités avec de bons rendements. La publication ne mentionne cependant aucune indication quant à la réalisation de cette étape sous atmosphère inerte ; ceci pouvant le cas échéant expliquer sans mal de mauvais rendements, avec une chimioluminescence de ces molécules très importante en milieu basique en présence de dioxygène.

III.D.2. Synthèses par amination d'une halogénoypyrazine

McCapra et Chang ont effectué dès 1967¹⁸⁸ la synthèse d'un composé modèle **19b** pour étudier la chimioluminescence de la varguline (**5**). Cette synthèse a malheureusement été rapportée dans une communication avec un minimum d'information.

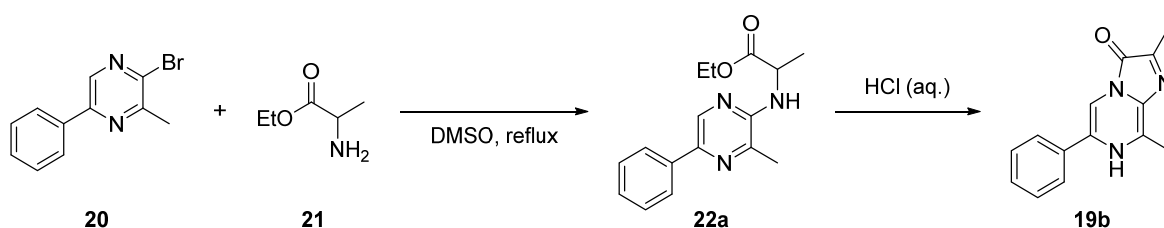


Schéma 8 : N-arylation thermique de l'alaninate d'éthyle

L'étape clé de cette synthèse (Schéma 8) est l'amination thermique de la bromopyrazine **20** par l'alaninate d'éthyle (**21**) dans le diméthylsulfoxyde bouillant. La cyclisation de **22a** en **19b** est ensuite effectuée dans l'acide chlorhydrique concentré chaud, sans toutefois que les auteurs ne précisent de rendement.

III.D.3. Synthèses par condensation sur une aminopyrazine

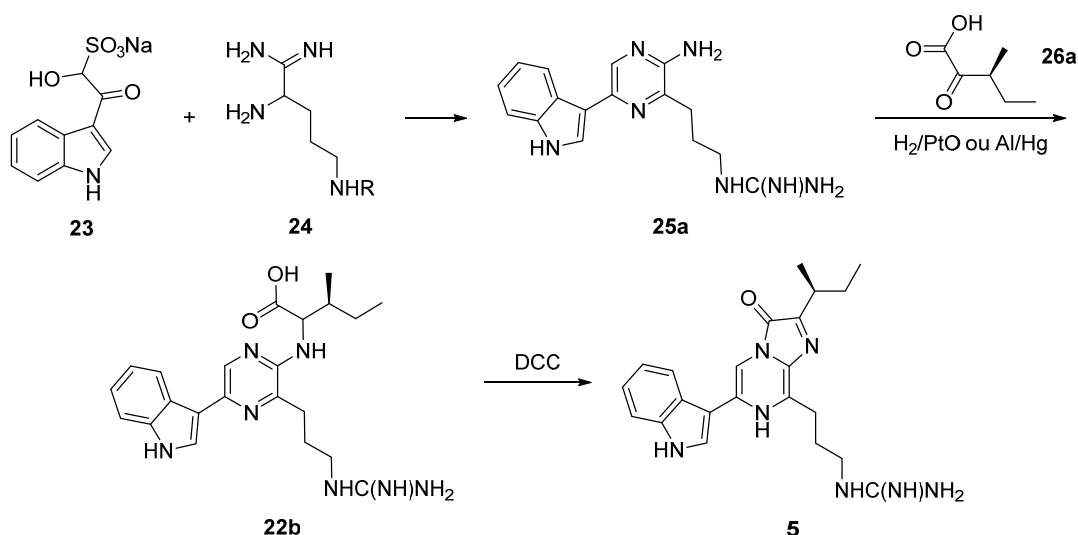


Schéma 9 : synthèse originale de varguline (**5**) par Kishi *et al.*

La plupart des autres synthèses d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones reposent sur l'approche utilisée pour la synthèse originale de varguline (**5**) par Kishi *et al.*²⁰²⁻²⁰³ à la fin des années 60 (Schéma 9). Le noyau pyrazine est formé par la condensation entre un dérivé d'α-cétoaldéhyde **23** et une α-aminoguanidine **24** convenablement protégée, dont les synthèses sont loin d'être triviales, pour

former l'étioluciférine (**25a**) en trois étapes. La condensation de l' α -cétoacide **26a** suivie d'une réduction de la base de Schiff permet l'obtention de l'intermédiaire **22b** qui est activé à l'aide de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour permettre la cyclisation en varguline (**5**).

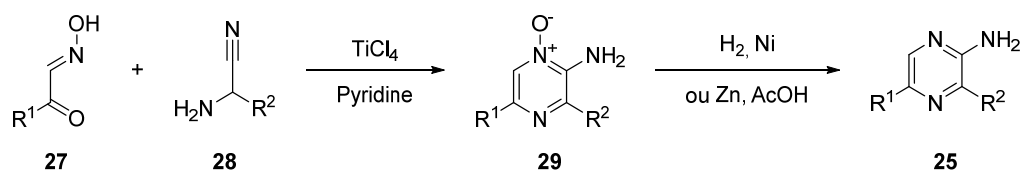


Schéma 10 : synthèse des 2-aminopyrazines **25** via la formation d'un pyrazine *N*-oxyde **29**

Cet enchainement d'étape a par la suite été raffiné, en formant l'aminopyrazine d'intérêt **25** par condensation d'un α -cétoaldoxime **27** sur l' α -aminonitrile **28** au moyen de tétrachlorure de titane dans la pyridine, permettant la synthèse de la 2-aminopyrazine *N*-oxyde **29**,²⁰⁴ qui est ensuite réduite à l'aide d'hydrogène (Schéma 10). Cette synthèse des 2-aminopyrazines **25** a été utilisée à de nombreuses reprises pour obtenir des intermédiaires vers de nouveaux analogues de cœlentérazine,^{99, 154-155, 164, 205} mais les voies d'accès aux α -aminonitriles **28** limitent *de facto* les substituants possibles en R^2 (une interrogation de la base de données Reaxys montre ainsi moins d'une centaine d' α -aminonitriles benzyliques ($R^2 = \text{CH}_2\text{-Ar}$ yle) synthétisés à ce jour, à comparer aux plus de 4 000 α -aminoacides recensés).

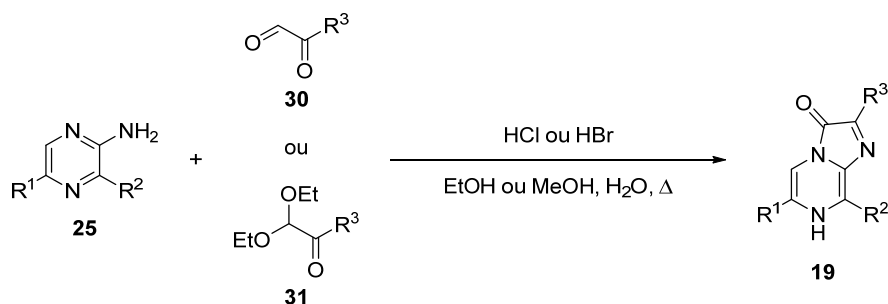
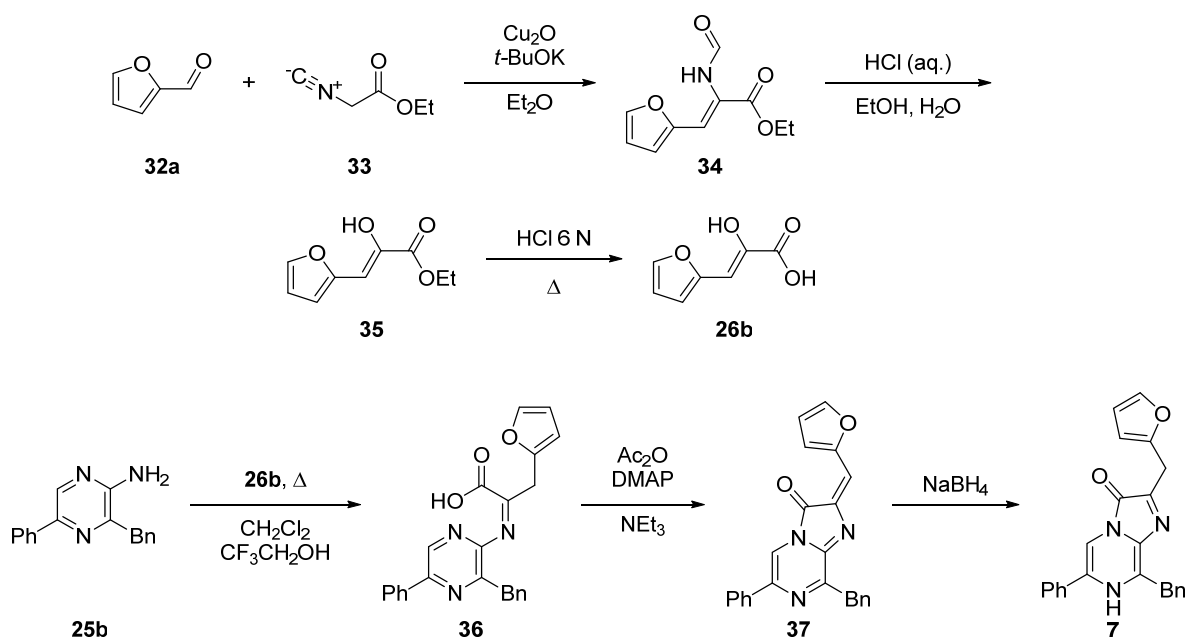


Schéma 11 : condensation des α -cétoaldéhydes **30** ou de leurs acétals **31** sur les 2-aminopyrazines **25**

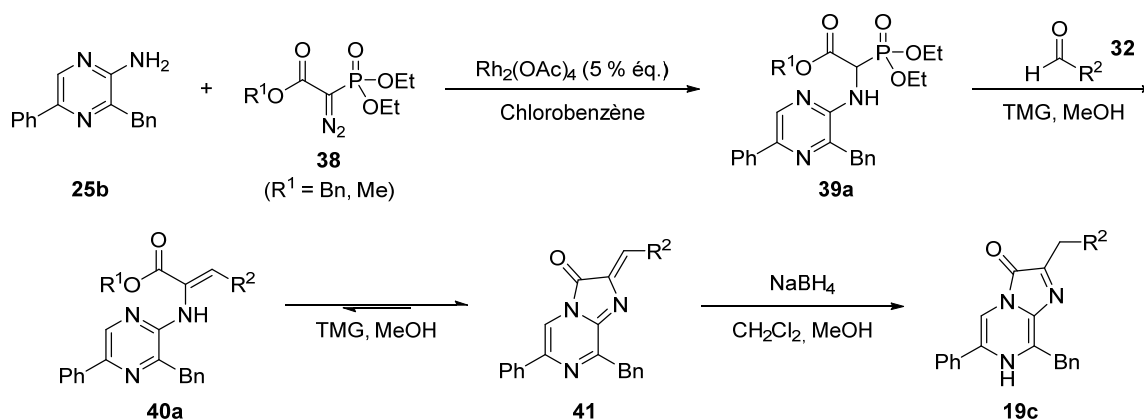
Une autre amélioration découle de la substitution des α -cétoacides par des α -cétoaldéhydes **30** ou des α -cétoacétaldéhydes **31** (Schéma 11), qui condensent en milieu acide chaud sur les 2-aminopyrazines **25** pour aboutir aux imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-ones **19**, ce qui a été appliqué aussi bien à des synthèses de cœlentérazine (**4**) que de varguline (**5**).²⁰⁶⁻²⁰⁹ Ici encore, cependant, les glyoxals et dérivés ne sont pas d'un accès facile et peuvent nécessiter de nombreuses étapes de synthèse, facteurs limitants pour l'exploration des substituants sur cette position.

Ainsi, une approche relativement complexe a été développée par Hall *et al.* (Promega) pour l'introduction du noyau furane dans la synthèse de la furimazine (Schéma 12).⁹⁹ Le 2-hydroxyacrylate **26b** est formé par la condensation du furfural (**32a**) sur le 2-isocyanoacétate d'éthyle (**33**), suivie d'une hydrolyse acide, puis est condensé thermiquement sur la 2-aminopyrazine **25b**. L'iminoacide **36** est ensuite activé via la formation d'un anhydride mixte et cyclisé en **37**, réduit au moyen de tétrahydruroborate de sodium pour aboutir à la furimazine (**7**).

Schéma 12 : synthèse de la furimazine (**7**) par Hall et al.⁹⁹

III.D.4. Synthèses à diversifications tardives

La synthèse originale de la furimazine (**7**) par Promega Corporation⁹⁹ s'est appuyée sur les voies préalablement évoquées, par la condensation d'un hydroxyacrylate sur une aminopyrazine (voir ci-avant). De nouvelles voies de synthèses ont cependant été développées par les chercheurs de cette société afin de permettre la synthèse de nombreux analogues et la détermination de leurs propriétés de bioluminescence avec nanoKAZ. Les objectifs étaient donc assez similaires à ceux développés dans ce projet de thèse, mais ces résultats n'ont été publiés qu'après le début de notre projet et présentent une chimie assez différente et seuls quelques analogues en communs.

Schéma 13 : synthèse d'analogues de furimazine (**7**) diversifiés en position 2

La première synthèse dévoilée en juin 2016^{165, 167} (Schéma 13) utilise toujours comme réactif une 2-aminopyrazine **25b**, sur laquelle une insertion de carbène dans une liaison N-H catalysée au rhodium est effectuée pour aboutir à l'aminophosphonate **39a**. Ce dernier peut ensuite être mis à réagir avec une grande variété d'aldéhydes aromatiques **32** selon une réaction d'oléfine de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) en utilisant la 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (TMG) comme base pour aboutir aux composés **40a**. Ceux-ci sont en équilibre dans ces conditions avec les déshydroluciférines **41**, qui peuvent être réduites au moyen de tétrahydruroborate de sodium pour aboutir à une quarantaine de

luciférines originales **19c** présentant des noyaux aromatiques variés en R². Deux variantes de cette voie de synthèse utilisant toujours une réaction de HWE comme élément central ont été divulguées dans le même article afin d'éviter la formation non contrôlée de **41**, instable, et augmenter les rendements.

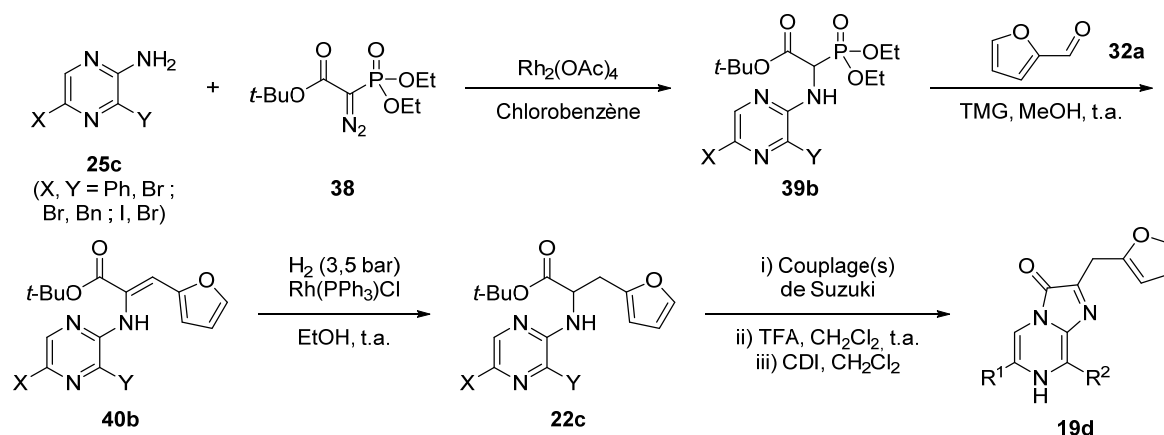


Schéma 14 : synthèse d'analogues de furimazine (**7**) modifiés en positions 6 et 8

Une seconde synthèse publiée en octobre 2017 et s'appuyant sur ces premiers travaux permet la diversification tardive des positions 6 et 8 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-one (Schéma 14),¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ en procédant aux réactions évoquées précédemment sur des 2-aminopyrazines mono- ou dihalogénées **25c**. L'insertion du carbène dans la liaison N–H et la réaction de HWE sont effectués comme précédemment, puis la double liaison de **40b** est réduite au moyen de dihydrogène sous pression en présence de catalyseur de Wilkinson pour fournir le *N*-(halogénopyrazin-2-yl)furylalaninate de *tert*-butyle (**22c**). Enfin, un ou deux couplages de Suzuki permettent l'obtention d'intermédiaires biarylés, dont les esters sont hydrolysés en milieu acide, puis qui sont soumis à une cyclisation induite par le *N,N'*-diimidazolecarbonyl (CDI) pour fournir une trentaine de nouveaux analogues de furimazine **19d**.

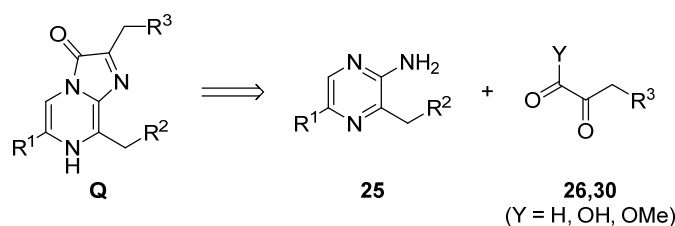
Ces synthèses récentes d'analogues comportant un noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-one sont indéniablement un pas en avant conséquent pour la préparation de nouveaux substrats de luciférase. Cette dernière synthèse ne permet cependant pas en l'état de variation en position 8 conservant un pont benzylique, ce qui peut s'avérer problématique pour la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Il sera intéressant de suivre l'évolution de ces recherches afin de voir si des couplages de Negishi au moyen de « benzylzinciques »²¹⁰ en position 8 seront accomplis dans le futur.

Partie II : Synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)- ones potentiellement bioluminescentes

La synthèse de composés potentiellement bioluminescents développée au laboratoire conserve l'approche en deux temps majoritairement utilisée dans la littérature, avec la construction du noyau pyrazine convenablement substitué suivie de la formation du second cycle aboutissant au noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-one **Q*** souhaité (Schéma 15).

Toutefois, nous souhaitons éviter de passer par l'étape clé de condensation entre des 2-aminopyrazines **25** et des composés α,β -dicarboxylés **26,30**, la synthèse de ces derniers ne nous semblant pas suffisamment flexible pour envisager la préparation d'analogues originaux. Nous nous sommes par conséquent dirigés vers une synthèse utilisant un couplage entre une chloropyrazine **42** et un α -aminoester **21**, suivi d'une cyclisation-protection menant à des acétates d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles **Z*** stables, précurseurs des analogues de luciférine **Q** voulus.

Précédents



Notre approche

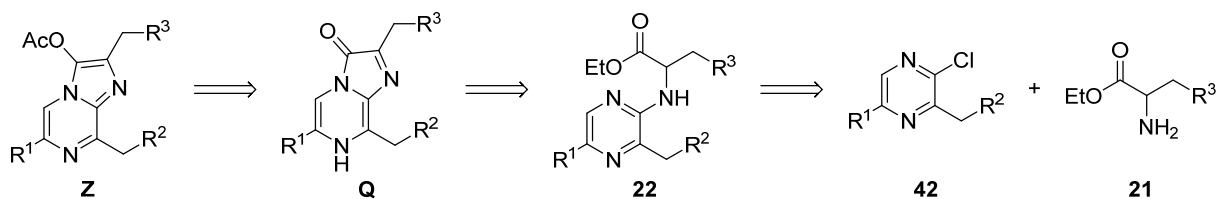


Schéma 15 : comparaison de notre approche et des précédents pour la synthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-ones

Les α -aminoesters **21** se sont ainsi avérés être des intermédiaires cruciaux à deux stades de notre synthèse : pour l'amination des chloropyrazines **42** mais également pour la préparation de ces dernières, comme nous le détaillerons plus loin. L'absence de centre asymétrique sur les analogues visés a conduit le laboratoire à explorer plusieurs synthèses racémiques d' α -aminoesters que nous exposerons en premier. Nous présenterons ensuite les deux synthèses utilisées au laboratoire pour construire le cycle pyrazine, puis le travail d'optimisation effectué pour coupler efficacement les α -aminoesters **21** sur ce noyau. Enfin, nous exposerons les méthodes permettant la fermeture du produit de N-arylation **22** et l'obtention de nouvelles imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-ones **Q** ou de leurs précurseurs **Z**.

Il est à noter que plusieurs voies présentées ci-après ont été développées ou utilisées avec comme seul objectif l'obtention rapide d'un ou plusieurs intermédiaires nécessaires aux études de relations « structure-luminescence ». Il est évident que de nombreuses réactions ont pu souffrir d'un manque d'optimisation, soit car la voie a été abandonnée suite au développement d'une alternative, soit car les

* Les numérotations en **Q** et en **Z** ont été utilisées dans l'intégralité de nos bases de données et lors des tests biochimiques (y compris avec nos collaborateurs), nous avons par conséquent décidé de la conserver dans ce manuscrit afin d'en simplifier la lecture aux futurs membres du groupe d'Yves Janin. Nous prions le lecteur de bien vouloir excuser cet écart aux usages de numérotation des molécules.

produits étaient obtenus en quantités suffisantes pour terminer la synthèse mais les analogues synthétisés n'étaient pas assez intéressants pour justifier l'optimisation de leurs préparations.

Enfin, je tiens à attirer l'attention du lecteur sur le fait que le développement de ce projet, commençant par la production « aisée » de furimazine (7) et aboutissant à la synthèse de plus de 110 analogues originaux de luciférines, a été hautement collaboratif. Ceci est en grande partie dû à la décision de l'Institut Pasteur de protéger ces découvertes et aux échéances découlant naturellement du processus d'examen et de dépôt du brevet. J'ai essayé de signaler au fil du manuscrit les manipulations, expériences préliminaires ou idées qui n'étaient pas directement le fruit de mon travail mais nécessaires à l'exposé des résultats par une dague « † ». Je tiens cependant à m'excuser auprès de Glwadys Gagnot, Vincent Hervin, Yves Janin et du lecteur si la paternité d'un résultat a malencontreusement échappé à ma vigilance.

I - SYNTHÈSES D' α -AMINOESTERS

Les α -aminoesters ont été les pierres angulaires de notre voie de synthèse d'analogues de luciférines, intervenant à deux reprises comme réactifs, et de nombreux accès synthétiques à ceux-ci ont été explorés au laboratoire pour produire le plus possible d'analogues de phénylalaninate ou de furylalaninate d'éthyle.

L'absence de centre chiral dans la structure des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones visées ne justifiait pas l'usage de synthèses asymétriques et nous avons par conséquent exploré les préparations racémiques d' α -aminoesters **21**. Ces derniers sont majoritairement synthétisés à partir de malonate de diéthyle **43** ou de nitroacétate d'éthyle **44**, soit via la condensation d'un aldéhyde sur le carbone acide, soit par alkylation sur ce dernier. Des synthèses d' α -aminoesters ont également été effectuées grâce à des réactions de cycloadditions [2+3] ou [2+4] (Schéma 16).

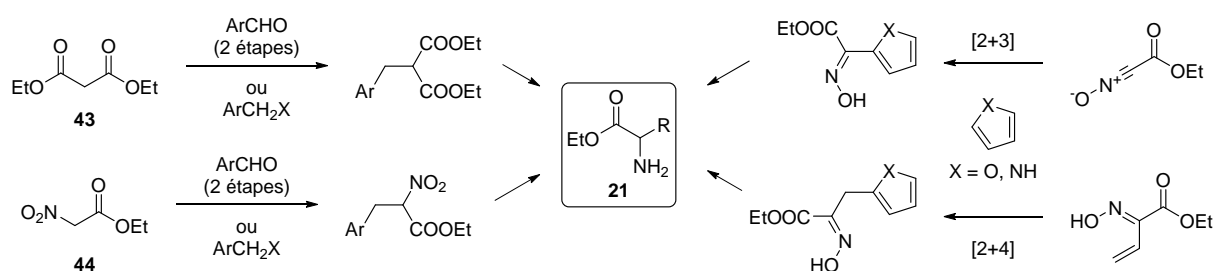


Schéma 16 : synthèse d' α -aminoesters **21**

Le lecteur intéressé par une étude approfondie de la littérature sur ce sujet pourra se rapporter à la revue²¹¹ rédigée par les membres du laboratoire, dont une copie est jointe en Annexe II de ce manuscrit.

Afin de faciliter la lecture de ce chapitre, les intermédiaires réactionnels ont été numérotés dans l'ordre d'apparition dans le manuscrit, mais précédés d'une lettre décrivant le noyau aromatique et ses éventuels substituants. Ces informations ont été rassemblées dans le Tableau 1, au verso.

Tableau 1 : nomenclature des intermédiaires dans ce chapitre

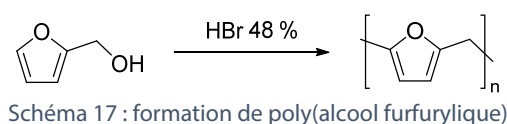
a	Furan-2-yle	z	<i>m</i> -Fluorophényle
b	Furan-3-yle	aa	<i>p</i> -Fluorophényle
c	5-Méthylfuran-2-yle	ab	<i>o,o</i> -Difluorophényle
d	5-Éthylfuran-2-yle	ac	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3)
e	4,5-Diméthylfuran-2-yle	ad	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5)
f	5-Cyclopropylfuran-2-yle	ae	<i>m,m</i> -Difluorophényle
g	5-Propylfuran-2-yle	af	<i>o,p</i> -Difluorophényle
h	5-Trifluorométhylfuran-2-yle	ag	<i>o</i> -Chlorophényle
i	Phényle	ah	<i>m</i> -Chlorophényle
j	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	ai	<i>p</i> -Chlorophényle
k	<i>o</i> -Tolyle	aj	<i>m</i> -Bromophényle
l	<i>m</i> -Tolyle	ak	<i>p</i> -Bromophényle
m	<i>p</i> -Tolyl	al	Cyclopentyle
n	<i>p</i> -Isopropylphényle	am	Cyclohexyle
o	<i>m</i> -Propylphényle	an	Tétrahydrofuran-2-yle
p	<i>p</i> -Propylphényle	ao	5-Éthylthiophène-2-yle
q	<i>m</i> -Cyclopropylphényle	ap	3-Méthylthiophène-2-yle
r	<i>p</i> -Cyclopropylphényle	aq	4,5-Diméthylthiophène-2-yle
s	<i>o</i> -Méthoxyphényle	ar	2-Pyridyle
t	<i>m</i> -Méthoxyphényle	as	3-Pyridyle
u	<i>p</i> -Méthoxyphényle	at	1,3-Dioxolane
v	<i>o</i> -Trifluorométhylphényle	au	5-Bromofuran-2-yle
w	<i>m</i> -Trifluorométhylphényle	av	Thiophène-2-yle
x	<i>p</i> -Trifluorométhylphényle	aw	3-Méthylisoxazol-5-yle
y	<i>o</i> -Fluorophényle	ax	3-Éthylisoxazol-5-yle

I.A. Synthèse d' α -aminoesters par alkylation...

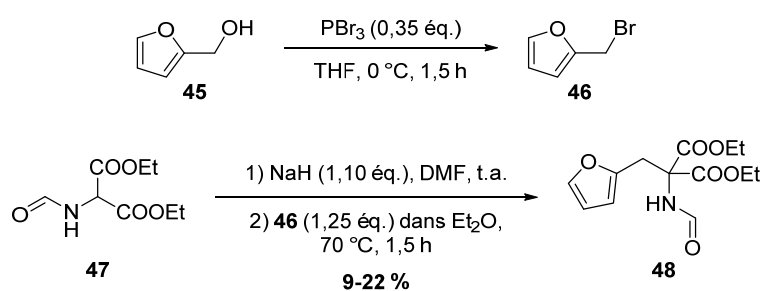
I.A.1. ...du formamidomalonate

L'objectif premier au début du projet étant le développement d'une synthèse de la furimazine (**7**) ou de proches analogues, nous avons tout d'abord cherché à synthétiser des α -aminoesters comportant un noyau furane. La voie de synthèse du 2-amino-3-(furan-2-yl)propanoate d'éthyle (ou furylalaninate d'éthyle, **21a**) par alkylation du 2-formamidomalonate de diéthyle (**47**) suivie d'une décarboxylation et d'une déformylation a ainsi été envisagée.

En ce qui concerne la transformation de l'alcool furfurylique (**45**) en 2-(bromométhyl)furane (**46**), un premier essai naïf au moyen d'une solution aqueuse à 45 % d'acide bromhydrique s'est probablement soldée par la polymérisation²¹² totale du réactif en poly(alcool furfurylique) (Schéma 17), de manière totalement incontrôlée.

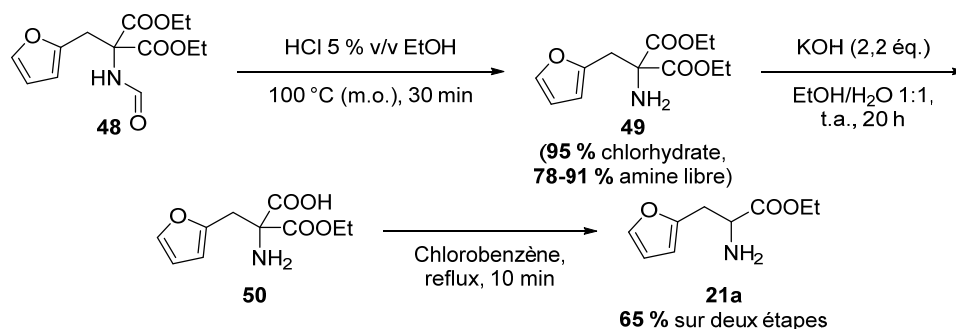


La synthèse du produit d'alkylation **48** a été décrite par Kitagawa²¹³ en utilisant le tribromure de phosphore pour obtenir à partir de l'alcool furfurylique (**45**) l'intermédiaire 2-(bromométhyl)furane (**46**). Ce dernier a ensuite été mis à réagir avec le formamidomalonate de diéthyle (**47**) en présence d'éthanolate de sodium pour fournir le produit souhaité avec un excellent rendement (91 %, non purifié toutefois). Dans notre cas, l'étape d'alkylation a cependant été plus problématique : la déprotonation du formamidomalonate de diéthyle (**47**) par l'éthanolate de sodium ne nous a pas permis d'obtenir le produit voulu. En revanche, l'utilisation d'hydruure de sodium a conduit au composé **48** souhaité, mais avec de faibles rendements (entre 9 % et 20 % selon qu'une recristallisation soit entreprise ou non après chromatographie, Schéma 18).



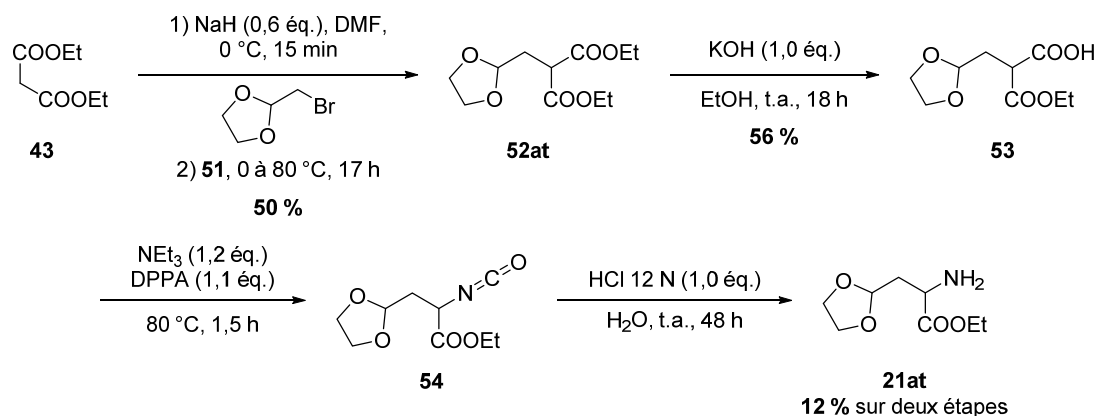
Le composé **48** est ensuite facilement déformylé au moyen d'une solution éthanolique d'acide chlorhydrique en chauffant une demi-heure à 100 °C au four à micro-ondes ou en tube scellé, pour conduire directement après évaporation des solvants et lyophilisation au chlorhydrate d'aminodiester **49** avec un rendement de 95 % ou, après extraction, l'amine libre entre 78 % et 91 %. Nous avons ensuite adapté le mode opératoire décrit par Watanabe²¹⁴ en limitant la quantité d'hydroxyde de potassium à 2,2 équivalents pour saponifier une seule des fonctions ester. Après acidification à l'acide chlorhydrique et lyophilisation, le composé **50** a ensuite été décarboxylé en

10 minutes au reflux du chlorobenzène, pour conduire au furylalaninate d'éthyle (**21a**) avec un rendement de 65 % (Schéma 19).



I.A.2. ...du malonate

Nous avons également voulu préparer l'aminoester **21at** comportant un 1,3-dioxolane à la place du noyau furane de **21a**. Dans un premier temps des essais d'alkylation du nitroacétate d'éthyle (**44**) par du 2-bromométhyl-1,3-dioxolane (**51**) commercial ont été peu fructueuses, que ce soit en déprotonant au moyen d'hydruire de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF)²¹⁵ ou en utilisant de l'hydrogénocarbonate de potassium et des catalyseurs de transfert de phase (chlorure de benzyltriéthylammonium ou de tétraéthylammonium).²¹⁶⁻²¹⁷



En revanche, l'alkylation du malonate de diéthyle (**43**) par le 2-bromométhyl-1,3-dioxolane (**51**) a conduit dans des conditions classiques (hydruire de sodium dans le DMF) à la formation de **52as** avec un rendement de 50 %.²¹⁸

Il a été alors possible d'effectuer comme précédemment une hydrolyse basique d'un seul des deux esters,²¹⁹ avec un rendement de 56 %. Ce faible rendement peut ici s'expliquer par une conversion incomplète de **52as** en **53**, ce qui nous a contraint à effectuer des extractions en milieu basique puis acide afin d'éliminer le malonate alkylé non saponifié, durant lesquelles une partie substantielle du produit souhaité a pu rester en phase aqueuse.

La transformation de l'acide **53** en amine **21at** a été effectuée grâce à sa conversion en azoture d'acyle à l'aide d'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA), suivi d'un réarrangement de Curtius pour offrir l'isocyanate **54**.²²⁰ L'hydrolyse acide de ce dernier, sans purification préalable, permet finalement

l'obtention de l' α -aminoester souhaité **21at** avec un rendement de 12 % depuis l'acide et seulement 3 % depuis le 2-bromométhyl-1,3-dioxolane (**51**) (Schéma 20).

Au vu des difficultés rencontrées et de la longueur de voies de synthèses présentées ci-dessus, nous avons alors développé d'autres approches notamment celles ne comportant pas d'étape d'alkylation.

I.B. Synthèse d' α -aminoesters via la formation d'un α -nitroester

Nous avons décidé d'explorer les limites d'une voie d'accès plus générale basée sur une réaction de Knoevenagel entre le nitroacétate d'éthyle (**44**) et des aldéhydes aromatiques **32** pour conduire aux 3-aryl-2-nitroacrylates **56** après déshydratation de l'intermédiaire **55**. Les réductions de la double liaison et du groupement nitro de ces 2-nitroacrylates **56** offrent ainsi un accès relativement plus simple à ces α -aminoesters **21** (Schéma 21).

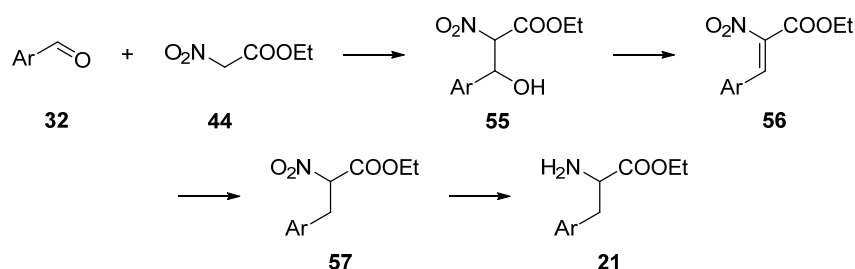


Schéma 21 : synthèse d' α -aminoesters **21** via une condensation de Knoevenagel sur le nitroacétate d'éthyle (**44**)

Comme explicité en détail dans notre revue sur le sujet,²¹¹ de nombreuses conditions ont été rapportées dans la littérature pour effectuer cette condensation, notamment le chauffage du nitroacétate d'éthyle (**44**) et d'aldéhydes aromatiques **32** : en présence de chlorure de diméthylammonium, avec ou sans fluorure de potassium²²¹⁻²²⁴ ; en utilisant un appareil de Dean-Stark en présence d'acide acétique²²⁵⁻²²⁶ ; en présence d'acides de Lewis métalliques²²⁷⁻²³⁰ tels que les tétrachlorures de titane ou de zirconium.

I.B.1. Condensation d'un aldéhyde sur le nitroacétate d'éthyle

Nous nous sommes tout d'abord intéressé à une approche publiée en 2011 par Fioravanti *et al.*,²³⁰ rapportant notamment la synthèse des 3-(furan-2-yl)- et 3-(5-méthylfuran-3-yl)-2-nitroacétates d'éthyle (**32a** et **32c**) avec d'excellents rendements (respectivement 95 et 97 %), en présence de tamis moléculaire 4 Å et de 0,1 équivalent de pipéridine au reflux du toluène ; le gros avantage de ces conditions étant d'éviter l'utilisation d'excès de tétrachlorures de titane ou de zirconium, plutôt onéreux et polluants.

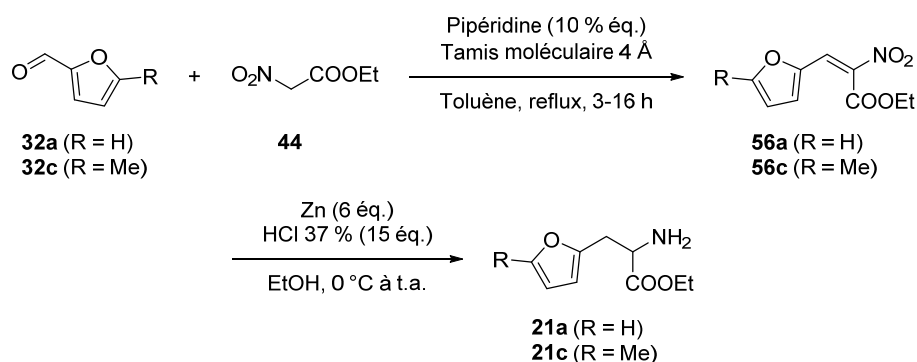


Schéma 22 : préparation des 2-amino-3-(furan-2-yl)propanoate (**21a**) et 2-amino-3-(5-méthylfuran-2-yl)propanoate d'éthyle (**21c**)

Nous avons donc effectué la condensation du furfural (**32a**) et du nitroacétate d'éthyle (**44**) dans les conditions décrites par Fioravanti puis entrepris une hydrogénation directe de l' α -nitroacrylate **56a** résultant en utilisant du zinc et de l'acide chlorhydrique concentré. Notre premier essai nous a ainsi permis d'obtenir plus de cinq grammes de l' α -aminoester **21a** souhaité avec un rendement de 48 %,

après purification par extractions successives en milieux acide puis basique (Schéma 22). Il est apparu toutefois que cet accès rapide était peu reproductible, un second essai de réduction dans des conditions apparemment identiques n'ayant mené qu'à des quantités faibles de produit peu propre. De même, la réduction directe de **56c**, obtenu à partir du 5-méthylfurfural (**32c**), en **21c** n'a pas permis d'isoler le produit avec une pureté satisfaisante.

Nous avons par conséquent exploré la réduction des α -nitroacrylates **56** en α -nitroesters **57** préalablement à la réduction de leur fonction nitro en amine. Les hydrogénations catalysées au palladium peuvent selon la littérature conduire à une réduction partielle ou complète du groupe nitro avant la double liaison.²³¹ Nos essais utilisant le système d'hydrogénation Thalès H-Cube sous 40 à 60 bars de dihydrogène avec du palladium supporté sur charbon ou du nickel de Raney se sont également montrés infructueux.

Une brève analyse de la littérature permet de constater l'utilisation récurrente de tétrahydruroborate de sodium.^{221, 227, 232-233} Nous avons par conséquent procédé tout d'abord à la réduction de **56a** et **56c** en utilisant un équivalent de ce réactif dans l'éthanol glacé. Toutefois, l'évaporation de l'éthanol avant extraction sans traitement préalable du milieu réactionnel conduit à la décarboxylation partielle des α -nitroesters pour donner les 2-(2-nitroéthyl)furanes correspondants dans des proportions non négligeables. De plus, ces produits co-éluent en chromatographie sur gel de silice quel que soit les conditions utilisés (Schéma 23).

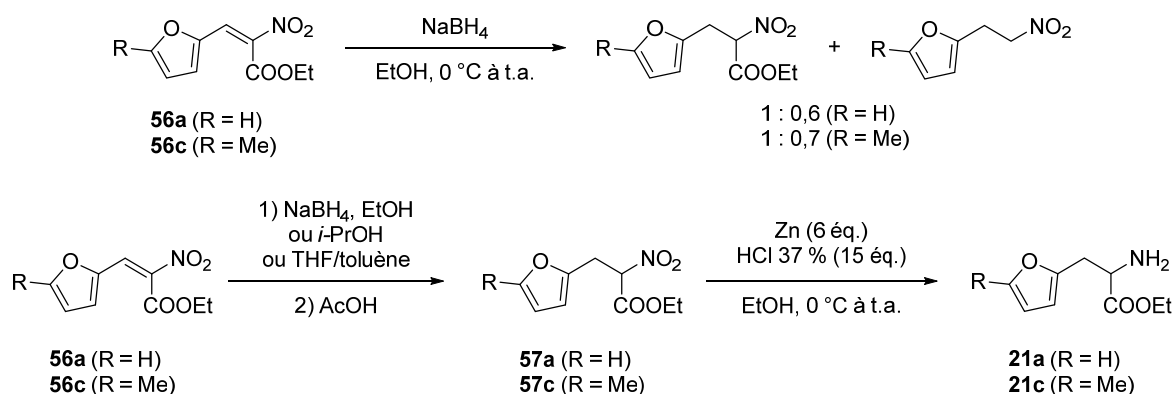


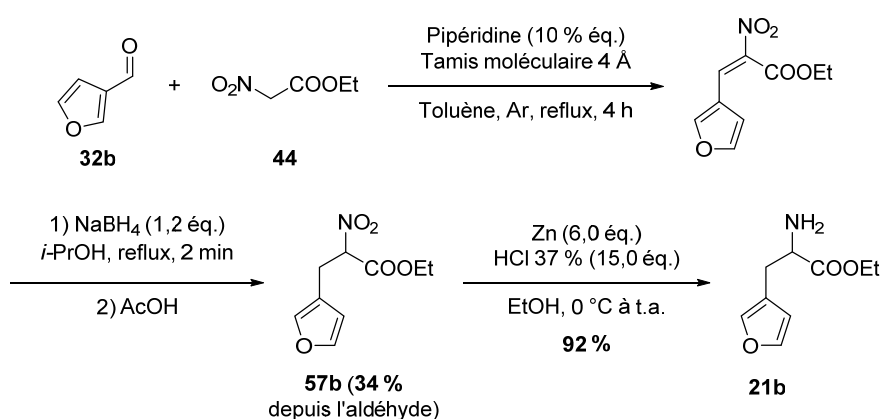
Schéma 23 : réduction des α -nitroacrylates **56a,c** en α -nitroesters **57a,c** puis en α -aminoesters **21a,c**

Nous avons par la suite procédé à l'acidification du milieu préalablement au traitement ce qui permet de limiter voire supprimer l'occurrence des produits de décarboxylation. L'utilisation d'isopropanol est également possible, à 0 °C pour quelques heures ou en chauffant brièvement jusqu'à ébullition et en laissant refroidir. Enfin, l'évaporation du toluène à la fin de la condensation de Knoevenagel n'est pas forcément utile et une simple dilution dans un solvant plus polaire (ici le tétrahydrofurane) permet également la réduction de la double liaison. Toutes ces conditions ont abouti à des rendements plutôt modestes en α -nitroesters depuis les aldéhydes correspondants : entre 31 et 39 % pour **57a** et entre 29 et 34 % pour **57c**. Il est à noter qu'un essai de réduction au moyen de triacétoxyborohydrure de sodium n'a pas permis d'obtenir les α -nitroesters souhaités.

Il est important de souligner que des expériences supplémentaires effectuées lors de l'écriture de ce manuscrit ont mis en évidence des rendements en α -nitroacrylate **56a** après purification par chromatographie sur gel de silice assez éloignés de ceux revendiqués par la littérature (35-50 % contre 95 %), ceci expliquant sans doute en partie les rendements moyens post-réduction. Fioravanti *et al.*

insistent sur le fait qu'une « haute température, une atmosphère inerte et l'utilisation de tamis moléculaire 4 Å sont des conditions absolument nécessaires pour obtenir une conversion complète et une déshydratation totale des intermédiaires [de Henry 55] ». ²³⁰ En dépit de toutes ces informations, il nous a cependant été impossible de déterminer l'origine des faibles rendements spécifiques à cette étape observés au laboratoire. Dans l'absolu, la réduction finale de ces composés nitrés **57a,c** nous a permis d'obtenir les α -aminoesters souhaités **21a** et **21c** avec des rendements respectifs de 76 et 95 %.

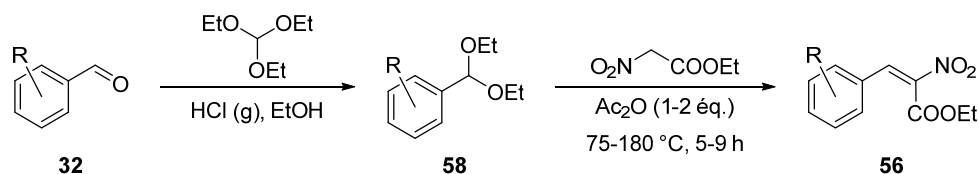
Cette voie a également permis d'obtenir un analogue de furylalaninate d'éthyle **21b** en partant du 3-furfural (**32b**) (Schéma 24). Après condensation dans les conditions de Fioravanti, réductions au tétrahydruroborate de sodium puis au zinc, nous avons pu isoler le 2-amino-3-(furan-3-yl)propanoate d'éthyle (**21b**) avec un rendement de 31 % en trois étapes et deux purifications (chromatographie sur gel de silice de **57b** et extractions en milieux acide puis basique de **21b**).

Schéma 24 : synthèse du 2-amino-3-(furan-3-yl)propanoate d'éthyle (**21b**)

Si cette approche par condensation d'un aldéhyde sur le nitroacétate d'éthyle (**44**) nous a permis d'obtenir nos premiers α -aminoesters **21a-c** en quantités suffisantes pour pouvoir synthétiser des imidazopyrazinones originales, des limitations sont apparues dès lors que les réactifs ne comportaient pas de noyau furane. Par exemple, la condensation du *p*-benzyloxybenzaldéhyde (**32j**) sur le nitroacétate d'éthyle (**44**) s'est avérée impossible dans les conditions décrites ci-dessus, ce qui nous a amenés à étudier les éventuelles limites d'une alternative décrite ci-dessous.

1.B.2. Réaction d'un acétal sur le nitroacétate d'éthyle

Dans le cadre d'un stage de première année de Master, Sarah Desmons a ainsi travaillé au laboratoire sur une réaction entre des acétals diméthyliques d'aldéhydes aromatiques **58** et le nitroacétate d'éthyle (**44**) décrite par Kochetkov *et al.* ²³⁴⁻²³⁵ (probablement inspirés par Klein et Bergmann ²³⁶ qui avaient appliqué cette méthode 20 ans auparavant avec l'acide malonique, mais sans succès avec le malonate de diéthyle) afin de synthétiser des dérivés de phénylalaninate d'éthyle (Schéma 25).

Schéma 25 : synthèse des α -nitroacrylates selon Kochetkov *et al.*

Le mécanisme de cette réaction a été décrit par Kochetkov²³⁵ (Schéma 26), avec en premier lieu la formation de l'acylal **I** qui, à 150 °C, forme probablement un carbocation qui peut réagir avec le nitroacétate d'éthyle (**44**) pour former le produit de C-alkylation **II**. L'élimination d'éthanol permet alors la formation du nitroacrylate **56**. Lorsque le noyau benzène est substitué par des groupes électroattracteurs, cependant, des quantités importantes (entre 30 et 50 %) des benzoates d'éthyle **IV** correspondants ont été isolés, ce qui s'explique par la formation de l'intermédiaire O-alkylé **III**.

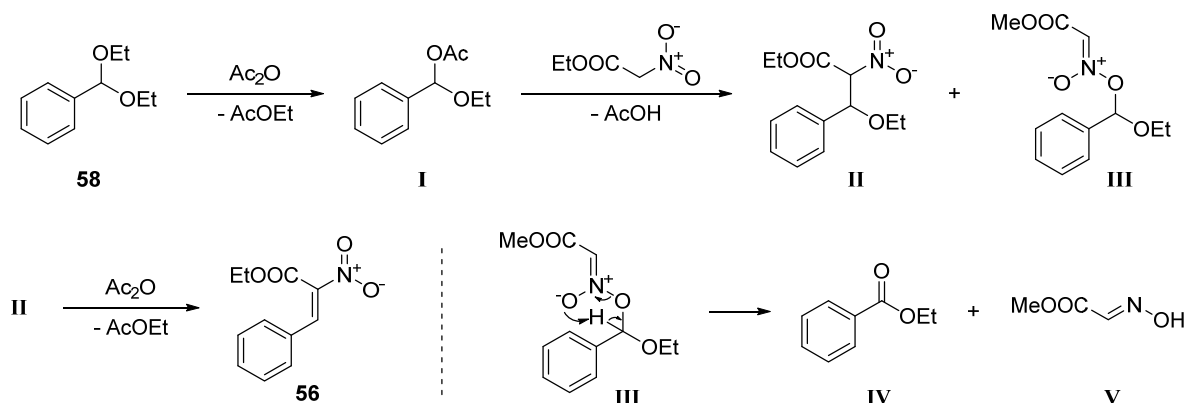


Schéma 26 : mécanisme de la formation des α -nitroacrylates selon Kochetkov *et al.*

Nous avons utilisé dans notre cas non pas les dérivés éthyliques décrits dans la littérature mais les acétals méthyliques d'aldéhydes aromatiques **59** (Schéma 27). Leur synthèse s'est effectuée dans le méthanol anhydre avec de l'orthoformate de triméthyle et une très petite quantité de résine présentant des groupements acides sulfoniques (DOWEX[™] 50WX8-100) comme catalyseur. Les acétals **58** se forment quasi-quantitativement en une nuit à température ambiante, sous garde à chlorure de calcium, et sont utilisés tels quels après évaporation du méthanol.

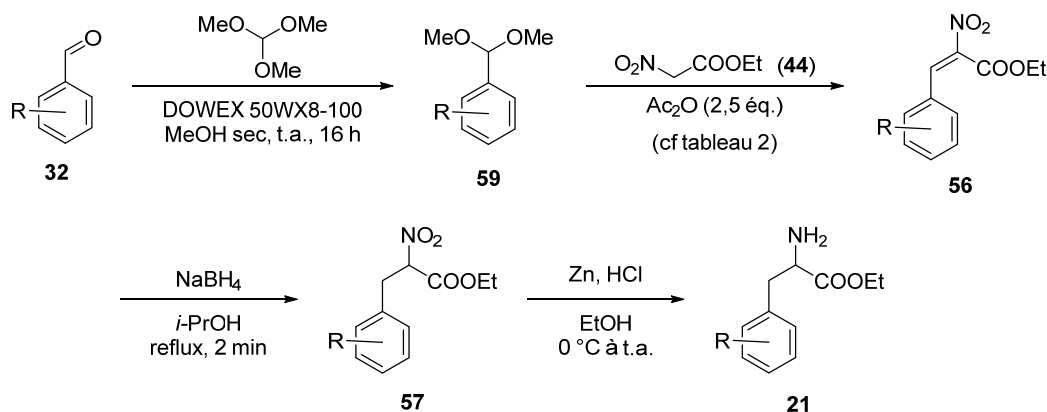


Schéma 27 : synthèse d' α -aminoesters **21** via la condensation d'acétals **59** sur le nitroacétate d'éthyle (**44**)

La réaction du nitroacétate d'éthyle (**44**) et des acétals **59** s'effectue sans solvant avec un léger excès d'anhydride acétique et à haute température. L'efficacité de la condensation est fortement dépendante des substituants présents sur le noyau aromatique, se traduisant par des rendements après réduction en α -nitroesters **57** moyens lorsque des groupes électrodonneurs sont présents (**57a,j,s,t,u**) et mauvais dans le cas contraire (**57y,z,aa**) (Tableau 2). Nous avons également essayé cette synthèse en partant du furfural (**32a**) et des alkylfurfurals **32c** et **32d**, mais pour obtenir finalement des rendements similaires voire moins bons que ceux décrits précédemment.

Tableau 2 : α -aminoesters **21** obtenus via la synthèse d' α -nitroesters **57** selon Kochetkov *et al.*

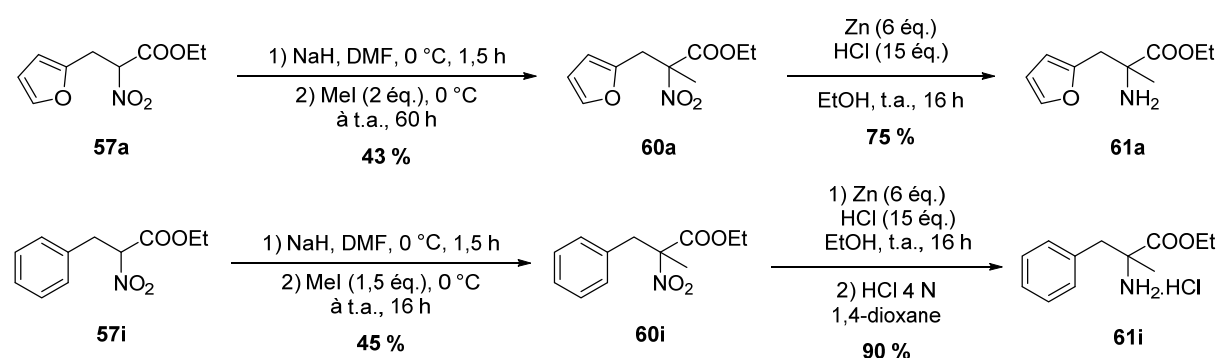
	Aldéhyde 32	Conditions de condensation	Rdt 57	Rdt 21	Rdt depuis l'aldéhyde
a†	Furfural	2 h à 140 °C	24 % ^a	93 %	19 %
c	5-Méthylfurfural	2 h à 140 °C	60 %	95 %	57 %
d†	5-Éthylfurfural	2 h à 140 °C	39 % ^a	57 %	22 %
j	<i>p</i> -Benzyloxybenzaldéhyde	6,5 h à 150 °C	51 %	93 %	47 %
s	<i>o</i> -Méthoxybenzaldéhyde	9 h à 150 °C	53 %	90 %	48 %
t	<i>m</i> -Méthoxybenzaldéhyde	9 h à 150 °C	21 %	92 %	19 %
u	<i>p</i> -Méthoxybenzaldéhyde	9 h à 150 °C	55 %	95 %	52 %
y	<i>o</i> -Fluorobenzaldéhyde	4 h à 190 °C	6 %	92 %	5 %
z	<i>m</i> -Fluorobenzaldéhyde	8 h à 160 °C + 3 h à 190 °C	5 %	n.i.	—
aa	<i>p</i> -Fluorobenzaldéhyde	9 h à 150 °C	13 %	95 %	12 %

^a Deux purifications

La réduction des α -nitroesters **57** à l'aide de zinc en poudre et d'acide chlorhydrique procède quant à elle avec d'excellents rendements et permet un accès aux α -aminoesters **21**. Ainsi nous obtenons ces composés avec des rendements globaux entre 5 et 48 %. Toutefois, notre volonté d'avoir aussi des α -aminoesters comportant des groupes électrodonneurs sur le noyau aromatique nous a incités, une fois encore, à explorer d'autres voies de synthèse ne comportant pas cette limitation.

1.B.3. α -Méthylation de 3-aryl-2-nitropropanoates d'éthyle

En dépit de ses limites, l'obtention des α -nitroesters décrite ci-dessus offre un accès synthétique très simple aux α -alkylaminoesters par C-alkylation, le groupe nitro jouant un rôle d'activation qui n'a nullement besoin d'être protégée pour une telle alkylation.

Schéma 28 : synthèse des 2-amino-3-aryl-2-méthylpropanoates d'éthyle **61a** et **61i**

Ainsi, nous avons pu obtenir après déprotonation de **57a** et **57i** à l'aide d'hydrure de sodium puis alkylation par l'iodure de méthyle les α -alkylaminoesters **60a** et **60i** avec des rendements de 43 % et 45 %. De nouveau, il est très probable que nous ayons affaire à une réaction secondaire d'O-alkylation pouvant expliquer les rendements modestes. La réduction des groupes nitro permet d'obtenir les α -aminoesters correspondants **61a** et **61i** (sous forme de chlorhydrate pour ce dernier) avec des rendements respectifs de 75 % et 90 %. Contrairement aux réductions effectuées régulièrement au laboratoire qui ne

nécessitent que quelques heures au plus, il a ici été impératif de laisser le mélange réagir toute une nuit pour obtenir une conversion totale des réactifs.

I.C. Synthèse d' α -aminoesters via la formation d'un α -hydroxyiminoester

Comme mentionné auparavant, les synthèses d' α -aminoesters décrites ci-dessus (I.B) se sont heurtées à une limitation importante de la première étape de condensation entre le nitroacétate d'éthyle (**44**) et des aldéhydes aromatiques. Nous avons donc alors exploré deux autres alternatives décrites ci-dessous.

I.C.1. Condensation d'un aldéhyde sur le malonate de diéthyle suivie d'une oximation

Nous avons choisi pour cette voie de synthèse de nous reposer sur la réaction de condensation centenaire de Knoevenagel²³⁷ conduisant après une première étape de réduction aux α -diesters **63** eux-mêmes étant transformables en α -hydroxyiminoester **64** par action d'un nitrite d'alkyle avant d'être enfin réduit en α -aminoesters **21** (Schéma 29).²³⁸⁻²³⁹ Il est à noter que cet enchaînement de réactions a été utilisé dès 1902 par Emil Fischer et Fritz Weigert²⁴⁰ pour synthétiser la lysine racémique.

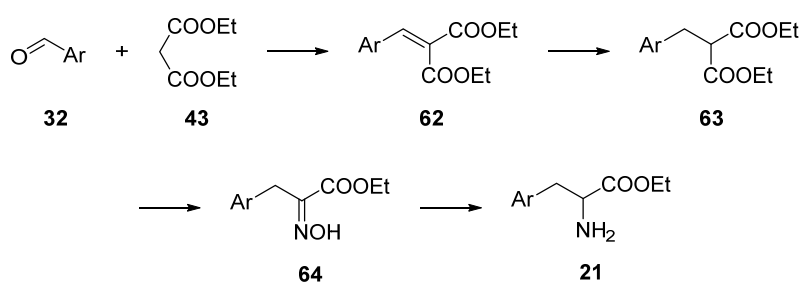


Schéma 29 : synthèse d' α -aminoesters **21** via la formation d' α -hydroxyiminoesters **64**

Les réactions décrites ci-après ont la plupart du temps été enchaînées sans purification particulière des produits intermédiaires jusqu'au stade de l'oxime. Par conséquent, les informations relatives aux rendements ont été rassemblées dans le Tableau 3 (Partie II : I.C.1.e., p. 56).

a. Condensation de Knoevenagel

Contrairement à la condensation des aldéhydes aromatiques avec le nitroacétate d'éthyle (**44**), leur condensation sur le malonate de diéthyle (**43**) s'est avérée très robuste en présence de quantités catalytiques (entre 0,05 et 0,10 équivalent) d'acide acétique glacial et de pipéridine, ainsi que de tamis moléculaire 4 Å dans l'éthanol anhydre à 60 °C pendant 10 heures (Schéma 30). De précédents résultats du laboratoire avaient montré l'importance d'effectuer cette réaction dans un minimum de solvant, avec dans notre cas environ 2 mL d'éthanol pour chaque gramme d'aldéhyde (soit des concentrations de réactifs entre 3,5 et 5 mol·L⁻¹ selon leur masse molaire).

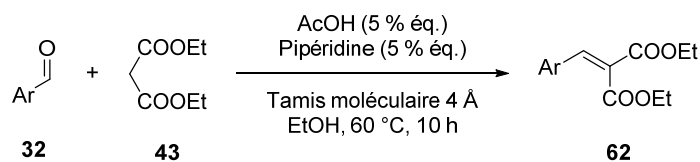
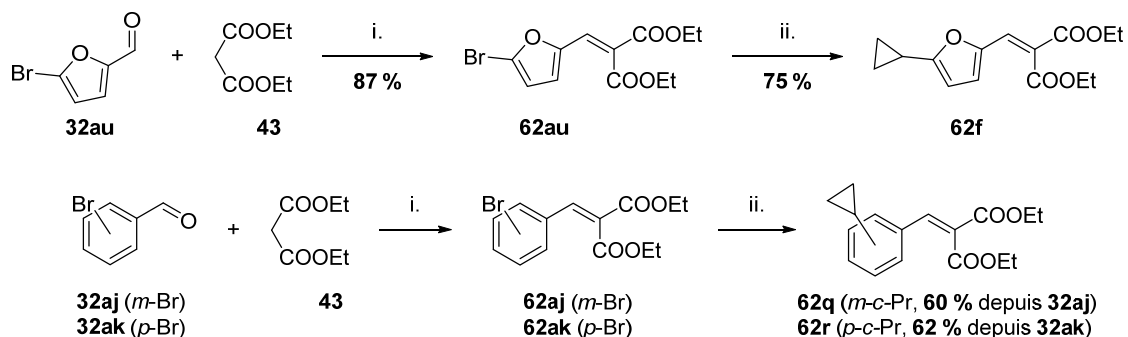


Schéma 30 : synthèse des arylidène malonates de diéthyle **62**

Des échantillons dilués sans traitement dans un solvant deutéré permettent de s'assurer facilement par RMN de la conversion totale des réactifs en 2-arylidène malonates de diéthyle **62** dans l'extrême majorité des cas, avec une pureté suffisante pour permettre directement leur réduction, après filtration du tamis, sans autre traitement.

Il a également été possible de suppléer à l'absence de certains aldéhydes commerciaux en condensant les bromoarylaldehydes **32aj,ak,au** sur le malonate de diéthyle (**43**), puis en couplant les produits correspondants avec l'acide cyclopropylboronique grâce à une réaction de Suzuki-Miyaura dans des conditions²⁴¹⁻²⁴² souvent utilisées au laboratoire (Schéma 31).



i. AcOH (5 % éq.), pipéridine (5 % éq.), tamis moléculaire 4 Å, EtOH, 60 °C, 12 h

ii. c-Pr-B(OH)₂ (1,3 éq.), Cs₂CO₃ (3,9 éq.), PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (2,5 % éq.), toluène/H₂O 95:5, reflux, 1 h

Schéma 31 : synthèse des cyclopropylarylidènemalonates de diéthyle **62f,q,r**

Nous avons ainsi pu obtenir les cyclopropylarylidènemalonates de diéthyle **62f** et **62q,r** avec des rendements entre 60 et 65 % avant leur réduction.

b. Réduction des 2-arylidènemalonates **62**

La réduction des arylidènemalonates **62** en 2-(arylméthyl)malonates **63 a**, lorsque cela était possible, été effectuée par hydrogénation catalytique au moyen de palladium adsorbé sur charbon. Comme cette réaction peut avoir lieu dans l'éthanol, nous avons le plus souvent engagé le mélange réactionnel contenant **62** après une simple filtration du tamis moléculaire et un lavage de celui-ci avec ce solvant. Après complétion de la réduction (surveillée grâce à la disparition des protons vinyliques en RMN après 12 à 24 heures) et filtration, le brut peut lui-aussi être « oximé » sans purification supplémentaire (cf. Partie II : I.C.1.c).

Cette méthode de réduction a cependant par deux fois conduit à des produits inattendus mais néanmoins intéressants pour nos études de relations « structure-luminescence ». Tout d'abord, l'hydrogénation des cyclopropylbenzylidènemalonates **62q** et **62r** a conduit à l'ouverture des cyclopropyles, aboutissant uniquement aux propylbenzylidènemalonates correspondants **63o** et **63p** (non purifiés, Schéma 32).

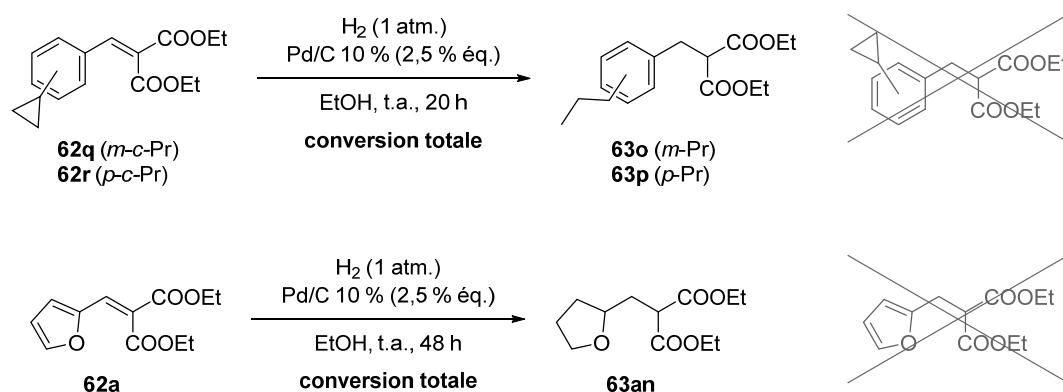


Schéma 32 : réactions inattendues lors de l'hydrogénation catalytique des arylidènemalonates **62a,q,r**

Par ailleurs, le noyau furane du 2-(furan-2-ylméthylène)malonate de diéthyle (**62a**) est réduit de manière concurrente à la double liaison dans les conditions décrites ci-dessus. Nous avons donc laissé la réaction se poursuivre jusqu'à l'hydrogénation complète des carbones, ce qui a offert un accès aisé au composé **63an** (non isolé) que nous n'avions pas réussi à obtenir par alkylation du malonate de diéthyle (**43**) par le 2-(bromométhyl)tétrahydrofurane dans les mêmes conditions qu'exposées dans le Schéma 20 (p. 42).

L'impossibilité de réduire sélectivement la double liaison formée par la condensation lorsqu'un noyau furane est présent et l'incompatibilité de l'hydrogénation catalytique avec des molécules portant des atomes de chlore ou de brome nous a conduits à effectuer des réductions au tétrahydruroborate de sodium (Schéma 33), déjà abordées dans le cas des α -nitroacrylates (Partie II : I.B.2), mais dans le cas présent à basse température et le plus souvent durant une nuit.

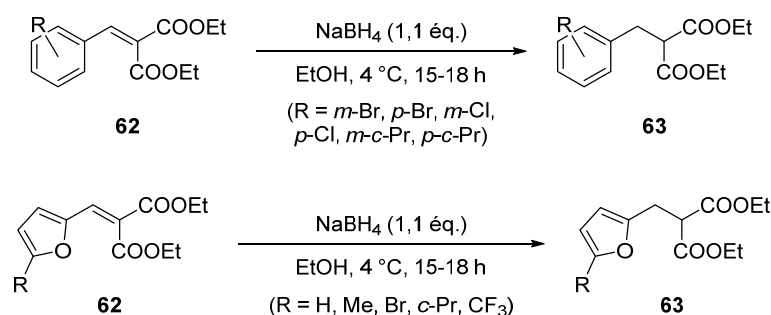


Schéma 33 : réduction des arylidènemalonates **62** incompatibles avec l'hydrogénation catalytique

Nous avons pu remarquer la formation en quantités non-négligeables de sous-produits, peut-être trop longtemps négligés à cause de l'enchaînement sans purification des réactions et la surveillance des réactions par la simple disparition des signaux vinyliques en RMN. Des essais à diverses températures (-15 °C, 0 °C et température ambiante) de réduction du furfurylidènemalonate de diéthyle (**62a**), en présence ou non d'eau selon Lehnert,²⁴³ n'ont pas réellement permis d'éviter la formation de sous-produits même si leur quantité augmente très nettement avec la température. Une étude plus exhaustive des mélanges réactionnels issus de ces différents essais de réduction a toutefois permis d'identifier les sous-produits **65** et **66** (Schéma 34) issus d'une réduction partielle ou totale des esters maloniques en alcools.

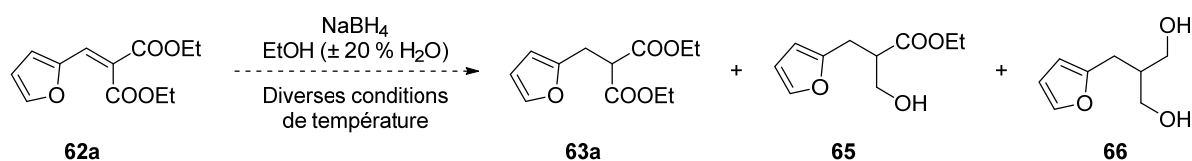


Schéma 34 : produits secondaires issus de la réduction de **62a** au tétrahydruroborate de sodium

Une recherche dans la littérature *a posteriori* montre cependant que ces réactions ne sont pas si insolites, mais sont quasi-exclusivement décrites à partir des 2-(arylméthyl)malonates **63** et avaient échappé à notre vigilance. Si ces réductions d'esters en alcools sont attendues avec du tétrahydruroaluminat de sodium (LiAlH_4),²⁴⁴ elles sont toutefois moins courantes avec le tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4) et nécessitent généralement l'addition de chlorure de lithium (LiCl)²⁴⁵ ou procèdent à haute température²⁴⁶ ou avec de larges excès de NaBH_4 .²⁴⁷⁻²⁴⁸

Des travaux plus récents au laboratoire[†] semblent montrer qu'il est possible dans certain cas d'éviter de telles sur-réductions en utilisant du tétrahydroborate de tétraméthylammonium en 2 heures à température ambiante. Par ailleurs, Kazancioglu *et al.* décrivent l'hydrogénation catalytique de la double liaison du 5-méthylfurfurylidènemalonate de diméthyle (**62c**) avec un rendement de 78 %, à l'aide de palladium adsorbé sur charbon mais en limitant le temps de réaction,²⁴⁴ ce qui laisse penser que des optimisations sont possibles si l'on était amené à devoir appliquer ce procédé pour une production d' α -aminoesters de ce type à plus grosse échelle.

c. Oximation des α -diesters

La transformation des 2-(arylméthyl)malonates **63** en α -hydroxyiminoesters **64** à l'aide d'alkylnitrites a été décrite au début du XX^e siècle par Dieckmann,²³⁸ probablement d'après des observations préalables²⁴⁹ de Victor Meyer (qui était incidemment le directeur de thèse d'Emil Knoevenagel).

Les conditions réactionnelles décrites dans la littérature varient assez peu, avec une première étape de déprotonation des 2-(arylméthyl)malonates **63** à l'aide d'un alcoolate de sodium, suivie de l'addition de nitrites d'alkyles²⁵⁰⁻²⁵¹ tels que le nitrite d'isopentyle (communément appelé nitrite d'isoamyle)²⁵²⁻²⁵⁴ ou le nitrite d'éthyle,²⁵⁵⁻²⁵⁷ un gaz qui peut être aisément généré à partir d'éthanol, de nitrite de sodium et d'acide mais qui présente le désavantage majeur de former un mélange explosif avec l'air (Schéma 35).²⁵⁸

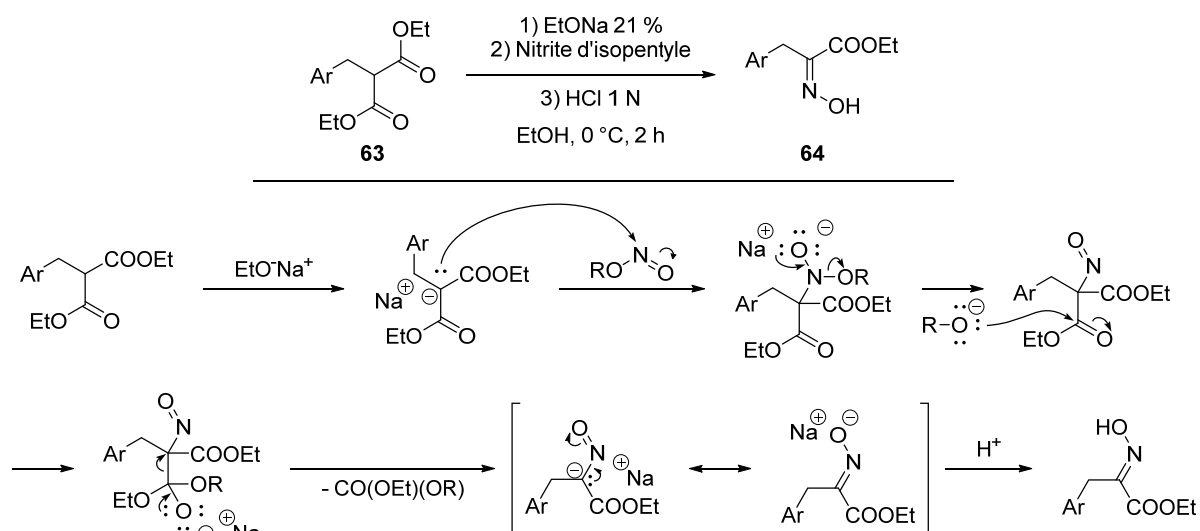
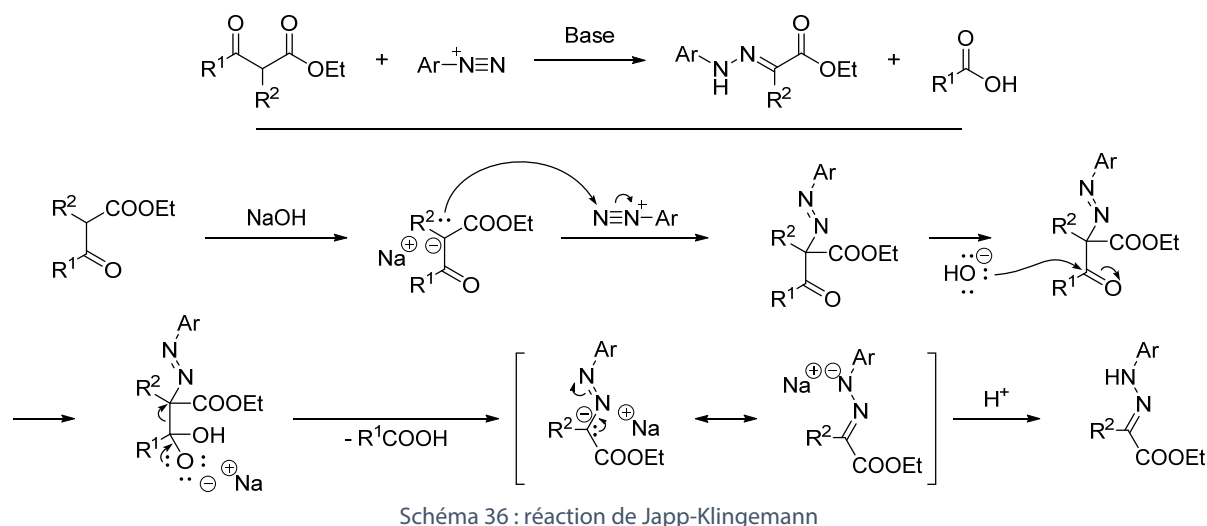


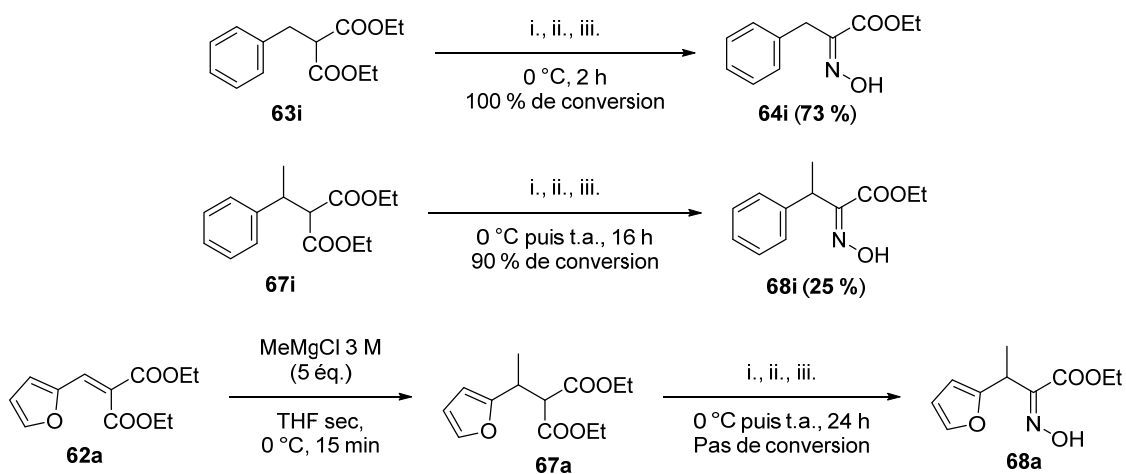
Schéma 35 : mécanisme d'oximation des 2-(arylméthyl)malonates **63**

À notre connaissance, aucune étude mécanistique n'a été effectuée sur cette réaction. Le mécanisme décrit ci-dessus s'appuie sur l'observation rapportée par Shivers et Hauser²⁵⁵ en 1947 de la formation de carbonate de diéthyle au cours de la réaction et par analogie avec la réaction de Japp-Klingemann (Schéma 36).²⁵⁹⁻²⁶⁰



Dans notre cas, les réactions ont été effectuées en deux heures à 0 °C avec de l'éthanolate de sodium et du nitrite d'isopentyle, avant acidification à l'acide chlorhydrique dilué (1 M). Une chromatographie sur gel de silice était ensuite souvent primordiale pour obtenir les α-hydroxyiminoesters avec une pureté suffisante pour que leurs réductions subséquentes (Partie II : I.C.1.d) offrent les α-aminoesters **21** correspondants sans autre purification qu'une extraction. Si cette réaction ne conduit pas forcément à des rendements faramineux (présentés dans le Tableau 3, p. 56), elle a le plus souvent permis d'obtenir les produits souhaités en quantité suffisante pour permettre la suite de la synthèse.

Nous avons cependant rencontré une limitation inattendue de cette transformation lorsque nous avons été amenés à tenter l'oximation des composés β-méthylés **67a,i** (Schéma 37). En effet, si la transformation du benzylmalonate de diéthyle (**63i**) en l'α-hydroxyiminoester correspondant **64i** s'effectue totalement en 2 heures à 0 °C avec un rendement de 73 %, l'oximation de **67i** nécessite un temps de réaction plus long et à plus haute température (résultat obtenu par Yves Janin), très probablement à cause de l'encombrement stérique introduit par le groupe méthyle. Il est probable que des réactions secondaires aient également lieu étant donné le très modeste rendement obtenu (25 % de **68i**) malgré la disparition d'une très grande partie du réactif **67i**.



i. EtONa 21 % (1,2 éq.) ; ii. Nitrite d'isopentyle (1,1 éq.) ; iii. HCl 1 N

Schéma 37 : variations de réactivité lors de l'oximation des β-méthyl-β-arylmalonates **67**

Toutefois, lorsque nous avons essayé forts de ces résultats l'oximation de **67a** (non isolé, obtenu par alkylation du furfurylidènemalonate de diéthyle (**62a**) à l'aide de chlorure de méthylmagnésium), nous avons constaté l'absence totale de réaction en une journée à température ambiante. Cette différence de réactivité entre les composés exhibant un noyau benzène et furane semble ici difficile à expliquer par de simples différences d'encombrements et demeure une des énigmes du laboratoire.

Une alternative pour la formation de l' α -aminoester **70** a depuis été utilisée au laboratoire, via une réaction d'addition-1,4 de méthylzincique (généré par l'action du méthyllithium sur le chlorure de zinc) sur le nitroacrylate d'éthyle (**44**), décrite par Fornicola *et al.*²²⁷ La réduction de l'adduit **69** au moyen de zinc et d'acide chlorhydrique conduit alors à l' α -aminoester **70** (Schéma 38).[†]

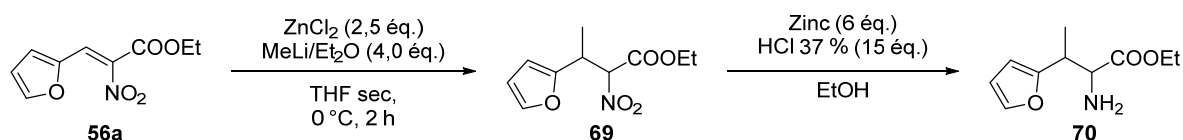


Schéma 38 : voie d'accès alternative au β -méthylfurylalaninate d'éthyle **70** selon Fornicola *et al.*

d. Réduction des α -hydroxyiminoesters

La réduction des α -hydroxyiminoesters **64** en α -aminoesters **21** a été effectuée de manière similaire à la réduction des α -nitroesters **57**, à l'aide de poussière de zinc (< 10 μm) et d'acide chlorhydrique concentré dans l'éthanol (Schéma 39).

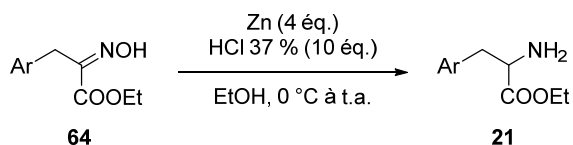


Schéma 39 : réduction des α -hydroxyiminoesters **64** en α -aminoesters **21**

À partir d' α -hydroxyiminoesters purifiés, ces conditions permettent d'obtenir les composés souhaités sans purification autre que le traitement final de la réaction avec des rendements généralement supérieurs à 80 %. Il est toutefois primordial de traiter le mélange réactionnel avec un excès d'ammoniaque avant extraction afin de casser les complexes de sels de zinc présents en solution.

e. Champ d'application de la réaction

Il convient de souligner que les rendements présentés ci-dessous sont susceptibles de refléter des problèmes aussi bien à l'étape de réduction de la double liaison des arylidènemalonates (tout particulièrement lors de l'utilisation de tétrahydroborate de sodium) qu'à l'étape d'oximation.

Par ailleurs, nous présentons ci-après les résultats obtenus par l'ensemble du laboratoire afin de montrer la portée de cette voie de synthèse. Les produits marqués d'une dague « † » ont ainsi été synthétisés par Yves Janin ou Glwadys Gagnot, sans aucune manipulation de l'auteur, et ne sont donc pas décrits en partie expérimentale.

Tableau 3 : rendements relatifs à la formation des α -aminoesters **21** via la formation d' α -hydroxyiminoesters **64**

$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R} \\ \text{32} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{R} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{C}(\text{NOH}) \text{---} \text{COOEt} \\ \text{64} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{R} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{C}(\text{NH}_2) \text{---} \text{COOEt} \\ \text{21} \end{array} $				
	R	64 depuis 32	21	Rdt global
a	Furan-2-yle	33 % [†]	89 %	29 %
c	5-Méthylfuran-2-yle	33 % [†]	81 %	27 %
d [†]	5-Éthylfuran-2-yle	34 %	94 %	32 %
e [†]	4,5-Diméthylfuran-2-yle	10 %	90 %	9 %
f	5-Cyclopropylfuran-2-yle	29 %	88 %	25 %
h	5-Trifluorométhylfuran-2-yle	36 %	95 %	34 %
i [†]	Phényle	61 %	—	—
k	<i>o</i> -Tolyle	61 %	85 %	52 %
l [†]	<i>m</i> -Tolyle	63 %	85 %	54 %
m	<i>p</i> -Tolyle	60 %	87 %	52 %
n	<i>p</i> -Isopropylphényle	48 %	78 %	37 %
o	<i>m</i> -Propylphényle	22 % ^a	90 %	20 %
p	<i>p</i> -Propylphényle	40 % ^a	85 %	34 %
q	<i>m</i> -Cyclopropylphényle	27 % ^b	89 %	24 %
r	<i>p</i> -Cyclopropylphényle	26 % ^b	80 %	21 %
s	<i>o</i> -Méthoxyphényle	60 %	83 %	50 %
t [†]	<i>m</i> -Méthoxyphényle	—	—	75 %
v [†]	<i>o</i> -Trifluorométhylphényle	—	—	61 %
w [†]	<i>m</i> -Trifluorométhylphényle	—	—	76 %
x [†]	<i>p</i> -Trifluorométhylphényle	62 %	91 %	56 %
y	<i>o</i> -Fluorophényle	57 %	88 %	50 %
z [†]	<i>m</i> -Fluorophényle	65 %	89 %	58 %
aa [†]	<i>p</i> -Fluorophényle	—	—	81 %
ab	<i>o,o</i> -Difluorophényle	54 %	94 %	51 %
ac	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3)	51 %	92 %	47 %
ad	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5)	50 %	95 %	48 %
ae	<i>m,m</i> -Difluorophényle	46 %	84 %	39 %
af [†]	<i>o,p</i> -Difluorophényle	50 %	85 %	43 %
ag	<i>o</i> -Chlorophényle	23 %	96 %	22 %
ah	<i>m</i> -Chlorophényle	26 %	92 %	24 %
ai	<i>p</i> -Chlorophényle	37 %	73 %	27 %
ak	<i>p</i> -Bromophényle	42 %	76 %	32 %
al [†]	Cyclopentyle	35 %	85 %	30 %
am [†]	Cyclohexyle	50 %	92 %	46 %
an [†]	Tétrahydrofuran-2-yle	—	—	36 %

$\text{O}=\text{C}-\text{R} \rightleftharpoons \text{R}-\text{CH}(\text{NOH})-\text{COOEt} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOEt}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> 32 64 21 </div>				
	R	64 depuis 32	21	Rdt global
ao †	5-Éthylthiophèn-2-yle	29 %	92 %	27 %
ap †	3-Méthylthiophèn-2-yle	32 %	89 %	28 %
aq †	4,5-Diméthylthiophèn-2-yle	31 %	87 %	27 %
ar †	2-Pyridyle	49 %	56 %	27 %
as †	3-Pyridyle	43 %	63 %	27 %

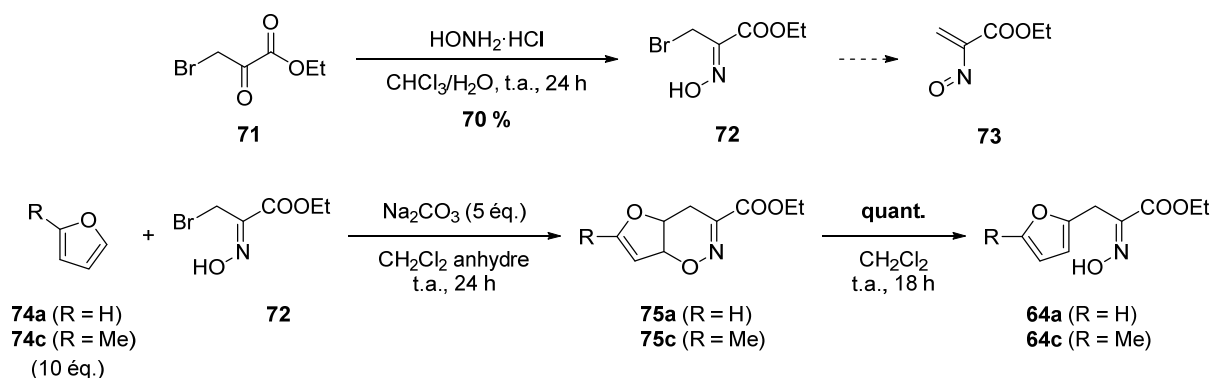
† Synthèse par Yves Janin ou Glwadys Gagnot

^a Via cyclopropylation et réduction/ouverture par hydrogénation catalytique (Schéma 32)^b Via cyclopropylation et réduction par NaBH₄ de l'arylidènemalonate (Schéma 33)

I.C.2. Via cycloaddition [4+2]

Une dernière voie d'accès décrite par Thomas Gilchrist²⁶¹⁻²⁶² a été étudiée avec comme objectif la maîtrise d'une préparation rapide, moins coûteuse et plus générale d'α-aminoesters comprenant un noyau furane substitué.

Celle-ci consiste en une cycloaddition [4+2] à demande inverse d'électrons entre un furane qui peut être substitué (par exemple par des alkyles) et le 2-nitrosoacrylate d'éthyle (**73**). Celui-ci est généré *in situ* par la réaction entre le 3-bromo-2-hydroxyiminopropanoate d'éthyle (**72**) et une base. Gilchrist rapporte ainsi en 1979²⁶¹ la synthèse de **75a** en utilisant un excès de furane (**74a**) avec un rendement de 46 % et en 1987²⁶³ celle de **75c** partant du 2-méthylfurane (**74c**) avec un rendement de 50 %. Il décrit également dans ce dernier article l'ouverture quantitative en solution des cycloadduits intermédiaires dihydro-4*H*-furo[2,3-*e*]oxazines **75a,c** en α-hydroxyiminoesters correspondants **64a,c**.

Schéma 40 : synthèse d'α-hydroxyiminoesters **64a,c** selon Gilchrist^{261, 263}

Cette synthèse permet un accès en deux étapes à partir du bromopyruvate d'éthyle (**71**) commercial (ou en trois étapes à partir du pyruvate d'éthyle, encore moins coûteux) à des α-hydroxyiminoesters comportant un noyau furane avec des rendements qui restent modestes, mais qui sont à mettre en perspective avec les 30-35 % obtenus via les condensations sur le malonate de diéthyle (**43**) et les réductions parfois hasardeuses avec le tétrahydruroborate de sodium (cf. Partie II : I.C.1.b). Enfin, il est probablement pertinent de mentionner ici les prix passablement élevés des aldéhydes **32d** (5-éthylfurfural, 35 €/g), **32e** (4,5-diméthylfurfural, 32 €/g) ou **32g** (5-propylfurfural, 1460 €/g) en comparaison avec les alkylfuranes correspondants **74d** (3 €/g), **74e** (18 €/g) ou **74g** (7 €/g).

Une première modification apportée aux conditions originales par Yves Janin a été l'utilisation de 0,01 équivalent de bromure de tétrabutylammonium (NBu₄Br, TBAB) comme catalyseur de transfert de phase. Il a ainsi pu être préparé avec des temps de réactions courts une sélection d' α -hydroxyiminoesters (Tableau 4, entrées 1 à 4) avec des rendements plus importants que précédemment (38 % à comparer à 10 % pour **64e**).

Étant donné sa facilité d'exécution et son potentiel pour fournir en un temps record des grosses quantités de produit, nous avons essayé d'optimiser les rendements de cette réaction. Nous avons ainsi montré dans un premier temps qu'un changement de solvant n'était pas délétère en utilisant l'acétate d'éthyle (solvant que nous utilisons en routine pour les extractions) en lieu et place du toluène (Tableau 4, entrées 5 et 6), entraînant une augmentation marginale des rendements. De même, l'ajout d'eau à la réaction permet toujours d'obtenir **64e** avec un rendement de 50 %.

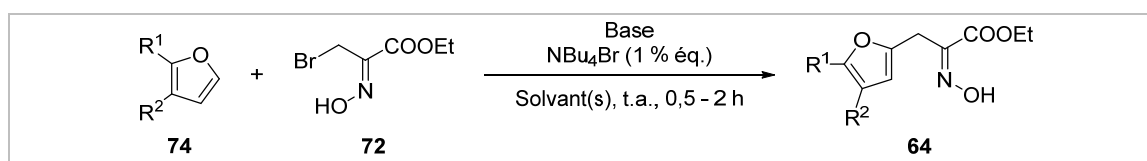
Nous avons également essayé d'étudier l'éventuelle influence du contre-ion du carbonate sur la réaction de cycloaddition. Ainsi, dans l'acétate d'éthyle, aucune conversion n'est observée en deux heures avec le carbonate de lithium (entrée 8) lorsque les mêmes réactifs fournissent 46 % de **64c** avec le carbonate de sodium (entrée 5) ; l'ajout d'eau au mélange réactionnel permet toutefois de restaurer la réactivité de la base (entrée 9). De manière inexplicable, nous avons observé par RMN avant purification que l'utilisation de carbonate de césium (entrée 10) mène majoritairement au cycloadduit **75c** (représenté Schéma 40), qui ne s'ouvre que lors de son adsorption sur silice avant chromatographie pour finalement fournir 33 % de **64c**.

Enfin, nous avons observé qu'un dégagement gazeux, probablement du dioxyde de carbone, avait lieu durant la réaction – ce qui permet d'ailleurs de « surveiller » l'avancement des réactions à l'aide d'un bulleur. Aussi, l'hydrogénocarbonate issu de la déprotonation de **72** par le carbonate doit lui aussi participer activement à la réaction. Toutefois, le premier essai utilisant l'hydrogénocarbonate de sodium comme base dans le toluène n'a montré aucune conversion (entrée 12). Ici encore, l'ajout d'eau au milieu réactionnel a en revanche permis de restaurer des rendements autour de 50 % (entrées 13 et 14).

Toutes ces données convergent vers des différences de disponibilité de la base en phase organique malgré ou grâce au catalyseur de transfert de phase, avec le carbonate de sodium permettant la réaction dans divers solvants, mais le carbonate de lithium ou l'hydrogénocarbonate de sodium nécessitant leur dissolution en phase aqueuse avant de pouvoir participer à la réaction. Un essai tardif a également montré que la présence d'eau permettait de se passer du catalyseur de transfert de phase, soulignant l'importance de celui-ci à l'interface solide-liquide.

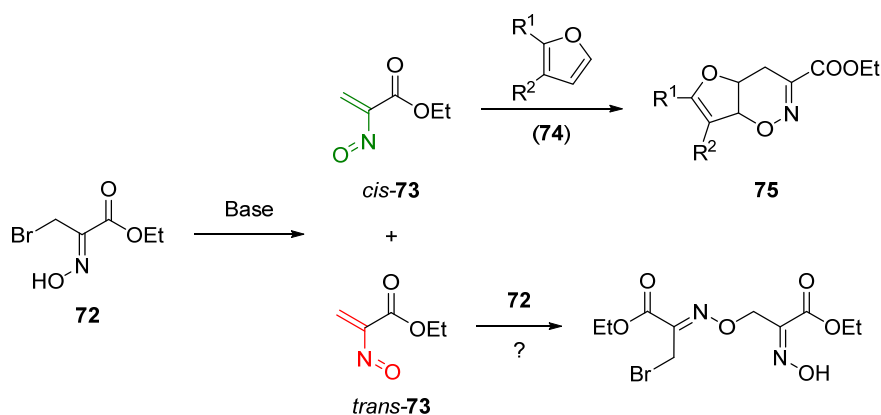
Ces essais ont permis de reproduire les rendements obtenus par Gilchrist avec des quantités stœchiométriques de furanes **74** et de 3-bromo-2-hydroxyiminopropanoate d'éthyle (**72**), mais les tentatives d'amélioration de ceux-ci sont restées vaines et les limitations observées pourraient être dépendantes des propriétés électroniques intrinsèques de nos réactifs, très importantes dans les réactions de cycloaddition.

Tableau 4 : conditions modifiées pour la synthèse d'α-hydroxyiminoesters **64** via une cycloaddition [4+2]

							
		R ¹	R ²	Base	Solvant	Temps	Rdt 64
1†	c	Me	H	Na ₂ CO ₃	Toluène	2,5 h	42 %
2†	d	Et	H	Na ₂ CO ₃	Toluène	30 min.	43 %
3†	g	Pr	H	Na ₂ CO ₃	Toluène	30 min.	40 %
4†	e	Me	Me	Na ₂ CO ₃	Toluène	30 min.	38 %
5	c	Me	H	Na ₂ CO ₃	AcOEt	40 min.	46 %
6	e	Me	Me	Na ₂ CO ₃	AcOEt	2,0 h	48 %
7	e	Me	Me	Na ₂ CO ₃	AcOEt/H ₂ O 2:1	45 min.	50 %
8	c	Me	H	Li ₂ CO ₃	AcOEt	2,0 h	n.i. ^a
9	c	Me	H	Li ₂ CO ₃	AcOEt/H ₂ O 2:1	2,0 h	50 %
10	c	Me	H	Cs ₂ CO ₃	AcOEt/H ₂ O 5:1	1,0 h	32 %
11	c	Me	H	K ₂ CO ₃	AcOEt/H ₂ O 5:1	1,0 h	44 %
12†	c	Me	H	NaHCO ₃	Toluène	1,5 h	n.i. ^a
13	c	Me	H	NaHCO ₃	AcOEt/H ₂ O 1:1	2,0 h	44 %
14†	c	Me	H	NH ₄ HCO ₃	AcOEt/H ₂ O 5:1	30 min.	53 %

† Synthèse par Yves Janin ; ^a Conversion nulle

Une autre explication pourrait être l'existence d'un équilibre trop lent entre les isomères *cis* et *trans* du 2-nitrosoacrylate d'éthyle (**73**) issu du traitement de l'oxime **72** par une base, l'isomère *trans* comportant une géométrie moléculaire non favorable à la cycloaddition. Ce serait alors le ralentissement (voire le blocage) de la libre rotation de la liaison C–N due à une conjugaison²⁶⁴ qui limiterait nos rendements en cycloadduit **75** à un maximum proche de 50 % quelles que soient les conditions réactionnelles essayées. Le devenir de l'isomère *trans* reste incertain, mais nous avons pu constater en CL/SM la formation dans le milieu réactionnel de composés résultant de la réaction entre **72** et **73** sans pour autant pouvoir les caractériser complètement.



I.D. De la stabilité des α -aminoesters

Relativement tardivement et à notre grand désarroi, nous avons redécouvert que les α -aminoesters conservés sous forme de base libre peuvent réagir sur eux-mêmes pour donner les piperazine-2,5-diones correspondantes (Schéma 42), ceci se traduisant le plus souvent par l'apparition d'un insoluble dans les flacons après quelques mois, aussi bien à température ambiante qu'à -20 °C.

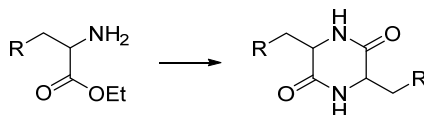


Schéma 42 : auto-réaction des α -aminoesters sous forme de base libre

Une première solution lorsque de grosses quantités devaient être faites était de conserver des stocks des α -hydroxyiminoesters précurseurs et de ne procéder à la réduction de l'oxime en amine (qui ne nécessite le plus souvent comme purification qu'une extraction) qu'au dernier moment.

Une seconde solution était bien évidemment la conservation des α -aminoesters sous forme de chlorhydrate. Ceux-ci peuvent s'obtenir de manière quasi-quantitative en faisant buller du chlorure d'hydrogène (formé par ajout d'acide sulfurique concentré sur du chlorure de sodium²⁶⁵ ou d'acide chlorhydrique concentré sur du chlorure de calcium²⁶⁶) dans une solution d' α -aminoesters dans l'éther diéthylique.

Toutefois, cette méthode induit une polymérisation au point d'entrée du gaz lorsque le produit contient un noyau furane, ce qui était forcément problématique pour des précurseurs d'analogues de la furimazine (7), et nous a longtemps laissé penser que les chlorhydrates de furylalaninates d'éthyle étaient impossibles à isoler.

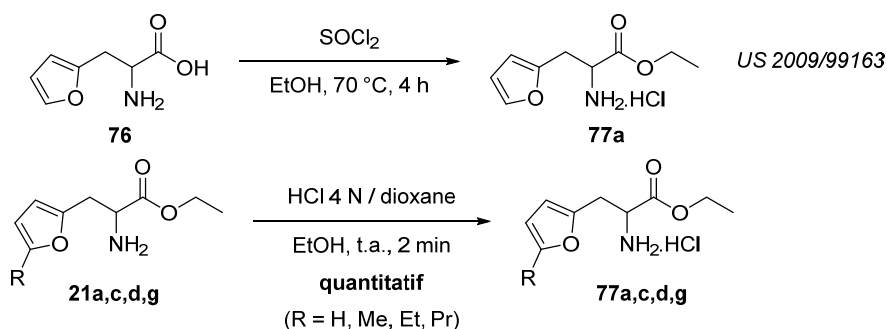


Schéma 43 : synthèse du chlorhydrate de furylalaninate d'éthyle (**77a**) et analogues

Une recherche plus tardive dans la littérature technique nous montrera cependant que l'estérification de la furylalanine (**76**) dans l'éthanol avec du chlorure de thionyle est possible et conduit à 95 % de chlorhydrate de furylalaninate d'éthyle (**77a**) (Schéma 43).²⁶⁷ Dans notre cas, la dilution des α -aminoesters **21** dans un solvant protique préalablement à l'addition de chlorure d'hydrogène en solution dans le 1,4-dioxane a conduit de manière quantitative après évaporation des solvants aux chlorhydrates d' α -aminoesters souhaités **77**. Aucune dégradation n'est observable par RMN après deux mois de conservation sans précaution particulière à température ambiante.

II - CONSTRUCTION DU NOYAU PYRAZINE

Deux stratégies de construction du noyau pyrazine ont été utilisées au laboratoire (Schéma 44). La première approche est basée sur une réaction connue permettant d'obtenir les 2-hydroxypyrazines **79** en une étape à partir d'arylglyoxals **30** et d' α -aminoamides **78** (voie 1) ; la seconde est complètement originale et permet d'obtenir les pyrazines désirées en 4 ou 5 étapes à partir d' α -aminoesters **21** et de β -nitrostyrènes **80** (voie 2).

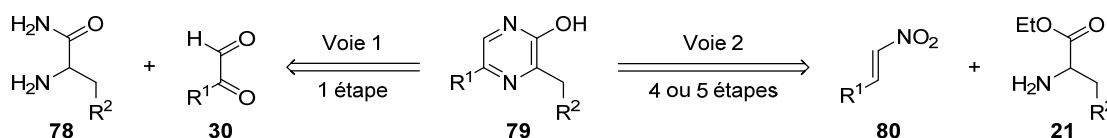


Schéma 44 : construction des 2-hydroxypyrazines **79**

II.A. Voie 1

La première approche utilisée pour la synthèse des 2-hydroxypyrazines **79** a été découverte par Jones en 1949²⁶⁸⁻²⁶⁹ et légèrement simplifiée par Karmas²⁷⁰ trois ans plus tard. Elle met en jeu la condensation de composés α,β -dicarbonylés, tels que les cétoaldéhydes **30**, sur des α -aminoamides **78** en présence d'hydroxyde de sodium concentré (12,5 N) dans l'eau ou le méthanol refroidi au moins à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schéma 45).

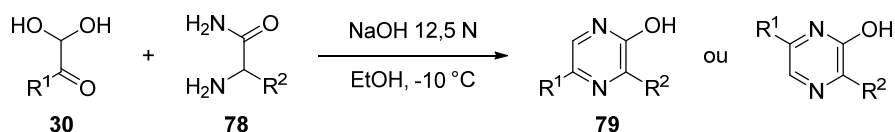


Schéma 45 : synthèse des 2-hydroxypyrazines selon Jones²⁶⁸⁻²⁶⁹

L'intérêt majeur de cette voie de synthèse est qu'elle permet la formation du cycle pyrazine en une unique étape de condensation. Dans notre cas, les très nombreux α -aminoesters préparés ci-avant pouvaient facilement être transformés en α -aminoamides **78** et cette approche nous paraissait donc toute indiquée, *a minima* au départ de phénylglyoxal (**30i**, $R^1 = \text{Ph}$), pour accéder à de nombreuses 2-hydroxypyrazines **79** diversement substituées en position 3.

II.A.1. Synthèse des α -aminoamides

Les α -aminoesters **21** sont facilement convertis en α -aminoamides **78** par chauffage dans une solution d'ammoniac. Quelques expériences menées avec de l'éthanol ammoniacal 2 N préparé au laboratoire ont montré des temps de réaction beaucoup trop importants (plusieurs jours, entrées 2 et 3), ce qui nous a laissé penser que le titre en ammoniac dissous était insuffisant.

L'utilisation d'une solution ammoniacale 7 N commerciale et d'un réacteur autoclave en acier a toutefois permis d'obtenir la phénylalaninamide (**78i**) à partir de l'ester éthylique de phénylalanine (**21i**) avec des rendements de l'ordre de 80 % (entrée 3). Il est apparu lors d'autres essais que l'agitation du milieu dans le réacteur est cruciale, une mauvaise agitation entraînant une chute significative du rendement et l'apparition de solides non identifiés dans le milieu réactionnel (entrée 4, 62 % contre 87 %).

Nous avons ainsi pu synthétiser au laboratoire les α -aminoamides **78** avec de bons rendements, excepté **78a** dont la synthèse n'a toutefois jamais été répétée pour identifier la source du problème (Tableau 5).

Tableau 5 : conversion des α -aminoesters **21** en α -aminoamides **78**

$ \begin{array}{ccc} \text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OEt} & \xrightarrow{\text{NH}_3} & \text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \textbf{21} & & \textbf{78} \end{array} $						
		R	Source NH ₃	Température	Temps	Rdt 78
1	i	Phényle	NH ₃ /EtOH 4 N	55 °C	15 j.	70 %
2	i	Phényle	NH ₃ /EtOH 2 N	100 °C	4 j.	61 %
3	i	Phényle	NH ₃ /MeOH 7 N	70 °C	24 h	78-83 %
4†	i	Phényle	NH ₃ /MeOH 7 N	90 °C	20 h	62-87 %
5†	a	Fur-2-yle	NH ₃ /MeOH 3,5 N	70 °C	20 h	37 %
6†	an	Tétrahydrofur-2-yle	NH ₃ /MeOH 7 N	70 °C	20 h	99 %
7†	ar	Pyrid-2-yle	NH ₃ /MeOH 7 N	70 °C	20 h	90 %
8†	as	Pyrid-3-yle	NH ₃ /MeOH 7 N	70 °C	22 h	98 %

II.A.2. Synthèse des arylglyoxals

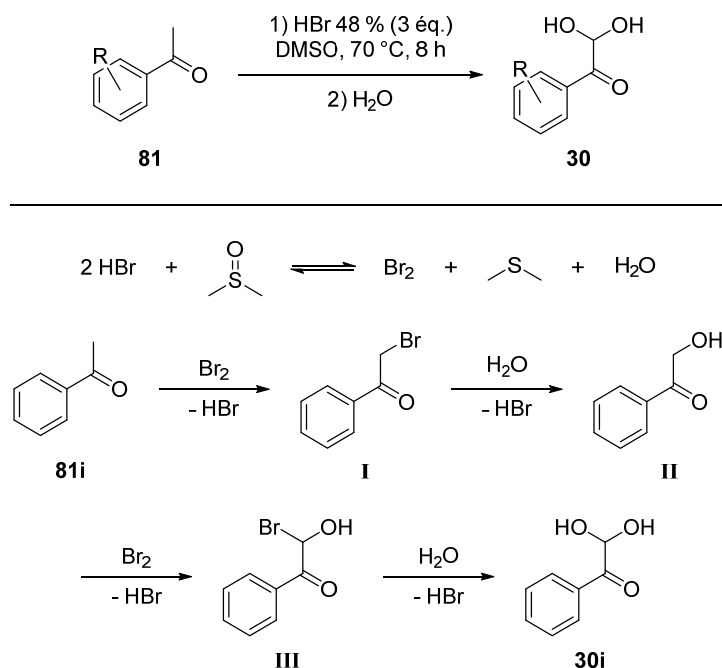
Les premiers analogues de furimazine (**7**) synthétisés au laboratoire ne nécessitaient pas la préparation d'arylgyoxals **30** particuliers, le phénylgyoxal (2-oxo-2-phénylacetaldehyde, **30i**) étant commercialement disponible. Toutefois, notre volonté d'étudier l'influence de substituants sur tous les noyaux aromatiques des analogues de luciférines nécessitait la synthèse d'une pluralité d'intermédiaires.

Une revue détaillée de la synthèse des arylglyoxals et de leur utilisation en synthèse organique a été publiée par Eftekhari-Sis *et al.* en 2013.²⁷¹ Leur préparation a principalement été effectuée par oxydation au dioxyde de sélénium(IV) des acétophénonnes en quelques heures dans le 1,4-dioxane bouillant.²⁷²⁻²⁷⁵

Il est également possible de procéder à l'oxydation du méthyle grâce à l'action conjuguée d'acide bromhydrique concentré et de diméthylsulfoxyde (DMSO),²⁷⁶⁻²⁷⁹ solution adoptée au laboratoire afin d'éviter l'utilisation de dérivés de sélénium (Schéma 46).

Un mécanisme pour cette oxydation d'acétophénone a été proposé par Floyd *et al.*,²⁷⁶ s'appuyant sur une communication originale de Kornblum²⁸⁰ rapportant la conversion de la 2-bromoacétophénone (**I**) en phénylgyoxal (**30i**) par simple agitation dans le DMSO à température ambiante.

Des essais préliminaires par Floyd *et al.* ont cependant montré que cette conversion est médiocre dans le DMSO anhydre et nécessite l'ajout d'une faible quantité d'eau pour aboutir au phénylgyoxal **30i**, supposant par conséquent une solvolysé de la 2-bromoacétophénone (**I**) pour former le cétoalcool intermédiaire **II**. Dans le cas des oxydations d'acétophénonnes en présence d'acide bromhydrique concentré, de faibles quantités de dibrome seraient créés par réaction de l'acide sur le diméthylsulfoxyde et permettrait la bromation initiale de l'acétophénone formant **I**, puis celle du cétoalcool **II**. La solvolysé de **III** aboutirait ainsi au phénylgyoxal hydraté souhaité.



Nous avons ainsi pu synthétiser jusqu'à 15 grammes de *p*-benzyloxyphénylglyoxal (**30j**, R = *p*-OBn) avec des rendements entre 91 et 93 %.²⁷⁷ Cet excellent résultat n'a toutefois pas pu être reproduit au départ d'autres acétophénone (**81i,s,z**, R = H, *o*-OMe ou *m*-F) malgré leur description dans la littérature : la réaction aboutit alors dans le meilleur des cas à un mélange de produits dont seule une partie réagit à l'étape suivante, soit à de nombreux produits non identifiés et présentant en RMN des signaux mal définis (peut-être des polymères). Cette difficulté a ainsi constitué le premier goulot d'étranglement de cette voie de synthèse des 2-hydroxypyrazines **79**.

II.A.3. Formations de la pyrazinone

Comme montré dans le Schéma 45, la condensation d'un α-aminoamide **78** et d'un arylglyoxal **30** peut entraîner la formation de deux isomères, avec le substituant R¹ (différent de H) pouvant aboutir en position 5 ou 6 de la pyrazine, avec d'importantes variations dans les proportions selon les substrats. Cette régiosélectivité n'a à notre connaissance jamais été rationalisée et l'étude ultérieure de l'influence de la vitesse d'addition de la base et de la température par Konakahara et Takagi²⁸¹ a malheureusement été effectuée avec le glyoxal (**30**, R¹ = H), symétrique, et n'a donc pu fournir aucune indication à ce propos. Ici réside probablement l'un des plus gros inconvénients de cette réaction avec des « problèmes de régiochimie [qui] gangrènent cette voie de synthèse dès lors que des composés 1,2-dicarbonylés asymétriques sont utilisés ».^{282,‡}

Nous avons tout de même exploré au laboratoire l'applicabilité de cette réaction partant de réactifs non symétriques pour obtenir des 3-benzyl-5-arylpiazin-2-ols **79** (Schéma 47). À -78 °C dans le méthanol, un mélange de chlorhydrate de phénylalaninamide (**82i**), de phénylglyoxal (**30i**) et de soude 3,5 M en excès (**A**) permet d'obtenir environ 60 % de produits, avec un ratio **79a/83** 90:10. Dans les mêmes conditions, l'utilisation de triéthylamine à la place de la soude conduit à une quantité similaire de

‡ « Regiochemical issues plague the latter route when unsymmetrical 1,2-dicarbonyl compounds are used. »

produit, mais avec un ratio **79a/83** inversé (5:95, **B**), ce que nous avons également observé lorsque la solution de soude était trop diluée (0,7 M, **C**).

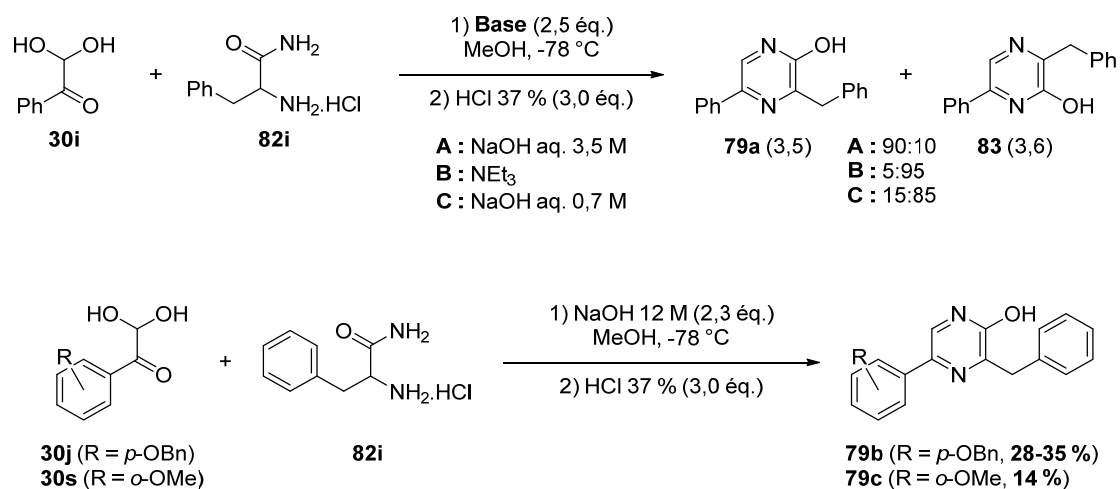


Schéma 47 : réaction d'arylglyoxals **30** et de la phénylalaninamide (**82i**)

Nous avons par conséquent décidé de nous rapprocher des conditions originales de Jones, ce qui nous a permis de synthétiser **79c** (partant de l'arylglyoxal **30s** non purifié) et **79b** avec des rendements médiocres (respectivement 14 et 28 %). Un essai utilisant un excès de chlorhydrate de phénylalaninamide (**82i**) a permis d'améliorer le rendement de **79b** jusqu'à 35 %.

Il est toutefois important de noter que l'obtention d'un mélange de régioisomères est d'autant plus problématique que leur séparation est extrêmement difficile. Il est possible de recristalliser les isomères « 3,5 » dans le toluène, mais généralement avec de mauvais rendements, et nous n'avons pas réussi à les séparer convenablement par chromatographie sur gel de silice. Nous avons également essayé de les séparer après chloration (cf. II.C), mais sans grand succès.

II.A.4. Conclusion

La synthèse des 2-hydroxypyrazines **79** selon Jones permet en théorie d'obtenir très rapidement les molécules cibles, ce qui lui procure un intérêt indéniable dans les cas simples. Toutefois, nos difficultés de préparation d'arylglyoxals **30** diversement substitués et le comportement erratique de l'étape de condensation ont considérablement limité le champ d'application de cette réaction. Ayant besoin pour nos études de relations « structure-luminescence » de varier la nature des substituants sur toute position de la molécule, nous avons privilégié *de facto* la seconde voie d'accès qui s'est avérée offrir une bien plus grande souplesse d'utilisation.

La compréhension du mécanisme de cette réaction et des paramètres permettant d'influer efficacement sur la régiosélectivité ou les rendements reste cependant un sujet d'étude de notre équipe de recherche tant cette approche serait intéressante pour la synthèse à grosse échelle (100 g à 1 kg) de certains de nos substrats.

II.B. Voie 2

La seconde voie d'accès aux 2-hydroxypyrazines **79**, dont l'analyse rétrosynthétique est présentée dans le Schéma 48, exploite pleinement les α -aminoesters **21** (ou leurs chlorhydrates **77**) synthétisés précédemment et met en jeu des β -nitrostyrènes **84** très facilement préparables à partir de nitrométhane (**88**) et d'aldéhydes aromatiques (**32**).

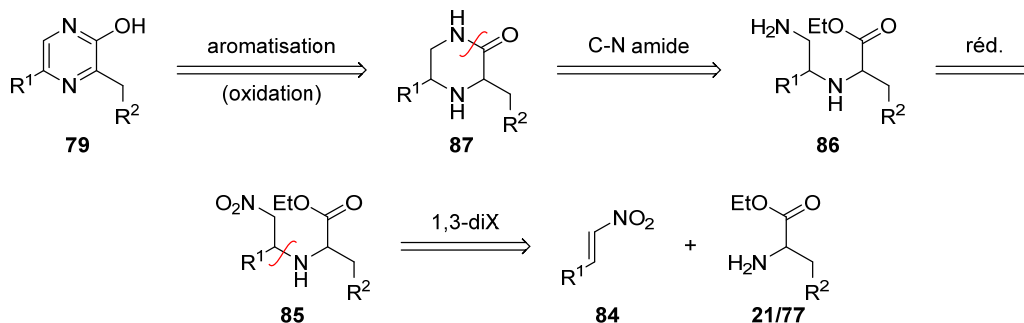


Schéma 48 : analyse rétrosynthétique de la formation des 2-hydroxypyrazines **79** (voie 2)

Cette voie 2 comporte donc quatre étapes (sans compter la synthèse préalable des composés **21/77** et **84**) et nécessite un ajustement à deux reprises des degrés d'oxydation, ce qui ne joue pas d'emblée en sa faveur. Toutefois, sa grande versatilité en a fait une alternative alléchante à la difficile préparation des 2-hydroxypyrazines selon Jones (voie 1).

II.B.1. Synthèse des β -nitrostyrènes

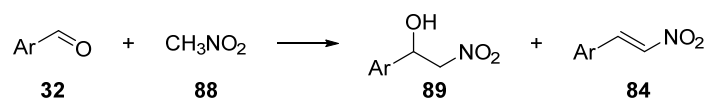


Schéma 49 : synthèse des β -nitrostyrènes **84**

La condensation du nitrométhane **99** sur les aldéhydes a été décrite en 1895 par Louis Henry²⁸³ pour fournir les nitroalcools **89** correspondants. Dans les cas favorables, une déshydratation des nitroalcools est possible, pour fournir les β -nitrostyrènes **84** d'intérêt. Diverses conditions réactionnelles ont été décrites dans la littérature : dans le nitrométhane pur en présence d'acétate d'ammonium,²⁸⁴ dans le méthanol en milieu acide,²⁸⁵ dans le méthanol avec basification au méthanolate de sodium suivi d'un traitement acide²⁸⁶ ou encore dans l'acide acétique en présence d'acétate d'ammonium.²⁸⁷⁻²⁸⁹

Malheureusement, toutes ces conditions ont mené la plupart du temps à la formation du nitroalcool **89**, avec des quantités assez variables de nitrostyrènes **84** et nous n'avons jamais réussi à obtenir l'un sans l'autre. Une amélioration tangible a été obtenue dans le cas de la condensation du benzaldéhyde (**32i**) en utilisant une faible quantité d'acétate d'ammonium et l'acide acétique comme solvant (Tableau 6, entrées 3 et 4),²⁸⁷ avec un rendement après recristallisation de 52 % (50 g). Les bons rendements obtenus sur une échelle d'environ 20 grammes avec le *p*-benzyloxybenzaldéhyde (**32j**, entrée 8) sont probablement dus au chauffage prolongé dans l'acide acétique après réaction : le nitroalcool **89j** est alors acétylé ce qui permet après élimination lors de la recristallisation dans l'éthanol l'obtention du nitrostyrène **84j** correspondant.

Tableau 6 : conditions de synthèse et rendements des β -nitrostyrènes

		Ar	MeNO ₂	Conditions	Purification	Rdt 84
1†	ai	<i>p</i> -Chlorophényle	Excès	0,3 éq. AcOH·NH ₃ , 100 °C m.o., 2 h	C.L.	30 %
2	ab	<i>o,o</i> -Difluorophényle	Excès	0,3 éq. AcOH·NH ₃ , 90 °C m.o., 2,5 h	C.L.	37 %
3	i	Phényle	Excès	0,3 éq. AcOH·NH ₃ , 90 °C m.o., 1 h	χ MeOH	30 %
4†	i	Phényle	2,0 éq.	0,5 éq. AcOH·NH ₃ , AcOH, reflux, 2 h	χ EtOH	52 %
5	j	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	1,0 éq.	HCl 5 N, MeOH, 1 h	–	n.i. ^a
6	j	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	0,3 éq.	0,3 éq. AcOH·NH ₃ , 90 °C m.o., 1 h	–	n.i. ^b
7	j	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	1,0 éq.	1,2 éq. MeONa, 15 min, t.a. ; puis 2 éq. HCl 37%, H ₂ O	χ EtOH	35 %
8	j	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	1,3 éq.	1,2 éq. MeONa, 15 min, t.a. ; puis 2 éq. HCl 37%, H ₂ O ; puis AcOH, reflux, 24 h	χ EtOH	70-75 %
9†	k	<i>o</i> -Tolyle	1,5 éq.	1,1 éq. AcOH·NH ₃ , AcOH, reflux, 8 h	C.L.	41 %
10†	l	<i>m</i> -Tolyle	1,5 éq.	1,1 éq. AcOH·NH ₃ , AcOH, reflux, 8 h	C.L.	41 %
11†	m	<i>p</i> -Tolyle	1,5 éq.	1,1 éq. AcOH·NH ₃ , AcOH, reflux, 8 h	χ EtOH	33 %
12†	z	<i>m</i> -Fluorophényle	1,5 éq.	1,1 éq. AcOH·NH ₃ , AcOH, reflux, 8 h	C.L.	35 %

^a Conversion nulle ; ^b Dégradation ; χ : recristallisation ; C.L. : chromatographie liquide (sur gel de silice)

Ici encore, plusieurs conditions ont été testées jusqu'à obtenir les produits voulus en quantités suffisantes pour poursuivre la synthèse. Dans l'absolu, une optimisation du processus pour obtenir une élimination complète de l'hydroxyle du nitroalcool serait souhaitable si le laboratoire devait être amené à synthétiser un de ces composés (non commercialement disponible) en plus grande quantité.

II.B.2. Formation des pipérazin-2-ones

La synthèse des pipérazin-2-ones **87** a été effectuée en trois étapes à partir des β -nitrostyrènes **84** et des α -aminoesters **21**, via une addition-1,4 suivie d'une réduction du groupement nitro et d'une amidification thermique intramoléculaire.

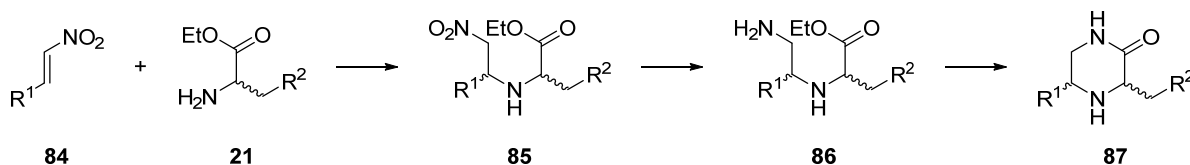


Schéma 50 : formation des pipérazin-2-ones **87**

Cet enchaînement de réactions menant à une pipérazin-2-one était à notre connaissance totalement original lors de sa découverte au laboratoire. Nous détaillerons ci-dessous les essais menés pour chaque étape de notre voie de synthèse, mais les expériences ayant été menées sans purification des intermédiaires, nous avons présenté les rendements rassemblés dans le Tableau 7 (p. 72).

a. Additions-1,4 et stabilité de l'adduit formé

Des essais d'additions-1,4 de l'ester éthylique de phénylalanine (**21i**) sur le β -nitrostyrène (**84i**) ont été effectués dans un premier temps en solution dans le tétrahydrofurane, l'acétonitrile, le dichlorométhane ou l'éthanol. Toutefois, le suivi de ces réactions par RMN ^1H (par mesure de la disparition des protons vinyliques du β -nitrostyrène (**84i**)) s'est rapidement montré totalement décorrélié des résultats obtenus après réduction du groupe nitro en amine et cyclisation. Ainsi, des essais dont l'avancement au niveau de l'étape d'addition semblaient médiocres conduisaient à la pipérazinone souhaitée avec de bons rendements et inversement.

Nous en sommes venus à penser qu'en solution l'adduit-1,4 **85** est en équilibre avec ses précurseurs. Les conversions mesurées en RMN ^1H lors de nos premiers essais ne correspondraient alors pas à l'avancement dans le milieu réactionnel, mais à celui de l'échantillon après l'évaporation nécessaire des solvants... pour pouvoir effectuer l'analyse RMN ^1H .

Nous avons par conséquent effectué les essais d'addition sans solvant ou, lorsque les deux réactifs étaient solides, en les diluant dans le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle puis en concentrant le mélange sous pression réduite pour homogénéiser le mélange et obtenir l'adduit **85** (Schéma 51). Par ailleurs, afin d'homogénéiser les mélanges d'huiles et ne possédant pas au laboratoire d'agitateur magnétique suffisamment puissant, ces réactions ont parfois été effectuées dans des ballons directement connectés à un évaporateur rotatif (« bétonnière »), dont le bain pouvait être utilisé pour chauffer et fluidifier le mélange réactionnel.

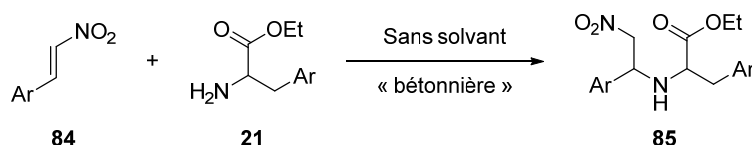


Schéma 51 : addition-1,4 des α -aminoesters **21** sur les β -nitrostyrènes **84**

Nous avons alors pu vérifier en RMN ^1H la validité de notre hypothèse avec la réversion quasi-totale en une nuit de cette addition lors de la dissolution d'échantillons dans du méthanol deutéré. La Figure 13a montre que cette réversion se traduit par la réapparition des protons vinyliques du β -nitrostyrène **84i**

autour de 8 ppm et un retour à un seul système de protons éthyliques autour de 1,5 ppm et 4 ppm (l'adduit **85** possédant deux centres asymétriques, les diastéréoisomères résultants affichent deux systèmes éthyliques en RMN ^1H). *A contrario*, l'adduit **85** est beaucoup plus stable en solution dans le chloroforme deutéré (Figure 13b).

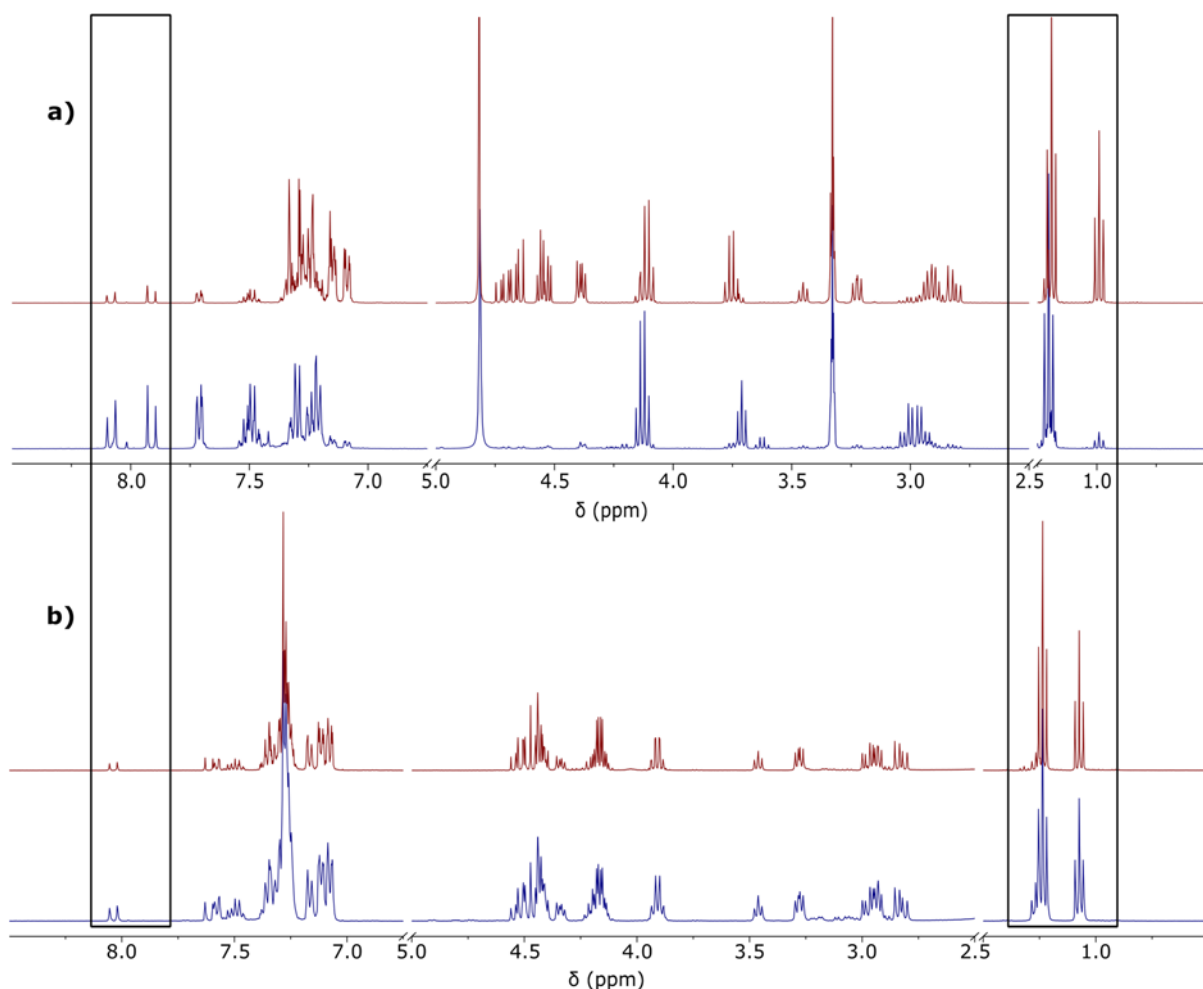


Figure 13 : suivi par RMN ^1H de l'adduit **85** en solution dans a) MeOD, b) CDCl_3 ; à $t = 0$ (rouge) et $t = 24$ h (bleu)

Une étude *a posteriori* de la littérature concernant les additions-1,4 d'amines sur le nitrostyrène ou des nitrovinyles a montré une grande variabilité de cet équilibre selon les substrats (Schéma 52). Ainsi, Chen *et al.*²⁹⁰ ont décrit la synthèse d'une pipéridine substituée **92** via la formation d'un adduit-1,4 du nitrostyrène (**84i**) sur l'ester méthylique de phénylalanine (**90**), mais qui est directement piégé par une seconde addition sur la buténone (**91**). Gabrielli *et al.*²⁹¹ quant à eux ont rapporté l'addition aisée de chlorhydrates d' α -aminoesters **94** sur un β -nitroacrylate **93**, le protocole expérimental ne permettant cependant pas de conclure sur l'occurrence des adduits **95** avant l'évaporation des solvants ; la réduction du groupe nitro permet ensuite une cyclisation en pipérazin-2-ones **96** selon un schéma assez semblable à ce que nous avons développé au laboratoire.

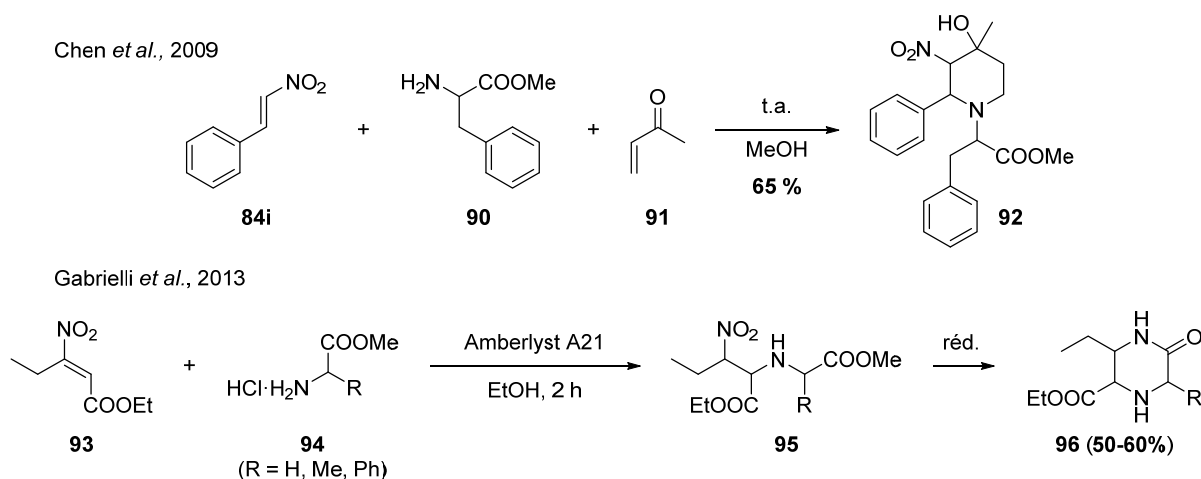


Schéma 52 : précédents d'additions-1,4 d'amines sur un nitrostyrène ou un nitrovinyle

Nous avons rapidement souhaité nous assurer de la stabilité de l'adduit-1,4 **85** dans les conditions de réduction au zinc des groupements nitro en amine déjà exposées en Partie II : I.B.2 et Partie II : I.C.1.d. En effet, la réaction s'effectue dans un mélange d'éthanol et d'acide chlorhydrique et les résultats exposés ci-dessus ne nous incitaient pas à être optimistes quant à l'utilisation de ces solvants et réactifs. Toutefois, le suivi en RMN ^1H de la stabilité de l'adduit a montré que s'il était défait en 24 heures dans l'éthanol deutéré (Figure 14a), il était relativement stabilisé par la présence d'acide chlorhydrique deutéré (DCl) avec une évolution assez limitée après une journée (Figure 14b). Il était par conséquent possible de procéder à la réduction de l'adduit dans les conditions habituelles, ce qui a d'ailleurs été effectué de manière systématique directement après l'addition-1,4, sans purification aucune.

Enfin, d'autres suivis (non montrés) ont montré que cette stabilisation en milieu acide n'était pas altérée en ajoutant un co-solvant à l'éthanol, ce qui nous a permis d'utiliser si besoin du 1,4-dioxane lors des réductions pour aider à la solubilisation des adduits **85**, et qu'elle était également efficace en présence de chlorure d'ammonium (même si cela n'a jamais été mis à profit durant ces travaux). Il est également possible partant d'un chlorhydrate d' α -aminoester **77** de dessaler ce dernier *in situ* à l'aide de triéthylamine et de procéder à l'addition-1,4 et à la réduction.

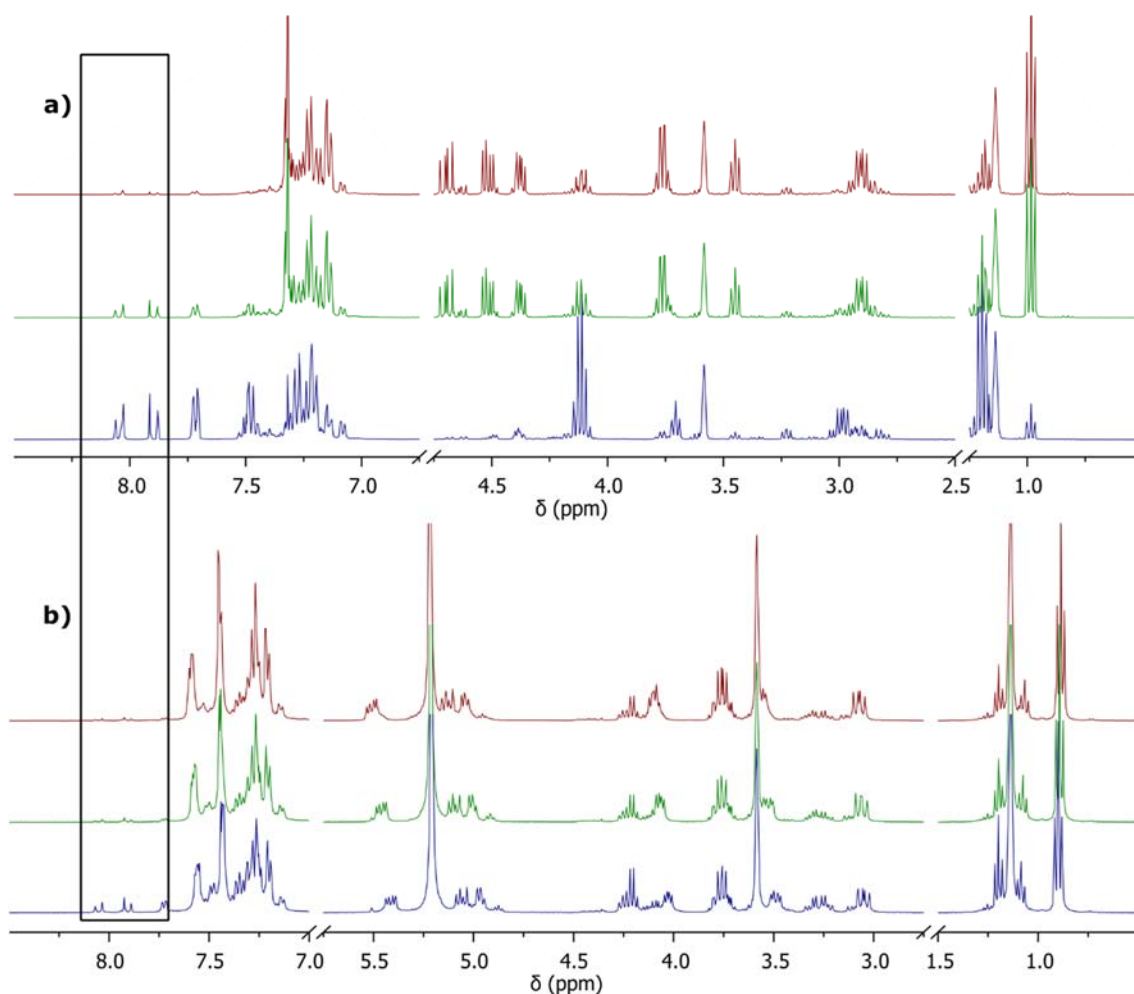


Figure 14 : suivi par RMN ^1H de l'adduit **85** en solution a) dans EtOD, b) dans EtOD + DCl ; à $t = 0$ h, 3 h et 24 h (de haut en bas)

b. Réduction de l'adduit-1,4

Plusieurs conditions de réduction des adduits-1,4 **85** ont été utilisées au commencement du projet, malheureusement sans que nous soyons à l'époque conscients de la réversibilité de la réaction d'addition dans les solvants alcooliques. Ainsi, après formation majoritaire de l'adduit-1,4 dans l'acétonitrile (dans lequel l'équilibre est plutôt déplacé vers l'adduit), une réduction catalytique au palladium²⁹² dans l'éthanol a conduit à la réduction totale du β -nitrostyrène (**84i**) au fur et à mesure de la réversion de la réaction. D'autres tentatives de réductions en utilisant le Thalès H-Cube avec du nickel de Raney²⁹¹ ou du palladium sur charbon dans l'éthanol se sont également soldés par des échecs.

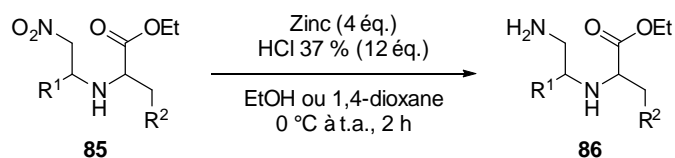


Schéma 53 : réduction des adduits-1,4 **85** (conditions finales)

Finalement, l'emploi de poussière de zinc en présence d'acide chlorhydrique dans l'éthanol à 0 °C, décrite à plusieurs occasions dans la littérature,^{290, 293-295} s'est avéré une fois encore gagnant, avec la stabilisation inattendue de l'adduit par l'acide décrite plus haut. Lorsque les adduits-1,4 **85** sont peu solubles dans l'éthanol, il est également possible de procéder à cette réaction dans le 1,4-dioxane de

manière satisfaisante, en faisant attention toutefois à ne pas geler la solution dans le bain de glace (Schéma 53). Enfin, nous n'avons jamais cherché à isoler les diamines résultantes de cette étape et systématiquement procédé à leur cyclisation comme décrit ci-après.

c. Cyclisation

L'amidification intramoléculaire a été réalisée en chauffant à haute température les adduits-1,4 réduits **86** afin de forcer la substitution de l'ester par l'amine primaire libre sans aucune activation (Schéma 54).

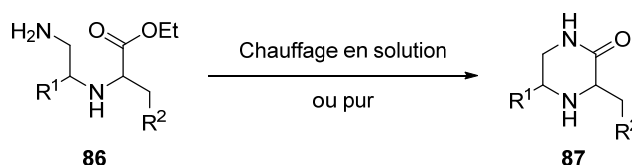


Schéma 54 : formation des pipérazin-2-ones **87** par amidification intramoléculaire

Lors des premiers essais sur de petites quantités de **86a** ($R^1 = R^2 = \text{Ph}$), il a été possible de procéder à sa cyclisation en le chauffant une heure dans le toluène à 130 °C au four à micro-ondes. Nous avons également procédé à des cyclisations dans le toluène au reflux durant une nuit, et même dans le chlorobenzène au reflux (132 °C). Sur grosse échelle (> 50 g), et après avoir observé durant quelques expériences des cyclisations précoces lors de l'évaporation de solvants dans des bains d'eau un peu trop chauds, nous avons finalement décidé de simplement chauffer l'adduit réduit **86** sans solvant à 140 °C au bain d'huile durant 3 heures pour obtenir la pipérazin-2-one correspondante.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'addition-1,4 étant un équilibre, les mélanges réactionnels peuvent contenir l' α -aminoester de départ si la réduction n'est pas assez rapide, ce qui oblige à une purification après cyclisation. Nous avons profité lorsque cela était possible de la différence de solubilité dans le cyclohexane des α -aminoesters **21** (très solubles) et des pipérazin-2-ones **87** (peu solubles) en dispersant le brut réactionnel dans celui-ci, ce qui a permis sur grosse échelle d'éviter une purification laborieuse par chromatographie sur gel de silice. Dans le cas de la pipérazin-2-one **87b** ($R^1 = p\text{-BnO-Ph}$, $R^2 = \text{Ph}$), le produit souhaité s'est avéré trop soluble dans le cyclohexane ; nous avons alors procédé à l'évaporation sous vide (4 mbar) à 170-180 °C de l'ester éthylique de phénylalanine, ce qui a permis dans le même temps la cyclisation du produit.

Lorsque des purifications des pipérazin-2-ones **87** par chromatographie sur gel de silice ont été effectuées, il était le plus souvent possible de séparer les paires de diastéréoisomères *cis* et *trans* formés. Afin de permettre leur description, nous avons procédé à l'identification des isomères dans le cas de **87a**, obtenus avec le (S)-phénylalaninate d'éthyle ((S)-**21i**) commercial énantiomériquement pur. Pour cela, nous avons identifiés en RMN grâce à une séquence DEPT-135 les carbones 3 et 5 de **87a** (seuls carbones tertiaires non aromatiques), puis les protons qu'ils portaient grâce à une expérience HSQC. Enfin, des expériences NOESY 1D²⁹⁶⁻²⁹⁸ permettent d'observer les effets Overhauser nucléaires entre les H^3 et H^5 dans le cas de l'isomère *cis* (Figure 15, gauche) et l'absence totale d'interaction entre ces protons dans le cas de l'isomère *trans* où ils sont de part et d'autre du cycle (Figure 15, droite). Les stéréoisomères des autres pipérazin-2-ones **87** ont par la suite été identifiées par comparaison des massifs aliphatiques de leurs RMN ^1H avec les isomères étudiés ci-dessus et des déplacements chimiques caractéristiques du C^5 .

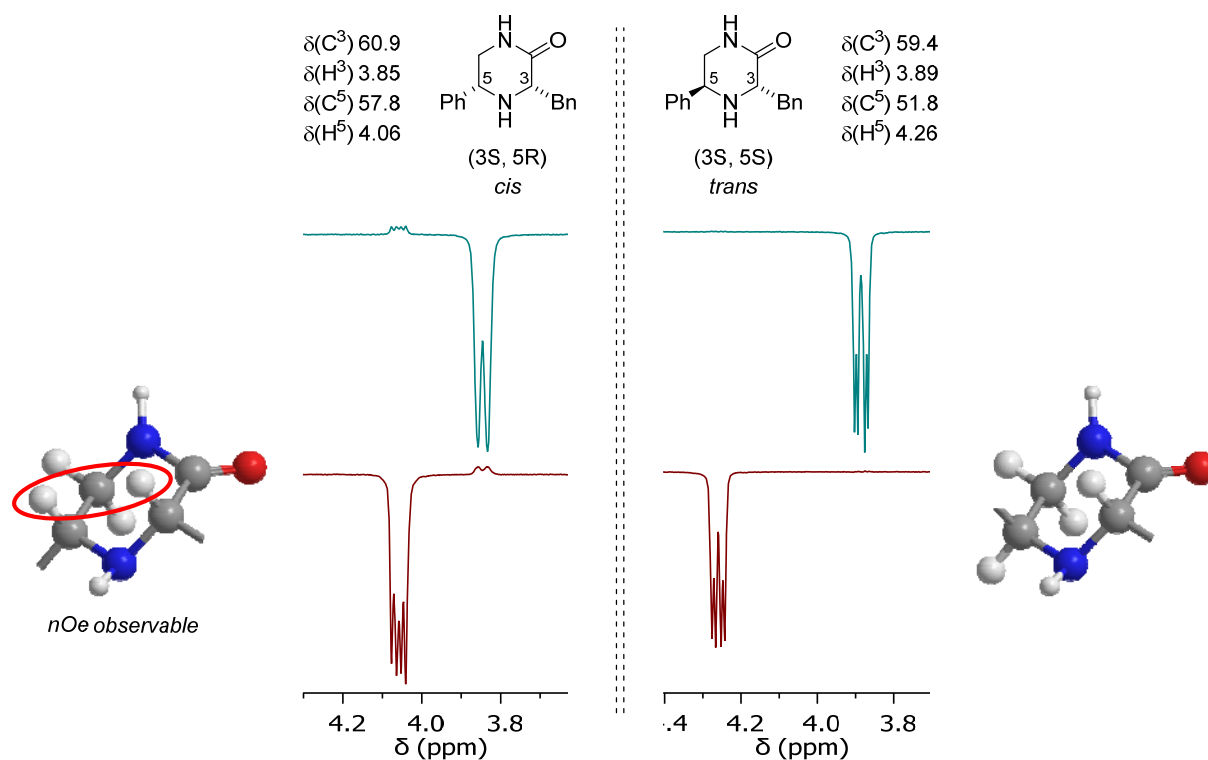


Figure 15 : discernement des diastéréoisomères des pipérazin-2-ones **84** par effet Overhauser nucléaire (seuls les diastéréoisomères formés par l'addition d'un (S)- α -aminoester sont dessinés)

Tableau 7 : rendements relatifs à la formation des pipérazin-2-ones **84** (voie 2)

		R ¹	R ² (21)	Cyclisation	Rdt 87 ^a (<i>cis/trans</i>)	Échelle (87)
1	87a	Phényle	Phényle (21a)	Tol. 130 °C (m.o.), 1 h	43 % (1,3:1)	0,50 g
2	87a	Phényle	Phényle (21a)	Tol. 150 °C (m.o.), 1 h	55 % (1,1:1)	0,64 g
3	87a	Phényle	Phényle (21a)	Tol. 130 °C (m.o.), 4 h	56 %	6,0 g
4	87a	Phényle	Phényle (21a)	Chlorobenzène, Δ, 16 h	58 % (1,1:1)	6,1 g
5	87a	Phényle	Phényle (21a)	Chlorobenzène, Δ, 15 h	72 % (2:1)	14 g
6	87a	Phényle	Phényle (21a)	Pur, 80 °C, 11h ; Tol., Δ, 3 h	64 %	40 g
7	87b	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	Phényle (21a)	Pur, 180 °C, 4 mbar	(cf. 42b)	
8	87d	Phényle	<i>o</i> -Chlorophényle (21ag)	Pur, 140 °C, 3 h	45 %	2,2 g
9	87i	<i>o,o</i> -Difluorophényle	Phényle (21a)	Pur, 140 °C, 3 h	62 %	2,0 g
10	87e	Phényle	<i>o,o</i> -Difluorophényle (21ab)	Pur, 140 °C, 3 h	61 % (1,7:1)	2,8 g
11	87f	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3 ; 21ac)	Pur, 140 °C, 3 h	63 % (1,3:1)	2,8 g
12	87g	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5 ; 21ad)	Pur, 140 °C, 3 h	61 % (1,3:1)	2,8 g
13	87h	Phényle	<i>m,m</i> -Difluorophényle (21ae)	Pur, 140 °C, 5 h	61 % (1,5:1)	2,7 g

^a Rendement calculé depuis l'α-aminoester **21**, après trois étapes

Cette voie de synthèse a permis au laboratoire d'obtenir plus d'une cinquantaine de pipérazin-2-ones **87** différentes, avec R¹ et R² le plus souvent des phényles mono- ou disubstitués par des halogènes ou des groupes alkyles, méthoxyle et trifluorométhyle (le Tableau 7 ne comporte que les analogues entièrement synthétisés par l'auteur).

II.B.3. Aromatisation

De nombreux oxydants ont été employés pour accomplir l'aromatisation de dihydroquinoxalin-2-ones **97** et fournir les 2-hydroxyquinoxalines **98** : le dioxyde de manganèse à chaud²⁹⁹ ou à froid,³⁰⁰ l'iode en milieu basique,³⁰¹ le peroxyde d'hydrogène concentré en milieu basique³⁰² ou encore avec la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)³⁰³⁻³⁰⁶ (Schéma 55).

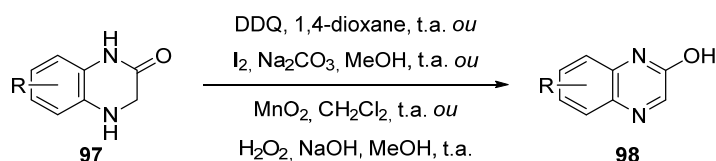


Schéma 55 : aromatisation des dihydroquinoxalin-2-ones

Toutefois, à notre connaissance, la double déshydrogénation menant aux pipérazin-2-ones **79** aromatiques qui nous concernait n'a jamais été décrite et nous avons par conséquent essayé plusieurs méthodes, notamment certaines décrites ci-dessus ou d'autres inspirées de l'aromatisation de dihydropyridines en pyridines.³⁰⁷

a. Essais non concluants

Un essai d'aromatisation de **87a** à l'aide de *N*-bromosuccinimide (NBS) dans l'éthanol, suivi en spectrométrie de masse, a montré l'aromatisation rapide d'une partie du réactif, mais avec une bromation tout aussi rapide du produit et, dans l'éthanol, la substitution du produit par des éthoxyles. De manière similaire, l'utilisation de *N*-chlorosuccinimide (NCS) dans l'acétonitrile a également provoqué des chlorations tous azimuts, l'étude des spectres RMN n'ayant malheureusement pas permis de déterminer exactement les positions réactives. Toutefois, nous avons pu observer des masses compatibles avec le produit aromatisé **79a** (M-4H) étant monosubstitué par un hydroxyle (M-5H+OH) ou un atome de chlore (M-5H+Cl) (Figure 16).



Figure 16 : analyse par CL/SM des produits de réaction entre **87a** et le *N*-chlorosuccinimide

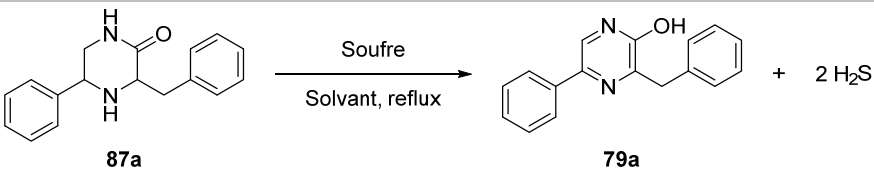
Par ailleurs, des tentatives d'aromatisation de la 3-benzyl-5-phénylpipérazin-2-one (**87a**) en la 2-hydroxypyrazine correspondante **79a** à l'air libre grâce à des quantités catalytiques de diiode en présence d'urée (originellement décrite pour l'aromatisation des dihydropyridines)³⁰⁷ se sont systématiquement soldées par l'obtention d'un mélange de réactif, de produit souhaité et de produits suroxydés. Nous n'avons pas réussi ici non plus à déterminer précisément la ou les positions suroxydées

(position benzylique, N-oxydation, position 6 de la 2-hydroxypyrazine ou de la pipérazin-2-one), les purifications par chromatographie sur silice ou par recristallisation ne permettant pas d'isoler les sous-produits avec une pureté suffisante.

b. Aromatisation au soufre (voie 2a)

Les premiers essais d'aromatisation des pipérazin-2-ones **87** à l'aide d'agents halogénés ne semblant pas aboutir, nous avons finalement eu recours à des aromatisations au soufre à haute température comme cela avait pu être fait avec des pyridines.^{308, 309, 310}

Tableau 8 : aromatisation de la 3-benzyl-5-phénylpipérazin-2-one (**87a**)

					
	S	Solvant	Température	Temps	Rdt 79a
1	15 éq.	Toluène	111 °C (reflux)	3 h	0 % (pas de conversion)
2	12 éq.	1,3-Dichlorobenzène	172 °C (reflux)	24 h	40 %
3	3,3 éq.	1,3-Dichlorobenzène	172 °C (reflux)	16 h	55 %
4	2,1 éq.	1,3-Dichlorobenzène	172 °C (reflux)	10 h	83 %

Cette réaction de déshydrogénation au soufre n'a pas lieu au reflux du toluène (Tableau 8, entrée 1) et a nécessité l'utilisation d'une température bien plus élevée (à 172 °C, au reflux du *m*-dichlorobenzène) pour obtenir une conversion complète de la pipérazin-2-one **87a**. Des manipulations ultérieures au laboratoire (non décrites) ont montré qu'il était également possible d'utiliser la décaline (décahydronaphtalène) pour effectuer cette réaction, avec un point d'ébullition autour de 190 °C ; la littérature mentionne également l'usage de tétraline (tétrahydronaphtalène, 208 °C)³⁰⁸ ou de xylène (138-145 °C)³¹¹ sur d'autres composés.

Les expériences avec un excès de soufre (entrées 2 et 3) ont également montré la sensibilité du 3-benzyl-5-phénylpyrazin-2-ol (**79a**) aux oxydants, avec des rendements se réduisant avec l'augmentation de la quantité de soufre au-delà des deux équivalents requis. Parmi la myriade de sous-produits, il a notamment été possible d'identifier le « dimère » **99** (Figure 17 ci-contre), traduisant la sensibilité importante de la position benzylique de ces molécules et pouvant peut-être expliquer les sur-halogénations observées précédemment.

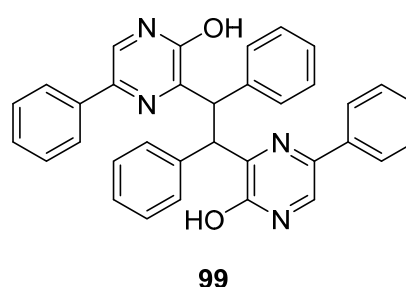


Figure 17 : sous-produit de l'aromatisation de **87a**

Finalement, cette méthode d'aromatisation a été utilisée au laboratoire avec un très léger excès de soufre (2,10 voire 2,05 équivalents), en enchainant le plus souvent avec l'activation de la position 2 du noyau pyrazine (voir le Tableau 9 pour les rendements relatifs aux manipulations enchainées), et a permis d'obtenir les composés **79** et **42** souhaités avec de bonnes conversions sur des lots de toute taille (du gramme à la trentaine de grammes).

c. Aromatisation via la formation d'un *N*-oxyde (voie 2b)

La synthèse de *N*-oxydes aromatiques est connue de longue date³¹² et leur utilité en synthèse n'est plus à démontrer.³¹³⁻³²¹ De même, les synthèses de pipéridine- ou pipérazine-*N*-oxydes à l'aide de peracides tels que l'acide peracétique ou l'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) ont précédemment été décrites dans la littérature,³²²⁻³²⁵ mais sans être des intermédiaires pour l'aromatisation des hétérocycles.

Yves Janin a cependant découvert au laboratoire que les pipérazine-*N*-oxydes **100** peuvent être aisément convertis en 2-hydroxypyrazines **79** non seulement thermiquement mais aussi grâce à l'action d'une base diluée. Ainsi, la *N*-oxydation d'une pipérazin-2-one **79** suivie d'un traitement à la soude dans l'éthanol quelques heures au reflux ou une nuit à température ambiante permet après acidification d'obtenir les 2-hydroxypyrazines **79** correspondantes (Schéma 56). À notre connaissance, cet enchaînement de réaction n'a jamais été décrit précédemment dans la littérature.

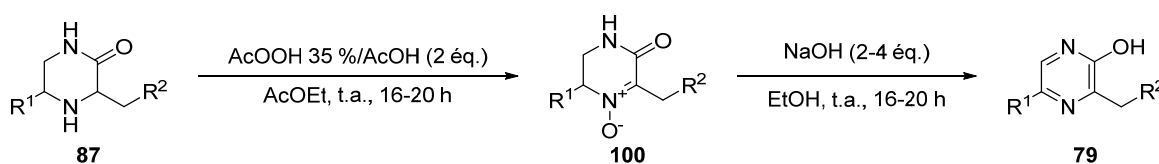


Schéma 56 : aromatisation des pipérazin-2-ones **79** via la formation d'un *N*-oxyde **100**

Afin d'obtenir les 2-hydroxypyrazines **79** pures, plusieurs stratégies ont pu être appliquées (Tableau 9). Si les pipérazin-2-ones **87** avaient été purifiées, la *N*-oxydation et le traitement basique ont été enchaînés pour fournir après acidification les produits **79** souhaités (qui peuvent être filtrés si insolubles dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique ou extraits à l'aide d'un solvant organique). *A contrario*, nous avons parfois directement procédé au traitement de bruts contenant les pipérazin-2-ones **87** au moyen d'acide peracétique avant de purifier les *N*-oxydes **100** par chromatographie sur gel de silice, puis de terminer l'aromatisation.

II.C. Activation de la position 2 de la pyrazine

L'activation de la position 2 du noyau pyrazine grâce à la substitution de l'hydroxyle par un meilleur groupe partant s'est rapidement imposée afin de permettre la N-arylation des α -aminoesters.

Nous avons tout d'abord choisi de substituer l'hydroxyle par un chlorure. Karmas et Spoerri ont décrit^{270, 326} dès les années 50 la chloration d'hydroxypyrazines à l'aide de trichlorure de phosphore au reflux (106 °C), conditions utilisées également par Ohta³¹⁵ ou Sato³¹⁷ plus récemment. Nous avons donc commencé par essayer ces conditions pour convertir **79a** en 3-benzyl-2-chloro-5-phénylpyrazine (**42a**). Toutefois, cette méthode ne montrait après 30 minutes qu'une conversion minimale, avec l'observation en spectrométrie de masse de composés polyphosphorylés,[†] et la même réaction laissée 17 heures a montré une conversion de l'ordre de seulement 10 % (Schéma 57). L'acidification des phases aqueuses (basiques) issues du traitement de la réaction a permis la récupération de l'hydroxypyrazine **79a** de départ. Cette mauvaise conversion laisse présager la formation de composés *N*-phosphorylés ne pouvant pas subir l'attaque nucléophile des ions chlorures pour conduire au dérivé chloré voulu.

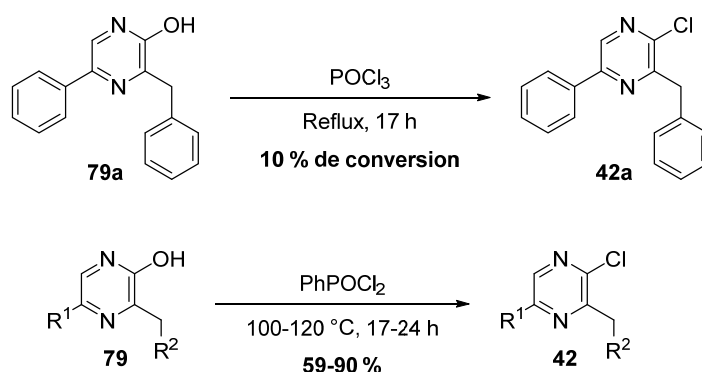


Schéma 57 : synthèse de la 3-benzyl-2-chloro-5-phénylpyrazine (**42a**) et analogues

Nous avons par la suite utilisé un agent chlorant proche, le dichlorure de phénylphosphoryle (PhPOCl_2), qui avait été utilisé avec succès par Schneller et May³²⁷ sur la 2,3-dihydroxypyrazine pour conduire à la 2,3-dichloropyrazine. Au moyen de ce réactif, nous avons pu convertir l'hydroxypyrazine **79a** en chloropyrazine **42a** souhaitée après 3 heures à 120 °C, avec des rendements entre 53 %[†] et 57 % à l'échelle du gramme. Une amélioration majeure a été rendue possible en portant une attention particulière au traitement de la réaction : nous avons ainsi observé qu'une dilution dans l'acétate d'éthyle préalablement au versement du mélange réactionnel sur de la glace pilée permet jusqu'à 30 % d'augmentation du rendement de cette réaction. Comme nous avons observé par ailleurs une possible hydrolyse des chloropyrazines **42** en milieu acide, cette dilution préalable permet probablement de limiter cette réaction secondaire lors du traitement. Nous avons par la suite adopté une température de réaction de chloration autour de 100 °C et un temps de réaction plus long (Schéma 57) pour fournir les 2-chloropyrazines **42** avec des rendements allant de 59 à 90 %.

Cette méthode de chloration est compatible avec des composés substitués par des fluors, des éthers ou des alkyles et nous a permis d'obtenir au laboratoire une quarantaine de 2-chloropyrazines différentes, dont une petite sélection est énumérée dans le Tableau 9. La voie 1 permet d'obtenir les 2-chloropyrazines en trois étapes depuis l' α -aminoester mais souffre des très mauvais rendements au stade de la formation du noyau pyrazine. *A contrario*, la voie 2 comprend cinq étapes et implique par conséquent plus de traitements ; il est toutefois possible d'enchaîner les réactions avec un minimum de

purifications par chromatographie, ce qui est évidemment intéressant dès que des quantités importantes de 2-chloropyrazines doivent être produites (cf. première entrée du tableau).

Tableau 9 : tableau relatif à la formation des 2-chloropyrazines **42***

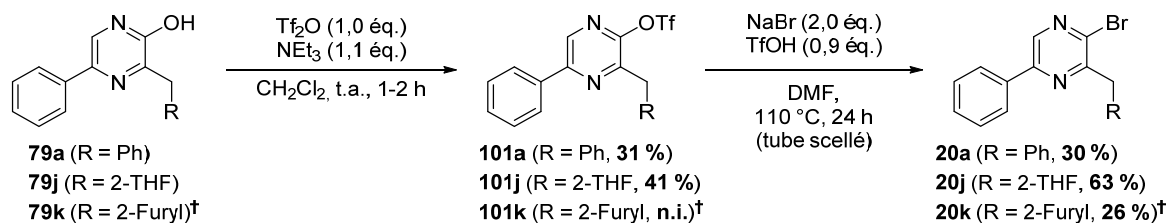
	R ¹	R ² (21)	Voie	87	100	79	42	Rdt depuis 21
a	Phényle	Phényle (21i)	2a	—	—	—	—	63 % (20,0 g)
b	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	Phényle (21i)	1	—	—	22 %	62 %	14 % (0,9 g)
b	<i>p</i> -Benzyloxyphényle	Phényle (21i)	2a	—	—	—	—	32 % (7,6 g)
c	<i>o</i> -Méthoxyphényle	Phényle (21i)	1	—	—	10 %	81 %	8 % (1,8 g)
d	Phényle	<i>o</i> -Chlorophényle (21ag)	2a	—	—	42 %	73 %	31 % (1,6 g)
e	Phényle	<i>o,o</i> -Difluorophényle (21ab)	2a	61 %	—	80 %	71 %	34 % (1,5 g)
e	Phényle	<i>o,o</i> -Difluorophényle (21ab)	2b	—	39 %	90 %	90 %	31 % (7,5 g)
f	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3 ; 21ac)	2b	—	—	43 %	80 %	35 % (1,9 g)
g	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5 ; 21ad)	2a	61 %	—	30 %	59 %	11 % (0,5 g)
g	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5 ; 21ad)	2b	—	—	39 %	69 %	27 % (1,2 g)
h	Phényle	<i>m,m</i> -Difluorophényle (21ae)	2a	61 %	—	68 %	43 % ^a	18 % (0,73 g)
h	Phényle	<i>m,m</i> -Difluorophényle (21ae)	2b	—	26 %	86 %	90 %	20 % (3,5 g)

* Les premiers rendements de chaque ligne sont exprimés par rapport à l' α -aminoester **21** correspondant

^a Purification par recristallisation (MeOH)

D'autres méthodes d'activation de la position 2 de la pyrazine ont été utilisées au laboratoire, soit lors des essais préliminaires de N-arylation, soit lorsque sa chloration était problématique.

Ainsi, la réaction du dichlorure de phénylphosphoryle sur l'hydroxypyrazine **79j**, présentant un cycle tétrahydrofurane en R², a entraîné l'ouverture et la polychloration de ce dernier. Une alternative a été trouvée en procédant en premier lieu à une triflation de l'hydroxypyrazine **79j** avec un rendement de 41 %, puis en substituant thermiquement le triflate par un bromure,³²⁸ pour obtenir la 2-bromopyrazine **20j** avec un rendement de 63 % (Schéma 58).

Schéma 58 : formation des 2-bromopyrazines **20a,j,k** via les esters trifliques **101a,j,k**

Le 3-benzyl-5-phénylpyrazin-2-ol **79a** a également été converti en la 2-bromopyrazine correspondante **20a**, avec toutefois une baisse du rendement de la seconde étape due à une conversion incomplète. Enfin, le composé **79k** présentant un noyau furane a pu être converti en **20k†** avec un rendement global équivalent à **20a**, mais en ne traitant l'ester triflique **101k** qu'avec une extraction liquide/liquide préalablement à la seconde étape.

Même si ces réactions mériteraient d'être optimisées, l'activation des 2-hydroxypyrazines **79** en 2-bromopyrazines **20** a permis au laboratoire de produire des partenaires de N-arylation sans avoir recours à des conditions acides, aboutissant à des analogues de luciférines qui n'auraient sinon pas pu être synthétisés.

III - N-ARYLATIONS ET CYCLISATIONS EN IMIDAZO[1,2-A]PYRAZIN-3(7H)-ONES

III.A. N-arylations

Ainsi que nous l'avons exposé précédemment, nous avons choisi au laboratoire d'éviter la synthèse de 2-aminopyrazines et de composés α,β -dicarbonylés pour accéder aux imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**, comme cela avait pu être largement rapporté dans la littérature.

McCapra et Chang avaient toutefois effectué en 1967 la synthèse d'un composé modèle **19a** pour étudier la chimiluminescence de la varguline (**5**), avec comme étape clé une amination thermique de la bromopyrazine **20** par l'alaninate d'éthyle (**21**) dans le diméthylsulfoxyde bouillant (Schéma 8), sans toutefois préciser de rendement.¹⁸⁸

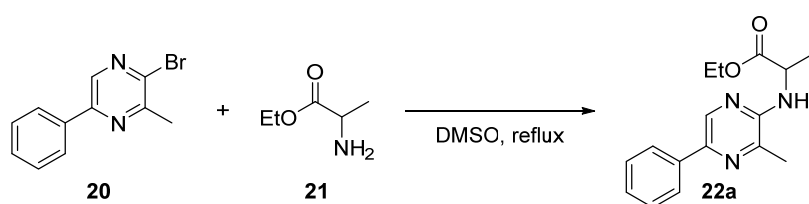
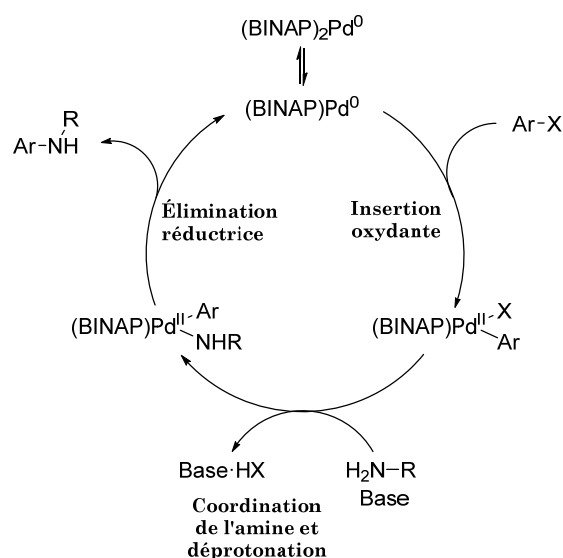


Schéma 59 : N-arylation thermique de l'alaninate d'éthyle selon McCapra et Chang¹⁸⁸

Au laboratoire, des essais infructueux de substitution nucléophile aromatique sans catalyseur de 2-chloro- et 2-iodopyrazines par le phénylalaninate d'éthyle **21i** nous ont rapidement incités à explorer les possibilités offertes par les couplages au palladium de Buchwald-Hartwig pour l'étape de N-arylation.

III.A.1. Mécanisme(s) de l'amination de Buchwald-Hartwig

Le couplage palladié entre un halogénoaryle et une amine libre (décrite dans deux articles différents en 1995 par Stephen Buchwald³²⁹ et John Hartwig,³³⁰ en opposition à la littérature antérieure nécessitant des complexes stanniques) pour former une liaison carbone-azote est supposé suivre un mécanisme proche de ceux établis pour les couplages carbone-carbone. Après réduction éventuelle du palladium(II) (non dessinée, dépendant du sel utilisé) et dissociation d'un ligand, le palladium(0) s'insère dans la liaison halogène-carbone de l'halogénoaryle, puis forme un complexe de coordination avec l'amine. La réaction nécessite alors l'action d'une base pour déprotoner l'amine dont l'acidité est exacerbée par le métal, avant de procéder à une élimination réductrice aboutissant au produit de couplage souhaité ainsi qu'au renouvellement du palladium(0) (Schéma 60).

Schéma 60 : mécanisme de l'amination au palladium et BINAP selon Buchwald et Hartwig³³¹

La détermination du cycle catalytique de la réaction a été délicate, notamment dans le cas des ligands diphosphines (comme le 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle **102**, cf. Figure 18), avec une première étude par Singh *et al.* rapportant que l'ordre des deux premières étapes pourrait être inversé en fonction de l'avancement de la réaction³³² pendant que Alcazar-Roman *et al.* expliquaient la cinétique des réactions en faisant intervenir un palladium(0) totalement ligandé au cœur du cycle catalytique.³³³

Finalement, une étude commune aux équipes de recherche de Buchwald et Hartwig a déterminé en 2006³³¹ que des erreurs s'étaient glissées dans les deux études précédentes, proposant le mécanisme final exposé dans le Schéma 60 lorsque du BINAP est utilisé, ce mécanisme n'étant à notre connaissance plus remis en question aujourd'hui. La cinétique de la réaction a été déterminée d'ordre zéro par rapport à la concentration d'amine, du premier ordre par rapport à la concentration d'halogénoaryle et inversement proportionnelle à la quantité de ligand dans le milieu. Cependant, ces pérégrinations mécanistiques ont souligné la multiplicité des espèces catalytiques pouvant être générées dans le milieu (par dissociation ou échange de ligands, oxydation des phosphines, chélation d'amines etc.), chaque espèce pouvant être efficace mais avec des cinétiques différentes.

Aussi, de nombreux facteurs³³⁴ peuvent influencer cette réaction :

- la nature de l'halogène de l'halogénoaryle peut avoir un rôle critique sur la cinétique de l'insertion oxydante ;
- lorsque l'aryle est un hétérocycle, des chélation du palladium peuvent inhiber la réaction ;
- les substituants de l'amine peuvent avoir des effets électroniques et des encombrements stériques modifiant significativement sa coordination, son acidité, ainsi que la cinétique de l'élimination réductrice ;
- la source de palladium ainsi que le ligand utilisé peuvent impacter la cinétique de formation d'espèce catalytique active ;
- la base utilisée doit être compatible avec tous les groupes fonctionnels ;
- le solvant et la température peuvent influencer sur tous les paramètres précédents.

Pour répondre à ces problématiques, de nombreuses conditions différentes ont été utilisées. Les bases fortes telles que le *tert*-butanolate de sodium (*t*-BuONa)³²⁹ ou le bis(triméthylsilyl)amidure de lithium

(LiHDMS)³³⁰ peuvent être remplacées par les carbonates de césium (Cs₂CO₃) et de potassium (K₂CO₃) ou le phosphate de potassium (K₃PO₄) afin d'augmenter la tolérance de la réaction envers les groupements sensibles aux bases.³³⁵ Les réactions sont typiquement conduites dans le toluène, le tétrahydrofurane, le 1,4-dioxane ou le *tert*-butanol avec des températures comprises entre 80 et 120 °C.

De nombreux ligands et précatalyseurs ont également été développés (Figure 18),³³⁶ avec des propriétés de chélation (et des stœchiométries relativement au palladium) différentes selon la présence d'une (seconde ligne) ou deux phosphines (première ligne).³³⁷ Les substituants des ligands permettent aussi d'ajuster leurs propriétés stériques³³⁸ et électroniques,³³⁹ pouvant ainsi favoriser les étapes d'insertion oxydante ou d'élimination réductrice du cycle catalytique et d'accorder les ligands aux substrats.

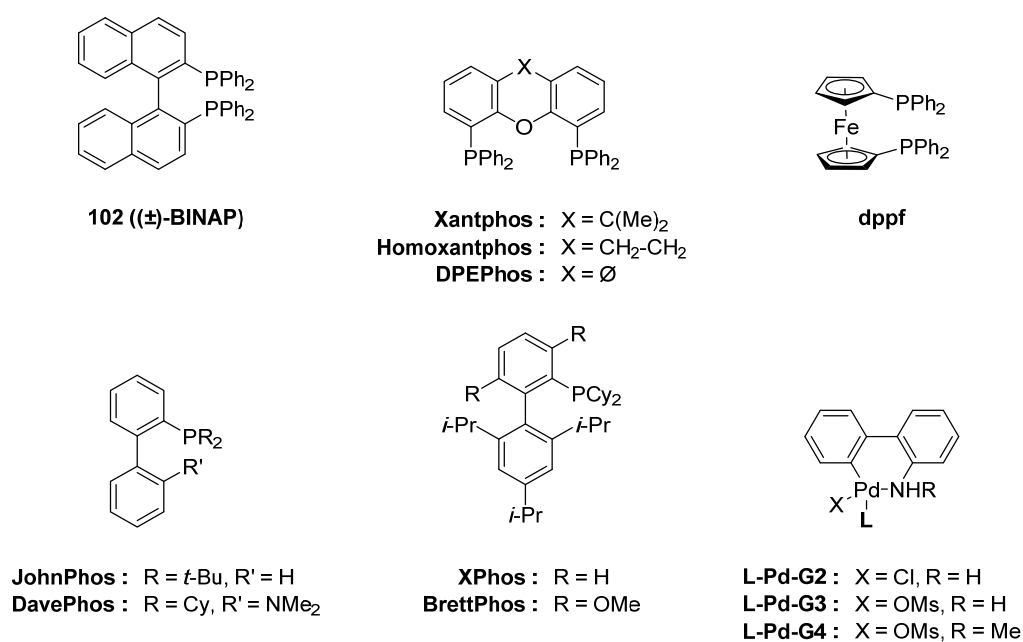


Figure 18 : ligands et précatalyseurs palladiés pour les aminations de Buchwald-Hartwig

Les myriades de conditions envisageables pour les réactions d'aminations de Buchwald et Hartwig ont conduit à la publication de nombreuses revues, qui restent probablement pour le scientifique le meilleur moyen d'espérer trouver des exemples de couplages suffisamment proches du cas d'intérêt pour identifier rapidement les systèmes catalytiques valant la peine d'être explorés.^{334, 336, 340-343}

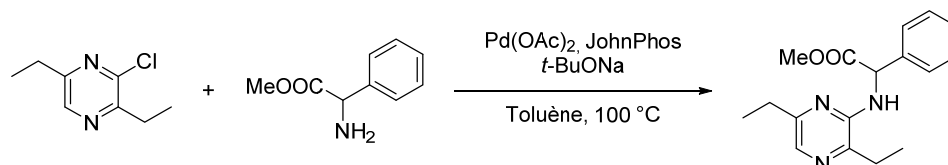
III.A.2. Choix des conditions de couplage des α -aminoesters avec les 2-chloropyrazines

La multiplicité des facteurs évoqués ci-dessus implique une grande variété de conditions envisageables pour effectuer la N-arylation des α -aminoesters **21** par les chloropyrazines **42** ou les bromopyrazines **20**. Les contributions électroniques ou stériques inhérentes à la nature des substrats sont en effet très importantes et nous avons par conséquent au cours de notre travail cherché à varier la source de palladium, la nature du ligand et de la base, le solvant et la température de réaction.

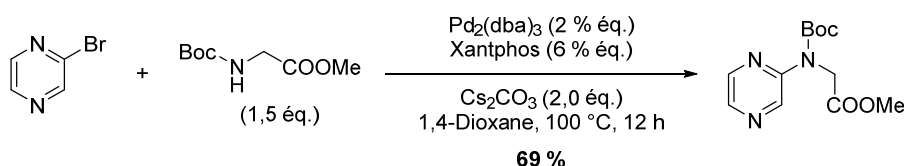
Quelques exemples d'amination d'halogénoypyrazines avaient été auparavant décrits dans la littérature (Schéma 61). Ainsi, Corbett *et al.*³⁴⁴ ont pu effectuer le couplage de la 2-chloro-3,6-diéthylpyrazine avec le 2-amino-2-phénylacétate de méthyle (sans préciser de rendement toutefois) en utilisant comme ligand du palladium le JohnPhos (d'après John P. Wolfe), un des premiers catalyseurs « biphenylphosphine » de Buchwald.³⁴⁵ Plus récemment, Falcone *et al.*³⁴⁶ ont rapporté le couplage entre la bromopyrazine et

l'estér méthylique de glycine *N*-substitué par un *tert*-butoxycarbonyl (Boc) avec un rendement de 69 % dans le dioxane en utilisant comme ligand le Xantphos. Enfin, Sharif *et al.* ont publié en 2016, après les premiers essais de *N*-arylation au laboratoire, des conditions d'amination de la chloropyrazine par le phénylalaninate de *tert*-butyle avec un très bon rendement de 87 %, en utilisant un précatalyseur assez récent³⁴⁷ permettant d'après les auteurs d'éviter la diarylation des amines primaires sans racémisation.

Corbett *et al.*, 2007 :



Falcone *et al.*, 2014 :



Sharif *et al.*, 2016 :

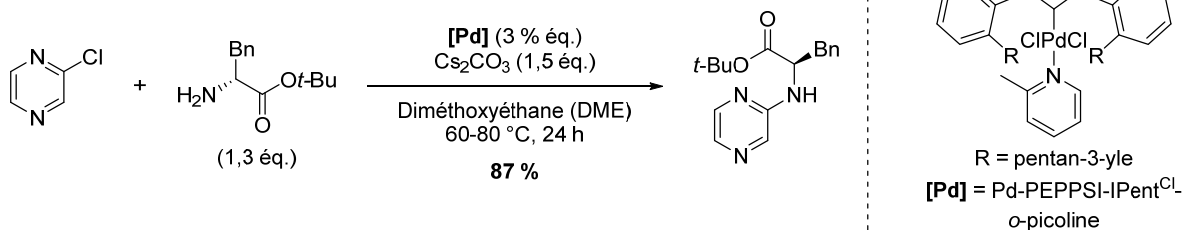
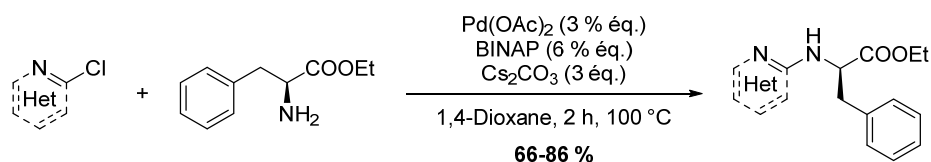


Schéma 61 : précédents d'amination d'halogénopyrazines

Notre point de départ en 2015 a cependant été une étude publiée par Hammoud, Schmitt *et al.* en 2013³⁴⁸ qui décrit justement le couplage au palladium d' α -aminoesters énantio-purs, notamment le L-phénylalaninate d'éthyle (L-**21i**), sur des halogéno(di)azines avec de bons rendements, en utilisant un système acétate de palladium(II)/BINAP et du carbonate de césium dans le 1,4-dioxane (Schéma 62). La publication n'incluait toutefois pas d'exemple partant de 2-chloropyrazines et il s'est avéré que malgré l'extrême similarité des substrats utilisés, des optimisations ont été nécessaires.

Hammoud, Schmitt *et al.* :



Notre problématique :

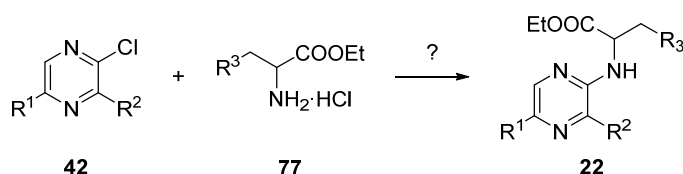


Schéma 62 : N-hétéroarylation d' α -aminoesters selon Hammoud *et al.*³⁴⁸

Ainsi, la tentative de couplage de la 3-benzyl-2-chloro-5-phénylpyrazine **42a** avec le chlorhydrate du phénylalaninate d'éthyle **77i** dans les conditions décrites ci-dessus s'est soldée par une conversion quasi-nulle après 3 heures de réaction.*

Finalement, les premières conditions permettant l'obtention du produit souhaité ont été trouvées suite à l'utilisation par inadvertance de la mauvaise bouteille de solvant : il s'est alors avéré que la réaction était totale après une heure à 130 °C (au four à micro-ondes) dans l'acétonitrile anhydre (Schéma 63), alors que ce même solvant n'avait offert que de faibles conversions à Hammoud *et al.* Toutefois, cette conversion complète de la 2-chloropyrazine **42a** n'a permis d'isoler **22a** qu'avec 55 % de rendement.

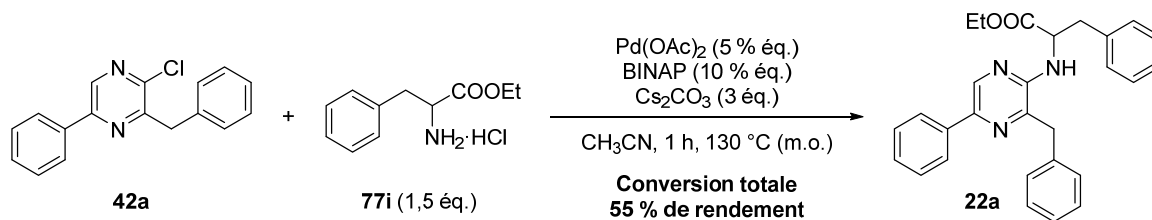


Schéma 63 : conditions initiales de N-arylation au laboratoire

Étant donné la température très élevée utilisée pour ce premier essai, nous avons suspecté une dégradation thermique des réactifs et/ou des produits et essayé de diminuer la température de réaction.

a. Premières optimisations

Nous avons ainsi répété cette réaction dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) à 80 °C (Tableau 10, entrée 2) puis 60 °C (entrée 3), ainsi que dans l'acétonitrile à 60 °C (entrée 4). Le rendement médiocre à température plus faible dans l'acétonitrile n'était probablement pas dû au solvant mais à une agitation pas assez rapide, comme nous l'exposerons plus loin ; cependant, cette réalisation a été tardive et nous avons donc longuement essayé d'optimiser la réaction dans le DMF. Les essais avec le ligand XPhos (entrées 5 et 6) n'ont pas permis la N-arylation efficace de l' α -aminoester et l'utilisation de Xantphos (entrée 7) ou de chlorure de palladium(II)/dppf (entrée 8) ont abouti à des conversions minimales à faible température. L'utilisation de tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) comme source de palladium(0) (entrée 9) a permis d'observer une conversion non-négligeable de 66 % en 12 heures (malgré la quantité moindre de BINAP, en ratio 1:1 avec le palladium contrairement aux expériences précédentes) ; la durée de réaction pourrait ici être allongée, l'activation du catalyseur pouvant être réduite par le déplacement lent de la dibenzylidèneacétone par le BINAP.³³² Enfin, les tentatives de remplacement de base (entrées 10 à 13) n'ont pas été concluantes, l'utilisation de carbonate de potassium permettant une conversion de **42a** moindre que son analogue au césium, probablement à cause de sa plus faible solubilité dans les solvants organiques.

* Il est à noter qu'Hammoud *et al.* n'utilisent pas les amines chlorhydratées ; néanmoins la quantité de base présente dans le milieu permet théoriquement de dessaler l'amine et procéder à sa déprotonation après complexation au palladium en étant toujours en excès.

Tableau 10 : premières optimisations de N-arylation

	Pd (éq.)	L (éq.)	Base	Solvant	Temp.	Durée	Conv.	Rdt
1	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	130 °C	1 h	100 %	55 %
2	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	80 °C	1,5 h	64 %	40 %
3	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	10 h	96 %	57 %
4	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	60 °C	16 h	55 % ^a	32 %
5	Pd(OAc) ₂ (5 %)	XPhos (10 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	16 h	0 %	–
6	Pd(OAc) ₂ (5 %)	XPhos (10 %)	<i>t</i> -BuONa	Toluène	60-120 °C ^b	3 h	0 %	–
7	Pd(OAc) ₂ (5 %)	Xantphos (10 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	12 h	16 %	n.i.
8	PdCl ₂ (5 %)	dppf (10 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	12 h	14 %	n.i.
9	Pd ₂ (dba) ₃ (2,5 %)	BINAP (5 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	12 h	66 %	n.i.
10	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	K ₃ PO ₄	DMF	60 °C	10 h	0 %	–
11	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	<i>t</i> -BuONa	DMF	60 °C	16 h	0 %	–
12	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	K ₂ CO ₃	DMF	60 °C	16 h	25 %	n.i.
13	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (10 %)	NEt ₃	DMF	60 °C	12 h	0 %	–
14	Pd(OAc) ₂ (5 %)	BINAP (7,5 %)	Cs ₂ CO ₃	DMF	60 °C	12 h	100 %	77 %

^a Agitation moyenne (environ 500 rpm)^b Conversion nulle à 60 °C, dégradation des produits au-delà 110 °C.

Finalement, une étude³⁴⁹ de 2015 portant sur les ligands diphosphines (tels BINAP ou Xantphos) a émis l'hypothèse que l'espèce catalytique active lors de leur utilisation avec du palladium(II) serait un complexe Pd–ligand mono-oxyde, réaffirmant la nécessité de limiter au maximum la quantité de ligand par rapport au palladium lors de la réaction. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'abaisser à 0,075 équivalent la quantité de BINAP (entrée 14) pourrait être bénéfique, ce qui a permis la conversion totale de **42a** en aminopyrazine **22a**, avec un rendement final de 77 %.

b. Optimisations à l'aide d'un standard interne en RMN

Les expériences présentées ci-dessus ont permis d'aboutir à des conditions satisfaisantes pour le couplage de **42a** et du phénylalaninate d'éthyle **77i**. Cependant, ces expériences avaient été effectuées sans excès de base (*i. e.* juste suffisamment pour dessaler l'amine et déprotoner un équivalent de complexes [PdCl(amine)(aryle)]), contrairement à la majorité des réactions de couplage publiées dans la littérature, et nous souhaitions éviter autant que faire se peut le DMF afin de faciliter le traitement de la réaction.

Des contrôles qualitatifs de stabilité de la 2-chloropyrazine **42a** dans le DMF à 60 °C, en présence ou non de palladium, ont montré des hydroxylation et réduction partielles de la position 2, traduisant l'existence potentielle de mécanismes de dégradation de l'halogénoaryle parallèlement à la N-arylation. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse – confirmée ultérieurement en observant une

chimiluminescence des produits de couplage en milieu basique fort – que **22a** pouvait également être dégradé en milieu basique.

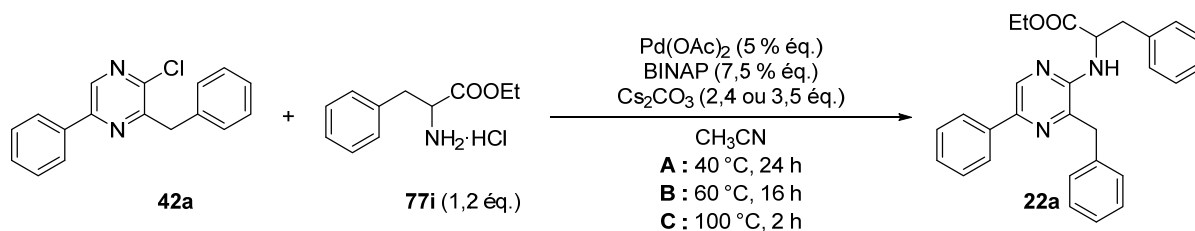


Schéma 64 : influence de la température et de l'excès de base sur la réaction d'amination

Nous avons utilisé l'imidazole comme standard interne en RMN pour déterminer quantitativement l'importance des dégradations pouvant potentiellement expliquer les différences entre conversion observée et rendement isolé. Nous avons alors observé une conversion autour de 90 % à 40 °C (**A**) et une conversion quasi-complète à 60 °C (**B**), sans dégradation particulière des produits et quel que soit l'excès de base. Environ 10 % de dégradation du produit de couplage était observé à 100 °C (**C**), ici encore sans influence de l'excès de base, avec des conversions entre 80 et 90 % en 2 heures.

c. Disponibilité de la base

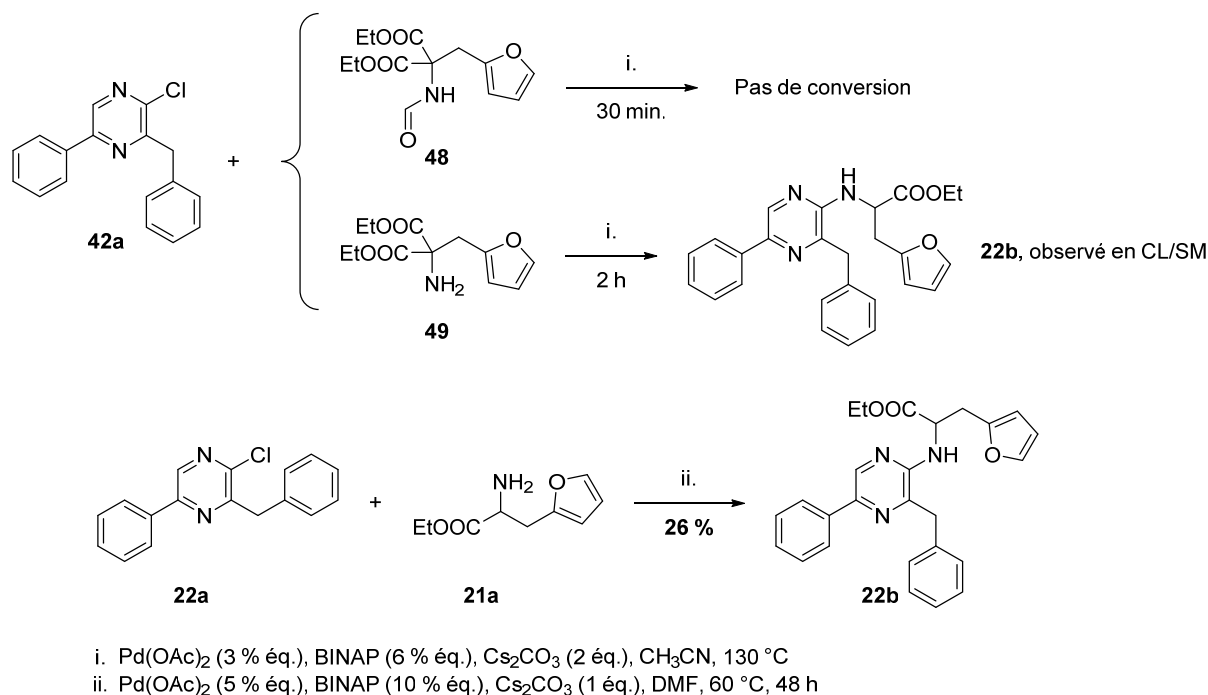
Les purifications par chromatographie sur gel de silice du produit des réactions **B** avec 2,4 ou 3,5 équivalents de carbonate de césium ont fourni respectivement 77 % (purification ratée) et 86 % du produit de couplage souhaité, en contradiction avec les résultats précédents (entrée 4 du Tableau 10). Nous nous sommes cependant rendu compte en essayant ces nouvelles conditions que ces dernières semblaient beaucoup plus adaptées à petite échelle (0,2 g de 2-chloropyrazine **42a**) qu'à plus grosse échelle (2,0 g de **42a**), avec des conversions variant du simple au double.

Heureusement, une réaction durant laquelle l'agitation a été interrompue par erreur (mais pas le chauffage) nous a permis de réaliser l'importance de celle-ci pour la disponibilité de la base en solution. Nous avons par la suite pris soin de réaliser les réactions dans des récipients cylindriques étroits (comme les réacteurs micro-ondes Biotage ou des tubes en verre munis d'un bouchon SVL) dans lesquels une gangue de bases minérales ne peut se former sous forte agitation (entre 800 et 1 000 rpm avec un barreau magnétique), permettant enfin une reproductibilité des expériences. Nous avons également montré au laboratoire la possibilité d'effectuer cette réaction en 12 heures dans un bain à ultrasons à 60 °C, avec des rendements similaires à ceux obtenus en effectuant les manipulations dans un bain d'huile.

Cet effet de la disponibilité de la base dans le solvant organique a été étudié attentivement par Meyers *et al.* en 2004³⁵⁰ pour des réactions de couplage effectuées dans le toluène. Ils montrent ainsi l'influence drastique de la structure et de l'aspect de surface du carbonate de césium avec des conversions passant de 15 % à 60 % en 4 heures selon le fournisseur de la base et supposent la déprotonation du complexe [Pd(amine)(aryle)] à l'interface du solide. Ils rapportent également une accélération de la réaction (51 % contre 85 % de conversion en 3 h) lorsque le carbonate de césium est préalablement broyé au mortier. Cette publication n'a été portée à notre connaissance que durant la rédaction de ce rapport, mais nous ne manquerons pas d'étudier dans le futur l'influence de la mouture de la base sur la cinétique de notre réaction d'amination.

III.A.3. Couplage des α -aminoesters avec les pyrazines

Les réactions d'optimisation décrites ci-dessus avec le chlorhydrate de phénylalaninate d'éthyle **77i** commercial ont été menées en parallèle du développement des voies d'accès aux α -aminoesters. Aussi, les tentatives initiales de couplage permettant la synthèse d'éventuels précurseurs de furimazine **7** ont été effectuées sur les intermédiaires décrits dans le Schéma 19 (Partie II : I.A.1).

Schéma 65 : essais préliminaires d'amination de la 2-chloropyrazine **42a**

Un premier essai de couplage de la 2-chloropyrazine **42a** avec le produit d'alkylation du formamidomalonate **48** n'a montré aucune conversion (Schéma 65). Toutefois, l'analyse en spectrométrie de masse d'un essai avec l' α -aminodiester **49** a permis d'observer la formation du produit souhaité **22b** ayant subi une mono-décarboxylation, la purification du produit ayant toutefois été impossible. Cela a redirigé les efforts du laboratoire vers la synthèse directe d' α -aminoesters et le premier essai de N-arylation du furylalaninate d'éthyle **21a** (dans des conditions loin d'être optimisées) a permis d'obtenir le précurseur de furimazine **22b** avec un rendement de 26 %.

Les conditions optimisées décrites précédemment ont ensuite été appliquées à un large panel de 2-chloropyrazines et d' α -aminoesters, permettant la synthèse au laboratoire de plus d'une centaine de produits de N-arylation originaux, tous chimistes confondus (les couplages réalisés par l'auteur sont présentés dans le Tableau 11, ainsi que la synthèse sur grosse échelle de **22b** et **22c**, par Vincent Hervin). La conversion des 2-chloropyrazines est généralement excellente, avec des rendements entre 64 et 91 % ; nous avons toutefois observé une baisse conséquente de la conversion lorsque deux fluors substituent le noyau aryle en R^2 .

Tableau 11 : rendements relatifs à la formation des *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters **22a-ag**

<div style="text-align: center;"> <p> Pd(OAc)_2 (5 % éq.) BINAP (7,5-10 % éq.) Cs_2CO_3 (1,0-1,3 éq. excès)* CH_3CN, 60 °C, 16 h </p> </div>					
R ¹	R ²	42	R ³ (21 ou 77)	Conv.	Rdt
Phényle	Phényle	42a	Phényle (77i)	98 %	86 % (22a)
			Furan-2-yle (21a)	100 %	75-89+ % (22b)
			5-Méthylfuran-2-yle (21c)	100 %	75-80+ % (22c)
			5-Éthylfuran-2-yle (21d)	100 %	74 % (22d)
			4,5-Diméthylfuran-2-yle (21e) ^a	70 %	49 % (22e)
			5-Cyclopropylfuran-2-yle (21f) ^a	100 %	67 % (22f)
			5-Trifluorométhylfuran-2-yle (21h)	70 %	44 % (22g)
			Thiophène-2-yle (21av)	100 %	80 % (22h)
			<i>p</i> -Benzyloxyphényle (77j)	90 %	70 % (22i)
			<i>p</i> -Isopropylphényle (77n) ^b	100 %	73 % (22j)
			<i>p</i> -Propylphényle (77p)	100 %	73 % (22k)
			<i>m</i> -Tolyle (21l)	80 %	61 % (22l)
			<i>p</i> -Tolyle (77m)	100 %	87 % (22m)
			<i>o</i> -Fluorophényle (77y)	100 %	76 % (22n)
			<i>p</i> -Fluorophényle (77aa)	90 %	69 % (22o)
			<i>o</i> -Méthoxyphényle (77s)	100 %	77 % (22p)
<i>p</i> -Benzyloxyphényle	Phényle	42b	<i>p</i> -Benzyloxyphényle (77j) ^b	100 %	86-91 % (22s) ^b
			<i>m</i> -Propylphényle (77o)	100 %	85 % (22t)
<i>o</i> -Méthoxyphényle	Phényle	42c	Phényle (77i)	100 %	72 % (22u)
			Furan-2-yle (21a)	100 %	64 % (22v)
			Furan-3-yle (21b)	100 %	84 % (22w)
Phényle	<i>o</i> -Chlorophényle	42d	Phényle (77i)	93 %	67 % (22x)
			Furan-2-yle (21a)	73 %	65 % (22y)
Phényle	<i>m</i> -Chlorophényle	42i ^a	Furan-2-yle (77a)	71 %	36 % (22z)
<i>o</i> -Fluorophényle	<i>m</i> -Fluorophényle	42j	5-Méthylfuran-2-yle (77c)	100 %	80 % (22aa)
Phényle	<i>o,o</i> -Difluorophényle	42e	Furan-2-yle (77a)	100 %	91 % (22ab)
Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3)	42f	Furan-2-yle (77a)	30 %	18 % (22ac)
			5-Méthylfuran-2-yle (77c)	48 %	20 % (22ad)
Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5)	42g	Furan-2-yle (77a)	30 %	7 % (22ae)
			5-Méthylfuran-2-yle (77c)	35 %	22 % (22af)
Phényle	<i>m,m</i> -Difluorophényle	42h	Furan-2-yle (77a)	30 %	18 % (22ag)

* Excès calculé par rapport à la quantité minimale nécessaire pour déprotoner un équivalent de complexe [Pd(amine)(aryle)] et, le cas échéant, dessaler l' α -aminoester ; ^a Réactif peu pur ; ^b Ester méthylique

Ces résultats médiocres avec les 2-chloropyrazines polyfluorées nous ont amenés à essayer une fois encore d'autres conditions pour la N-arylation. Glwadys Gagnot avait réussi au laboratoire à procéder à l'amination du bromonaphtalène par le phénylalaninate d'éthyle (**77i**) dans le toluène et nous avons par conséquent essayé d'accomplir nos couplages dans un mélange acétonitrile/toluène (Tableau 12, méthode **A**). Nous avons alors observé une amélioration des conversions, avec un temps de réaction minimale de 24 heures. Finalement, il a été possible dans les cas où la réaction était toujours trop lente de l'effectuer dans le toluène seul et en augmentant la température à 90 °C (méthode **B**), permettant d'obtenir à nouveau des rendements supérieurs à 70 %.

Tableau 12 : rendements relatifs à la formation des *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters **22,ad,af,ah-at**

R ² (42)	R ³ (77)	Conv.	Rdt (22)
Phényle (42a)	5-Propylfuran-2-yle (77g)	(B)	71 % (22ah)
<i>o</i> -Fluorophényle (42k)	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	(B)	81 % (22ai)
<i>m</i> -Fluorophényle (42j)	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	(B)	88 % (22aj)
<i>o,o</i> -Difluorophényle (42e)	5-Méthylfuran-2-yle (77c)	100 % (A)	84 % (22ak)
	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	(B)	85 % (22al)
	5-Éthylfuran-2-yle (77c)	(B)	72 % (22am)
<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3 ; 42f)	5-Méthylfuran-2-yle (77c)	95 % (A)	80 % (22ad)
	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	70 % (A)	46 % (22an)
	5-Éthylfuran-2-yle (77d)	(B)	80 % (22ao)
<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5 ; 42g)	5-Méthylfuran-2-yle (77c)	60 % (A)	47 % (22af)
	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	80 % (A)	64 % (22ap)
	5-Éthylfuran-2-yle (77d)	75 % (A)	37 % (22aq)
<i>m,m</i> -Difluorophényle (42h)	5-Méthylfuran-2-yle (77c)	89 % (A)	68 % (22ar)
	4,5-Diméthylfuran-2-yle (77e)	90 % (A)	73 % (22as)
	5-Éthylfuran-2-yle (77d)	(B)	80 % (22at)

III.B. Formation des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones

Deux accès aux imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**[‡] potentiellement bioluminescentes sont envisageables, soit par cyclisation directe des *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters **22**, soit en formant tout d'abord les acétates d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles **Z**,[‡] l'acétyle pouvant ensuite être hydrolysé en milieu acide (Schéma 66). Cette seconde méthode a été fortement privilégiée au laboratoire grâce aux facilités de purification et de stockage qu'elle offre.

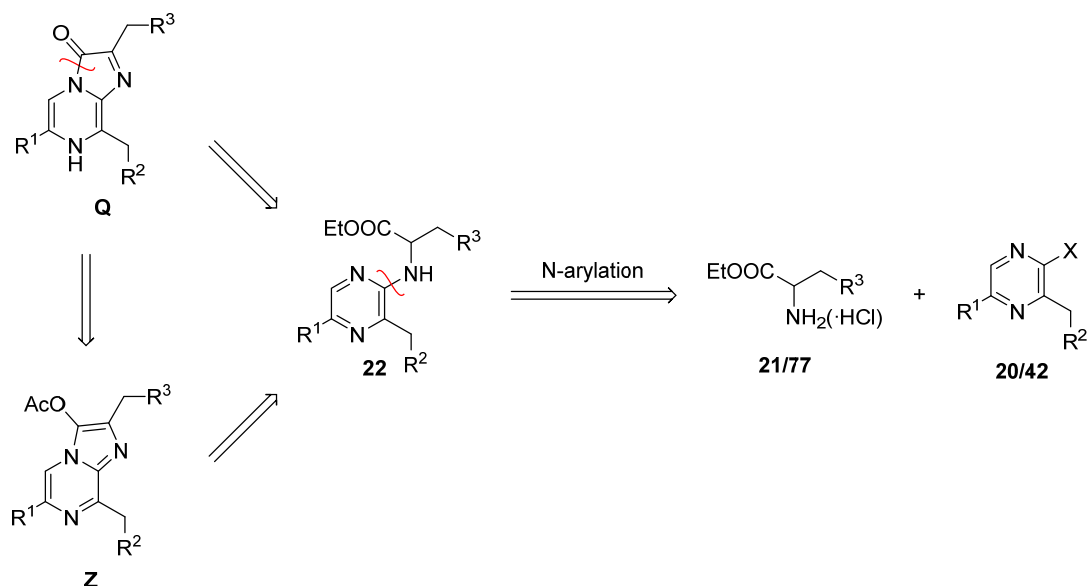


Schéma 66 : rétrosynthèse des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**

III.B.1. Cyclisation thermique

La cyclisation à chaud en milieu acide pour obtenir les imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q** a d'abord été décrite pour procéder à la double condensation d' α,β -dicarbonyles sur des 2-aminopyrazines dans les synthèses de varguline **5**^{206, 209, 351-352} ou de coelentérazine **4**.²⁰⁸ Cette réaction a également été effectuée par McCapra et Chang¹⁸⁸ à l'aide d'acide chlorhydrique concentré pour cycliser le *N*-(pyrazin-2-yl)aminoester déjà décrit dans le Schéma 8 (p. 30).

Nous avons choisi de procéder à la cyclisation de **22b** selon une méthode décrite par Levi *et al.*³⁵³ en chauffant à 90 °C dans l'éthanol acidifié à l'acide chlorhydrique 37 % dans un tube scellé sous argon durant 24 heures, pour fournir la furimazine avec un rendement d'environ 28 % après précipitation (Schéma 67).

Cette méthode a néanmoins plusieurs inconvénients : le rendement de la réaction est faible malgré la durée importante de chauffage et il est connu que les imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones ne sont pas stables à température ambiante en solution (ce que nous avons pu vérifier en RMN) et ne peuvent pas

[‡] Les numérotations en **Q** et en **Z** ont été utilisées dans l'intégralité de nos bases de données et lors des tests biochimiques (y compris avec nos collaborateurs), nous avons par conséquent décidé de la conserver dans ce manuscrit afin d'en simplifier la lecture aux futurs membres du groupe d'Yves Janin. Nous prions le lecteur de bien vouloir excuser cet écart aux usages de numérotation des molécules.

être facilement purifiés par chromatographie.[‡] Des analyses en spectrométrie de masse montrent par ailleurs la formation simultanée de produit oxydé **41b** malgré les précautions prises pour éviter la présence d'oxygène.

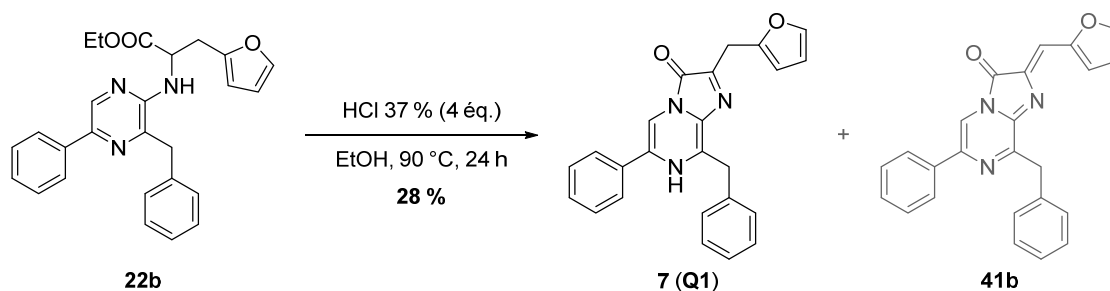


Schéma 67 : cyclisation en imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one selon Levi *et al.*³⁵³

Si nous avons ainsi pu produire pour la première fois au laboratoire la furimazine, la somme des désavantages explicités ci-dessus nous a rapidement conduits à envisager une voie alternative d'obtention des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**, compatible avec l'utilisation des luciférines faite par nos collègues biologistes et biochimistes.

III.B.2. Cyclisation via rupture de l'ester, acétylation et déprotection « à la demande »

Des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones *O*-protégées ont été décrites de nombreuses fois dans la littérature : sous forme de sulfate comme précurseur naturel supposé de coelentérazine par Inoue *et al.*,⁴² sous forme d'esters,³⁵³⁻³⁵⁵ de carbamate d'énol³⁵⁶ ou sous forme d'éthers de galactosyle.³⁵⁷ Ces composés ont cependant été quasi-exclusivement envisagés comme des précurseurs de luciférines *in cellulo* ou *in vivo*, avec une déprotection *in situ* par des enzymes (p. ex. estérases ou galactosidases), et pas comme des précurseurs synthétiques d'intérêt. Plus étrange encore, les quelques désacétylations chimiques envisagées dans la littérature n'ont été effectuées qu'en milieu basique bien que les luciférines chimioluminescent aisément dans ces conditions, obligeant à procéder à la réaction sous atmosphère inerte.

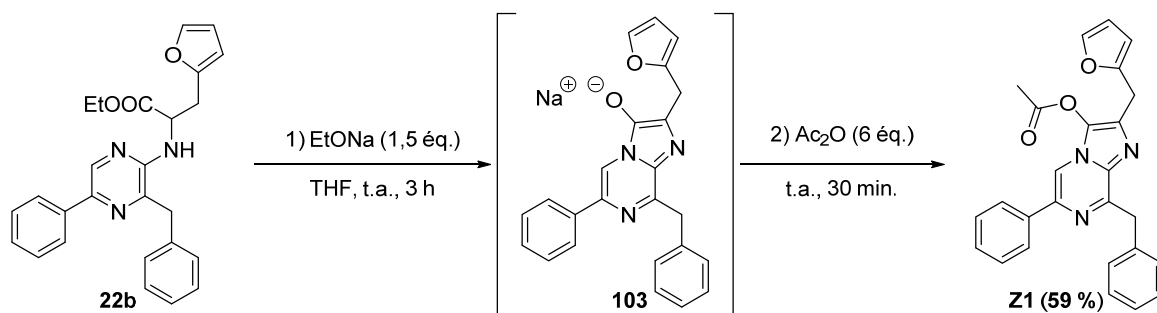
S'étant brièvement confronté à la difficulté d'obtention de la furimazine, nous avons décidé de synthétiser des précurseurs *O*-acétylés **Z**, faisant le pari qu'il serait possible de les déprotéger efficacement et sans formation excessive de produits secondaires.

a. Cas général

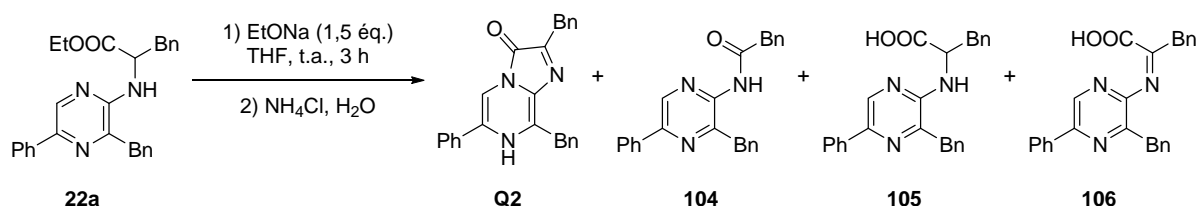
Le *N*-(pyrazin-2-yl)aminoester **22b** a ainsi été cyclisé en présence d'éthanolate de sodium dans le tétrahydrofurane sous atmosphère inerte, puis mis à réagir avec un excès d'anhydride acétique pour former l'*O*-acétylfurimazine **Z1**, avec un rendement cumulé par recristallisation successives dans le cyclohexane de 59 % (Schéma 71). Ce composé (comme tous ses analogues) exhibe une excellente

[‡] Plusieurs groupes rapportent la purification d'analogues de luciférines par chromatographie, mais nous n'avons jamais pu au laboratoire obtenir les produits après colonne de silice avec une pureté satisfaisante et/ou sans dégrader la majorité du produit. Il reste possible que l'adsorption du mélange réactionnel sur silice par évaporation sous pression réduite des solvants, méthode utilisée au laboratoire pour « charger » la colonne, soit fatale pour ces espèces.

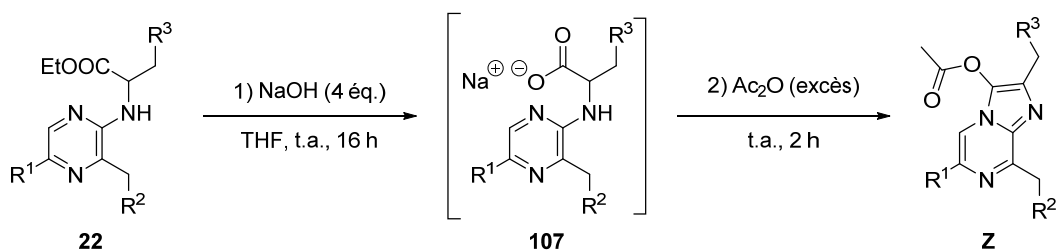
stabilité, avec des échantillons conservés plus de deux années à température ambiante sans précaution particulière conservant toute leur intégrité.

Schéma 68 : formation de l'O-acétylfurimazine **Z1**

Il est probable que cette réaction procède via la formation de l'énolate **103**, après déprotonation de l'amine et une cascade électronique aboutissant à la formation de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-olate, avant de réagir avec l'anhydride acétique. Le traitement de la réaction partant de **22a** au chlorure d'ammonium dilué plutôt qu'à l'anhydride acétique (Schéma 69) a permis d'observer des quantités importantes de bisdésoxycœlentérazine (**Q2**), ainsi que l'amide **104**, produit de chimioluminescence de **Q2**, et les acides carboxyliques **105** et **106** résultants probablement de la réouverture de l'énolate ; ces résultats étant en faveur de l'hypothèse mécanistique exposée ci-dessus.

Schéma 69 : produits du traitement de **103** au chlorure d'ammonium

La cyclisation à l'éthanolate de sodium n'a cependant pas toujours permis une cyclisation totale à partir des *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters **22** et la présence d'éthanol non-participant oblige à utiliser un plus grand excès d'anhydride acétique. Nous avons par la suite procédé à la cyclisation-protection à l'aide d'hydroxyde de sodium pilé dans le tétrahydrofurane anhydre, puis au moyen d'un excès « raisonnable » d'anhydride acétique (Schéma 70).

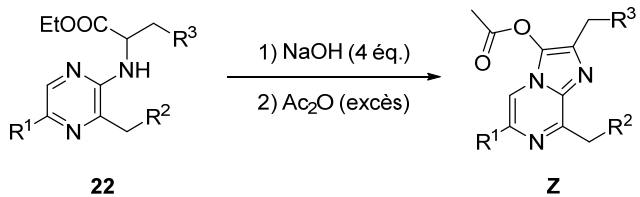
Schéma 70 : formation des acétates d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles **Z**

Nous suspectons ici un mécanisme de cyclisation différent, probablement dû à la basicité moindre de l'hydroxyde, avec en premier lieu une saponification de l'ester pour donner le carboxylate **107** suivie d'une activation de la fonction acide par l'anhydride acétique via la formation d'un anhydride mixte. Enfin, une addition de la pyrazine suivie de l'élimination d'un acétate et une seconde réaction avec l'anhydride acétique pourrait fournir le composé **Z** souhaité. Nous n'avons pas mené d'étude mécanistique particulière sur la seconde étape de cette voie d'accès aux acétates

d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles (**Z**), mais la neutralisation du milieu réactionnel après saponification nous a permis d'obtenir lorsque nécessaire les acides carboxyliques correspondants (cf. Schéma 71, p. 95).

Cette méthode nous a permis de synthétiser au laboratoire plus d'une centaine d'*O*-acétylluciférines **Z**, avec généralement des réactions totales et de bons rendements. Ces précurseurs étant destinés à être utilisés pour des tests biologiques ou biochimiques, un soin particulier a été apporté à leur purification en procédant lorsque cela était possible à leur recristallisation dans le cyclohexane ou le *n*-heptane. Si les composés étaient obtenus en faible quantité, une purification préalable par chromatographie sur gel de silice pouvait être nécessaire afin d'éliminer des impuretés pouvant empêcher leur recristallisation, mais pouvait conduire à des pertes tangibles de produit. Pour ces raisons, certains rendements exposés dans le Tableau 13 (pages suivantes) peuvent ne pas refléter fidèlement la robustesse de cette étape.

Tableau 13 : rendements relatifs à la formation des acétates d'imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yles **Z**

				
22	R¹	R²	R³	Rdt Z
22b	Phényle	Phényle	Furan-2-yle	59-82 ^a % (Z1)
22c			5-Méthylfuran-2-yle	60-82 ^a % (Z3)
22d			5-Éthylfuran-2-yle	57 % (Z12)
22e			4,5-Diméthylfuran-2-yle	45 % (Z16)
22g			5-Trifluorométhylfuran-2-yle	44 % (Z28)
22h			Thiophène-2-yle	73 % (Z13)
22q			3-Méthylisoxazol-5-yle	60 % (Z114)
22r			3-Éthylisoxazol-5-yle	73 % (Z115)
22ah			5-Propylfuran-2-yle	54 % (Z133)
22f			5-Cyclopropylfuran-2-yle	42 % (Z36)
22j			<i>p</i> -Isopropylphényle	70 % (Z38)
22l			<i>m</i> -Tolyle	61 % (Z14)
22m			<i>p</i> -Tolyle	87 % [†] (Z55)
22n			<i>o</i> -Fluorophényle	71 % [†] (Z56)
22o			<i>p</i> -Fluorophényle	70 % (Z15)
22p			<i>o</i> -Méthoxyphényle	72 % [†] (Z57)
†			<i>m</i> -Méthoxyphényle	56 % (Z18)
†			Tétrahydrofur-2-yle	81 % (Z19)
22u	<i>o</i> -Méthoxyphényle	Phényle	Phényle	53 % (Z11)
22v			Furan-2-yle	68 % (Z9)
22w			Furan-3-yle	29 % (Z10)
22aa	<i>o</i> -Fluorophényle	<i>m</i> -Fluorophényle	5-Méthylfuran-2-yle	70 % (Z105)
22x	Phényle	<i>o</i> -Chlorophényle	Phényle	67 % (Z88)
22y			Furan-2-yle	70 % (Z87)
22z	Phényle	<i>m</i> -Chlorophényle	Furan-2-yle	32 % (Z104)
22ah	Phényle	<i>o</i> -Fluorophényle	4,5-Diméthylfuran-2-yle	64 % (Z131)
22aj	Phényle	<i>m</i> -Fluorophényle	4,5-Diméthylfuran-2-yle	55 % (Z132)
22ab	Phényle	<i>o,o</i> -Difluorophényle	Furan-2-yle	69 % (Z102)
22ak			5-Méthylfuran-2-yle	83 % (Z121)
22am			5-Éthylfuran-2-yle	70 % (Z129)
22al			4,5-Diméthylfuran-2-yle	75 % (Z130)
22ac	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3)	Furan-2-yle	73 % (Z107)
22ad			5-Méthylfuran-2-yle	73 % (Z108)

22	R¹	R²	R³	Rdt Z
22ao	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,3)	5-Éthylfuran-2-yle	75 % (Z127)
22an			4,5-Diméthylfuran-2-yle	74 % (Z124)
22ae	Phényle	<i>o,m</i> -Difluorophényle (2,5)	Furan-2-yle	54 % (Z109)
22af			5-Méthylfuran-2-yle	77 % (Z110)
22aq			5-Éthylfuran-2-yle	58 % (Z123)
22ap			4,5-Diméthylfuran-2-yle	71 % (Z122)
22ag	Phényle	<i>m,m</i> -Difluorophényle	Furan-2-yle	61 % (Z103)
22ar			5-Méthylfuran-2-yle	81 % (Z113)
22at			5-Éthylfuran-2-yle	45 % (Z128)
22as			4,5-Diméthylfuran-2-yle	72 % (Z125)

^a Meilleur rendement obtenu par Vincent Hervin sur « grosse échelle » (4,5 g), un milligramme de furimazine (ou d'analogue plus efficace) permettant d'observer des signaux dans 500 à 50 000 puits, selon la dilution du substrat, dans des plaques 96 puits.

b. Cas des analogues de coérentérazine

La méthode exposée ci-dessus a dû être adaptée lorsque nous avons souhaité synthétiser les précurseurs de la coérentérazine **4** ou d'analogues proches présentant un ou plusieurs hydroxyles libres dans la structure finale. Les conditions utilisées tout au long de la synthèse imposant d'importantes variations de pH et de température, nous avons choisi de protéger les groupements hydroxyles sous forme d'éthers de benzyle. L'ordre des étapes de déprotection et de cyclisation s'est néanmoins avéré cruciale pour obtenir les précurseurs *O*-protégés recherchés, la saponification–cyclisation–protection monotope étant rendue impossible si des hydroxyles libres sont déjà présents.

Par conséquent, nous avons tout d'abord procédé à la saponification de l'ester **22** dans des conditions similaires à celles décrites précédemment. L'acide **108** correspondant a alors été isolé, puis les éthers de benzyle ont été hydrogénolysés à l'aide de palladium sur charbon en utilisant du formiate d'ammonium comme source d'hydrogène. Enfin, l'ajout d'anhydride acétique permet la cyclisation et l'acétylation de **109** pour fournir le précurseur acétylé souhaité **Z** (Schéma 71).

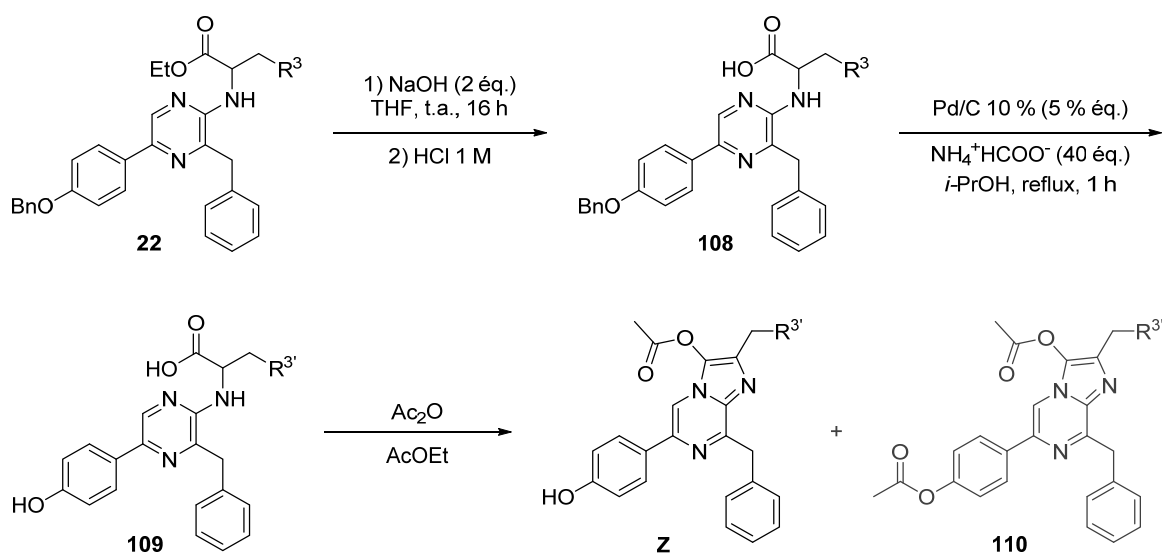


Schéma 71 : formation d'acétates d'imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yles présentant un hydroxyle libre

Malheureusement, nous n'avons en pratique pas réussi à contrôler très efficacement la mono-acétylation, que ce soit en influant sur le nombre d'équivalents d'anhydride acétique, la température, le solvant ou l'ajout d'une base ; nous avons donc été contraints de procéder à l'ajout successif de portions d'anhydride acétique, jusqu'à observer par RMN des rapports **109**:**Z**:**110** « satisfaisants », puis d'isoler **Z** par chromatographie sur gel de silice. Cette approche a permis de synthétiser les précurseurs de nouveaux analogues (Tableau 14), avec des rendements globaux assez faibles avec le plus souvent une légère pollution (< 5 %) des produits **Z** par son équivalent polyacétylé.

Tableau 14 : rendements relatifs à la formation de composés **Z** possédant un ou des hydroxyle(s) libre(s)

R ³ (22)	Rdt 108	Rdt 109	Rdt Z	Rdt depuis 22
<i>p</i> -Benzyloxyphényle (22s)	68 % (108a)	54 % (109a) ^a	68 % (Z86) ^a	25 %
<i>m</i> -Propylphényle (22t)	82 % (108b)	71 % (109b) [†]	8 % (Z76) ^b	5 %
5-Éthylfuran-2-yle ([†])	98 % (108c)	22 % (109c) [†]	43 % (Z78)	9 %
4,5-Diméthylfuran-2-yle ([†])	n.i.	42 % (109d) [†]	20 % (Z79)	8 %

^a R³ = *p*-hydroxyphényle ; ^b 57 % de produit diacétylé

Nous avons réessayé lors de l'écriture de ce manuscrit une méthode envisagée au tout début du projet puis tombée dans l'oubli, consistant à hydrogénolyser les benzyles en dernière étape, après cyclisation et acétylation (Schéma 72).

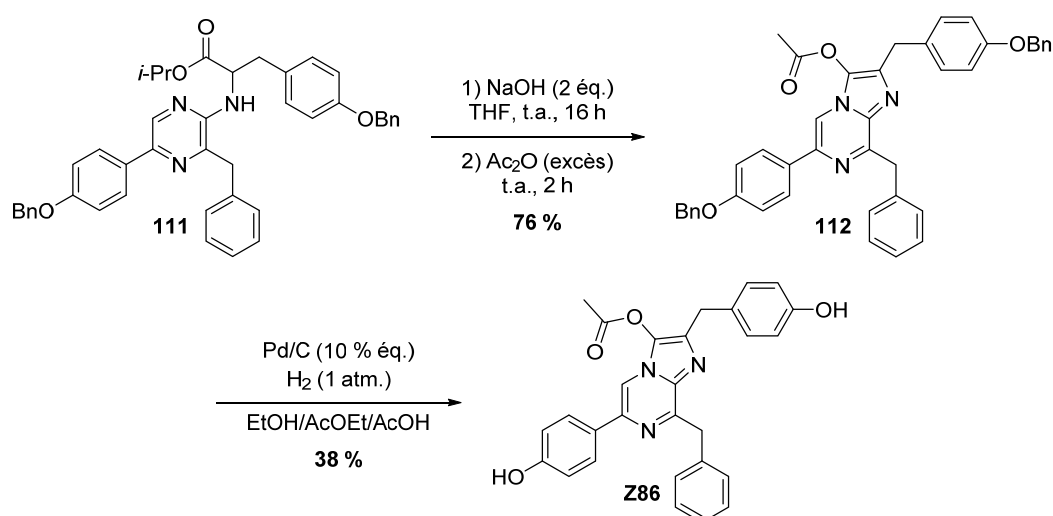


Schéma 72 : synthèse de **Z86** par hydrogénolyse tardive des benzyles

La première étape de clivage de l'ester puis d'acétylation a permis d'obtenir le produit O-acétylé **112** avec un rendement de 76 % (nous avons effectué cette réaction en partant de l'ester isopropylique plutôt qu'éthylique pour des simples questions de disponibilité des réactifs au moment de cet essai). L'étape d'hydrogénolyse des benzyles a d'abord été tentée dans l'éthanol mais aucune conversion n'a été observée en 14 heures, probablement à cause de l'insolubilité de **112**. L'ajout d'acétate d'éthyle a permis la solubilisation des réactifs, mais l'avancement était toujours faible après 24 heures de réaction supplémentaire. L'ajout de quelques pourcents en volume d'acide acétique a finalement permis la débenzylation quasi-totale de **112** en 24 heures et une chromatographie sur silice a permis d'obtenir la coelentérazine mono-acétylée **Z86** pure avec un rendement de 38 % (soit 29 % en deux étapes contre 25 % en trois étapes précédemment).

L'étape d'hydrogénolyse doit bien entendu être optimisée, mais cet essai a montré une facilité d'exécution incomparable à la mono-acétylation par ajout successifs d'anhydride acétique exposée plus haut et nous sommes confiants dans le fait de pouvoir fournir si besoin est des précurseurs O-acétylés de luciférines présentant des hydroxyles libres avec une pureté suffisante à nos collaborateurs.

c. Déprotection des proluciférines

La protection des imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q** par O-acétylation a permis de conserver ces molécules hautement réactives sous une forme stable à température ambiante,^{*} même en présence de dioxygène. Il fallait toutefois que les proluciférines **Z** puissent être déprotégées de manière simple, efficace et rapide par nos collègues biologistes afin de générer les potentiels substrats de luciférase(s), dans des conditions compatibles avec la plupart des expériences pouvant être entreprises *in vitro*, *in cellulo* ou *in vivo*.

Ces prérequis nous ont amené à abandonner d'entrée les désacétylations évoquées dans la littérature utilisant du méthanol ammoniacal^{42, 354, 357-358} (sous atmosphère inerte afin d'éviter la chimioluminescence de **Q** en milieu basique), le réactif comme les gaz inertes étant beaucoup plus rares chez nos collègues que dans un laboratoire de chimie.

Étonnamment, la désacétylation de **Z** en milieu acide n'avait à notre connaissance jamais été revendiquée, quand bien même cette réaction semble évidente d'un point de vue purement chimique et que l'acide résiduel en solution après déprotection permet de limiter la chimioluminescence en milieu basique des luciférines. Par ailleurs, il était essentiel de s'assurer de la solubilité du réactif **Z** comme du produit **Q** lors de la réaction ; nous avons par conséquent privilégié l'utilisation d'un mélange de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'éthanol comme solvants (Schéma 73).

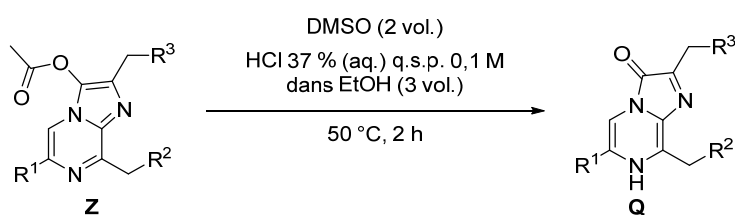


Schéma 73 : déprotection des proluciférines **Z** en imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**

Nous avons pu vérifier par spectrométrie de masse (Figure 19) que les composés O-acétylés **Z** étaient effectivement désacétylés en 2 heures à 50 °C (en étuve ou en bain d'eau thermostaté, typiquement présent dans un laboratoire de biologistes) pour fournir des solutions mères de **Q** à diluer dans le tampon choisi pour les expériences de bioluminescence. Dans le cadre des études présentées dans la prochaine partie, nous avons ajusté les volumes de DMSO et d'éthanol acide de manière à obtenir une concentration finale arbitraire de 4.5 mM.

^{*} Des lots conservés à température ambiante, sans aucune précaution particulière, n'ont montré aucune évolution en CL/SM et en RMN après deux années.

Partie II : Synthèse d'imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones

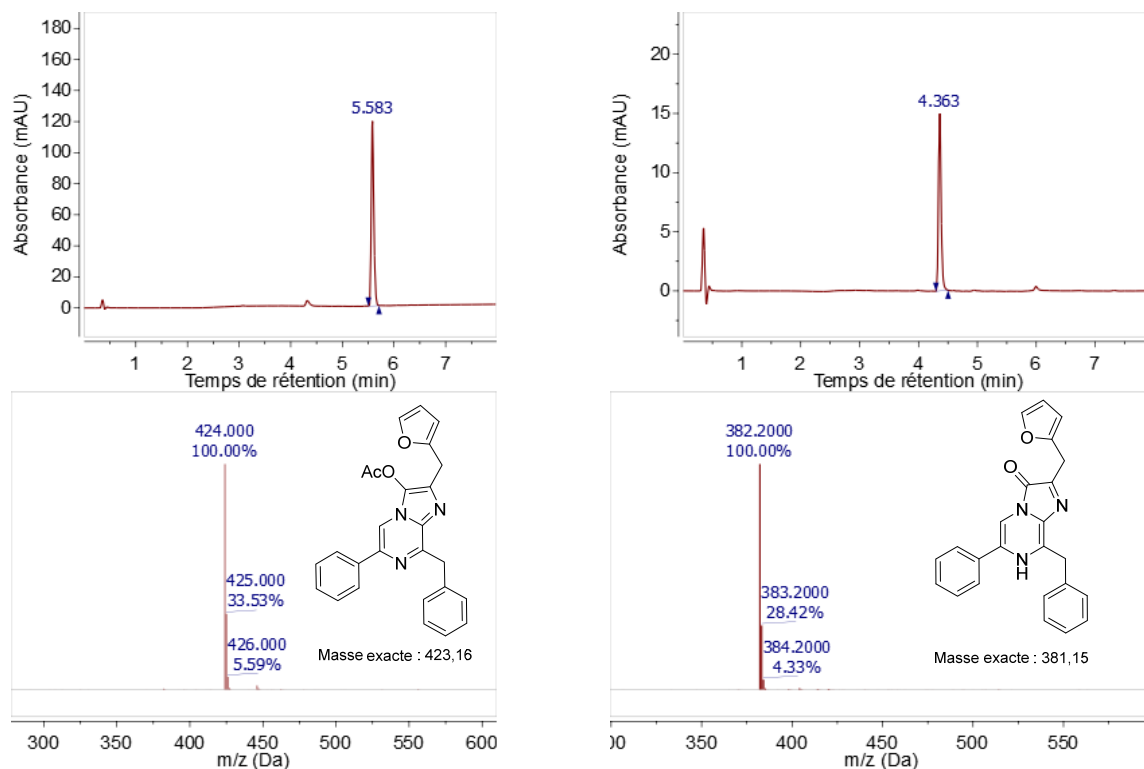


Figure 19 : observation en CL/SM de la déprotection en 2 h à 50 °C de **Z1** en **Q1** (observation en spectrométrie de masse des $[M+H]^+$, élution en chromatographie en phase inverse eau-acétonitrile 95:5–5:95 en 3 min ; le pic à 0,5 min est le pic d'injection)

IV - EXPERIMENTAL SECTION

A Biotage Initiator 2 microwave oven was used for reactions mentioning such heating method.

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer at 400 MHz and 100 MHz, respectively. Shifts (δ) are given in ppm with respect to the TMS signal and cross-coupling constants (J) are given in Hertz.

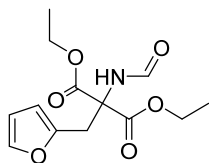
Column chromatography were performed either on Merck silica gel 60 (0.035–0.070 mm) or neutral alumina using a Gilson solvent pump and a Gilson automated collecting system driven by a UV detector set to 254 nm (or 280 nm if the elution mixture contains ethyl acetate). Sample deposition was always carried out by absorption of the mixture to be purified on a small amount of the solid phase followed by its deposition on the top of the column.

The low resolution mass spectra were obtained on an Agilent 1200 series LC/MS system using an Agilent JetStream atmospheric electrospray ionization system. The high resolution mass spectra (HRMS) were obtained using a Waters Micromass Q-TOF with an electrospray ion source.

The reagents were bought from Merck–Sigma Aldrich, ThermoFisher (Alfa Aesar, Acros), TCI chemicals, or Fluorochem and were used without further purification. If needed, methanol was dried by storage over 3 Å molecular sieves, ethanol and toluene were dried by storage over 4 Å molecular sieves.³⁵⁹ Anhydrous *N,N*-dimethylformamide, acetonitrile, and tetrahydrofuran were bought and directly syringed from the bottle under an argon balloon.

Experiments needing to be under inert atmosphere were purged with a stream of dry argon then carried out with an argon balloon to keep a positive pressure of inert gas.

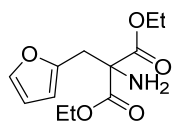
IV.A. Preparations of molecules described in I.A

Diethyl 2-formamido-2-(furan-2-ylmethyl)malonate (48)

Phosphorus tribromide (2.9 g, 0.37 eq) was added dropwise to an ice-cold solution of furfuryl alcohol (2.8 g, 1 eq) in tetrahydrofuran (15 mL). After 1.5 h, the reaction was quenched with water and extracted with 2x50 mL diethyl ether. The combined organic phases were washed with saturated sodium hydrogen carbonate, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to the tenth of the initial diethyl ether volume.

The resulting solution of furfuryl bromide (**46**) was added over a mixture prepared beforehand of diethyl formamidomalonate (**47**, 4.6 g, 0.8 eq) and sodium hydride (60% in mineral oil, 1.0 g, 0.9 eq) in *N,N*-dimethylformamide (100 mL), then heated at 70 °C for 1.5 h. This was then concentrated under vacuum, diluted in hydrochloric acid 1M, and extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed six times with water, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. Purification with a chromatography over silica gel (cyclohexane-ethyl acetate 3:1 to 2:1) and recrystallizations in cyclohexane gave the desired product as fluffy white crystals (**48**, 1.8 g, 22%).

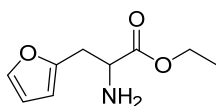
^1H NMR (CDCl_3): 8.17 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.28 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.09 (dd, $J = 3.2, 0.6$ Hz, 1H), 4.31 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.31 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 166.9, 159.7, 149.4, 142.2, 110.3, 108.9, 65.2, 63.0, 31.5, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}$: 306.0954. Found: 306.1088.

Diethyl 2-amino-2-(furan-2-ylmethyl)malonate (49)

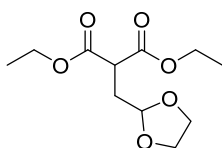
Diethyl 2-formamido-2-(furan-2-ylmethyl)malonate (**48**, 0.20 g) was heated 0.5 h at 100 °C with microwave irradiation in an excess of 10:1 ethanol-37% hydrochloric acid mixture (13 mL). This was concentrated to dryness, diluted in ethyl acetate, washed with saturated sodium hydrogen carbonate, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The desired product was obtained with as an oil (**49**, 0.16 g, 89%).

^1H NMR (CDCl_3): 7.34 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H), 6.31 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 3.2, 0.8$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.94 (bs, 2H), 3.48 (s, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 169.4 (2C), 149.0, 142.5, 110.4, 109.4, 65.3, 62.5 (2C), 33.7, 14.0 (2C). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_5$: 256.1185. Found: 256.1145.

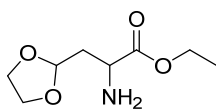
It is also possible after heating to lyophilize the resulting mixture to give the hydrochloride salt of **49** as an off-white solid with a quantitative yield.

Ethyl 2-amino-3-(furan-2-yl)propanoate (21a) from 49

Diethyl 2-amino-2-(furan-2-ylmethyl)malonate (**49**, 0.70 g, 1.0 eq) and potassium hydroxide (0.34 g, 2.2 eq) were stirred at room temperature in 1:1 ethanol–water (80 mL) during 20 h. After evaporation of ethanol under vacuum and acidification with diluted hydrochloric acid, the aqueous phase was lyophilized during 48 h. The resulting mixture was heated to reflux of chlorobenzene for 10 min, then concentrated to dryness, diluted in ethyl acetate, and washed with saturated sodium hydrogen carbonate and brine. Removal of solvents under vacuum gave the desired product as a yellowish oil (**21a**, 0.33 g, 65%). ¹H NMR (CDCl₃): 7.35 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H), 6.13 (dd, *J* = 3.1, 0.7 Hz, 1H), 4.30–4.10 (m, 2H), 3.77 (dd, *J* = 7.2, 5.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 14.9, 5.2 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 14.9, 7.2 Hz, 1H), 1.61 (s, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 174.7, 151.5, 141.9, 110.3, 107.5, 61.0, 53.8, 33.5, 14.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₄NO₃: 184.0974. Found: 184.0934.

Diethyl 2-((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)malonate (52at)

Sodium hydride (60% in mineral oil, 3.2 g, 1.2 eq) was added portion–wise to an ice–cold solution of diethyl malonate (**43**, 21.1 g, 2.0 eq) in DMF (150 mL). After 10 min stirring at 0 °C, 2-(bromomethyl)-1,3-dioxolane (**51**, 11.0 g, 1.0 eq) was added and the mixture was heated under argon atmosphere at 80 °C for 17 h. After evaporation of solvents, the crude was dissolved in saturated ammonium chloride and extracted with diethyl ether. The organic phase was washed thrice with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. Purification by chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 10:1 to 1:1) gave the desired product as a colorless oil (**52at**, 7.9 g, 50%). ¹H NMR (CDCl₃): 5.03 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.28–4.14 (m, 4H), 4.03–3.90 (m, 2H), 3.94–3.80 (m, 2H), 3.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.36 (dd, *J* = 7.2, 3.9 Hz, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃): 169.2, 102.0, 65.1 (2C), 61.4 (2C), 46.9, 32.5, 26.9, 14.0 (2C). HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₈O₆Na: 269.1001. Found: 269.0999.

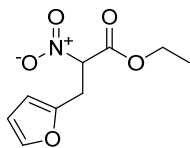
Ethyl 2-amino-3-(1,3-dioxolan-2-yl)propanoate (21at)

A solution of potassium hydroxide (1.8 g, 1.0 eq.) in ethanol (60 mL) was added dropwise to diethyl 2-((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)malonate (**52at**, 7.8 g, 1.0 eq) in ethanol (40 mL) and stirred overnight at room temperature. Unreacted **52at** was extracted with dichloromethane, then the aqueous phase was made acidic with 37% hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The resulting organic phase was washed twice with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness to give 2-((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-3-ethoxy-3-oxopropanoic acid (**53**, 3.9 g, 56%). **53** (3.9 g, 1.0 eq) was dissolved without further purification along with triethylamine (2.1 g, 1.2 eq) in dry toluene (50 mL) degassed by bubbling argon and kept under inert atmosphere. Diphenylphosphoryl azide (5.3 g, 1.1 eq) was added dropwise with a syringe and the mixture was stirred 15 min at room temperature then

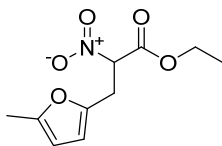
Experimental section

1.5 h at 80 °C. Toluene was evaporated under reduced pressure and the crude green oil was triturated twenty times with cyclohexane. Combined organic phases were concentrated to dryness to afford 3.0 g of unpurified ethyl 3-(1,3-dioxolan-2-yl)-2-isocyanatopropanoate **54**. This was then stirred over the week-end in water (50 mL) with 37% hydrochloric acid (1.1 mL, 1.0 eq), diluted with 1 M hydrochloric acid and washed with ethyl acetate. The aqueous phase was made basic with 28% ammonium hydroxide and extracted thrice with ethyl acetate. These organic phases were washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness to give ethyl 2-amino-3-(1,3-dioxolan-2-yl)propanoate as a colorless oil (**21at**, 0.41 g, 12%). ¹H NMR (CDCl₃): 5.05 (dd, *J* = 5.1, 4.2 Hz, 1H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.04–3.92 (m, 2H), 3.92–3.80 (m, 2H), 3.66 (dd, *J* = 8.2, 4.5 Hz, 1H), 2.15 (ddd, *J* = 14.1, 5.1, 4.5 Hz, 1H), 1.95 (ddd, *J* = 14.1, 8.2, 4.2 Hz, 1H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 175.3, 102.6, 64.9, 64.8, 61.0, 51.2, 38.3, 14.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₆NO₄: 190.1079. Found: 190.1061.

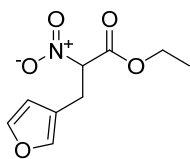
IV.B. Preparations of molecules described in I.B.1

Ethyl 3-(furan-2-yl)-2-nitropropanoate (57a) via ethyl 3-(furan-2-yl)-2-nitroacrylate (56a)

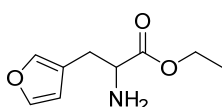
A solution of ethyl nitroacetate (**44**, 3.0 g, 1.0 eq) and furfural (**32a**, 2.2 g, 1.0 eq) in toluene with 4 Å molecular sieve (50 g) was degassed by bubbling argon. Piperidine (0.20 g, 0.1 eq) was added and the mixture was heated at reflux for two hours, then concentrated to dryness. Purification by chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 1:1) gave a 2:3 mixture of nitroacrylate isomers (**56a**, 2.3 g, 48%). The acrylate (**56a**, 0.50 g, 1 eq) was dispersed in isopropanol (10 mL, dried over 4 Å molecular sieve). To this was added portion–wise sodium borohydride (0.09 g, 1 eq) and the suspension was heated at reflux before allowing it to cool back to room temperature. Acetic acid was then cautiously added (0.5 mL, 3 eq). The crude was dispersed in water, extracted with ethyl acetate, then the organic layer was washed with 1 N hydrochloric acid, water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness to give 95% pure ethyl 3-(furan-2-yl)-2-nitropropanoate (**57a**, 0.41 g, 77%). ¹H NMR (CDCl₃): 7.37–7.36 (m, 1H), 6.33–6.31 (m, 1H), 6.20–6.18 (m, 1H), 5.44 (dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, 1H), 4.32 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (dd, *J* = 15.8, 9.3 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* = 15.8, 5.5 Hz, 1H), 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.7, 147.8, 142.6, 110.4, 86.3, 63.3, 29.2, 13.8. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₉H₁₁NO₅Na: 236.0535; found, 236.0522.

Ethyl 3-(5-methylfuran-2-yl)-2-nitropropanoate (57c) via ethyl 3-(5-methylfuran-2-yl)-2-nitroacrylate (56c)

A solution of ethyl nitroacetate (**44**, 4.20 g, 1.1 eq) and 5-methylfurfural (**32c**, 3.33 g, 1.0 eq) in toluene (100 mL) with 4 Å molecular sieve (20 g) was degassed by bubbling argon. Piperidine (0.26 g, 0.1 eq) was added and the mixture was heated at reflux for three hours, then concentrated to dryness to give the crude nitroacrylate **56c** (6.37 g). A portion of the crude (1.19 g, 1.0 eq) was diluted in ice–cold isopropanol (100 mL). Sodium borohydride (0.24 g, 1.2 eq) was added portion–wise at 0 °C, then the mixture was stirred 1 h at room temperature. Acetic acid was then cautiously added. The crude was dispersed in water, extracted with ethyl acetate, then the organic layer was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness to give 98% pure ethyl 3-(5-methylfuran-2-yl)-2-nitropropanoate (**57c**, 0.97 g, 76%). ¹H NMR (CDCl₃): 6.02 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.89–5.83 (m, 1H), 5.40 (dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.58 (dd, *J* = 15.7, 9.3 Hz, 1H), 3.45 (dd, *J* = 15.7, 5.5 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.9, 152.4, 145.9, 109.3, 106.6, 86.7, 63.4, 29.5, 14.0, 13.6. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₁₃NO₅Na: 250.0691; found, 250.0682.

Ethyl 3-(furan-3-yl)-2-nitropropanoate (57b)

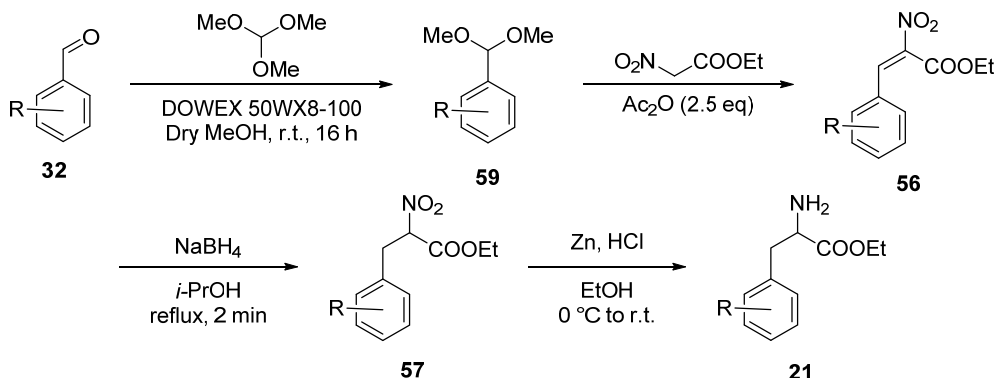
Obtained as an oil (0.74 g, 34% from furan-3-carbaldehyde **32b**) from ethyl 3-(furan-3-yl)-2-nitroacrylate prepared as described for **56a**, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5 to 90:10). ¹H NMR (CDCl₃): 7.40–7.38 (m, 1H), 7.35–7.33 (m, 1H), 6.31–6.30 (m, 1H), 5.26 (dd, *J* = 9.4, 5.5 Hz, 1H), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.45 (dd, *J* = 15.3, 9.4 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 15.3, 5.5 Hz, 1H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.9, 143.6, 140.8, 117.7, 110.4, 88.3, 63.2, 26.1, 13.8. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₉H₁₁NO₅Na, 236.0559; found, 236.0567.

Ethyl 2-amino-3-(furan-3-yl)propanoate (21b)

Ethyl 3-(furan-3-yl)-2-nitropropanoate (**57b**, 0.74 g, 1.0 eq) and 37% hydrochloric acid (4.3 mL, 15 eq) were dissolved in ethanol (10 mL) at 0 °C. Zinc dust (1.36 g, 6 eq) was added portion-wise (waiting for the zinc cloud to disappear between each portion), then the mixture was stirred 2 h at room temperature. The reaction was diluted in water, made basic with 28% ammonium hydroxide (until disappearance of white zinc complexes), and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over sodium carbonate, and concentrated to dryness to afford ethyl 2-amino-3-(furan-3-yl)propanoate (0.59 g, 92%). ¹H NMR (CDCl₃): 7.40–7.38 (m, 1H), 7.35–7.33 (m, 1H), 6.31–6.30 (m, 1H), 5.26 (dd, *J* = 9.4, 5.5 Hz, 1H), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.45 (dd, *J* = 15.3, 9.4 Hz, 1H), 3.32 (dd, *J* = 15.3, 5.5 Hz, 1H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 175.0, 143.1, 140.4, 120.0, 111.1, 60.9, 54.7, 30.2, 14.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₄NO₃, 184.0974; found, 184.0951.

IV.C. Preparations of α -aminoesters from aldehyde acetals and ethyl nitroacetate (I.B.2)

IV.C.1. General procedure



Step 1: preparation of dimethylacetals **59**

The corresponding aldehyde **32** (1.0 eq) and trimethylorthoformate (1.2 eq) were dissolved in methanol (5 eq, dried over 3 \AA molecular sieve). To this was added the DOWEX 50WX8-100 ion-exchange resin (0.1 g) and the solution was stirred overnight under a calcium chloride-protected atmosphere. The resin was then removed by filtration, the filter washed with dry methanol and the filtrate concentrated to dryness (at 30 mbar) to yield the corresponding volatile acetal (usually not fully stable in CDCl_3).

Step 2: condensation with ethyl nitroacetate (**44**), preparation of the nitroacrylates **56**

In order to remove some eventual traces of water, prior to this reaction, under a calcium chloride-protected atmosphere, the nitroacetate (**44**, 1.0 eq) was stirred in acetic anhydride (1.2 eq) for 15 minutes. To this solution was added the crude acetal described above dissolved in acetic anhydride (1.2 eq) and the solution was heated at the temperature and time described in each case below while allowing the resulting low boiling methyl acetate to distil off. This was then thoroughly concentrated to dryness to yield the crude 3-aryl-2-nitroacrylates **56**.

Step 3: reduction with sodium borohydride, preparation of the α -nitroesters **57**

The crude acrylate **56** was dispersed/dissolved in isopropanol (100 mL, dried over 4 \AA molecular sieve). To this was added portion-wise sodium borohydride (1 eq) and the suspension was heated up to reflux before allowing it to cool back to room temperature. Acetic acid was then cautiously added (1 eq) and the isopropanol was removed under vacuum. The crude residue was dispersed in water and 10% hydrochloric acid (1.1 eq) was added to help the hydrolysis of unreacted boron hydrides. The resulting solution was extracted with ethyl acetate, the organic layer was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The residue was then purified as described in each case below to yield the corresponding substituted nitroester **57**.

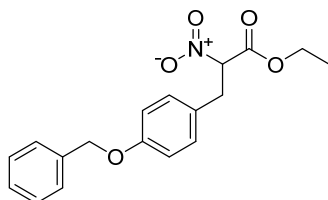
Step 4: reduction with zinc and hydrochloric acid, preparation of the α -aminoesters **21**

The nitroester **57** (1 eq) and 37% hydrochloric acid (15 eq) were dissolved in ethanol (three times the volume of HCl 37%) at $0\text{ }^\circ\text{C}$. Zinc dust (6 eq) was added portion-wise (waiting for the zinc cloud to disappear between each portion), then the mixture was stirred 2 h at room temperature. The reaction

was diluted in water and ethyl acetate, made basic with 28% ammonium hydroxide (until disappearance of white zinc complexes), and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over sodium carbonate, and concentrated to dryness to afford the corresponding α -aminoesters **21**.

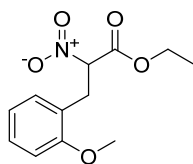
IV.C.2. α -Nitroesters

Ethyl 3-(4-(benzyloxy)phenyl)-2-nitropropanoate (**57j**)



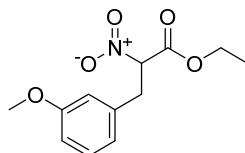
Obtained as a yellow solid (4.08 g, 51% from 4-benzyloxybenzaldehyde **32j**) after heating at 150 °C for 9 h in the course of the condensation step and a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 92:8 to 9:1). ^1H NMR (CDCl_3): 7.47–7.39 (m, 4H), 7.38–7.32 (m, 1H), 7.18–7.13 (m, 2H), 6.98–6.92 (m, 2H), 5.36–5.28 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.30 (qd, $J = 7.1, 1.4$ Hz, 2H), 3.58–3.40 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 164.1, 158.4, 136.8, 130.0, 128.6, 128.4, 128.0, 127.4, 126.3, 115.3, 89.4, 70.1, 63.1, 35.5, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Na}$: 352.1161; found, 352.1150.

Ethyl 3-(2-methoxyphenyl)-2-nitropropanoate (**57s**)

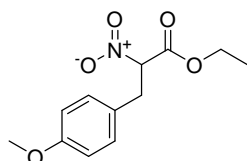


Obtained as an oil (6.12 g, 53% from 2-methoxybenzaldehyde **32s**) after heating at 150 °C for 9 h in the course of the condensation step and a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5 to 9:1). ^1H NMR (CDCl_3): 7.31–7.26 (m, 1H), 7.14 (dd, $J = 7.2, 1.7$ Hz, 1H), 6.93–6.86 (m, 2H), 5.57 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.55 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 14.1, 8.9$ Hz, 1H), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 164.5, 157.4, 131.3, 129.3, 122.2, 120.8, 110.3, 87.1, 62.8, 55.3, 32.3, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{Na}$: 276.0848; found, 276.0831.

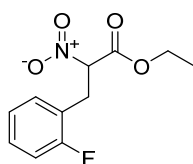
Ethyl 3-(3-methoxyphenyl)-2-nitropropanoate (**57t**)



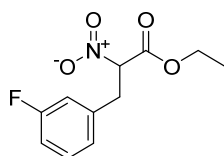
Obtained as an oil (2.34 g, 21% from 3-methoxybenzaldehyde **32t**) after heating at 150 °C for 9 h in the course of the condensation step and a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5 to 9:1). ^1H NMR (CDCl_3): 7.28–7.22 (m, 1H), 6.85–6.79 (m, 2H), 6.78–6.75 (m, 1H), 5.35 (dd, $J = 9.4, 5.9$ Hz, 1H), 4.31 (qd, $J = 7.1, 1.0$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.56 (dd, $J = 14.6, 9.4$ Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 14.6, 5.9$ Hz, 1H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 164.5, 157.4, 131.3, 129.3, 122.2, 120.8, 110.3, 87.1, 62.8, 55.3, 32.3, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{Na}$: 276.0848; found, 276.0831.

Ethyl 3-(4-methoxyphenyl)-2-nitropropanoate (57u)

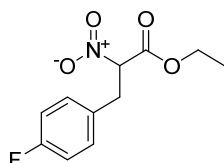
Obtained as an oil (6.95 g, 55% from 4-methoxybenzaldehyde **32u**) after heating at 150 °C for 9 h in the course of the condensation step and a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5 to 9:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.19–7.11 (m, 2H), 6.91–6.82 (m, 2H), 5.30 (dd, *J* = 9.4, 6.0 Hz, 1H), 4.30 (qd, *J* = 7.1, 1.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.52 (dd, *J* = 14.6, 9.4 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J* = 14.6, 6.0 Hz, 1H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 164.1, 159.2, 130.0, 126.0, 114.4, 89.4, 63.1, 55.2, 35.5, 13.9. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₅NO₅Na: 276.0848; found, 276.0840.

Ethyl 3-(2-fluorophenyl)-2-nitropropanoate (57y)

Obtained as an oil (0.73 g, 6% from 2-fluorobenzaldehyde **32y**) after heating at 190 °C for 4 h in the course of the condensation step and two chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1) and (cyclohexane–dichloromethane 2:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.34–7.27 (m, 1H), 7.25–7.18 (m, 1H), 7.14–7.05 (m, 2H), 5.45 (dd, *J* = 8.8, 6.6 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.65–3.51 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.9, 161.2 (d, *J* = 246 Hz), 131.5 (d, *J* = 4 Hz), 129.9 (d, *J* = 8 Hz), 124.6 (d, *J* = 4 Hz), 121.1 (d, *J* = 15 Hz), 115.6 (d, *J* = 21 Hz), 87.3, 63.2, 30.4 (d, *J* = 2 Hz), 13.8. HRMS (*m/z*): [M-H][−] calcd for C₁₁H₁₁FNO₄: 240.0672; found, 240.0675.

Ethyl 3-(3-fluorophenyl)-2-nitropropanoate (57z)

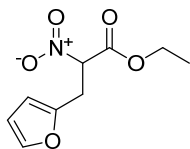
Obtained as an oil (0.59 g, 5% from 3-fluorobenzaldehyde **32z**) after heating at 160 °C for 8 h then at 190 °C for 4 h in the course of the condensation step and two chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5) and (cyclohexane–dichloromethane 2:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.36–7.28 (m, 1H), 7.04–6.99 (m, 2H), 6.99–6.93 (m, 1H), 5.34 (dd, *J* = 9.4, 5.8 Hz, 1H), 4.32 (qd, *J* = 7.2, 0.9 Hz, 2H), 3.58 (dd, *J* = 14.7, 9.4 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 14.7, 5.8 Hz, 1H), 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.8, 162.9 (d, *J* = 248 Hz), 136.5 (d, *J* = 7 Hz), 130.6 (d, *J* = 9 Hz), 124.6 (d, *J* = 3 Hz), 116.0 (d, *J* = 22 Hz), 114.9 (d, *J* = 21 Hz), 88.8, 63.3, 35.9 (d, *J* = 2 Hz), 13.8. HRMS (*m/z*): [M-H][−] calcd for C₁₁H₁₁FNO₄: 240.0672; found, 240.0675.

Ethyl 3-(4-fluorophenyl)-2-nitropropanoate (57aa)

Obtained as an oil (2.72 g, 23% from 4-fluorobenzaldehyde **32aa**) after heating at 190 °C for 4 h in the course of the condensation step and two chromatography over silica gel

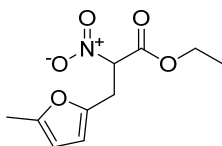
(cyclohexane–ethyl acetate 9:1) and (cyclohexane–dichloromethane 2:1). ^1H NMR (CDCl_3): 7.26–7.15 (m, 2H), 7.08–6.97 (m, 2H), 5.32 (dd, $J = 9.4, 5.8$ Hz, 1H), 4.30 (qt, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 2H), 3.56 (dd, $J = 14.7, 9.4$ Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 14.7, 5.8$ Hz, 1H), 1.30 (td, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.8, 162.3 (d, $J = 247$ Hz), 130.6 (d, $J = 8$ Hz), 129.8 (d, $J = 3$ Hz), 115.9 (d, $J = 22$ Hz), 89.1, 63.2, 35.5, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FNO}_4$: 240.0672; found, 240.0645.

Ethyl 3-(furan-2-yl)-2-nitropropanoate (57a)



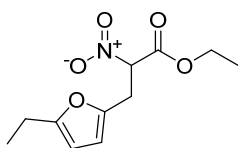
Obtained as an oil (3.82 g, 24% from furfural **32a**) after heating at 140 °C for 2 h in the course of the condensation step and two chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1) and (cyclohexane–dichloromethane 3:2). ^1H NMR (CDCl_3): 7.37–7.36 (m, 1H), 6.33–6.31 (m, 1H), 6.20–6.18 (m, 1H), 5.44 (dd, $J = 9.3, 5.5$ Hz, 1H), 4.32 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.67 (dd, $J = 15.8, 9.3$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J = 15.8, 5.5$ Hz, 1H), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.7, 147.8, 142.6, 110.4, 86.3, 63.3, 29.2, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{Na}$: 236.0535; found, 236.0522.

Ethyl 3-(5-methylfuran-2-yl)-2-nitropropanoate (57c)

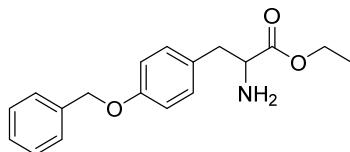


Obtained as an oil (3.44 g, 60% from 5-methylfurfural **32c**) after heating at 140 °C for 2 h in the course of the condensation step and a chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 3:2). ^1H NMR (CDCl_3): 6.02 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.89–5.83 (m, 1H), 5.40 (dd, $J = 9.3, 5.5$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.58 (dd, $J = 15.7, 9.3$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 15.7, 5.5$ Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.9, 152.4, 145.9, 109.3, 106.6, 86.7, 63.4, 29.5, 14.0, 13.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{Na}$: 250.0691; found, 250.0682.

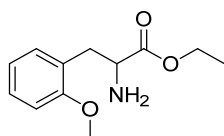
Ethyl 3-(5-ethylfuran-2-yl)-2-nitropropanoate (57d)



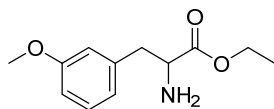
Obtained as an oil (3.68 g, 39% from 5-ethylfurfural **32d**) after heating at 140 °C for 2 h in the course of the condensation step and two chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 2:1 to 1:6) and (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 6.06 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.91–5.86 (m, 1H), 5.43 (dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, 1H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.61 (dd, $J = 15.7, 9.3$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 15.7, 5.6$ Hz, 1H), 2.61 (q, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.8, 157.9, 145.7, 108.9, 104.8, 86.5, 63.2, 29.3, 21.3, 13.8, 12.0. HRMS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_5$: 240.0872; found, 240.0857.

IV.C.3. α -Aminoesters**Ethyl 2-amino-3-(4-(benzyloxy)phenyl)propanoate (21j)**

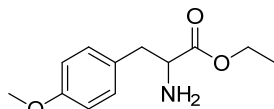
Obtained as an oil (6.44 g, 93% from **57j**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.49–7.31 (m, 6H), 7.18–7.10 (m, 2H), 6.98–6.90 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.69 (dd, $J = 7.7$, 5.3 Hz, 1H), 3.04 (dd, $J = 13.7$, 5.4 Hz, 1H), 2.84 (dd, $J = 13.7$, 7.7 Hz, 1H), 1.48 (bs, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.1, 157.8, 133.1, 130.3, 130.0, 129.6, 128.6, 127.9, 127.4, 114.9, 70.0, 60.8, 56.0, 40.3, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3$: 300.1600; found, 300.1591.

Ethyl 2-amino-3-(2-methoxyphenyl)propanoate (21s)

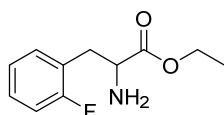
Obtained as an oil (5.16 g, 90% from **57s**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.26–7.20 (m, 1H), 7.17–7.12 (m, 1H), 6.96–6.84 (m, 2H), 4.15 (qd, $J = 7.1$, 2.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (dd, $J = 8.1$, 5.8 Hz, 1H), 3.11 (dd, $J = 13.3$, 5.8 Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 13.3$, 8.1 Hz, 1H), 1.51 (bs, 2H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.4, 157.8, 131.2, 128.1, 125.9, 120.4, 110.4, 60.7, 55.2, 54.5, 36.3, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3$: 224.1287; found, 224.1218.

Ethyl 2-amino-3-(3-methoxyphenyl)propanoate (21t)

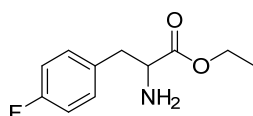
Obtained as an oil (0.81 g, 92% from **57t**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.84–6.74 (m, 3H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (dd, $J = 7.9$, 5.2 Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 13.5$, 5.2 Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.5$, 7.9 Hz, 1H), 1.52 (bs, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.9, 159.7, 138.9, 129.5, 121.6, 115.0, 112.2, 60.9, 55.8, 55.1, 41.2, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3$: 224.1287; found, 224.1260.

Ethyl 2-amino-3-(4-methoxyphenyl)propanoate (21u)

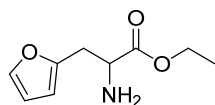
Obtained as an oil (4.2 g, 95% from **57u**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.17–7.09 (m, 2H), 6.90–6.82 (m, 2H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.68 (dd, $J = 7.7$, 5.3 Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 13.6$, 5.3 Hz, 1H), 2.83 (dd, $J = 13.6$, 7.7 Hz, 1H), 1.48 (bs, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.1, 158.5, 130.3, 129.3, 114.0, 60.8, 56.0, 55.2, 40.2, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3$: 224.1287; found, 224.1238.

Ethyl 2-amino-3-(2-fluorophenyl)propanoate (21y)

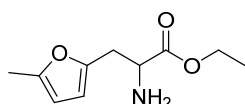
Obtained as an oil (0.34 g, 92% from **57y**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.28–7.20 (m, 2H), 7.12–7.02 (m, 2H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.77 (dd, $J = 7.9, 5.8$ Hz, 1H), 3.11 (dd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 13.7, 7.9$ Hz, 1H), 1.64 (s, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.9, 161.4 (d, $J = 246$ Hz), 131.7 (d, $J = 5$ Hz), 128.6 (d, $J = 8$ Hz), 124.4 (d, $J = 16$ Hz), 124.0 (d, $J = 4$ Hz), 115.4 (d, $J = 22$ Hz), 61.0, 54.8, 34.8, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FNO}_2$: 212.1087; found, 212.1045.

Ethyl 2-amino-3-(4-fluorophenyl)propanoate (21aa)

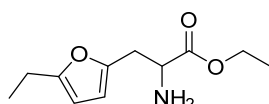
Obtained as an oil (1.95 g, 94% from **57aa**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.22–7.14 (m, 2H), 7.04–6.96 (m, 2H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.69 (dd, $J = 7.7, 5.5$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 13.7, 5.5$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 13.7, 7.7$ Hz, 1H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.0, 161.9 (d, $J = 245$ Hz), 133.0 (d, $J = 4$ Hz), 130.8 (d, $J = 8$ Hz, 2C), 115.3 (d, $J = 22$ Hz, 2C), 61.0, 55.9, 40.3, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FNO}_2$: 212.1087; found, 212.1069.

Ethyl 2-amino-3-(furan-2-yl)propanoate (21a)

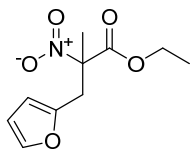
Obtained as an oil (4.84 g, 94% from **57a**). Analytical data similar to what was described above.

Ethyl 2-amino-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (21c)

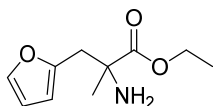
Obtained as an oil (1.26 g, 95% from **57c**). ^1H NMR (CDCl_3): 5.97 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 5.88–5.82 (m, 1H), 4.24–4.14 (m, 2H), 3.72 (dd, $J = 7.3, 5.0$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 14.9, 5.0$ Hz, 1H), 2.91 (dd, $J = 14.9, 7.3$ Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.57 (s, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.9, 151.5, 149.6, 108.5, 106.2, 61.1, 54.0, 33.8, 14.3, 13.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3$, 198.1130; found, 198.1089.

Ethyl 2-amino-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (21d)

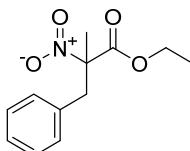
Obtained as an oil (1.83 g, 56% from **57d**) after a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 to 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 6.01 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.91–5.85 (m, 1H), 4.25–4.16 (m, 2H), 3.75 (dd, $J = 7.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 14.8, 5.0$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 14.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.61 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.7, 157.1, 149.3, 108.1, 104.4, 60.9, 53.8, 33.7, 21.3, 14.2, 12.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_3$, 212.1287; found, 212.1261.

IV.D. Preparations of α -methylaminoesters (I.B.3)**Ethyl 3-(furan-2-yl)-2-methyl-2-nitropropanoate (60a)**

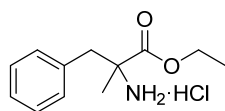
Ethyl 3-(furan-2-yl)-2-nitropropanoate (1.30 g, 1.00 eq) was dissolved in ice-cold anhydrous DMF (10 mL) under inert atmosphere. Sodium hydride (60% in mineral oil, 0.25 g, 1.05 eq) was added and the solution was stirred 1.5 h at 0 °C. Methyl iodide (0.76 mL, 2.00 eq) was added and the solution was stirred at room temperature over week-end. The crude was diluted in water and extracted with ethyl acetate. The organic phase was then washed thrice with brine and dried over magnesium sulfate to afford the desired product (**60a**, 0.60 g, 43%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 2:1 to 1:1). ^1H NMR (CDCl_3): 7.33 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.15 (dd, $J = 3.2, 0.8$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.67 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 3.53 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 166.9, 147.8, 142.9, 110.8, 109.9, 92.0, 63.2, 35.3, 21.3, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{Na}$: 250.0691. Found: 250.0702.

Ethyl 2-amino-3-(furan-2-yl)-2-methylpropanoate (61a)

60a (0.60 g, 1 eq) and 37% hydrochloric acid (3.3 mL, 15 eq) were dissolved in ethanol (26 mL) at 0 °C. Zinc dust (1.04 g, 6 eq) was added portion-wise (waiting for the zinc cloud to disappear between each portion), then the mixture was stirred 16 h at room temperature. The reaction was diluted in water, made basic with 28% ammonium hydroxide (until disappearance of white zinc complexes), and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over sodium carbonate, and concentrated to dryness to afford the desired product (0.39 g, 75%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.30 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H), 6.09 (dd, $J = 3.1, 0.8$ Hz, 1H), 4.16 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.13 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 1.76 (s, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 176.8, 151.6, 142.0, 110.3, 108.2, 61.3, 58.0, 39.5, 26.6, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3$: 198.1130. Found: 198.1075.

Ethyl 2-methyl-2-nitro-3-phenylpropanoate (60i)

Ethyl 2-nitro-3-phenylpropanoate (3.84 g, 1.00 eq) was dissolved in ice-cold anhydrous DMF (50 mL) under inert atmosphere. Sodium hydride (60% in mineral oil, 0.70 g, 1.02 eq) was added and the solution was stirred 30 min at 0 °C. Methyl iodide (1.60 mL, 1.50 eq) was added and the solution was stirred at room temperature overnight. The crude was diluted in water and extracted with ethyl acetate. The organic phase was then washed twice with water, brine and dried over magnesium sulfate to afford the desired product (**60i**, 1.89 g, 45%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 2:1). Analytical data was similar to literature.²¹⁶

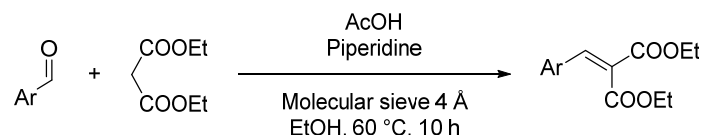
Ethyl 2-amino-2-methyl-3-phenylpropanoate hydrochloride (61i)

60i (1.89 g, 1 eq) and 37% hydrochloric acid (9.9 mL, 15 eq) were dissolved in ethanol (75 mL) at 0 °C. Zinc dust (3.12 g, 6 eq) was added portion-wise (waiting for the zinc cloud to disappear between each portion), then the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was diluted in water, made basic with 28% ammonium hydroxide (until disappearance of white zinc complexes), and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, and dried over sodium carbonate. 4 M hydrochloric acid in 1,4-dioxane (3 mL, 1.5 eq) was added and the solution was concentrated to dryness to afford the desired product as an off-white solid (1.66 g, 90%). Analytical data was similar to literature.³⁶⁰

IV.E. Preparations of α -aminoesters from aldehydes and diethyl malonate (1.C.1)

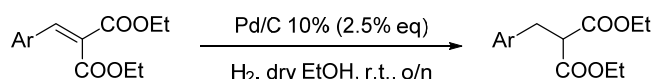
IV.E.1. General method

Step 1: Knoevenagel condensation of diethyl malonate and aldehyde, preparation of diethyl 2-arylidene malonates

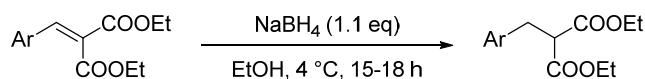


Under an inert atmosphere, the considered aldehyde (**32**, 1.0 eq), diethyl malonate (**43**, 1.0 eq), acetic acid (5% eq), piperidine (5% eq) and 4 Å molecular sieve (16x mass of water generated by the condensation) were heated in dry ethanol (q.s. 2.5 M, dried over 4 Å molecular sieve) without stirring at 60 °C for 10 h. ^1H NMR spectra of a crude sample usually pointed out the complete disappearance of the starting aldehydes.

Step 2: reduction of the substituted diethyl 2-arylidene malonate, preparation of the substituted malonate

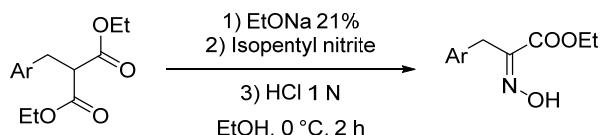


The crude arylidenemalonate prepared in Step 1 was filtered, the 4 Å molecular sieve was washed with dry ethanol. To the resulting ethanol solution, 10% palladium over charcoal (2.5% eq) was added and this was stirred overnight under a hydrogen atmosphere (1 atm). The resulting suspension was filtered, the filtrate concentrated to dryness to give fairly pure diethyl 2-(arylmethyl)malonates **63**.

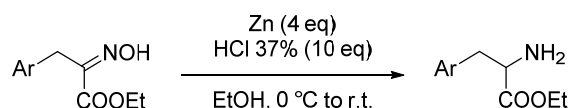


Alternatively, as specified in some of the following examples, this hydrogenation was achieved using sodium borohydride (1.1 eq) added at 4 °C and stirring overnight at this temperature. Acetic acid (1.2 eq) was then added, the mixture diluted in an excess of water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was then washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness to yield the crude substituted diethyl 2-(arylmethyl)malonates **63**.

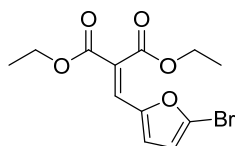
Step 3: preparation of α -hydroxyiminoesters from diethyl 2-(arylmethyl)malonates



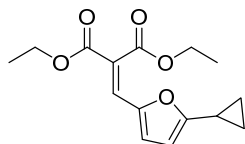
The crude substituted malonate (1.0 eq) was dissolved in ethanol (q.s. 0.75 M, dried over 4 Å molecular sieve) and cooled to 0 °C. A 21% solution of sodium ethoxide in ethanol was added (1.2 eq) followed by a slow addition of isoamyl nitrite (1.1 eq). This was stirred at 0 °C for two hours, made slightly acid by the addition of 1 N hydrochloric acid and diluted in water. The solution was extracted with ethyl acetate, the organic layer was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness to yield the crude α -hydroxyiminoesters **64** further purified as described below.

Step 4: reduction with zinc and hydrochloric acid, preparation of the α -aminoesters 21/77

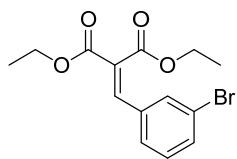
The nitroester (1 eq) and 37% hydrochloric acid (10 eq) were dissolved in ethanol at 0 °C. Zinc dust (4 eq) was added portion-wise (waiting for the zinc cloud to disappear between each portion), then the mixture was stirred 2 h at room temperature. The reaction was diluted in water and ethyl acetate, made basic with 28% ammonium hydroxide (until disappearance of white zinc complexes), and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over sodium carbonate, and concentrated to dryness to afford the corresponding α -aminoesters **21**.

*IV.E.2. Preparations of bromo- and cyclopropyl-arylidemalonates***Diethyl 2-((5-bromofuran-2-yl)methylene)malonate (62au)**

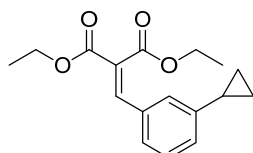
Obtained following Step 1 of the general procedure as an orange solid (**62au**, 4.72 g, 87% from 5-bromofurfural (**32au**)) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.35 (s, 1H), 6.71 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz), 6.44 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz), 4.41 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.41 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.33 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 165.8, 163.9, 150.9, 127.1, 126.2, 126.6, 119.7, 114.5, 61.8, 61.6, 14.1, 14.0. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₃BrO₅Na, 338.9844; found, 338.9868.

Diethyl 2-((5-cyclopropylfuran-2-yl)methylene)malonate (62f)

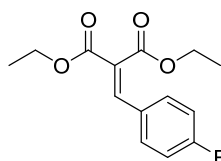
62au (4.36 g, 1.0 eq), cyclopropylboronic acid (1.53 g, 1.3 eq) and cesium carbonate (17 g, 3.9 eq) were dispersed in a 95:5 mixture of toluene and water (60 mL). This was degassed by blowing a gentle stream of argon into the suspension, [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene] dichloropalladium complexed with dichloromethane (0.28 g, 2.5% eq) was added and this was heated to reflux under argon for 50 minutes. The resulting dark solution was diluted in ethyl acetate, washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The residue was purified by a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 8:1) to give the cyclopropyl-bearing derivative as an oil (2.88 g, 75%). ¹H NMR (CDCl₃): 7.32 (s, 1H), 6.65 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 6.09 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 4.37 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 4.25 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.89 (tt, 1H, *J* = 8.4, 5.0 Hz), 1.37 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.01–0.93 (m, 2H), 0.88–0.79 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃): 166.8, 164.7, 162.5, 147.0, 127.4, 120.1, 119.9, 107.3, 61.5, 61.4, 14.3, 14.2, 9.7, 8.3, (one signal missing). HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₁₈O₅Na, 301.1052; found, 301.1034.

Diethyl 2-(3-bromobenzylidene)malonate (62aj)

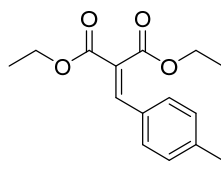
Obtained following Step 1 of the general procedure as an orange solid from 3-bromobenzaldehyde (**32aj**, 5.00 g) and the crude was used without further purification.

Diethyl 2-(3-cyclopropylbenzylidene)malonate (62q)

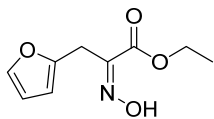
The crude **62ak** (6.44 g, considered pure) was engaged in Suzuki cross-coupling as described for **62f**, to yield after chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5) the desired product (**62q**, 4.68 g, 60% from **32aj**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.72 (s, 1H), 7.27 (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 4.36 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.32 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.90 (m, 1H), 1.35 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.32 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.99 (m, 2H), 0.69 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 166.7, 164.2, 144.6, 142.3, 132.9, 128.6, 128.1, 126.8, 128.5, 126.2, 61.6, 61.5, 15.2, 14.1, 13.9, 9.2.

Diethyl 2-(4-bromobenzylidene)malonate (62ak)

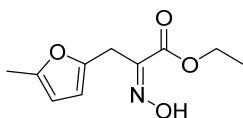
Obtained following Step 1 of the general procedure as an orange solid from 4-bromobenzaldehyde (**32ak**, 5.00 g) and the crude was used without further purification (13.27 g).

Diethyl 2-(4-cyclopropylbenzylidene)malonate (62r)

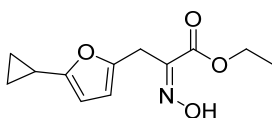
The crude arylidenemalonate **62ak** (13.27 g, considered pure) was engaged in Suzuki cross-coupling as described for **62f**, to yield after chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5) the desired product (**62r**, 4.89 g, 62% from **32ak**). ^1H NMR (CDCl_3): 7.70 (s, 1H), 7.41 – 7.33 (m, 2H), 7.11 – 7.01 (m, 2H), 4.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.92 (tt, $J = 8.3, 5.0$ Hz, 1H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.08 – 1.00 (m, 2H), 0.80 – 0.72 (m, 2H). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$, 311.1259; found, 311.1259.

IV.E.3. Preparations of α -hydroxyiminoesters**Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(furan-2-yl)propanoate (64a)**

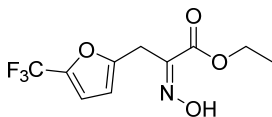
Obtained as a solid (5.98 g, 33% from furfural **32a**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.73 (s, 1H), 7.32 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.16–6.10 (m, 1H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.9, 148.7, 148.4, 141.5, 110.4, 107.0, 62.0, 23.6, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_4$: 198.0766; found: 198.0775.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (64c)

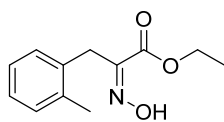
Obtained as a solid (5.99 g, 33% from 5-methylfurfural **32c**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.42 (s, 1H), 5.99 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.91–5.84 (m, 1H), 4.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.9, 151.1, 148.8, 146.7, 107.7, 106.3, 61.9, 23.6, 14.0, 13.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Na}$: 234.0742; found: 234.0744.

Ethyl 3-(5-cyclopropylfuran-2-yl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64f)

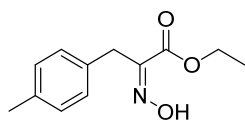
Obtained as a white solid (1.09 g, 44% from **62f**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.42 (bs, 1H), 5.97 (m, 1H), 5.84 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 4.33 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.97 (s, 2H), 1.84 (m, 1H), 1.36 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.84 (m, 2H), 0.73 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.0, 156.5, 148.8, 146.3, 107.5, 104.2, 61.9, 23.7, 14.0, 8.7, 6.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{Na}$, 260.0899; found, 260.0892.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(5-(trifluoromethyl)furan-2-yl)propanoate (64h)

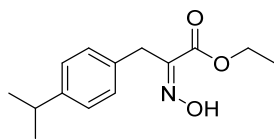
Obtained as a white solid (0.62 g, 36% from 5-trifluoromethylfuran-2-carbaldehyde **32h**), using sodium borohydride at 0 °C, after two chromatographies over silica gel (dichloromethane–ethanol 99:1) and (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.70 (s, 1H), 6.72–6.64 (m, 1H), 6.21–6.15 (m, 1H), 4.33 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.05 (s, 2H), 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.7, 152.0, 147.6, 141.0 (q, $J = 42.7$ Hz), 119.2 (q, $J = 266.7$ Hz), 112.7 (q, $J = 2.8$ Hz), 108.18 (s), 62.4, 23.7, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{NO}_4$: 266.0640; found, 266.0584.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(*o*-tolyl)propanoate (64k)

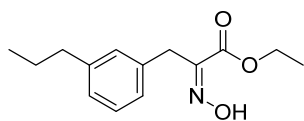
Obtained as a white solid (3.38 g, 61% from 2-methylbenzaldehyde **32k**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 10.09 (s, 1H), 7.16 (m, 4H), 4.28 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.00 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.4, 151.2, 136.5, 133.9, 130.3, 128.6, 126.7, 126.0, 61.9, 27.9, 19.7, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Na}$: 244.0950; found, 244.0942.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(*p*-tolyl)propanoate (64m)

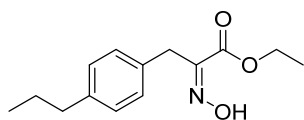
Obtained as a white solid (3.31 g, 60% from 4-methylbenzaldehyde **32m**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 10.07 (s, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 4.31 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.97 (s, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.35 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.3, 151.1, 136.2, 132.7, 129.2, 129.1, 61.9, 30.1, 21.0, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Na}$: 244.0950; found, 244.0944.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(4-isopropylphenyl)propanoate (64n)

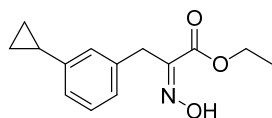
Obtained as a solid (2.04 g, 48% from 4-isopropylbenzaldehyde **32n**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.74 (s, 1H), 7.26–7.22 (m, 2H), 7.16–7.11 (m, 2H), 4.29 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.95 (s, 2H), 2.87 (hept, 1H, $J = 6.9$ Hz), 1.32 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.23 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.3, 151.2, 147.2, 133.0, 129.1, 126.6, 61.8, 33.7, 30.1, 24.0, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}$, 272.1263; found, 272.1258.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(3-propylphenyl)propanoate (64o)

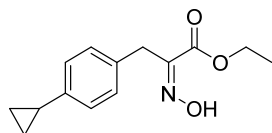
A two days–long catalytic hydrogenation of diethyl 2-(3-cyclopropylbenzylidene)malonate (**62q**, 4.68 g) with 10% palladium over charcoal (0.52 g, 2.5% eq) followed by oximation of the crude diethyl 2-(3-propylbenzyl)malonate **62o** using the general condition described above gave this compound (1.40 g, 35% from **62q**) as a white solid after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.74 (bs, 1H), 7.19 (m, 3H), 7.05 (m, 1H), 4.31 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.99 (s, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.34 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.3, 151.6, 143.0, 135.5, 129.3, 128.3, 126.8, 126.4, 61.9, 38.0, 30.5, 24.5, 14.0, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}$, 272.1263; found, 272.1250.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(4-propylphenyl)propanoate (64p)

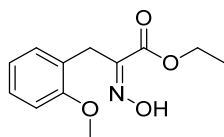
A two days-long catalytic hydrogenation of diethyl 2-(4-cyclopropylbenzylidene)malonate (**62r**, 4.89 g) with 10% palladium over charcoal (0.55 g, 2.5% eq) followed by oximation of the crude diethyl 2-(4-propylbenzyl)malonate **62p** using the general condition described above gave this compound (2.64 g, 62% from **62r**) as a white solid after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9.64 (s, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 4.31 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.98 (s, 2H), 2.57 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.34 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.3, 151.2, 141.0, 132.8, 129.0, 128.6, 61.8, 37.7, 30.1, 24.5, 14.0, 13.8. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₉NO₃Na, 272.1263; found, 272.1276.

Ethyl 3-(3-cyclopropylphenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64q)

By using the general preparation of oxime esters described above, using sodium borohydride overnight at 4 °C for the reduction step, this compound was obtained as a colorless oil (1.72 g, 27% from 3-bromobenzaldehyde **32aj**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 6:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9.99 (bs, 1H), 7.20 (m, 3H), 6.91 (m, 1H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.88 (m, 1H), 1.34 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.96 (m, 2H), 0.69 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.3, 151.0, 144.2, 135.6, 128.4, 126.8, 126.2, 123.8, 61.9, 30.4, 15.3, 14.0, 9.1. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₇NO₃Na, 270.1106; found, 270.1112.

Ethyl 3-(4-cyclopropylphenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64r)

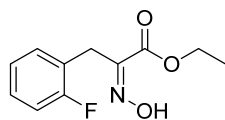
By using the general preparation of oxime esters described above, using sodium borohydride overnight at 4 °C for the reduction step, this compound was obtained as a pale yellow solid (1.03 g, 26% from 4-bromobenzaldehyde **32ak**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 6:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9.31 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 4.29 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 1.86 (m, 1H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.93 (m, 2H), 0.67 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃): 163.3, 151.2, 142.3, 132.6, 129.1, 125.8, 61.8, 30.0, 15.0, 14.0, 9.0. HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₇NO₃Na, 270.1106; found, 270.1109.

Ethyl 2-(hydroxyimino)-3-(2-methoxyphenyl)propanoate (64s)

Obtained as a white solid (3.15 g, 60% from 2-methoxybenzaldehyde **32s**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9.65 (s, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.88 (m, 2H), 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 3.99 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz).

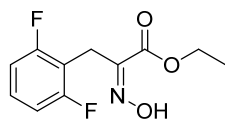
^{13}C NMR (CDCl_3): 163.5, 157.2, 151.6, 129.7, 127.8, 124.3, 120.5, 110.4, 61.7, 55.4, 25.7, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{Na}$: 260.0899; found, 260.0904.

Ethyl 3-(2-fluorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64y)



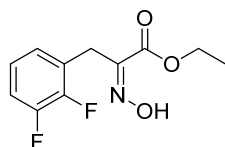
Obtained as a white solid (3.11 g, 57% from 2-fluorobenzaldehyde **32y**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 10.20 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.05 (m, 2H), 4.30 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.04 (s, 2H), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.1, 160.9 (247 Hz), 150.1, 130.6 (4 Hz), 128.3 (8 Hz), 124.0 (4 Hz), 122.8 (16 Hz), 115.3 (23 Hz), 62.0, 23.7 (4 Hz), 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FNO}_3\text{Na}$: 248.0699; found, 248.0704.

Ethyl 3-(2,6-difluorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ab)



Obtained as a white solid (4.66 g, 54% from 2,6-difluorobenzaldehyde **32ab**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.81 (s, 1H), 7.18 (tt, $J = 8.3, 6.3$ Hz, 1H), 6.92–6.79 (m, 2H), 4.29 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.01 (s, 2H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.7, 161.4 (dd, $J = 249, 8$ Hz, 2C), 148.8, 128.1 (t, $J = 10$ Hz), 112.2 (t, $J = 19$ Hz), 111.0 (m, 2C), 61.9, 18.5 (t, $J = 4$ Hz), 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_3\text{Na}$: 266.0605; found, 266.0613.

Ethyl 3-(2,3-difluorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ac)

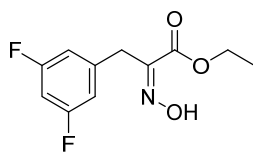


Obtained as a white solid (3.86 g, 51% from 2,2-difluorobenzaldehyde **32ac**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.83 (s, 1H), 7.09–6.95 (m, 3H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.8, 150.7 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 149.5, 149.0 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 125.2 (d, $J = 7$ Hz), 125.1 (d, $J = 2$ Hz), 123.8 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.6 (d, $J = 17$ Hz), 62.1, 23.4 (dd, $J = 4, 3$ Hz), 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_3\text{Na}$: 266.0604; found, 266.0603.

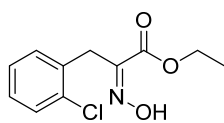
Ethyl 3-(2,5-difluorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ad)



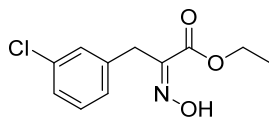
Obtained as a white solid (4.80 g, 50% from 2,5-difluorobenzaldehyde **32ad**) after a recrystallization in toluene. ^1H NMR (CDCl_3): 9.66 (s, 1H), 7.05–6.86 (m, 3H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.01 (s, 2H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 162.8, 158.6 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 156.8 (dd, $J = 242, 3$ Hz), 149.6, 124.3 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 117.0 (dd, $J = 25, 4$ Hz), 116.2 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.7 (dd, $J = 24, 8$ Hz), 62.1, 23.7 (dd, $J = 3, 1$ Hz), 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_3\text{Na}$: 266.0605; found, 266.0615.

Ethyl 3-(3,5-difluorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ae)

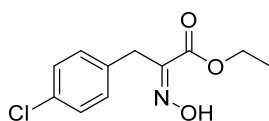
Obtained as a white solid (4.18 g, 46% from 3,5-difluorobenzaldehyde **32ae**) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.91 (s, 1H), 6.98–6.78 (m, 2H), 6.73–6.63 (m, 1H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.0 (dd, $J = 248, 13$ Hz, 2C), 162.9, 149.7, 139.2 (t, $J = 10$ Hz), 112.2 (2C), 102.3 (t, $J = 25$ Hz), 62.2, 30.2, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{NO}_3$: 244.0785; found, 244.0788.

Ethyl 3-(2-chlorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ag)

Obtained as a white solid (2.41 g, 23% from 2-chlorobenzaldehyde **32ag**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.88 (s, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.18 (m, 3H), 4.29 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.1, 150.2, 134.0, 133.6, 129.7, 129.5, 128.0, 126.8, 62.0, 28.5, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3\text{Na}$: 264.0403; found, 264.0408.

Ethyl 3-(3-chlorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ah)

Obtained as a white solid (2.67 g, 26% from 3-chlorobenzaldehyde **32ah**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.60 (bs, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.22 (m, 3H), 4.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.0, 150.4, 137.6, 134.3, 129.7, 129.4, 127.4, 126.9, 62.1, 30.1, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3\text{Na}$: 264.0403; found, 264.0406.

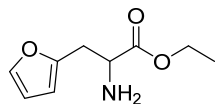
Ethyl 3-(4-chlorophenyl)-2-(hydroxyimino)propanoate (64ai)

Obtained as a white solid (2.31 g, 37% from 4-chlorobenzaldehyde **32ai**), using sodium borohydride at 4 °C overnight, after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1). ^1H NMR (CDCl_3): 9.91 (s, 1H), 6.98–6.78 (m, 2H), 6.73–6.63 (m, 1H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.0, 150.6, 134.1, 132.6, 130.6, 128.6, 62.0, 29.9, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{Na}$, 264.0403; found, 264.0437.

IV.E.4. Preparations of α -aminoesters

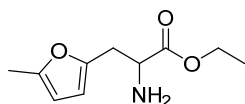
All following molecules have been reduced using zinc dust and hydrochloric acid, as described above in Step 4 of the general method.

Ethyl 2-amino-3-(furan-2-yl)propanoate (21a)



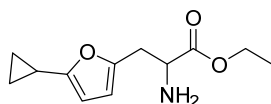
Obtained as an oil (2.55 g, 89%). Analytical data similar to what was described above.

Ethyl 2-amino-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (21c)



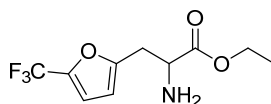
Obtained as an oil (1.46 g, 81%). Analytical data similar to what was described above.

Ethyl 2-amino-3-(5-cyclopropylfuran-2-yl)propanoate (21f)



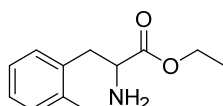
Obtained as an oil (0.70 g, 88%). ^1H NMR (CDCl_3): 5.99 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.85 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.20 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.74 (dd, 1H, $J = 7.1, 5.1$ Hz), 3.03 (dd, 1H, $J = 14.8, 5.1$ Hz), 2.93 (dd, 1H, $J = 14.8, 7.1$ Hz), 1.84 (m, 1H), 1.36 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 0.84 (m, 2H), 0.73 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.7, 156.7, 149.0, 108.2, 104.0, 60.9, 53.7, 33.3, 14.1, 8.7, 6.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3$, 224.1287; found, 224.1282.

Ethyl 2-amino-3-(5-(trifluoromethyl)furan-2-yl)propanoate (21h)

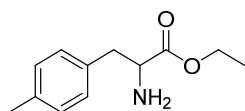


Obtained as a 95% pure oil (0.53 g, 93%). ^1H NMR (CDCl_3): 6.66 (dd, 1H, $J = 3.3, 1.2$ Hz), 6.20–6.15 (m, 1H), 4.20–4.10 (m, 2H), 3.79–3.73 (m, 1H), 3.08 (dd, 1H, $J = 15.0, 5.4$ Hz), 2.99 (dd, 1H, $J = 15.0, 7.1$ Hz), 1.60 (bs, 2H), 1.22 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.2, 154.7, 141.0 (q, $J = 42.6$ Hz), 119.0 (q, $J = 266.6$ Hz), 112.4 (q, $J = 2.8$ Hz), 108.5, 61.3, 53.3, 33.4, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_3$, 252.0847; found, 252.0852.

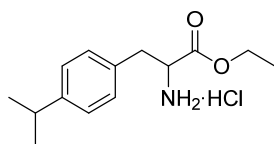
Ethyl 2-amino-3-(*o*-tolyl)propanoate (21k)



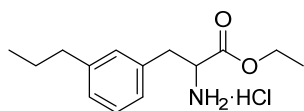
Obtained as an oil (2.69 g, 85%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.16 (m, 4H), 4.17 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.71 (dd, 1H, $J = 8.7, 5.6$ Hz), 3.14 (dd, 1H, $J = 13.8, 5.6$ Hz), 2.84 (dd, 1H, $J = 13.8, 8.7$ Hz), 2.82 (s, 3H), 1.24 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.3, 136.5, 135.9, 130.5, 130.0, 126.8, 125.9, 60.9, 55.0, 38.9, 19.5, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2$: 208.1338; found, 208.1332.

Ethyl 2-amino-3-(*p*-tolyl)propanoate (21m)

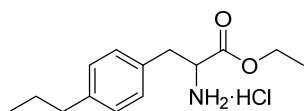
Obtained as an oil (2.70 g, 87%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.11 (m, 4H), 4.19 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.70 (dd, 1H, $J = 7.9, 5.3$ Hz), 3.07 (dd, 1H, $J = 13.6, 5.3$ Hz), 2.84 (dd, 1H, $J = 13.6, 7.9$ Hz), 2.34 (s, 3H), 1.28 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.1, 136.3, 134.2, 129.4, 129.2 (two signals), 129.1, 60.9, 55.9, 40.7, 21.0, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2$: 208.1338; found, 208.1333.

Ethyl 2-amino-3-(4-isopropylphenyl)propanoate hydrochloride (77n) via 21n

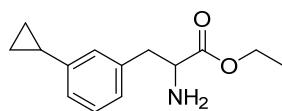
Obtained as an oil which was immediately treated with a solution of hydrogen chloride in dioxane and concentrated to dryness to give the hydrochloride salt as a white powder (1.9 g, 78%, 91% pure). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 8.23 (s, 3H), 7.22–7.12 (m, 4H), 4.16–4.02 (m, 3H), 3.16 (dd, 1H, $J = 13.9, 5.8$ Hz), 3.01 (dd, 1H, $J = 13.9, 7.8$ Hz), 2.86 (hept, 1H, $J = 6.9$ Hz), 1.18 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 1.06 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 169.3, 147.2, 132.2, 129.3, 126.3, 61.3, 53.4, 35.9, 33.0, 23.8, 13.7. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2$: 236.1651; found, 236.1651.

Ethyl 2-amino-3-(3-propylphenyl)propanoate hydrochloride (77o) via 21o

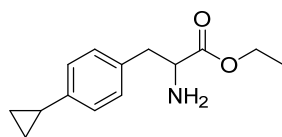
Obtained as an oil which was immediately treated with a solution of hydrogen chloride in dioxane and concentrated to dryness to give the hydrochloride salt as a white powder (1.89 g, 90%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 8.72 (bs, 3H), 7.24 (m, 1H), 7.08 (m, 3H), 4.18 (dd, $J = 7.9, 5.6$ Hz, 1H), 4.08 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.21 (dd, $J = 13.9, 5.6$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 13.9, 7.9$ Hz, 1H), 2.53 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 169.4, 142.8, 135.0, 129.9, 128.9, 127.7, 127.2, 62.0, 53.7, 37.6, 36.5, 24.4, 14.2, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2$: 236.1651; found, 236.1637.

Ethyl 2-amino-3-(4-propylphenyl)propanoate hydrochloride (77p) via 21p

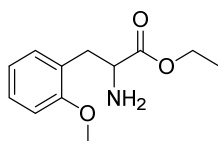
Obtained as an oil which was immediately treated with a solution of hydrogen chloride in dioxane and concentrated to dryness to give the hydrochloride salt as a white powder (2.46 g, 85%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 8.59 (bs, 3H), 7.15 (s, 4H), 4.20 (dd, $J = 7.5, 5.9$ Hz, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.16 (dd, $J = 7.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.02 (dd, $J = 14.2, 7.9$ Hz, 1H), 2.54 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 169.5, 142.6, 132.3, 129.8, 129.0, 62.0, 53.7, 37.3, 36.2, 24.5, 14.2, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2$: 236.1651; found, 236.1659.

Ethyl 2-amino-3-(3-cyclopropylphenyl)propanoate (21q)

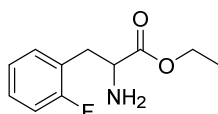
Obtained as an oil (1.66 g, 89%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.19 (m, 1H), 6.95 (m, 3H), 4.19 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.71 (dd, 1H, $J = 7.9, 5.2$ Hz), 3.05 (dd, 1H, $J = 13.5, 5.2$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J = 13.5, 7.9$ Hz), 1.88 (m, 1H), 1.53 (s, 2H), 1.28 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 0.95 (m, 2H), 0.68 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.0, 144.3, 137.2, 128.4, 126.8, 126.3, 124.0, 60.9, 55.8, 41.2, 15.3, 14.2, 9.2, 9.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_2$: 234.1494; found, 234.1496.

Ethyl 2-amino-3-(4-cyclopropylphenyl)propanoate (21r)

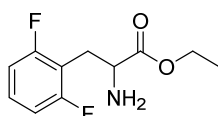
Obtained as an oil (0.71 g, 80%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.09 (m, 2H), 7.01 (m, 2H), 4.18 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.70 (dd, 1H, $J = 7.9, 5.2$ Hz), 3.06 (dd, 1H, $J = 13.7, 5.2$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J = 13.7, 7.9$ Hz), 1.87 (m, 1H), 1.54 (s, 2H), 1.28 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 0.95 (m, 2H), 0.68 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.0, 142.4, 134.2, 129.2, 125.9, 60.9, 55.9, 40.6, 15.0, 14.2, 9.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_2$: 234.1494; found, 234.1490.

Ethyl 2-amino-3-(2-methoxyphenyl)propanoate (21s)

Obtained as an oil (2.47 g, 83%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.24 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.90 (m, 2H), 4.15 (qd, 2H, $J = 7.2, 2.3$ Hz), 3.84 (s, 3H), 3.80 (dd, 1H, $J = 8.1, 5.9$ Hz), 3.11 (dd, 1H, $J = 13.3, 5.9$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J = 13.3, 8.1$ Hz), 1.24 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.5, 157.8, 131.2, 128.1, 125.9, 120.4, 110.4, 60.7, 55.2, 54.5, 36.3, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3$: 224.1287; found, 224.1283.

Ethyl 2-amino-3-(2-fluorophenyl)propanoate (21y)

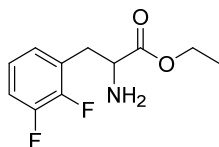
Obtained as an oil (2.57 g, 88%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.23 (m, 2H), 7.06 (m, 2H), 4.17 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.76 (dd, 1H, $J = 7.9, 5.9$ Hz), 3.11 (dd, 1H, $J = 13.6, 5.9$ Hz), 2.93 (dd, 1H, $J = 13.6, 7.9$ Hz), 1.24 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.9, 161.4 (245 Hz), 131.6 (5 Hz), 128.6 (8 Hz), 124.5 (16 Hz), 124.0 (4 Hz), 115.3 (22 Hz), 61.0, 54.8, 34.8, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FNO}_2$: 212.1087; found, 212.1089.

Ethyl 2-amino-3-(2,6-difluorophenyl)propanoate (21ab)

Obtained as an oil (3.46 g, 94%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.21 (m, 1H), 6.89 (m, 2H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 (dd, $J = 8.1, 6.2$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 13.7, 6.1$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 13.7, 8.1$ Hz,

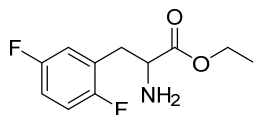
1H), 1.54 (s, 2H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.8, 161.8 (dd, $J = 247, 8$ Hz, 2C), 128.4 (t, $J = 10$ Hz), 113.5 (t, $J = 20$ Hz), 111.1 (2C), 61.1, 54.2, 28.3, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{NO}_2$: 230.0993; found, 230.0995.

Ethyl 2-amino-3-(2,3-difluorophenyl)propanoate (21ac)



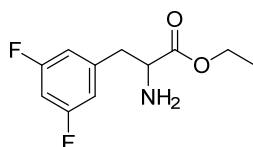
Obtained as an oil (3.36 g, 92%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.03 (m, 3H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.76 (dd, $J = 7.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.13 (ddd, $J = 13.7, 5.9, 1.5$ Hz, 1H), 2.97 (ddd, $J = 13.7, 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 1.53 (s, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.7, 150.6 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 149.4 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 127.1 (d, $J = 13$ Hz), 126.2 (t, $J = 3$ Hz), 123.8 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.8 (d, $J = 17$ Hz), 61.1, 54.7, 34.5, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{NO}_2$: 230.0993; found, 230.1004.

Ethyl 2-amino-3-(2,5-difluorophenyl)propanoate (21ad)



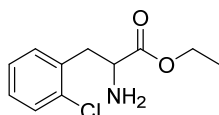
Obtained as an oil (3.44 g, 95%). ^1H NMR (CDCl_3): 6.96 (m, 3H), 4.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 (dd, $J = 7.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.08 (ddd, $J = 13.7, 5.8, 1.2$ Hz, 1H), 2.91 (ddd, $J = 13.8, 7.9, 0.9$ Hz, 1H), 1.52 (s, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.7, 158.5 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 157.4 (dd, $J = 241, 3$ Hz), 126.3 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 117.9 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.2 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.8 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 61.1, 54.7, 34.6, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{NO}_2$: 230.0993; found, 230.1000.

Ethyl 2-amino-3-(3,5-difluorophenyl)propanoate (21ae)



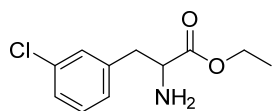
Obtained as an oil (3.33 g, 84%). ^1H NMR (CDCl_3): 6.73 (m, 3H), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.71 (s, 1H), 3.06 (dd, $J = 13.6, 5.4$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 13.6, 7.7$ Hz, 1H), 1.49 (s, 2H), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.5, 163.0 (dd, $J = 248, 13$ Hz, 2C), 141.4 (t, $J = 9$ Hz), 112.1 (2C), 102.3 (t, $J = 25$ Hz), 61.1, 55.5, 40.7, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{NO}_2$: 230.0993; found, 230.0995.

Ethyl 2-amino-3-(2-chlorophenyl)propanoate (21ag)



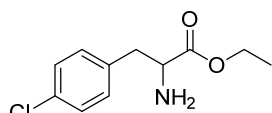
Obtained as an oil (2.53 g, 96%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.38 (m, 1H), 7.22 (m, 3H), 4.16 (m, 2H), 3.84 (dd, $J = 8.5, 5.8$ Hz, 1H), 3.24 (dd, $J = 13.5, 5.8$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 13.5, 8.5$ Hz, 1H), 1.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.0, 135.5, 134.4, 131.6, 129.6, 128.2, 126.7, 61.0, 54.4, 39.2, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{ClNO}_2$: 228.0791; found, 228.0791.

Ethyl 2-amino-3-(3-chlorophenyl)propanoate (21ah)



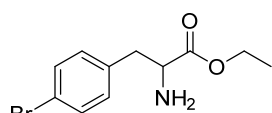
Obtained as an oil (2.31 g, 92%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.23 (td, $J = 4.3, 2.5$ Hz, 3H), 7.14–7.08 (m, 1H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.71 (dd, $J = 7.8, 5.5$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 13.6, 5.5$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 13.6, 7.8$ Hz, 1H), 1.57 (s, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.7, 139.5, 134.3, 129.7, 129.4, 127.5, 127.0, 61.0, 55.7, 40.7, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{ClNO}_2$: 228.0791; found, 228.0726.

Ethyl 2-amino-3-(4-chlorophenyl)propanoate (21ai)



Obtained as an oil (1.48 g, 73%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.29 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 4.18 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.69 (dd, 1H, $J = 7.5, 5.6$ Hz), 3.05 (dd, 1H, $J = 13.7, 5.6$ Hz), 2.84 (dd, 1H, $J = 13.7, 7.5$ Hz), 1.47 (s(l), 2H), 1.26 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.8, 135.9, 132.7, 130.6, 128.6, 61.0, 55.7, 40.5, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{ClNO}_2$, 228.0791; found, 228.0806.

Ethyl 2-amino-3-(4-bromophenyl)propanoate (21ak)



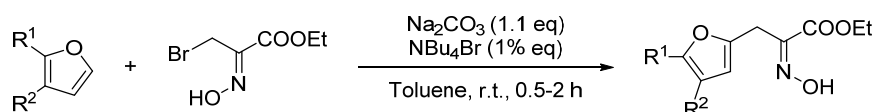
Obtained as an oil (0.61 g, 76%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.44 (m, 2H), 7.10 (m, 2H), 4.18 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.69 (dd, 1H, $J = 7.7, 5.3$ Hz), 3.04 (dd, 1H, $J = 13.7, 5.3$ Hz), 2.84 dd, 1H, $J = 13.7, 7.7$ Hz), 1.47 (s(l), 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 174.8, 136.4, 131.6, 131.0, 120.7, 61.0, 55.7, 40.5, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrNO}_2$, 272.0286; found, 272.0296.

IV.F. Preparations of α -aminoesters via [4+2] cycloaddition with furanes (I.C.2)

Preparation of ethyl bromopyruvate (71) from inexpensive ethyl pyruvate has been described in the literature.³⁶¹⁻³⁶³ In the laboratory, synthesis of a close analogue (methyl 3-bromo-2-oxobutanoate from methyl 2-oxobutanoate, not described in the manuscript) using slow addition of 1 eq bromine over a solution of reagent in dichloromethane at room temperature gave satisfactory results.

Conversion of ethyl bromopyruvate (71) in ethyl 3-bromo-2-(hydroxyimino)propanoate (72) was described by Gilchrist *et al.*,²⁶¹⁻²⁶² Ottehnheim *et al.*,³⁶⁴ and in a recent patent³⁶⁵ in quantitative yields.

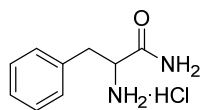
General method for the [4+2] cycloaddition of 72 on furanes



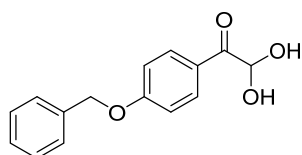
A solution of ethyl 3-bromo-2-(hydroxyimino)propanoate (71, 1.0 eq), the desired furane (1.0 eq), and tetrabutylammonium bromide (1% eq) in toluene was stirred with sodium carbonate (1.1 eq) for 2 hours at room temperature. This was diluted in water and extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The residue was then purified by chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1 to 4:1).

Alternatively, one can use ethyl acetate or a 5:1 ethyl acetate–water mixture to carry out the reaction. In the latter case, tetrabutylammonium bromide is not mandatory.

IV.G. Preparations of 2-hydroxypyrazines, Path 1 (II.A)

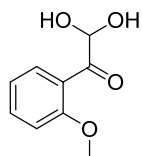
Phenylalaninamide hydrochloride (78i, 2-amino-3-phenylpropanamide hydrochloride)

Phenylalanine ethyl ester hydrochloride (**77i**, 15.0 g) was dispersed in a 7 M ammonia solution in methanol (50 mL, more than 5 eq of ammonia) in a sealed stainless steel reactor and heated at 70 °C for 24 h. The mixture was then concentrated to dryness, dispersed in isopropyl alcohol overnight and filtered, to give the desired product as an off-white solid (10.9 g, 83%).

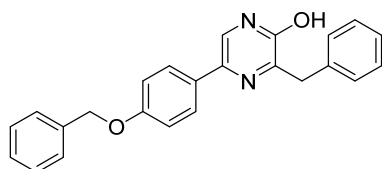
***p*-Benzyloxyphenylglyoxal hydrate (30j, 1-(4-(benzyloxy)phenyl)-2,2-dihydroxyethan-1-one)**

Procedure adapted from patent application EP2650293.²⁷⁷

4-Benzyloxyacetophenone (**81j**, R = *p*-OBn, 5.00 g, 1.0 eq) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 50 mL), and 48% hydrobromic acid (7.56 mL, 3.0 eq) was added dropwise at room temperature under stirring. After the addition was complete, the mixture was heated to 70 °C for 8 h, then cooled and ice-cold water (50 mL) was poured. After filtration, the cake was washed with water and dried to give the desired product (**30j**, 4.94 g) with a purity greater than 90%.

***o*-Methoxyphenylglyoxal hydrate (30s, 2,2-dihydroxy-1-(2-methoxyphenyl)ethan-1-one)**

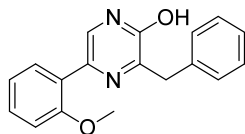
The same procedure was used than for the synthesis of **30j**, starting from 2-methoxyacetophenone (**81s**, 15.33 g). However, addition of water did not lead to a filterable solid; the mixture was thus extracted with ethyl acetate, washed 6 times with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness to yield 9.27 g of a yellow oil containing the target glyoxal along with many unidentified compounds, which was used in the next step without purification.

3-Benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-ol (79b)

A solution of *p*-benzyloxyphenylglyoxal hydrate (**30j**, 2.00 g, 1.0 eq) and phenylalaninamide hydrochloride (**82i**, 1.55 g, 1.0 eq) in methanol was cooled to -78 °C with an ethanol/dry ice bath. Sodium hydroxide (12 N, 0.72 g in 1.4 mL water, 2.3 eq) was added dropwise, then the mixture was stirred 30 min at -76 °C and 1 h at 0 °C. This was allowed to go back at room temperature, then was made acidic with 37% hydrochloric acid (1.92 mL, 3.0 eq) and stirred 2 h at room temperature. The precipitate was filtered and the cake recrystallized in toluene to give the desired product as a pale yellow solid (0.81 g, 28%). ¹H NMR (CDCl₃) 12.31 (s, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.40 (m, 4H),

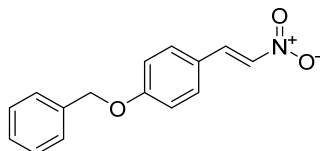
7.37 (m, 9H), 7.19 (m, 1H), 7.03 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.06 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 157.8, 156.5, 154.8, 137.9, 137.0, 131.2, 129.0, 128.8, 128.4, 128.2, 127.7, 127.6, 126.1, 125.8, 121.5, 114.9, 69.2, 38.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$: 369.1603; found, 369.1603.

3-Benzyl-5-(2-methoxyphenyl)pyrazin-2-ol (79c)



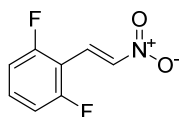
The same procedure was used than for the synthesis of **79b**, starting from the crude *o*-methoxyphenylglyoxal hydrate (**30s**, 9.27 g, considered as pure), to yield after recrystallization in toluene the desired product (2.14 g, 14%). ^1H NMR (CDCl_3): 13.33 (bs, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.02 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.51–7.42 (m, 2H), 7.37–7.28 (m, 3H), 7.25–7.19 (m, 1H), 7.08 (td, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 1H), 7.02–6.94 (m, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.92 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 157.1, 156.8, 156.5, 137.8, 131.2, 129.6 (2 signals), 129.1, 128.4, 126.5, 125.2, 124.6, 121.2, 111.3, 55.6, 39.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$: 293.1290. Found: 293.1253.

IV.H. Preparations of 2-hydroxypyrazines, Path 2 (II.B)

IV.H.1. Preparations of β -nitrostyrenes (II.B.1)***p*-Benzyloxynitrostyrene (84j, 1-(benzyloxy)-4-(2-nitrovinyl)benzene)**

4-Benzyloxybenzaldehyde (**32j**, 10.0 g, 1.0 eq) and nitromethane (**88**, 3.3 mL, 1.3 eq) were dispersed in methanol (80 mL). Sodium methanolate (25% in methanol, 12.9 mL, 1.2 eq) was added dropwise over 10 min, and the mixture was then stirred overnight at room temperature. This was then diluted in water (400 mL), acidified with 37% hydrochloric acid (5.0 mL), and extracted with water. The organic phase was washed twice with brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was heated 24 h in glacial acetic acid, concentrated to dryness, and recrystallized in ethanol, to yield, in three crops, the product as yellow crystals (8.9 g, 74%).

Analytical data similar to published information.³⁶⁶

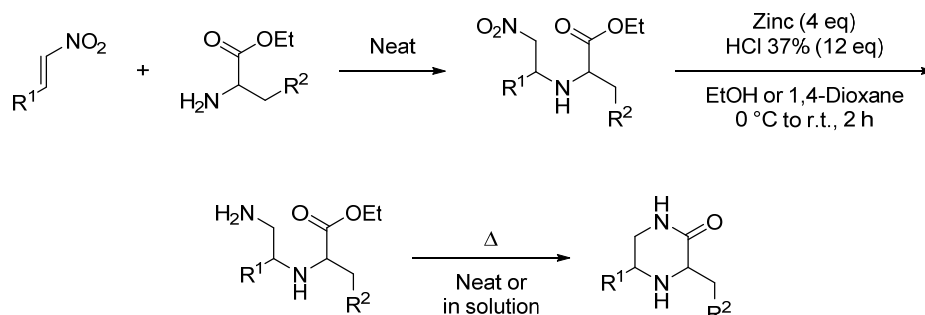
***o,o*-Difluoronitrostyrene (84ab, 1,3-difluoro-2-(2-nitrovinyl)benzene)**

2,6-Difluorobenzaldehyde (**32ab**, 4.0 g, 1.0 eq), nitromethane (**88**, 8.1 g, 4.7 eq) and ammonium acetate (0.7 g, 0.3 eq) were heated at 90 °C for 2.5 h using microwave irradiation. The mixture was diluted in ethyl acetate, washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. Chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 4:1) led to the isolation of the desired product (1.9 g, 37%).

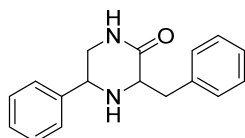
Analytical data similar to published information.³⁶⁷

IV.H.2. Preparations of piperazin-2-ones (II.B.2)

General procedure



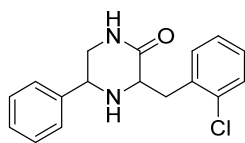
Possibly substituted β -nitrostyrene (**84**, 1 eq) was added to the freshly extracted free base of α -aminoester (**21**, 1 eq). Upon stirring on a rotatory evaporator at room temperature the suspension homogenized in about 10 minutes to give the 1,4-adduct **85**. If both starting materials were solid, they were dissolved in dichloromethane or ethyl acetate, and the mixture was concentrated to dryness. The resulting oil was dispersed in a cold 4:1 solution of dioxane and 37% hydrochloric acid (12 eq). Zinc dust ($< 10 \mu\text{m}$, 4 eq) was added portion-wise in the course of 10 minutes. The temperature was then allowed to rise to room temperature and the suspension was stirred for 2 hours. This was diluted in water, made basic with an excess of 22% ammonia and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over sodium carbonate, and concentrated to dryness to give the crude compound **86** as an oil. Finally, this oil was heated at 140°C for 3 h under an argon atmosphere. The ethanol arising from the cyclization was removed under vacuum and the resulting solid was subjected to purification procedures as described below for each pairs of diastereoisomers.

3-Benzyl-5-phenylpiperazin-2-one (**87a**)

The crude mixture of diastereoisomers was dispersed in boiling cyclohexane to remove unreacted phenylalanine ester and the resulting solid purified by a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 96:4 to 95:5) to yield the *cis* (2.05 g, 35%) and the *trans* (1.29 g, 22%) compounds as white solids.

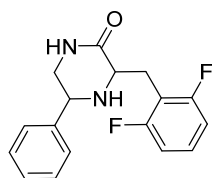
cis isomers: ^1H NMR (CDCl_3): 7.42–7.29 (m, 9H), 7.26–7.20 (m, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.06 (dd, 1H, $J = 9.7, 4.7$ Hz), 3.84 (dt, 1H, $J = 10.1, 3.4$ Hz), 3.60 (dd, 1H, $J = 13.6, 3.1$ Hz), 3.41–3.25 (m, 2H), 2.91 (dd, 1H, $J = 13.6, 10.1$ Hz), 1.78 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.0, 140.2, 138.4, 129.4, 128.7, 128.7, 128.2, 126.8, 126.6, 60.9, 57.8, 50.0, 38.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$, 267.1497; found: 267.1459.

trans isomers: ^1H NMR (CDCl_3): 7.46–7.18 (m, 10H), 6.44 (s, 1H), 4.27 (dd, 1H, $J = 9.6, 4.0$ Hz), 3.89 (dd, 1H, $J = 10.7, 3.6$ Hz), 3.54–3.44 (m, 1H), 3.41 (dt, 1H, $J = 11.5, 4.0$ Hz), 3.32 (dd, 1H, $J = 13.8, 3.6$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J = 13.8, 10.7$ Hz), 1.79 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.8, 139.8, 138.0, 129.3, 128.9, 128.8, 128.2, 126.9, 126.8, 59.4, 51.7, 49.3, 37.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$, 267.1497; found: 267.1435.

3-(2-Chlorobenzyl)-5-phenylpiperazin-2-one (87d)

This compound was obtained as a white powder containing a mixture of the two diastereoisomers after a recrystallization in cyclohexane (2.21 g, 45%).

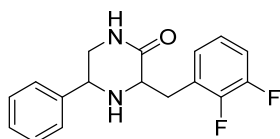
^1H NMR (CDCl_3): 7.42-7.29 (m, 7H), 7.25-7.14 (m, 2H), 6.85 (bs, 0.4H), 6.69 (bs, 0.6H), 4.37 (dd, $J = 9.8$, 4.2 Hz, 0.4H), 4.10-3.98 (m, 1.4H), 3.83 (dd, $J = 13.8$, 3.4 Hz, 0.6H), 3.51-3.30 (m, 3H), 3.02 (dd, $J = 13.8$, 9.8 Hz, 0.6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.6, 171.0, 140.3, 134.7, 131.8, 131.4, 129.8, 129.8, 128.7, 128.2, 128.2, 128.1, 127.2, 127.1, 126.9, 126.8, 59.1, 58.7, 57.8, 52.2, 50.0, 49.4, 36.3, 35.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}$: 301.1108; found, 301.1117.

3-(2,6-Difluorobenzyl)-5-phenylpiperazin-2-one (87e)

The crude mixture of diastereoisomers was purified by a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 to 96:4) to yield the *cis* (1.73 g, 38%) and the *trans* (1.05 g, 23%) compounds as white solids.

cis isomer: ^1H NMR (CDCl_3): 7.35 (m, 5H), 7.18 (m, 1H), 6.89 (m, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.09 (dd, $J = 9.4$, 5.1 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.38 (m, 2H), 3.09 (dd, $J = 13.9$, 10.3 Hz, 1H), 1.73 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.7, 162.0 (dd, $J = 248$, 9 Hz, 2C), 140.2, 128.7, 128.3 (t, $J = 10$ Hz), 128.2, 126.7, 114.2 (t, $J = 20$ Hz), 111.2 (2C), 58.8, 57.6, 50.0, 25.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 303.1309; found, 303.1301.

trans isomer: ^1H NMR (CDCl_3): 7.35 (m, 5H), 7.18 (m, 1H), 6.87 (m, 2H), 6.58 (s, 1H), 4.41 (dd, $J = 10.1$, 4.0 Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 9.8$, 5.4 Hz, 1H), 3.44 (m, 4H), 1.63 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.3, 162.0 (dd, $J = 247$, 9 Hz, 2C), 128.7, 128.5 (t, $J = 10$ Hz), 128.2, 127.0, 113.8 (t, $J = 20$ Hz), 111.3 (2C), 57.6, 51.5, 49.3, 25.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 303.1309; found, 303.1306.

3-(2,3-Difluorobenzyl)-5-phenylpiperazin-2-one (87f)

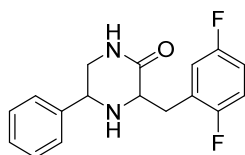
The crude mixture of diastereoisomers was purified by a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 to 96:4) to yield the *cis* (1.57 g, 36%) and the *trans* (1.21 g, 27%) compounds as white solids.

cis isomer: ^1H NMR (CDCl_3): 7.34 (m, 5H), 7.06 (m, 3H), 6.66 (s, 1H), 4.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 9.1$, 3.2 Hz, 1H), 3.62 (ddd, $J = 13.9$, 3.4, 1.4 Hz, 1H), 3.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.04 (dd, $J = 14.0$, 9.3 Hz, 1H), 1.77 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.6, 150.7 (dd, $J = 248$, 13 Hz), 149.6 (dd, $J = 247$, 13 Hz), 140.1, 128.8, 128.3, 127.9 (d, $J = 12$ Hz), 126.8, 126.3 (t, $J = 3$ Hz), 123.9 (dd, $J = 7$, 5 Hz), 115.6 (d,

$J = 17$ Hz), 59.5, 57.7, 49.9, 31.7. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{17}F_2N_2O$: 303.1309; found, 303.1308.

trans isomer: 1H NMR ($CDCl_3$): 7.36 (m, 5H), 7.05 (m, 3H), 6.58 (s, 1H), 4.32 (dd, $J = 9.7, 4.0$ Hz, 1H), 3.92 (dd, $J = 10.2, 4.2$ Hz, 1H), 3.38 (m, 4H), 1.70 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 171.2, 150.7 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 149.7 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 139.7, 128.8, 128.2, 127.7 (d, $J = 12$ Hz), 127.0, 125.9 (t, $J = 3$ Hz), 124.3 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.8 (d, $J = 17$ Hz), 58.6, 51.8, 49.2, 31.0. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{17}F_2N_2O$: 303.1309; found, 303.1304.

3-(2,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpiperazin-2-one (87g)

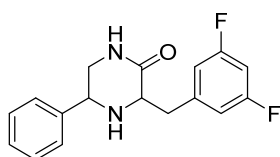


The crude mixture of diastereoisomers was purified by a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 to 96:4) to yield the *cis* (1.58 g, 35%) and the *trans* (1.17 g, 26%) compounds as white solids.

cis isomer: 1H NMR ($CDCl_3$): 7.34 (m, 5H), 7.05 (m, 2H), 6.89 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.57 (dd, $J = 14.0, 2.4$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 6.8, 2.5$ Hz, 2H), 2.99 (ddd, $J = 14.0, 9.1, 0.8$ Hz, 1H), 1.77 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 170.6, 158.5 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 157.6 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 140.1, 128.8, 128.3, 127.1 (dd, $J = 18, 8$ Hz), 126.8, 118.0 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.2 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.6 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 59.5, 57.7, 49.9, 31.9. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{17}F_2N_2O$: 303.1309; found, 303.1304.

trans isomer: 1H NMR ($CDCl_3$): 7.35 (m, 5H), 6.96 (m, 3H), 6.26 (s, 1H), 4.31 (dd, $J = 9.7, 4.1$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 10.3, 4.1$ Hz, 1H), 3.35 (m, 4H), 1.70 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 171.0, 158.7 (dd, $J = 240, 2$ Hz), 157.6 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 139.7, 128.8, 128.2, 127.0, 126.8 (dd, $J = 18, 8$ Hz), 117.6 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.5 (dd, $J = 26, 9$ Hz), 114.9 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 58.6, 51.8, 49.2, 31.3. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{17}F_2N_2O$: 303.1309; found, 303.1306.

3-(3,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpiperazin-2-one (87h)

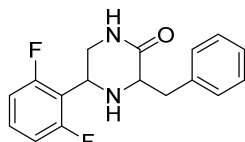


The crude mixture of diastereoisomers was purified by a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 to 96:4) to yield the *cis* (1.52 g, 36%) and the *trans* (1.05 g, 25%) compounds as white solids.

cis isomer: 1H NMR ($CDCl_3$): 7.36 (m, 5H), 6.87 (m, 3H), 6.68 (tt, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 8.4, 6.0$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 9.4, 3.0$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 13.8, 3.2$ Hz, 1H), 3.35 (m, 2H), 2.94 (dd, $J = 13.8, 9.5$ Hz, 1H), 1.74 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 170.6, 164.3 (d, $J = 13$ Hz), 161.8 (d, $J = 13$ Hz), 142.3 (t, $J = 9$ Hz), 139.9, 128.8, 128.3, 126.8, 112.3, 102.2, 60.3, 57.7, 49.7, 38.4. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{17}H_{17}F_2N_2O$: 303.1309; found, 303.1302.

trans isomer: ^1H NMR (CDCl_3): 7.35 (m, 5H), 7.02 (s, 1H), 6.80 (m, 2H), 6.69 (tt, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 8.3, 4.6$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 10.1, 3.7$ Hz, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.27 (dd, $J = 13.9, 3.6$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 13.9, 10.1$ Hz, 1H), 1.76 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.4, 164.4 (d, $J = 13$ Hz), 161.9 (d, $J = 13$ Hz), 142.2 (t, $J = 9$ Hz), 139.5, 128.9, 128.3, 126.8, 112.2, 102.3 (t, $J = 25$ Hz), 58.6, 51.9, 48.9, 37.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 303.1309; found, 303.1306.

3-Benzyl-5-(2,6-difluorophenyl)piperazin-2-one (87i)



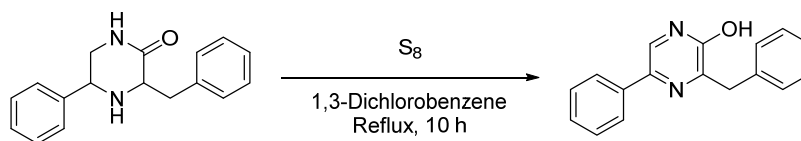
This compound was obtained as a mixture of diastereoisomers after a recrystallization in cyclohexane (1.97 g, 62%).

^1H NMR (CDCl_3): 7.36–7.18 (m, 7H), 6.95–6.84 (m, 2H), 6.81 (bs, 0.6H), 6.70 (bs, 0.4H), 4.71 (dd, $J = 10.5, 4.2$ Hz, 0.6H), 4.61–4.53 (m, 0.4H), 3.93–3.79 (m, 1.4H), 3.54 (t, $J = 11.6$ Hz, 0.4H), 3.40 (dt, $J = 11.6, 4.2$ Hz, 0.6H), 3.36–3.22 (m, 3H), 3.17 (dd, $J = 13.8, 10.5$ Hz, 0.6H). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 303.1309, found: 303.1323.

IV.H.3. Preparations of 2-hydroxypyrazines (II.B.3)

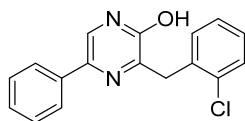
a. Route 2a

General procedure

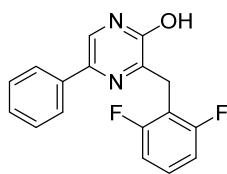


The considered piperazin-2-one **87** (1.00 eq) and sulfur (2.05 eq) were heated to reflux in 1,3-dichlorobenzene for 10 h. This was concentrated to dryness and the residue was purified as described below.

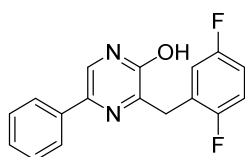
3-(2-Chlorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (79d)



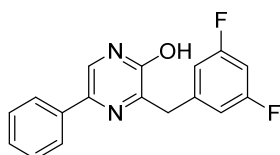
Obtained as a powder (2.06 g, 42% from **21ag**) after a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2) and a dispersion in a boiling mixture of toluene and cyclohexane. ^1H NMR (DMSO): 12.47 (bs, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.46 (m, 1H), 7.32 (m, 5H), 7.25 (m, 1H), 4.22 (s, 2H). ^{13}C NMR (DMSO): 156.1, 155.3, 136.4, 136.3, 134.1, 132.2, 131.2, 129.5, 129.0, 128.7, 127.6, 127.4, 124.8, 122.7, 36.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}$: 297.0795; found, 297.0795.

3-(2,6-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (79e)

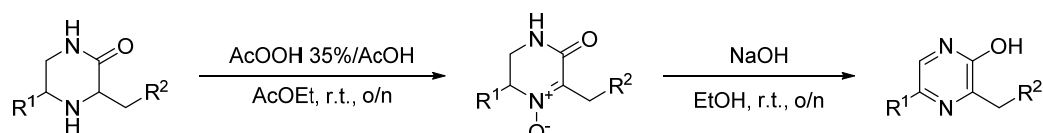
Obtained as a reddish solid (2.22 g, 80%) after chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2). ^1H NMR (DMSO): 12.51 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.40 (m, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.17 (m, 4H), 4.14 (s, 2H). ^{13}C NMR (DMSO): 161.7 (dd, $J = 246, 9$ Hz), 155.2, 154.8, 136.3, 131.0, 129.3 (t, $J = 10$ Hz), 129.0, 127.7, 124.6, 122.8, 113.7 (t, $J = 20$ Hz), 111.5, 26.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 299.0996; found, 299.0999.

3-(2,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (79g)

Poor conversion. Obtained as a solid (0.80 g, 30%) after two chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2 then cyclohexane–ethyl acetate 2:1) and a recrystallization in toluene. ^1H NMR (DMSO): 12.53 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.25 (m, 3H), 7.14 (td, $J = 8.3, 4.5$ Hz, 1H), 4.12 (s, 2H). ^{13}C NMR (DMSO): 158.3 (dd, $J = 239, 2$ Hz), 157.4 (dd, $J = 240, 2$ Hz), 155.6, 155.3, 136.3, 131.2, 129.0, 127.7, 127.2 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 124.7, 123.0, 118.4 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.7 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 115.1 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 32.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 299.0996; found, 299.1001.

3-(3,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (79h)

Decaline (decahydronaphtalene) was used instead of 1,3-dichlorobenzene. Obtained as yellow needles (1.59 g, 68%) after chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 98:2) and recrystallization in a *n*-heptane/toluene mixture. ^1H NMR (DMSO): 12.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.07 (m, 3H), 4.11 (s, 2H). ^{13}C NMR (DMSO): 162.6 (dd, $J = 245, 13$ Hz), 156.2, 155.4, 142.8 (t, $J = 10$ Hz), 136.3, 131.4, 129.1, 127.7, 124.9, 123.3, 112.8, 102.2 (t, $J = 26$ Hz), 38.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: 299.0996; found, 299.1010.

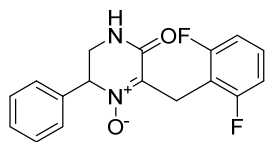
b. Route 2b**General procedure**

The considered piperazin-2-one **87** (1.0 eq) was dissolved in acetic acid (q.s. 0.3 M) and a 36% solution of peracetic acid in acetic acid (2.2 eq) was added. This was stirred overnight, diluted in ethyl acetate, washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The residue could

be further purified by a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 1:1 to 1:2) to yield the *N*-oxide **100** as a white powder.

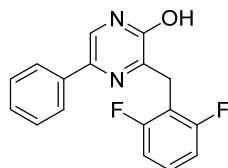
The considered *N*-oxide **100** (1.0 eq) and powdered sodium hydroxide (4.0 eq) were then diluted in ethanol (q.s. 0.3 M) and stirred overnight at room temperature. The solution was made acidic with 1 N hydrochloric acid and the subsequent precipitate was filtered, washed with water, and dried under vacuum to yield the desired piperazin-2-ol **79**.

6-(2,6-Difluorobenzyl)-5-oxo-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyrazine 1-oxide (100e)



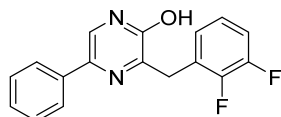
Obtained as a white solid (8.58 g, 39% from **21ab**) after chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 1:1). ¹H NMR (DMSO): 8.32 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.38 (m, 3H), 7.28 (m, 3H), 7.03 (m, 2H), 5.24 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.90 (ddd, *J* = 13.9, 4.8, 1.6 Hz, 1H), 3.55 (ddd, *J* = 13.9, 4.7, 3.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (DMSO): 161.5 (dd, *J* = 247, 8 Hz), 160.1, 139.3, 135.7, 129.0, 128.9, 128.8, 127.1, 112.8 (t, *J* = 19 Hz), 111.7 (m), 71.8, 42.8, 18.9 (t, *J* = 3 Hz). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₁₅F₂N₂O₂: 317.1102; found, 317.1105.

3-(2,6-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (42e)



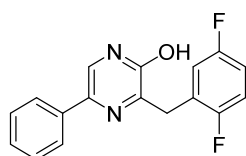
Obtained as a white solid (8.27 g, 90%). Analytical data identical to description above.

3-(2,3-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (42f)

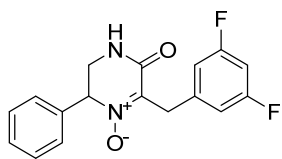


Obtained as a white solid (0.26 g, 43% from **21ac**). ¹H NMR (DMSO): 12.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.24 (m, 6H), 4.17 (s, 2H). ¹³C NMR (DMSO): 155.5, 155.2, 150.2 (dd, *J* = 245, 13 Hz), 148.9 (dd, *J* = 245, 13 Hz), 136.3, 131.3, 129.0, 127.8 (d, *J* = 13 Hz), 127.7, 127.2 (t, *J* = 3 Hz), 124.7 (2 signals), 123.0, 115.9 (d, *J* = 17 Hz), 32.4. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₁₃F₂N₂O: 299.0996; found, 299.1006.

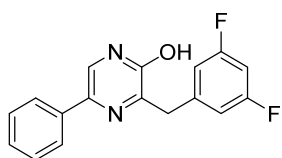
3-(2,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (42g)



Obtained as a white solid (1.33 g, 39% from **21ad**). Analytical data identical to description above.

6-(3,5-Difluorobenzyl)-5-oxo-2-phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyrazine 1-oxide (100h)

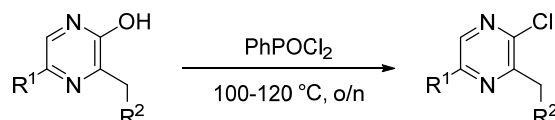
Obtained as a white solid (4.82 g, 26% from **21ae**) after chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 1:1 to 1:2). ^1H NMR (DMSO): 8.39 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.35 (m, 3H), 7.20 (m, 2H), 7.07 (tt, $J = 9.5, 2.4$ Hz, 1H), 6.99 (m, 2H), 5.29 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.00 (m, 3H), 3.60 (ddd, $J = 13.9, 4.6, 3.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (DMSO): 162.6 (dd, $J = 246, 13$ Hz), 160.5, 141.5 (t, $J = 10$ Hz), 140.0, 135.8, 128.9, 128.9, 127.1, 112.5 (m), 102.4 (t, $J = 26$ Hz), 71.5, 42.6, 30.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$: 317.1102; found, 317.1100.

3-(3,5-Difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-ol (79h)

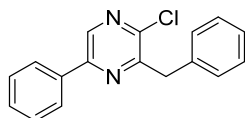
Obtained as a white solid (3.91 g, 86%). Analytical data identical to description above.

IV.I. Preparations of 2-chloropyrazines (II.C)

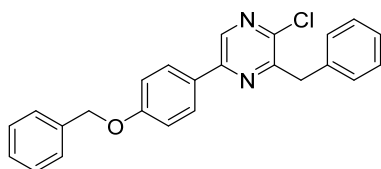
General procedure



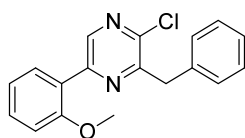
Under a calcium-protected atmosphere, the considered 2-hydroxypyrazine **79** was dispersed in an excess of phenylphosphonic dichloride and the suspension was heated at 100 °C for the indicated time. The resulting solution was diluted in ethyl acetate, poured onto an excess of crushed ice, and stirred for 15 min. This was made basic with 22% ammonia and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The resulting residue was purified as described below.

3-Benzyl-2-chloro-5-phenylpyrazine (**42a**)

Obtained from crude 3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-ol (**79a**, via route 2a without any intermediate chromatography) after heating with phenylphosphonic dichloride for 24 h. Purified with a final chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3 to 96:4) to give a yellowish solid (20.04 g, 62% from phenylalanine ethyl ester). ¹H NMR (CDCl₃): 8.68 (s, 1H), 8.08–8.00 (m, 2H), 7.58–7.47 (m, 3H), 7.44–7.40 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 2H), 7.30–7.25 (m, 1H), 4.41 (s, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃): 153.6, 150.4, 146.9, 138.6, 137.1, 135.4, 130.0, 129.2, 129.1, 128.5, 126.9, 126.8, 41.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₁₄ClN₂, 281.0846; found, 281.0730.

3-Benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)-2-chloropyrazine (**42b**)

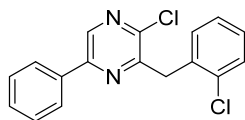
Obtained from crude 3-benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-ol (**79b**, via route 2a without any intermediate chromatography) after heating with phenylphosphonic dichloride for 24 h. Purified with a final chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 1:1) followed by a recrystallization in ethanol to give a yellowish solid (7.61 g, 32% from phenylalanine methyl ester). ¹H NMR (CDCl₃): 8.61 (s, 1H), 8.0 (m, 2H), 7.47–7.20 (m, 10H), 7.11 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.38 (s, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃): 161.5, 153.3, 150.1, 145.9, 138.0, 137.2, 136.6, 129.2, 128.7, 128.5, 128.3, 128.1, 127.9, 127.4, 126.7, 115.4, 70.1, 41.2 (one signal missing). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₀ClN₂O, 387.1264; found, 387.1266.

3-Benzyl-5-(2-methoxyphenyl)-2-chloropyrazine (**42c**)

Obtained as a yellow solid (1.82 g, 81%) after heating for 18 hours and a chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 3:2). ¹H NMR (CDCl₃): 8.86 (s, 1H), 7.91

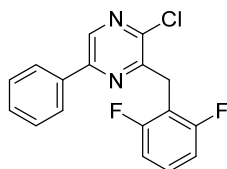
(dd, 1H, $J = 7.6, 1.8$ Hz), 7.48–7.36 (m, 3H), 7.34–7.28 (m, 2H), 7.26–7.18 (m, 1H), 7.11 (td, 1H, $J = 7.6, 0.8$ Hz), 7.03 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.37 (s, 2H), 3.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 157.4, 153.4, 149.4, 146.2, 143.3, 137.5, 131.3 (two signals), 129.3, 128.6, 126.8, 124.9, 121.4, 111.6, 55.7, 41.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}$, 311.0951; found, 311.0965.

2-Chloro-3-(2-chlorobenzyl)-5-phenylpyrazine (42d)



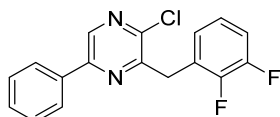
Obtained as a white solid (1.58 g, 73%) after a recrystallization in ethanol. ^1H NMR (CDCl_3): 8.70 (s, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.46 (m, 4H), 7.22 (m, 3H), 4.52 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 152.4, 150.2, 147.0, 138.5, 135.2, 134.6, 131.0, 130.0, 129.5, 129.0, 128.2, 126.8, 126.7, 38.6. (one signal missing) HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_2$: 315.0456; found, 315.0466.

2-Chloro-3-(2,6-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazine (42e)



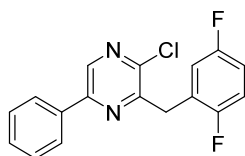
Obtained as a solid (7.5 g, 90%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 98:2). ^1H NMR (CDCl_3): 8.67 (m, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 7.28 (m, 1H), 6.95 (m, 2H), 4.43 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 161.8 (dd, $J = 248, 8$ Hz), 151.2, 150.0, 146.4, 138.3, 135.2, 129.9, 128.9, 128.6 (t, $J = 10$ Hz), 126.7, 113.0 (t, $J = 20$ Hz), 111.0, 28.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}_2$: 317.0657; found, 317.0650.

2-Chloro-3-(2,3-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazine (42f)



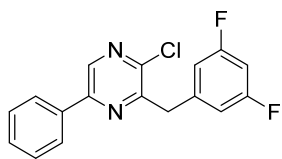
Obtained as a white solid (1.91 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 8.71 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.50 (m, 3H), 7.07 (m, 3H), 4.45 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 151.8, 150.7 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 150.3, 149.2 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 146.7, 138.8, 135.1, 130.1, 129.1, 126.8, 126.6 (d, $J = 13$ Hz), 125.8 (t, $J = 3$ Hz), 123.8 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.9 (d, $J = 17$ Hz), 34.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}_2$: 317.0657; found, 317.0651.

2-Chloro-3-(2,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazine (42g)



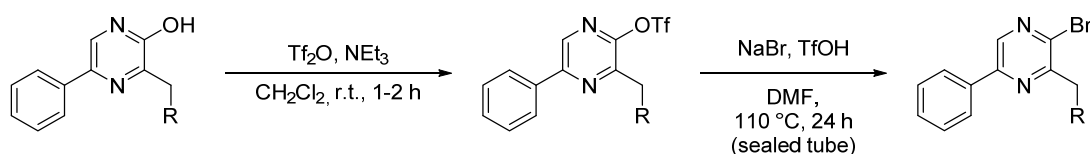
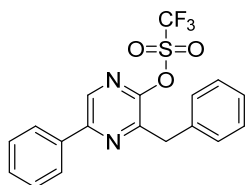
Obtained as a white solid (1.16 g, 69%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 8.72 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.50 (m, 3H), 7.07 (m, 1H), 6.97 (m, 2H), 4.40 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 158.5 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 157.1 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 151.7, 150.4, 146.7, 138.9, 135.1, 130.1, 129.1, 126.8, 125.7 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 117.5 (dd, $J = 24, 4$ Hz), 116.2 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.9 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 34.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}_2$: 317.0657; found, 317.0658.

2-Chloro-3-(3,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazine (42h)

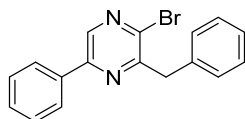


Obtained as a white solid (3.5 g, 90%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 98:2). ^1H NMR (CDCl_3): 8.72 (s, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.52 (m, 3H), 6.91 (m, 2H), 6.2 (tt, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 4.36 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 163.0 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 152.2, 150.6, 146.8, 140.7 (t, $J = 9$ Hz), 139.1, 135.0, 130.2, 129.1, 126.9, 112.1, 102.4 (t, $J = 25$ Hz), 40.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}_2$: 317.0657; found, 317.0651.

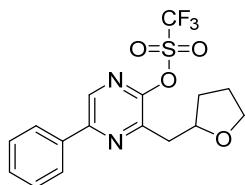
IV.J. Preparations of 2-bromopyrazines (II.C)

**3-Benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl trifluoromethanesulfonate (101a)**

At room temperature, 3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-ol (**79a**, 0.74 g, 1.0 eq) was dissolved in dry dichloromethane (20 mL, stabilized by amylene, dried over 4 Å molecular sieve). Triethylamine (0.42 mL, 1.1 eq) was then added, followed by a dropwise addition of triflic anhydride (0.48 mL, 1.0 eq). The resulting solution was stirred for 40 minutes then diluted in ethyl acetate. The organic phase was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The resulting residue was purified by chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 4:1 to 2:1) to yield the desired product (0.34 g, 31%) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3): 8.60 (s, 1H), 8.05–7.97 (m, 2H), 7.57–7.49 (m, 3H), 7.39–7.30 (m, 4H), 7.29–7.23 (m, 1H), 4.32 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 152.5, 150.7, 147.6, 137.1, 136.3, 135.0, 130.6, 129.3 (2 signals), 128.9, 127.3 (2 signals), 118.7 (q, $J = 320.9$ Hz), 39.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 395.0677; found, 395.0695.

3-Benzyl-2-bromo-5-phenylpyrazine (20a)

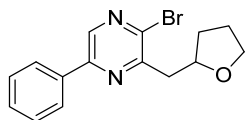
In a tube featuring a Teflon–coated screw cap, **101a** (0.08 g, 1.0 eq) and dry sodium bromide (0.04 g, 2.1 eq) were dispersed in dry *N,N*-dimethylformamide (3 mL). Triflic acid (16 μL , 0.9 eq) was added, the tube was sealed and heated at 120 °C overnight. The resulting solution was diluted in ethyl acetate, washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The resulting residue was then purified by chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 3:1) to yield the desired product (0.02 g, 30%). ^1H NMR (CDCl_3): 8.63 (s, 1H), 8.05–7.97 (m, 2H), 7.56–7.47 (m, 3H), 7.43–7.37 (m, 2H), 7.35–7.29 (m, 2H), 7.28–7.21 (m, 1H), 4.41 (s, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 155.6, 150.7, 139.8, 139.2, 137.3, 135.4, 130.3, 129.4, 129.2, 128.6, 127.0, 126.9, 42.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrN}_2$, 325.0340; found, 325.0319.

5-Phenyl-3-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)pyrazin-2-yl trifluoromethanesulfonate (101j)

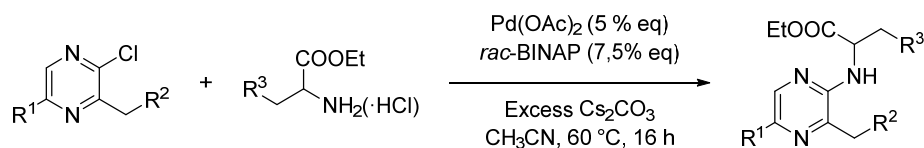
In an ice bath, 5-phenyl-3-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)pyrazin-2-ol (**79j**, 1.09 g, 1.00 eq) was dissolved in dry dichloromethane (40 mL, stabilized by amylene, dried over 4 Å molecular sieve). Triethylamine (0.61 mL, 1.05 eq) was then added, followed by a dropwise addition of triflic anhydride (0.73 mL, 1.02 eq). The resulting solution was stirred overnight at room temperature, then

diluted in dichloromethane. The organic phase was washed twice with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The resulting residue was purified by chromatography over silica gel (cyclohexane–dichloromethane 1:4) to yield the desired product (0.68 g, 41%) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3): 8.60 (s, 1H), 8.01 (m, 2H), 7.53 (m, 3H), 4.51 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.27 (dd, $J = 14.1, 7.8$ Hz, 1H), 3.10 (dd, $J = 14.1, 5.4$ Hz, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.76 (m, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 153.3, 151.1, 146.5, 136.7, 135.0, 130.3, 129.1, 127.1, 118.6 (321 Hz), 77.3, 67.9, 38.2, 26.9, 25.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 389.0783; found, 389.0808.

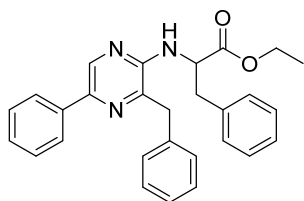
2-Bromo-5-phenyl-3-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)pyrazine (20j)



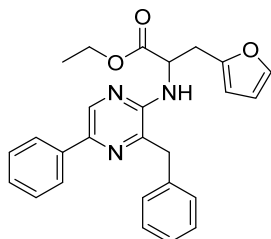
In a tube featuring a Teflon-coated screw cap, **101j** (0.66 g, 1.0 eq) and dry sodium bromide (0.44 g, 2.5 eq) were dispersed in dry *N,N*-dimethylformamide (15 mL). Triflic acid (0.14 mL, 0.9 eq) was added, the tube was sealed and heated at 110 °C for 23 h. The resulting solution was diluted in ethyl acetate, washed twice with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The resulting residue was then purified by chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 99.5:0.5) to yield the desired product (0.35 g, 63%). ^1H NMR (CDCl_3): 8.62 (s, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.50 (m, 3H), 4.57 (p, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.42 (dd, $J = 14.6, 6.7$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 14.6, 6.7$ Hz, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.99 (m, 2H), 1.76 (m, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 154.3, 150.5, 140.2, 138.9, 135.4, 130.0, 129.0, 126.9, 77.4, 67.9, 42.1, 31.2, 25.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}$, 319.0446; found, 319.0464.

IV.K. Preparations of *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters (III.A.3)**General procedure for the Buchwald-Hartwig coupling of 2-chloropyrazines **42** with α -aminoesters **21/77****

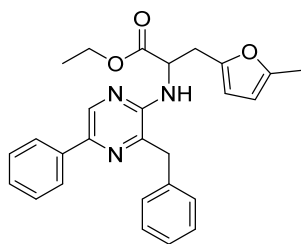
In a 20 mL sealable vial, the considered 2-chloropyrazine (**42**, 1.00 eq), the considered α -aminoester (1.05 eq, either as a free base **21** or as a hydrochloride salt **77**), cesium carbonate (2.05 eq or 3.05 eq), palladium acetate (5% eq) and racemic 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl ((\pm)-BINAP, 7.5% eq) were weighted. The air was replaced by argon, then a dry solvent was injected (acetonitrile unless mentioned otherwise, q.s. 0.2 M). This was heated at 60 °C for 12 to 24 h (unless mentioned otherwise) using either an oil bath with vigorous stirring (> 900 rpm) or a heated ultrasonic bath. The resulting suspension was dispersed in ethyl acetate, filtered and rinsed, then the filtrate was concentrated to dryness prior to further purification as described below.

Ethyl (3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)phenylalaninate (22a**)**

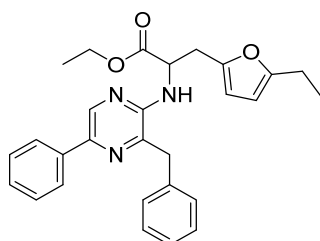
Obtained from **42a** and the hydrochloride salt of phenylalanine ethyl ester (**77i**) as an oil (0.27 g, 86%) after a chromatography over silica gel (neat dichloromethane). ¹H NMR (CDCl₃): 8.43 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.53–7.43 (m, 1H), 7.41–7.34 (m, 1H), 7.33–7.20 (m, 8H), 7.05–6.95 (m, 2H), 4.97 (m, 2H), 4.14 (s, 2H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.18 (dd, *J* = 13.8, 5.4 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 13.8, 5.9 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.4, 150.4, 141.2, 141.1, 137.5, 136.9, 136.5, 136.3, 129.3, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 127.8, 126.9, 126.9, 125.7, 61.2, 54.9, 40.9, 37.8, 14.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈N₃O₂, 438.2182; found, 438.2185.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22b**)**

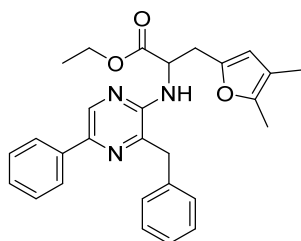
Obtained from **42a** and **21a** (free base) as an oil (5.61 g, 89%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ¹H NMR (CDCl₃): 8.42 (s, 1H), 7.99–7.92 (m, 2H), 7.52–7.42 (m, 2H), 7.39–7.28 (m, 5H), 7.28–7.24 (m, 2H), 6.22 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 5.85 (dd, *J* = 3.2, 0.7 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.95 (dt, *J* = 7.5, 5.3 Hz, 1H), 4.23–4.11 (m, 4H), 3.24–3.18 (m, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.0, 150.6, 150.3, 141.9, 141.2, 141.1, 137.5, 136.8, 136.6, 128.8, 128.7, 128.7, 127.8, 126.8, 125.7, 110.3, 107.7, 61.3, 53.2, 40.9, 30.4, 14.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₆N₃O₃, 428.1974; found: 428.1965.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22c)

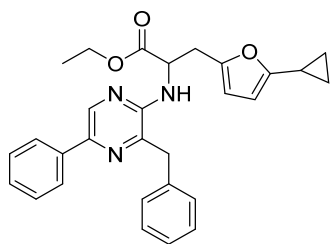
Obtained from **42a** and **21c** (free base) as a yellow oil (5.85 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). ^1H NMR (CDCl_3): 8.38 (s, 1H), 7.96–7.89 (m, 2H), 7.48–7.40 (m, 2H), 7.38–7.26 (m, 5H), 7.25–7.19 (m, 1H), 5.83–5.77 (m, 1H), 5.72 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.89 (dt, $J = 7.5, 5.3$ Hz, 1H), 4.21–4.08 (m, 4H), 3.12 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.2, 151.6, 150.5, 148.7, 141.3, 141.2, 137.7, 136.9, 136.8, 128.9, 128.9, 127.9, 127.0, 125.8, 108.7, 106.3, 61.4, 53.4, 40.9, 30.7, 14.3, 13.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$, 442.2131; found, 442.2121.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (22d)

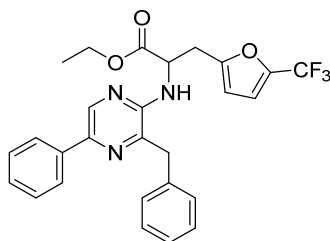
Obtained from **42a** and **21d** (free base) as a yellow solid (0.48 g, 74%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.39 (s, 1H), 7.96–7.89 (m, 2H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.37–7.26 (m, 4H), 7.26–7.20 (m, 2H), 5.80 (dd, $J = 2.0, 1.0$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.91 (dt, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.22–4.08 (m, 4H), 3.14 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.56 (qd, $J = 7.5, 0.6$ Hz, 2H), 1.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.3, 157.3, 150.5, 148.6, 141.3, 141.2, 137.7, 137.0, 136.8, 128.9 (three signals), 127.9, 127.0, 125.8, 108.5, 104.7, 61.4, 53.3, 40.9, 30.8, 21.5, 14.3, 12.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$, 457.2319; found, 457.2314.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoate (22e)

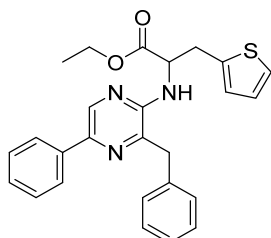
Obtained from **42a** and **21e** (free base) as an oil (0.20 g, 49%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.39 (s, 1H), 7.97–7.90 (m, 2H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.39–7.19 (m, 6H), 5.65 (s, 1H), 5.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.88 (dt, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.19–4.12 (m, 4H), 3.09 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.3, 150.6, 147.4, 146.8, 141.3, 141.2, 137.7, 137.0, 136.8, 128.9, 128.8, 127.9, 126.9, 125.8, 114.5, 111.2 (two signals), 61.3, 53.4, 40.8, 30.7, 14.2, 11.4, 10.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$, 456.2287; found, 456.2337.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-cyclopropylfuran-2-yl)propanoate (22f)

Obtained from **42a** and **21f** (free base) as an oil (0.31 g, 67%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.39 (s, 1H), 7.97–7.90 (m, 2H), 7.48–7.41 (m, 2H), 7.38–7.20 (m, 6H), 5.78 (dd, $J = 3.1, 0.5$ Hz, 1H), 5.72 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.08 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 4.90 (dt, 1H, $J = 7.6, 5.3$ Hz), 4.20–4.11 (m, 4H), 3.12 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 1.81 (tt, 1H, $J = 8.5, 5.1$ Hz), 1.22 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.88–0.80 (m, 2H), 0.73–0.65 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.2, 156.9, 150.5, 148.3, 141.3, 141.2, 137.7, 136.9, 136.7, 128.9 (three signals, two superimposed), 127.9, 127.0, 125.8, 108.7, 104.3, 61.4, 53.2, 40.9, 30.8, 14.3, 8.9, 6.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$, 468.2287; found, 468.2291.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-trifluoromethylfuran-2-yl)propanoate (22g)

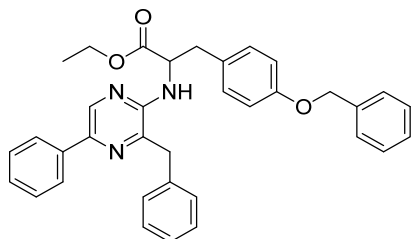
Obtained from **42a** and **21h** (free base) as an oil (0.17 g, 44%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 93:7). ^1H NMR (CDCl_3): 8.40 (s, 1H), 7.99–7.92 (m, 2H), 7.50–7.42 (m, 2H), 7.40–7.33 (m, 1H), 7.33–7.20 (m, 5H), 6.55 (dd, $J = 3.3, 1.2$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 3.3, 0.6$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.98 (dt, $J = 7.1, 5.2$ Hz, 1H), 4.26–4.09 (m, 4H), 3.29 (dd, $J = 15.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 15.2, 5.2$ Hz, 1H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.6, 154.0, 150.0, 141.5 (23 Hz), 141.4 (15 Hz), 141.1 (43 Hz), 137.6, 136.9, 136.7, 129.0, 128.9, 128.8, 128.0, 127.1, 125.8, 119.2 (267 Hz), 112.5 (3 Hz), 108.8, 61.9, 52.9, 41.1, 30.6, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 496.1848; found, 496.1847.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(thiophen-2-yl)propanoate (22h)

Obtained from **42a** and **21av** (free base) as an oil (0.51 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.42 (s, 1H), 8.00–7.89 (m, 2H), 7.50–7.42 (m, 2H), 7.40–7.32 (m, 1H), 7.32–7.26 (m, 3H), 7.26–7.21 (m, 2H), 7.14–7.08 (m, 1H), 6.85 (dd, $J = 5.2, 3.4$ Hz, 1H), 6.58–6.50 (m, 1H), 5.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.99 (dt, $J = 7.1, 5.0$ Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.44 (dd, $J = 14.6, 4.7$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 14.9,$

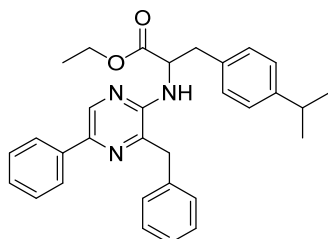
4.9 Hz, 1H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.9, 150.3, 141.5, 141.3, 137.8, 137.6, 137.0, 136.7, 129.0, 128.9, 128.9, 128.0, 127.0, 127.0, 126.7, 125.8, 124.7, 61.6, 54.7, 41.1, 32.0, 14.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, 444.1746; found, 444.1766.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4-benzyloxyphenyl)propanoate (22i)



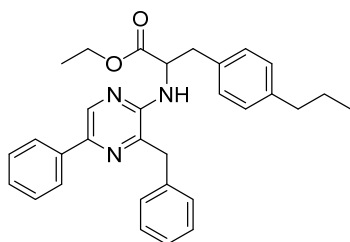
Obtained from **42a** and **77j** (hydrochloride salt) as an oil (0.68 g, 70%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.41 (s, 1H), 8.00–7.86 (m, 2H), 7.50–7.16 (m, 13H), 6.90–6.84 (m, 2H), 6.84–6.79 (m, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.99–4.84 (m, 2H), 4.12 (qd, 2H, $J = 7.1$, 0.6 Hz), 4.12 (s, 2H), 3.11 (dd, 1H, $J = 13.9$, 5.0 Hz), 3.01 (dd, 1H, $J = 13.9$, 5.5 Hz), 1.19 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.6, 157.9, 150.5, 141.2 (two signals), 137.7, 137.2, 137.0, 136.7, 130.4, 128.9 (two signals), 128.8, 128.7, 128.6, 128.1, 127.9, 127.6, 127.0, 125.8, 115.0, 70.2, 61.3, 55.1, 41.0, 37.1, 14.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$, 544.2600; found, 544.2654.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4-isopropylphenyl)propanoate (22j)



Obtained from **42a** and **77n** (hydrochloride salt) as an oil (0.25 g, 73%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.40 (s, 1H), 7.97–7.90 (m, 2H), 7.49–7.40 (m, 2H), 7.38–7.32 (m, 1H), 7.32–7.23 (m, 3H), 7.23–7.17 (m, 2H), 7.12–7.05 (m, 2H), 6.94–6.88 (m, 2H), 4.99–4.84 (m, 2H), 4.18–4.06 (m, 4H), 3.08 (qd, 2H, $J = 13.8$, 5.7 Hz), 2.96–2.84 (m, 1H), 1.25 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 1.16 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.7, 150.6, 147.5, 141.3, 141.2, 137.7, 137.0, 136.7, 133.6, 129.3, 128.9, 128.9, 128.8, 127.9, 127.0, 126.6, 125.8, 61.2, 55.0, 41.0, 37.6, 33.9, 24.2, 24.1, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$, 480.2683; found, 480.2690.

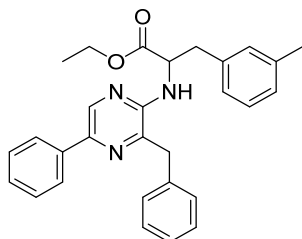
Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4-propylphenyl)propanoate (22k)



Obtained from **42a** and **77p** (hydrochloride salt) as an oil (0.25 g, 73%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.42 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.26 (m, 5H), 7.05 (m, 2H), 6.91 (m, 2H), 4.93 (m, 2H), 4.13 (m, 4H), 3.14 (dd, 1H, $J = 13.9$, 5.5 Hz), 3.06 (dd, 1H, $J = 13.9$, 6.0 Hz), 2.59 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.19

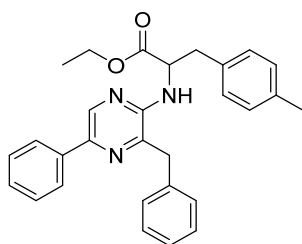
(t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 0.97 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.5, 150.4, 141.2, 141.1, 141.0, 137.5, 136.9, 136.6, 133.3, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 127.8, 126.9, 125.6, 61.1, 54.9, 40.8, 37.7, 37.5, 24.5, 14.1, 13.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$, 480.2651; found, 480.2671.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(*m*-tolyl)propanoate (22l)



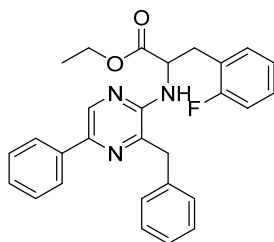
Obtained from **42a** and **21l** (free base) as an oil (0.28 g, 61%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.41 (s, 1H), 8.07–7.90 (m, 2H), 7.48–7.42 (m, 2H), 7.38–7.32 (m, 1H), 7.30–7.26 (m, 1H), 7.26–7.23 (m, 1H), 7.21–7.16 (m, 2H), 7.15–7.08 (m, 1H), 7.07–7.01 (m, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 4.93 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz), 4.92 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz), 4.88–4.79 (m, 2H), 4.11 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.11 (q, 2H, $J = 15.4$ Hz), 3.11 (dd, 1H, $J = 13.8, 5.5$ Hz), 3.03 (dd, 1H, $J = 13.8, 6.1$ Hz), 2.30 (s, 3H), 1.17 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.7, 150.6, 141.3, 141.3, 138.1, 137.7, 137.0, 136.7, 136.3, 130.2, 128.9, 128.9, 128.8, 128.5, 127.9, 127.8, 127.0, 126.4, 125.8, 61.2, 55.1, 40.9, 38.0, 21.5, 14.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$, 452.2338; found, 452.2408.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(*p*-tolyl)propanoate (22m)



Obtained from **42a** and **77m** (hydrochloride salt) as an oil (0.35 g, 87%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 94:6). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.28 (m, 3H), 7.22 (m, 2H), 7.04 (m, 2H), 6.89 (m, 2H), 4.93 (m, 2H), 4.15 (m, 4H), 3.15 (dd, 1H, $J = 13.8, 5.2$ Hz), 3.06 (dd, 1H, $J = 13.8, 5.8$ Hz), 2.35 (s, 3H), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.5, 150.4, 141.2, 141.1, 137.5, 136.8, 135.5, 135.4, 133.1, 129.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 127.8, 126.8, 125.7, 61.1, 54.9, 40.8, 37.4, 21.1, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$, 452.2338; found, 452.2325.

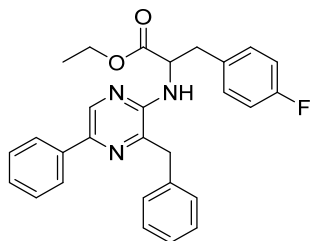
Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(2-fluorophenyl)propanoate (22n)



Obtained from **42a** and **77y** (hydrochloride salt) as an oil (0.31 g, 76%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). ^1H NMR (CDCl_3): 8.42 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.27 (m, 6H), 6.98 (m, 3H), 4.99 (m, 2H), 4.15 (m, 4H), 3.22 (dd,

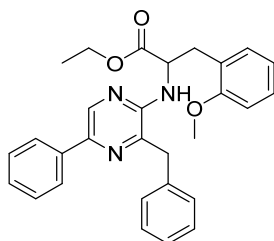
1H, $J = 13.9, 5.5$ Hz), 3.16 (dd, 1H, $J = 13.9, 6.3$ Hz), 1.20 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.4, 161.3 (246 Hz), 150.4, 141.2, 141.1, 137.5, 136.7 (25 Hz), 131.5 (5 Hz), 128.8, 128.7, 128.6, 128.6 (8 Hz), 127.8, 126.9, 125.7, 124.1, 124.0, 123.5 (16 Hz), 115.2 (22 Hz), 61.3, 54.3, 40.8, 31.2, 14.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{FN}_3\text{O}_2$, 456.2087; found, 456.2084.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4-fluorophenyl)propanoate (22o)



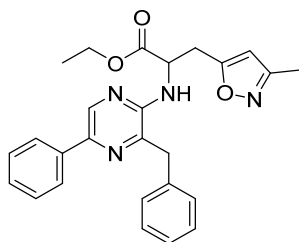
Obtained from **42a** and **77aa** (hydrochloride salt) as an oil (0.45 g, 69%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.41 (s, 1H), 7.99–7.91 (m, 2H), 7.51–7.41 (m, 2H), 7.40–7.32 (m, 1H), 7.31–7.25 (m, 3H), 7.23–7.17 (m, 2H), 6.91–6.79 (m, 4H), 4.99–4.84 (m, 2H), 4.21–4.06 (m, 4H), 3.15 (dd, $J = 13.9, 5.1$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 13.9, 5.5$ Hz, 1H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.4, 162.0 (245 Hz), 150.4, 141.3, 141.3, 137.6, 137.0, 136.6, 132.1 (3 Hz), 130.8 (8 Hz), 129.0, 128.9, 128.7, 128.0, 127.1, 125.8, 115.4 (21 Hz), 61.4, 55.0, 41.1, 37.0, 14.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{FN}_3\text{O}_2$, 456.2087; found, 456.2110.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(2-methoxyphenyl)propanoate (22p)



Obtained from **42a** and **77s** (hydrochloride salt) as a yellow solid (0.32 g, 77%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 95:5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.38 (s, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.34 (m, 1H), 7.26 (m, 3H), 7.22 (m, 6H), 7.04 (dd, 1H, $J = 7.4, 1.7$ Hz), 6.88 (td, 1H, $J = 7.4, 1.0$ Hz), 6.83 (m, 1H), 5.30 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.85 (m, 1H), 4.11 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 3.20 (dd, 1H, $J = 13.6, 5.6$ Hz), 3.15 (dd, 1H, $J = 13.6, 7.6$ Hz), 1.20 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 173.0, 157.6, 150.7, 140.9, 140.8, 137.6, 136.8, 136.7, 131.0, 128.7 (two signals), 128.4, 127.6, 126.7, 125.6, 125.2, 120.8, 110.6, 60.9, 55.4, 55.2, 40.2, 32.4, 14.2, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$, 468.2287; found, 468.2281.

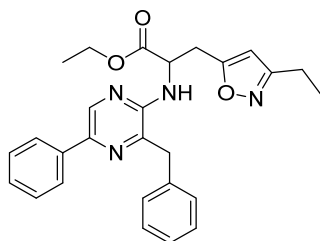
Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(3-methylisoxazol-5-yl)propanoate (22q)



Obtained from **42a** and **77aw** (hydrochloride salt) as a yellow oil (0.17 g, 97% purity, 48%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.33 (m, 6H), 5.48 (s, 1H), 5.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.01 (dt,

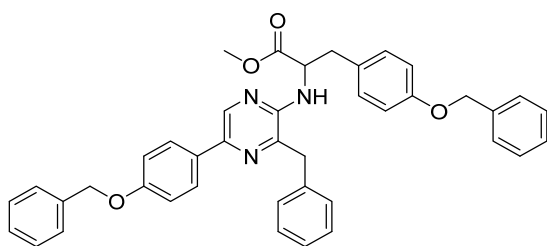
$J = 6.9, 5.2$ Hz, 1H), 4.19 (m, 4H), 3.41 (dd, $J = 15.4, 5.1$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 15.4, 5.3$ Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.2, 167.9, 159.6, 149.9, 141.5, 141.4, 137.3, 136.7, 136.5, 128.9, 128.8, 128.7, 127.9, 126.9, 125.7, 103.2, 61.8, 52.4, 41.0, 29.0, 14.1, 11.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$: 443.2083; found, 443.2092.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(3-ethylisoxazol-5-yl)propanoate (22r)

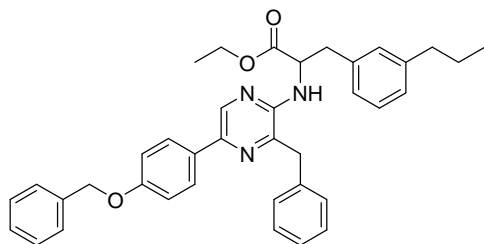


Obtained from **42a** and **77ax** (hydrochloride salt) as a yellow oil (0.29 g, 90% purity, 50%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1). ^1H NMR (CDCl_3): 8.42 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.33 (m, 6H), 5.57 (s, 1H), 5.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 5.02 (dt, $J = 7.0, 5.3$ Hz, 1H), 4.17 (m, 4H), 3.40 (dd, $J = 15.3, 5.1$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 15.3, 5.4$ Hz, 1H), 2.62 (qd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 2H), 1.23 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.3, 167.8, 165.0, 149.9, 141.5, 141.4, 137.3, 136.7, 136.5, 128.8, 128.8, 128.7, 127.9, 126.9, 125.7, 101.9, 61.8, 52.5, 40.9, 29.2, 19.5, 14.1, 12.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3$: 457.2240; found, 457.2244.

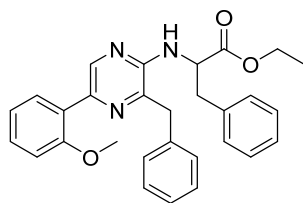
Methyl 2-((3-benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(4-benzyloxyphenyl)propanoate (22s)



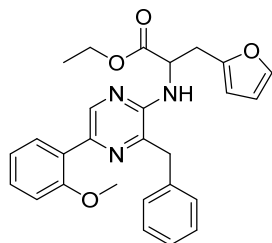
Obtained from **42b** and **77j** (hydrochloride salt) as a yellow oil (2.07 g, 91%) after a chromatography over silica gel (dichloromethane–ethanol 99.5:0.5). ^1H NMR (CDCl_3): 8.39 (s, 1H), 7.98–7.87 (m, 2H), 7.53–7.47 (m, 4H), 7.47–7.41 (m, 4H), 7.41–7.35 (m, 2H), 7.34–7.27 (m, 3H), 7.25–7.21 (m, 2H), 7.15–7.07 (m, 2H), 6.94–6.82 (m, 4H), 5.17 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.03–4.94 (m, 1H), 4.86 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.15 (dd, $J = 13.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 13.9, 6.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 173.1, 158.9, 157.8, 150.0, 141.1, 141.0, 137.1 (2C), 136.6, 136.3, 130.5, 130.2, 128.8, 128.7, 128.6 (2C), 128.5, 128.0 (2C), 127.5, 127.0, 126.9, 115.3, 115.0, 70.1 (2C), 54.9, 52.1, 40.9, 37.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_4$: 636.2863. Found: 636.2897.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(3-propylphenyl)propanoate (22t)

Obtained from **42b** and **77o** (hydrochloride salt) as a yellow oil (0.97 g, 85%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 92:8). ¹H NMR (CDCl₃): 8.36 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.32 (m, 11H), 7.07 (m, 3H), 6.92 (m, 1H), 6.82 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.84 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.12 (m, 4H), 3.14 (dd, *J* = 13.7, 5.7 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.7, 6.2 Hz, 1H), 2.56 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.6, 158.8, 150.0, 142.8, 141.1, 141.0, 137.0, 136.6, 136.2, 136.1, 130.5, 129.5, 128.8, 128.6, 128.4, 128.0, 127.5, 127.1, 126.9, 126.8, 126.6, 115.2, 70.1, 61.0, 55.0, 40.7, 38.0 (two superimposed signals), 24.5, 14.1, 13.8. HRMS (*m/z*): [*M*+H]⁺ calcd for C₃₈H₄₀N₃O₃: 586.3069; found, 586.3096.

Ethyl (3-benzyl-5-(2-methoxyphenyl)pyrazin-2-yl)phenylalaninate (22u)

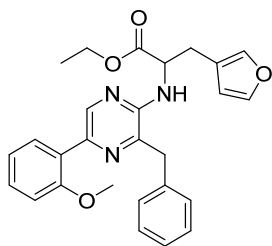
Obtained from **42c** and the **77i** (hydrochloride salt) as an oil (0.42 g, 72%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1). ¹H NMR (CDCl₃): 8.59 (s, 1H), 7.87 (m, 1H), 7.37–7.26 (m, 2H), 7.26–7.17 (m, 7H), 7.08 (m, 1H), 7.03–6.92 (m, 3H), 5.01–4.93 (m, 1H), 4.86 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.15 (dd, *J* = 13.8, 5.5 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 13.8, 6.0 Hz, 1H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.5, 157.0, 149.9, 143.0, 141.3, 141.1, 140.4, 139.4, 136.9, 130.5, 129.2, 129.0, 128.8, 127.0, 126.9, 121.3, 119.3, 111.5, 111.3, 61.4, 55.7, 54.0, 41.2, 27.4, 14.3. HRMS (*m/z*): [*M*+H]⁺ calcd for C₂₉H₃₀N₃O₃: 468.2287; found, 468.2282.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-(2-methoxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22v)

Obtained from **42c** and **21a** (free base) as an oil (0.40 g, 64%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1). ¹H NMR (CDCl₃): 8.58 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.37–7.27 (m, 5H), 7.25–7.19 (m, 2H), 7.08 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 0.6 Hz, 1H), 6.20 (dd, *J* = 3.1, 1.8 Hz, 1H), 5.82 (dd, *J* = 3.1, 0.5 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.00–4.91 (m, 1H), 4.15 (s, 2H), 4.13 (qd, *J* = 7.1, 1.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.19 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.2, 157.0, 150.8, 149.9, 142.0, 141.2, 141.1, 139.5, 137.0, 130.5,

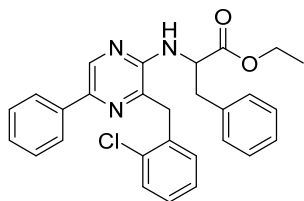
129.1, 128.9 (two signals), 126.9, 121.3, 111.5, 110.4, 107.8, 61.4, 55.7, 41.0, 30.6, 27.1, 14.2. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{28}N_3O_4$, 458.2080; found, 458.2083.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-(2-methoxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-3-yl)propanoate (22w)



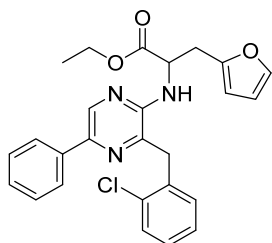
Obtained from **42c** and **21b** (free base) as an oil (0.53 g, 84%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 9:1). 1H NMR ($CDCl_3$): 8.60 (s, 1H), 7.89 (dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.38–7.19 (m, 7H), 7.13–7.04 (m, 1H), 7.00 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.97–5.91 (m, 1H), 5.02–4.87 (m, 2H), 4.24–4.07 (m, 4H), 3.89 (s, 3H), 2.97 (qd, $J = 14.7, 4.8$ Hz, 2H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 172.5, 157.0, 149.9, 143.0, 141.3, 141.1, 140.4, 139.4, 136.9, 130.5, 129.2, 129.0, 128.8, 127.0, 126.9, 121.3, 119.3, 111.5, 111.3, 61.4, 55.7, 54.0, 41.2, 27.4, 14.3. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{28}N_3O_4$, 458.2080; found, 458.2095.

Ethyl (3-(2-chlorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)phenylalaninate (22x)

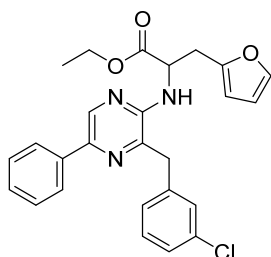


Obtained from **42d** and **77i** (hydrochloride salt) as an oil (0.19 g, 67%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). 1H NMR ($CDCl_3$): 8.44 (s, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.44 (m, 3H), 7.35 (m, 1H), 7.26–7.16 (m, 6H), 7.05 (m, 2H), 5.00 (m, 2H), 4.24 (m, 2H), 4.16 (dq, $J = 7.2, 1.0$ Hz, 2H), 3.22 (dd, $J = 13.7, 5.4$ Hz, 1H), 3.13 (dd, $J = 13.7, 6.3$ Hz, 1H), 1.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 172.4, 150.3, 141.2, 140.0, 137.4, 136.9, 136.3, 134.5, 134.0, 130.4, 129.5, 129.2, 128.7, 128.5, 128.2, 127.8, 127.0, 126.9, 125.6, 61.2, 55.0, 38.0, 37.1, 14.1. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{27}ClN_3O_2$, 472.1792; found, 472.1784.

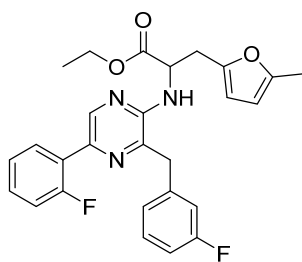
Ethyl 2-((3-(2-chlorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22y)



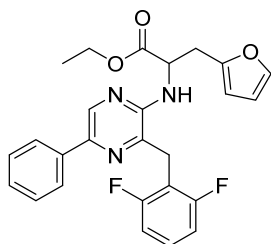
Obtained from **42d** and **21a** (free base) as an oil (0.44 g, 65%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). 1H NMR ($CDCl_3$): 8.44 (s, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.45 (m, 3H), 7.35 (m, 1H), 7.25–7.15 (m, 4H), 6.22 (m, 1H), 5.92 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.24 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 171.9, 150.6, 150.2, 142.0, 141.2, 140.0, 137.4, 136.9, 134.5, 134.1, 130.4, 129.5, 128.7, 128.2, 127.8, 127.0, 125.6, 110.3, 107.7, 61.3, 53.3, 37.1, 30.5, 14.1. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{25}ClN_3O_3$, 462.1584; found, 462.1576.

Ethyl 2-((3-(3-chlorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22z)

Obtained from **42i** and **77a** (hydrochloride salt) as a yellow oil (0.16 g, 36%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.44 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 7.27 (m, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 6.25 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 5.89 (dd, *J* = 3.2, 0.7 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.14 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 3.24 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.9, 150.5, 150.2, 142.0, 141.3, 140.2, 138.7, 137.3, 137.2, 134.6, 130.0, 128.8, 128.8, 127.9, 127.2, 126.9, 125.7, 110.3, 107.8, 61.4, 53.2, 40.3, 30.4, 14.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₅ClN₃O₃: 462.1584; found, 462.1597.

Ethyl 2-((3-(3-fluorobenzyl)-5-(2-fluorophenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22aa)

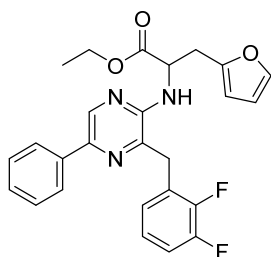
Obtained from **42j** and **77c** (hydrochloride salt) as a yellow oil (0.53 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.00 (td, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1H), 7.33 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.06 (dd, *J* = 7.6, 0.6 Hz, 1H), 6.96 (m, 2H), 5.82 (m, 1H), 5.77 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.95 (dt, *J* = 7.5, 5.3 Hz, 1H), 4.20 (m, 2H), 4.15 (s, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.18 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.22 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.0, 163.1 (d, *J* = 246 Hz), 160.2 (d, *J* = 249 Hz), 151.5, 150.2, 148.4, 140.8 (d, *J* = 13 Hz), 140.6, 139.1 (d, *J* = 7 Hz), 136.9 (d, *J* = 3 Hz), 130.2 (d, *J* = 8 Hz), 130.0 (d, *J* = 3 Hz), 129.2 (d, *J* = 8 Hz), 125.2 (d, *J* = 12 Hz), 124.5 (d, *J* = 3 Hz), 124.3 (d, *J* = 3 Hz), 116.1 (d, *J* = 23 Hz), 115.6 (d, *J* = 22 Hz), 113.9 (d, *J* = 21 Hz), 108.7, 106.2, 61.3, 53.1, 40.2, 30.5, 14.1, 13.4. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₆F₂N₃O₃: 478.1942; found, 478.1935.

Ethyl 2-((3-(2,6-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22ab)

Obtained from **42e** and **77a** (hydrochloride salt) as a white solid (0.40 g, 91%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.40 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.35 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 7.28 (m, 2H), 6.94 (m, 2H), 6.30 (dd, *J* = 3.2,

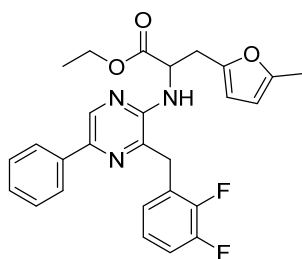
1.9 Hz, 1H), 6.07 (dd, $J = 3.2, 0.6$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.08 (dt, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 4.25 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.34 (m, 2H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.1, 161.8 (dd, $J = 248, 8$ Hz), 150.8, 149.7, 142.0, 140.9, 138.6, 137.3, 136.4, 128.6, 128.4 (t, $J = 10$ Hz), 127.7, 125.4, 112.8 (t, $J = 20$ Hz), 111.1, 110.3, 107.8, 61.4, 53.4, 30.6, 26.6, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 464.1786; found, 464.1798.

Ethyl 2-((3-(2,3-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22ac)

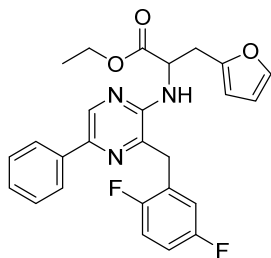


Obtained from **42f** and **77a** (hydrochloride salt) as a white solid (0.08 g, 18%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 8.44 (s, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.29 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 6.26 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 5.98 (dd, $J = 3.2, 0.8$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.01 (dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz, 1H), 4.20 (m, 4H), 3.28 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.9, 150.6 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 150.5, 150.1, 148.9 (dd, $J = 246, 13$ Hz), 142.1, 141.3, 139.2 (d, $J = 1$ Hz), 137.2, 137.1, 128.7, 127.9, 126.2 (d, $J = 13$ Hz), 125.6, 125.4 (t, $J = 3$ Hz), 124.1 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.7 (d, $J = 17$ Hz), 110.3, 107.8, 61.4, 53.3, 32.4 (t, $J = 3$ Hz), 30.4, 14.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 464.1786; found, 464.1780.

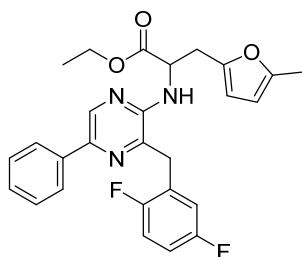
Ethyl 2-((3-(2,3-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22ad)



The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C. Obtained from **42f** and **77c** (hydrochloride salt) as a solid (0.31 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.45 (dd, $J = 8.3, 6.9$ Hz, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 5.87 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.83 (dd, $J = 3.2, 1.2$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.97 (dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz, 1H), 4.19 (m, 4H), 3.22 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.0, 151.6, 150.6 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 150.1, 148.9 (dd, $J = 246, 13$ Hz), 148.4, 141.2, 139.2, 137.2, 137.0, 128.7, 127.9, 126.2 (d, $J = 12$ Hz), 125.5, 125.4 (t, $J = 3$ Hz), 124.0 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.7 (d, $J = 17$ Hz), 108.6, 106.1, 61.3, 53.3, 32.3, 30.6, 14.1, 13.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 478.1942; found, 478.1946.

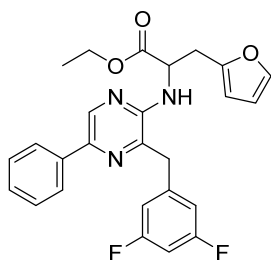
Ethyl 2-((3-(2,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22ae)

Obtained from **42g** and **77a** (hydrochloride salt) as an oil (0.03 g, 7%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.45 (s, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.06 (m, 1H), 6.94 (m, 2H), 6.25 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 5.98 (dd, *J* = 3.2, 0.8 Hz, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.01 (dt, *J* = 7.5, 5.4 Hz, 1H), 4.21 (qd, *J* = 7.1, 1.1 Hz, 2H), 4.14 (m, 2H), 3.28 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.0, 158.7 (dd, *J* = 242, 2 Hz), 156.8 (dd, *J* = 240, 2 Hz), 150.6, 150.0, 142.0, 141.3, 139.2, 137.2, 137.2, 128.8, 127.9, 125.6, 125.4 (dd, *J* = 10, 8 Hz), 117.1 (dd, *J* = 24, 4 Hz), 116.2 (dd, *J* = 25, 9 Hz), 114.9 (dd, *J* = 24, 9 Hz), 110.3, 107.8, 61.4, 53.3, 32.5, 30.5, 14.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₄F₂N₃O₃: 464.1786; found, 464.1783.

Ethyl 2-((3-(2,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22af)

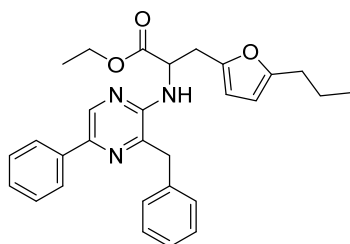
The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C. Obtained from **42g** and **77c** (hydrochloride salt) as a solid (0.18 g, 47%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). ¹H NMR (CDCl₃): 8.44 (s, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.05 (td, *J* = 8.9, 4.5 Hz, 1H), 6.94 (m, 2H), 5.86 (m, 1H), 5.82 (m, 1H), 5.21 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.97 (dt, *J* = 7.5, 5.5 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.13 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 3.22 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.1, 158.7 (dd, *J* = 242, 2 Hz), 156.7 (dd, *J* = 240, 3 Hz), 151.6, 150.1, 148.5, 141.2, 139.1, 137.2, 137.1, 128.7, 127.9, 125.5, 125.5 (dd, *J* = 19, 8 Hz), 117.1 (dd, *J* = 24, 4 Hz), 116.2 (dd, *J* = 25, 9 Hz), 114.9 (dd, *J* = 24, 9 Hz), 108.6, 106.1, 61.3, 53.4, 32.4, 30.6, 14.1, 13.4. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₆F₂N₃O₃: 478.1942; found, 478.1940.

Ethyl 2-((3-(3,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(furan-2-yl)propanoate (22ag)



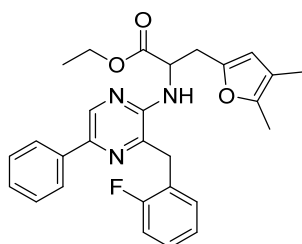
Obtained from **42h** and **77a** (hydrochloride salt) as a solid (0.08 g, 18%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.46 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 6.81 (m, 2H), 6.71 (m, 1H), 6.26 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.97 (dt, *J* = 7.5, 5.0 Hz, 1H), 4.20 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.27 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.9, 163.2 (dd, *J* = 249, 13 Hz), 150.5, 150.2, 142.1, 141.4, 140.6 (t, *J* = 9 Hz), 139.6, 137.4, 137.2, 128.8, 128.0, 125.7, 111.6, 110.3, 107.9, 102.5 (t, *J* = 25 Hz), 61.5, 53.2, 40.2, 30.3, 14.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₄F₂N₃O₃: 464.1786; found, 464.1788.

Ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-propylfuran-2-yl)propanoate (22ah)



The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C. Obtained from **42a** and **77g** (hydrochloride salt) as an oil (0.30 g, 71%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.42 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.31 (m, 6H), 5.83 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.94 (dt, *J* = 7.5, 5.3 Hz, 1H), 4.18 (m, 4H), 3.16 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.65 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.1, 155.7, 150.3, 148.4, 141.1, 141.0, 137.5, 136.8, 136.6, 128.8, 128.7, 127.7, 126.8, 125.6, 108.3, 105.5, 61.2, 53.2, 40.7, 30.6, 30.0, 21.3, 14.1, 13.7. (One missing signal) HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₉H₃₂N₃O₃: 470.2444; found, 470.2445.

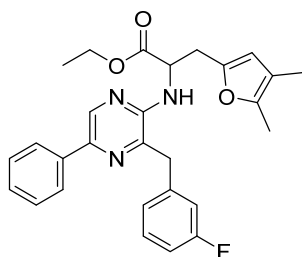
Ethyl 3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)-2-((3-(2-fluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)propanoate (22ai)



The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 11 h. Obtained from **42k** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.32 g, 81%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.41 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.08 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 5.26 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.94 (dt,

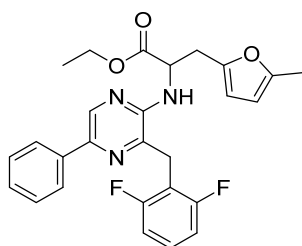
$J = 7.7, 5.5$ Hz, 1H), 4.20 (m, 4H), 3.15 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.1, 160.8 (d, $J = 244$ Hz), 150.2, 147.2, 146.7, 141.1, 139.9, 137.4, 136.9, 130.8 (d, $J = 4$ Hz), 128.7, 128.4 (d, $J = 8$ Hz), 127.7, 125.5, 124.2 (d, $J = 4$ Hz), 123.7 (d, $J = 16$ Hz), 115.2 (d, $J = 22$ Hz), 114.4, 111.0, 61.2, 53.4, 32.5 (d, $J = 3$ Hz), 30.6, 14.1, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_3$: 474.2193; found, 474.2194.

Ethyl 3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)-2-((3-(3-fluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)propanoate (22aj)



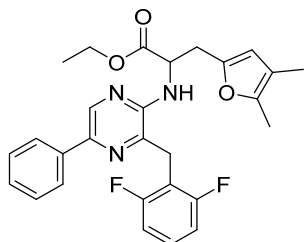
The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 20 h. Obtained from **42j** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.35 g, 88%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 6.97 (m, 2H), 5.70 (s, 1H), 5.08 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.91 (dt, $J = 7.6, 5.3$ Hz, 1H), 4.19 (m, 4H), 3.14 (m, 2H), 2.13 (s, 2H), 1.89 (s, 2H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.1, 163.0 (d, $J = 246$ Hz), 150.4, 147.1, 146.7, 141.2, 140.3, 139.2 (d, $J = 7$ Hz), 137.4, 137.1, 130.1 (d, $J = 8$ Hz), 128.7, 127.8, 125.6, 124.3 (d, $J = 3$ Hz), 115.6 (d, $J = 22$ Hz), 114.4, 113.7 (d, $J = 21$ Hz), 111.1, 61.2, 53.2, 40.2 (d, $J = 2$ Hz), 30.5, 14.1, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_3$: 474.2193; found, 474.2187.

Ethyl 2-((3-(2,6-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22ak)



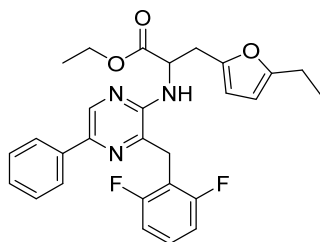
The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42e** and **77c** (hydrochloride salt) as a solid (0.38 g, 84%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 94:6). ^1H NMR (CDCl_3): 8.40 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.29 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 5.96 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.88 (dd, $J = 3.0, 1.0$ Hz, 1H), 5.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.04 (dt, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 4.25 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.27 (m, 2H), 2.27 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.2, 161.8 (dd, $J = 247, 8$ Hz), 151.6, 149.8, 148.8, 140.8, 138.5, 137.3, 136.4, 128.6, 128.4 (t, $J = 10$ Hz), 127.7, 125.4, 112.8 (t, $J = 20$ Hz), 111.1 (m), 108.6, 106.2, 61.3, 53.5, 30.7, 26.5 (t, $J = 2$ Hz), 14.1, 13.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 478.1942; found, 478.1951.

Ethyl 2-((3-(2,6-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoate (22al)



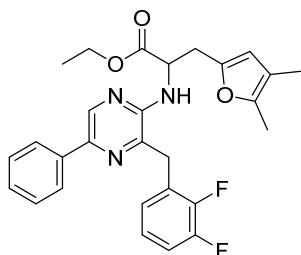
The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 11 h. Obtained from **42e** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.33 g, 85%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.39 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.29 (m, 3H), 6.94 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.37 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.01 (dt, *J* = 7.4, 5.5 Hz, 1H), 4.25 (qd, *J* = 7.1, 4.6 Hz, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.23 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.3, 161.8 (dd, *J* = 248, 8 Hz), 149.8, 147.4, 146.8, 140.8, 138.5, 137.3, 136.4, 128.6, 128.4 (t, *J* = 10 Hz), 127.6, 125.4, 114.5, 112.8 (t, *J* = 20 Hz), 111.1, 111.0 (m), 61.3, 53.6, 30.6, 26.5 (m), 14.1, 11.2, 9.8. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈F₂N₃O₃: 492.2099; found, 492.2105.

Ethyl 2-((3-(2,6-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (22am)



The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 11 h. Obtained from **42e** and **77c** (hydrochloride salt) as an oil (0.28 g, 72%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). ¹H NMR (CDCl₃): 8.40 (s, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 5.97 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.88 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.05 (dt, *J* = 7.5, 5.5 Hz, 1H), 4.26 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.28 (m, 2H), 2.62 (qd, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.3, 161.8 (dd, *J* = 248, 8 Hz), 157.4, 149.8, 148.7, 140.8, 138.5, 137.3, 136.4, 128.6, 128.4 (t, *J* = 10 Hz), 127.7, 125.4, 112.8 (t, *J* = 20 Hz), 111.1 (m), 108.4, 104.6, 61.3, 53.5, 30.7, 26.5, 21.4, 14.1, 12.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈F₂N₃O₃: 492.2099; found, 492.2103.

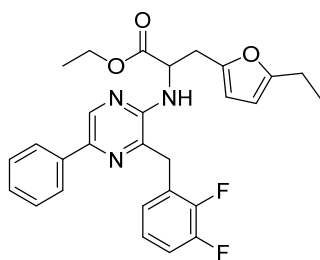
Ethyl 2-((3-(2,3-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoate (22an)



The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42f** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.21 g, 46%) after a

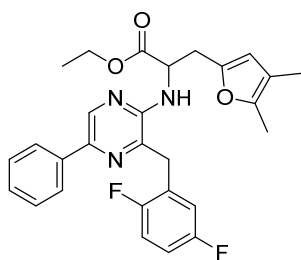
chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3 to 96:4). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 5.77 (s, 1H), 5.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.95 (dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz, 1H), 4.21 (m, 4H), 3.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.0, 150.6 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 150.1, 148.9 (dd, $J = 246, 13$ Hz), 147.1, 146.8, 141.2, 139.2, 137.2, 136.9, 128.7, 127.9, 126.2 (d, $J = 12$ Hz), 125.5, 125.4 (t, $J = 3$ Hz), 124.0 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.7 (d, $J = 17$ Hz), 114.4, 111.1, 61.3, 53.4, 32.3 (t, $J = 3$ Hz), 30.5, 14.1, 11.2, 9.7. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 492.2099; found, 492.2111.

Ethyl 2-((3-(2,3-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (22ao)



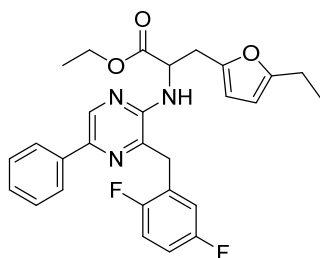
The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 11 h. Obtained from **42f** and **77d** (hydrochloride salt) as an oil (0.45 g, 74%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3 to 96:4). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 5.86 (m, 2H), 5.17 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.98 (dt, $J = 7.6, 5.4$ Hz, 1H), 4.20 (m, 4H), 3.23 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.57 (qd, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.0, 157.4, 150.6 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 150.0, 148.5 (dd, $J = 246, 13$ Hz), 148.3, 141.2, 139.2, 137.2, 137.0, 128.7, 127.9, 126.2 (d, $J = 13$ Hz), 125.5, 125.4 (t, $J = 3$ Hz), 124.0 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.7 (d, $J = 17$ Hz), 108.4, 104.5, 61.3, 53.3, 32.3, 30.6, 21.3, 14.1, 12.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 492.2099; found, 492.2090.

Ethyl 2-((3-(2,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoate (22ap)



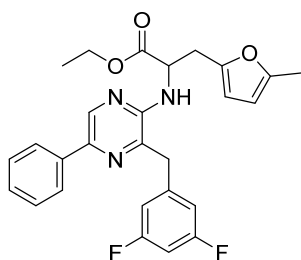
The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42g** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.25 g, 64%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 94:6). ^1H NMR (CDCl_3): 8.43 (s, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.94 (m, 2H), 5.77 (s, 1H), 5.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.95 (dt, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.14 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 3.17 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 172.1, 158.7 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 156.8 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 150.2, 147.2, 146.8, 141.2, 139.0, 137.2, 137.1, 128.7, 127.9, 125.5, 125.5 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 117.1 (dd, $J = 24, 4$ Hz), 116.1 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.8 (dd, $J = 24, 9$ Hz), 114.4, 61.3, 53.4, 32.4 (m), 30.5, 14.1, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 492.2099; found, 492.2083.

Ethyl 2-((3-(2,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (22aq)

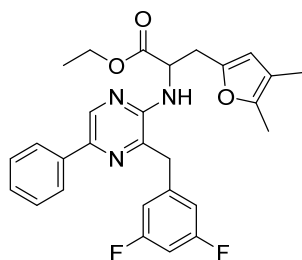


The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42g** and **77d** (hydrochloride salt) as an oil (0.15 g, 37%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 94:6). ¹H NMR (CDCl₃): 8.44 (s, 1H), 7.90 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.36 (m, 1H), 7.04 (m, 1H), 6.94 (m, 2H), 5.88 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.83 (dt, *J* = 2.9, 0.9 Hz, 1H), 5.21 (m, 1H), 4.98 (dt, *J* = 7.6, 5.5 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.13 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 3.23 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.58 (qd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.1, 158.7 (dd, *J* = 242, 2 Hz), 157.3, 156.8 (dd, *J* = 240, 2 Hz), 150.1, 148.4, 141.2, 139.1, 137.2, 137.1, 128.7, 127.9, 125.5, 125.4 (dd, *J* = 18, 8 Hz), 117.1 (dd, *J* = 24, 4 Hz), 116.2 (dd, *J* = 25, 9 Hz), 114.9 (dd, *J* = 24, 9 Hz), 108.4, 104.5, 61.3, 53.3, 32.4 (m), 30.6, 21.3, 14.1, 12.0. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈F₂N₃O₃: 492.2099; found, 492.2104.

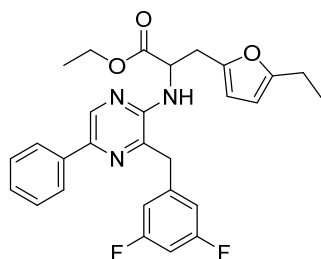
Ethyl 2-((3-(3,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-methylfuran-2-yl)propanoate (22ar)



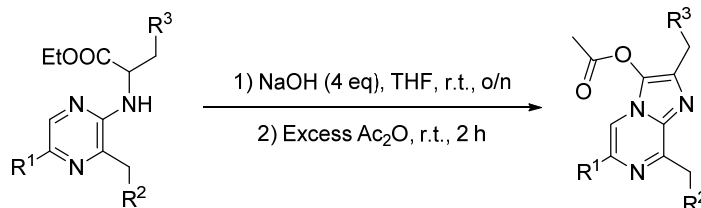
The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42h** and **77c** (hydrochloride salt) as an oil (0.31 g, 68%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 96:4). ¹H NMR (CDCl₃): 8.45 (s, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 6.79 (m, 2H), 6.70 (tt, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 5.83 (m, 1H), 5.81 (m, 1H), 5.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.93 (dt, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.19 (m, 2H), 2.22 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.0, 163.1 (dd, *J* = 249, 13 Hz), 151.7, 150.2, 148.3, 141.3, 140.6 (t, *J* = 9 Hz), 139.5, 137.3, 137.2, 128.8, 128.0, 125.6, 111.6 (m), 108.7, 106.2, 102.4 (t, *J* = 25 Hz), 61.4, 53.1, 40.1 (t, *J* = 2 Hz), 30.5, 14.1, 13.4. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₆F₂N₃O₃: 478.1942; found, 478.1945.

Ethyl 2-((3-(3,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoate (22as)

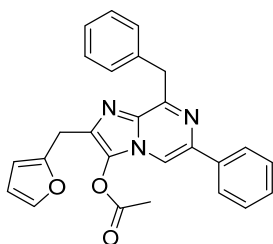
The general procedure above was used, but using 1:3 acetonitrile–toluene at 60 °C for 24 h. Obtained from **42h** and **77e** (hydrochloride salt) as an oil (0.24 g, 73%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 94:6). ¹H NMR (CDCl₃): 8.45 (s, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 6.80 (m, 2H), 6.70 (m, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.92 (dt, *J* = 7.5, 5.2 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.1, 163.1 (dd, *J* = 249, 13 Hz), 150.3, 147.1, 146.9, 141.4, 140.7 (t, *J* = 9 Hz), 139.5, 137.3, 137.2, 128.8, 127.9, 125.6, 114.5, 111.6 (m), 111.2, 102.3 (t, *J* = 25 Hz), 61.3, 53.2, 40.0 (m), 30.4, 14.1, 11.2, 9.7. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈F₂N₃O₃: 492.2099; found, 492.2087.

Ethyl 2-((3-(3,5-difluorobenzyl)-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoate (22at)

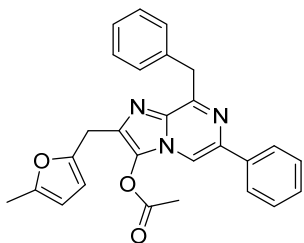
The general procedure above was used, but using toluene at 90 °C for 11 h. Obtained from **42h** and **77d** (hydrochloride salt) as an oil (0.31 g, 80%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3 to 96:4). ¹H NMR (CDCl₃): 8.45 (s, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 6.79 (m, 2H), 6.70 (m, 1H), 5.83 (m, 2H), 5.01 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.95 (dt, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.57 (qd, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 172.0, 163.1 (dd, *J* = 249, 13 Hz), 157.4, 150.2, 148.2, 141.4, 140.6 (t, *J* = 9 Hz), 139.5, 137.3, 137.2, 128.8, 127.9, 125.6, 111.6 (m), 108.5, 104.5, 102.4 (t, *J* = 25 Hz), 61.4, 53.1, 40.0 (t, *J* = 2 Hz), 30.5, 21.3, 14.1, 12.0. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₈F₂N₃O₃: 492.2099; found, 492.2103.

IV.L. Preparations of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetates (III.B.2.a)**General procedure for the synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetates (Z)**

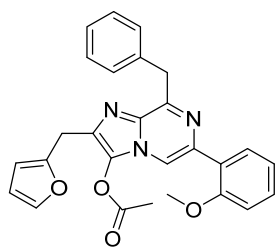
The considered *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters (**22**, 1 eq) and powdered sodium hydroxide (4 eq) were introduced in a flask that was then purged with a stream of argon. Anhydrous tetrahydrofuran was injected and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. An excess of acetic anhydride (15 eq) was injected, then the solution was stirred at room temperature for 2 h. This was diluted with water and extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was then diluted in cyclohexane and concentrated again to dryness to co-evaporate remaining acetic acid and acetic anhydride (this might be repeated if needed). The residue was then purified as indicated below.

8-Benzyl-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetate (Z1)

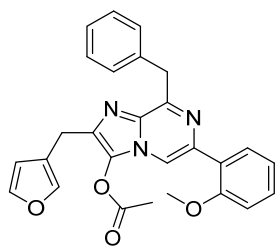
Obtained from **22b** as off-white crystals (4.55 g, 82%) after recrystallization from cyclohexane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.92 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.42-7.30 (m, 4H), 7.23 (m, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.16 (m, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.36 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.0, 153.0, 151.5, 141.5, 139.2, 137.8, 136.7, 133.5, 132.5, 129.7, 128.9, 128.8, 128.6, 128.3, 126.5, 126.4, 110.5, 108.9, 106.8, 39.3, 27.2, 20.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₂N₃O₃, 424.1661; found, 424.1607.

8-Benzyl-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetate (Z3)

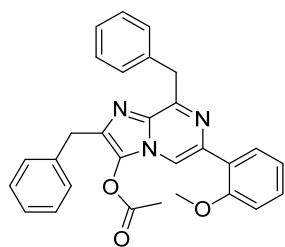
Obtained from **22c** as off-white crystals (4.80 g, 82%) after a recrystallization from cyclohexane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.93–7.86 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.64–7.57 (m, 2H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.41–7.35 (m, 1H), 7.35–7.27 (m, 2H), 7.25–7.16 (m, 1H), 6.03–5.97 (m, 1H), 5.93–5.86 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.26 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 153.1, 151.3, 149.7, 139.3, 138.0, 137.0, 133.7, 133.0, 129.9, 129.1, 128.9, 128.7, 128.4, 126.6 (two signals), 109.0, 107.6, 106.3, 39.5, 27.5, 20.2, 13.7. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₄N₃O₃, 438.1818; found, 438.1828.

8-Benzyl-2-(furan-2-ylmethyl)-6-(2-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z9)

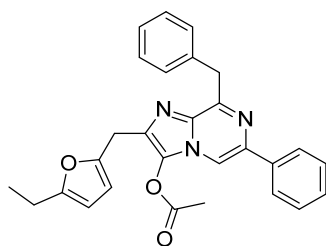
Obtained from **22v** as crystals (0.27 g, 68%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 8.21 (s, 1H), 8.05 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 2H), 7.39–7.27 (m, 4H), 7.23–7.18 (m, 1H), 7.09 (td, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 6.16–6.10 (m, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 156.9, 152.5, 151.9, 141.7, 138.1, 135.6, 133.5, 132.4, 131.1, 129.9, 129.7, 128.8, 128.4, 126.5, 125.7, 121.4, 113.5, 111.7, 110.6, 106.9, 55.9, 39.5, 27.4, 20.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₄N₃O₄: 454.1767. Found: 454.1785.

8-Benzyl-2-(furan-3-ylmethyl)-6-(2-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z10)

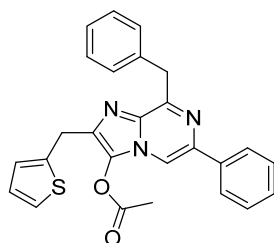
Obtained from **22w** as a beige solid (0.15 g, 29%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 8.21 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.41–7.27 (m, 5H), 7.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.15–7.06 (m, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.40–6.34 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.30 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 156.9, 152.4, 143.0, 140.1, 138.2, 135.6, 134.3, 133.5, 131.1, 129.8, 129.6, 128.5, 128.4, 126.5, 125.7, 121.5, 121.4, 113.4, 111.6 (two signals), 55.8, 39.6, 23.8, 20.0. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₄N₃O₄, 454.1767; found, 454.1786.

2,8-Dibenzyl-6-(2-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z11)

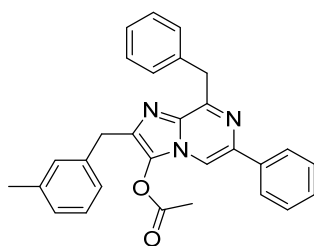
Obtained from **22u** as a beige solid (0.22 g, 53%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 8.17 (s, 1H), 8.05 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.65–7.58 (m, 2H), 7.38–7.27 (m, 7H), 7.26–7.16 (m, 2H), 7.09 (td, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.15 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 156.9, 152.4, 138.3, 138.2, 135.5, 135.1, 133.6, 131.1, 129.9, 129.6, 129.2, 128.8, 128.6, 128.4, 126.6, 126.5, 125.8, 121.4, 113.4, 111.7, 55.8, 39.5, 34.4, 19.9. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₉H₂₆N₃O₃, 464.1974; found, 464.1979.

8-Benzyl-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z12)

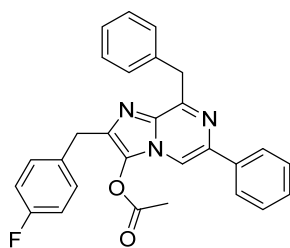
Obtained from **22d** as white solid (0.27 g, 57%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.93–7.86 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.64–7.57 (m, 2H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.41–7.35 (m, 1H), 7.33–7.27 (m, 2H), 7.24–7.18 (m, 1H), 6.01 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.93–5.87 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 2.61 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.2, 157.2, 153.1, 149.5, 139.3, 138.0, 137.0, 133.7, 133.1, 129.9, 129.1, 128.9, 128.7, 128.4, 126.6 (two signals), 109.0, 107.4, 104.7, 39.5, 27.5, 21.5, 20.2, 12.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3$, 452.1974; found, 452.2014.

8-Benzyl-6-phenyl-2-(thiophen-2-ylmethyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z13)

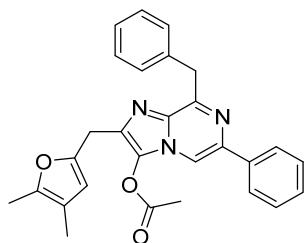
Obtained from **22h** as a white solid (0.37 g, 73%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.92–7.87 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.65–7.58 (m, 2H), 7.49–7.42 (m, 2H), 7.42–7.34 (m, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.25–7.20 (m, 1H), 7.19 (dd, $J = 5.1, 1.3$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 6.93–6.88 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.38 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H), 2.30 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 153.1, 140.3, 139.2, 137.8, 136.8, 134.4, 133.5, 129.8, 128.8, 128.6 (two signals), 128.3, 126.8, 126.5, 126.4, 125.9, 124.3, 108.9, 39.4, 28.5, 20.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, 440.1433; found, 440.1486.

8-Benzyl-2-(3-methylbenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z14)

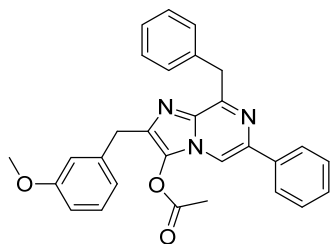
Obtained from **22q** as a beige solid (0.17 g, 61%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.92–7.85 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.66–7.58 (m, 2H), 7.49–7.35 (m, 3H), 7.35–7.27 (m, 2H), 7.24–7.16 (m, 2H), 7.15–7.01 (m, 3H), 4.62 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.2, 153.0, 139.2, 138.2, 138.1, 137.0, 135.5, 133.8, 130.0, 129.9, 129.0, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 127.3, 126.6 (two signals), 126.2, 109.0, 39.6, 34.3, 21.5, 20.0 (one signal missing). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$, 448.2025; found, 448.2053.

8-Benzyl-2-(4-fluorobenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z15)

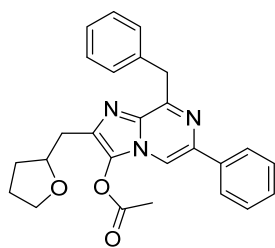
Obtained from **22o** as a beige solid (0.31 g, 70%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.94–7.86 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.65–7.58 (m, 2H), 7.50–7.36 (m, 3H), 7.35–7.17 (m, 5H), 7.00 (dd, *J* = 9.8, 7.7 Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.25 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 161.8 (d, *J* = 244.6 Hz), 153.1, 139.3, 138.0, 136.9, 135.1, 133.9 (d, *J* = 3.3 Hz), 133.8, 130.6 (d, *J* = 7.9 Hz), 129.9, 128.9, 128.7, 128.4, 126.6, 126.6, 115.3 (d, *J* = 21.3 Hz), 109.0, 39.6, 33.4, 20.1 (one signal missing). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₃FN₃O₂, 452.1774; found, 452.1776.

8-Benzyl-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z16)

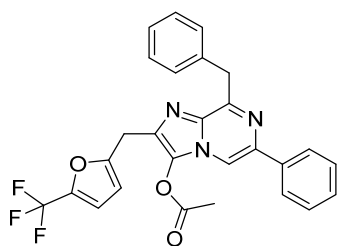
Obtained from **22e** as a beige solid (0.09 g, 45%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.94–7.86 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.65–7.58 (m, 2H), 7.50–7.41 (m, 2H), 7.41–7.35 (m, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.25–7.16 (m, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.91 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 153.1, 148.4, 146.4, 139.2, 138.0, 137.0, 133.7, 133.2, 129.9, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 126.6, 126.5, 114.7, 110.2, 109.0, 39.5, 27.4, 20.2, 11.4, 10.0. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₆N₃O₃, 452.1974; found, 452.1990.

8-Benzyl-2-(3-methoxybenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z18)

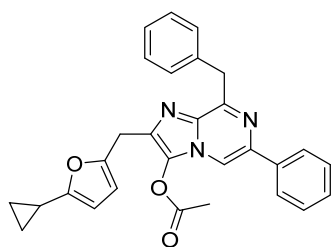
Obtained from ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(3-methoxyphenyl)propanoate as a white solid (0.20 g, 56%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.92–7.86 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.65–7.58 (m, 2H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.41–7.34 (m, 1H), 7.33–7.27 (m, 2H), 7.25–7.18 (m, 2H), 6.91–6.86 (m, 1H), 6.86–6.83 (m, 1H), 6.81–6.75 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.21 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 159.9, 153.1, 139.7, 139.2, 138.0, 137.0, 135.2, 133.8, 129.9, 129.6, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 126.6 (two signals), 121.6, 114.7, 112.3, 109.0, 55.3, 39.5, 34.4, 20.0. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₉H₂₆N₃O₃, 464.1974; found, 464.1982.

8-Benzyl-6-phenyl-2-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z19)

Obtained from ethyl 2-((3-benzyl-5-phenylpyrazin-2-yl)amino)-3-(tetrahydrofuran-2-yl)propanoate as an oil (0.36 g, 81%) which was evaluated without further purification. ^1H NMR (CDCl_3): 7.93–7.87 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.62–7.57 (m, 2H), 7.48–7.41 (m, 2H), 7.40–7.34 (m, 1H), 7.32–7.27 (m, 2H), 7.23–7.17 (m, 1H), 4.66–4.55 (m, 2H), 4.32–4.23 (m, 1H), 3.89–3.69 (m, 2H), 3.10–2.95 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.09–1.98 (m, 1H), 1.92–1.82 (m, 2H), 1.77–1.66 (m, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.5, 153.0, 139.1, 138.1, 137.1, 133.9, 133.8, 129.9, 129.7, 128.9, 128.6, 128.4, 126.6 (two signals), 109.2, 78.3, 68.2, 39.5, 33.5, 31.0, 25.8, 20.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3$, 428.1974; found, 428.1956.

8-Benzyl-6-phenyl-2-((5-trifluoromethylfuran-2-yl)methyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z28)

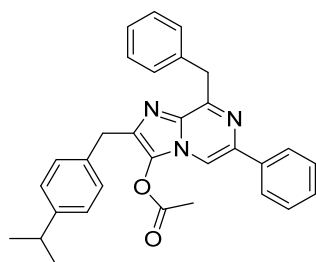
Obtained from **22g** as a white solid (0.07 g, 43%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.94–7.87 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.63–7.57 (m, 2H), 7.49–7.42 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 1H), 7.33–7.27 (m, 2H), 7.24–7.17 (m, 1H), 6.73 (dd, 1H, $J = 3.3, 1.2$ Hz), 6.21 (dd, 1H, $J = 3.4, 0.7$ Hz), 4.61 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.40 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 166.9, 154.9, 153.2, 140.9 (43 Hz), 139.4, 137.7, 136.7, 133.7, 131.2, 129.7, 129.0, 128.8, 128.7, 128.3, 126.5, 126.4, 119.2 (267 Hz), 112.6 (3 Hz), 109.0, 107.9, 39.5, 27.0, 20.0. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 492.1535; found, 492.1566.

8-Benzyl-2-((5-cyclopropylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z36)

Obtained from **22f** as a white solid (0.13 g, 42%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.93–7.86 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.64–7.57 (m, 2H), 7.48–7.41 (m, 2H), 7.41–7.35 (m, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.24–7.17 (m, 1H), 5.98 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 5.86 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 4.61 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.84 (tt, 1H, $J = 8.4, 5.1$ Hz), 0.89–0.80 (m, 2H), 0.76–0.69 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.2, 156.8, 153.1, 149.3, 139.3, 138.0, 137.0, 133.7, 133.0, 129.9, 129.1,

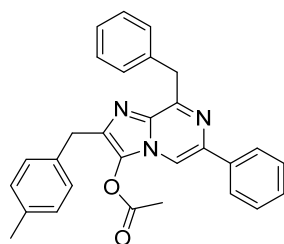
128.9, 128.7, 128.4, 126.6, 126.6, 109.0, 107.6, 104.3, 39.5, 27.6, 20.2, 8.9, 6.6. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{26}N_3O_3$, 464.1974; found, 464.1990.

8-Benzyl-2-(4-isopropylbenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z38)



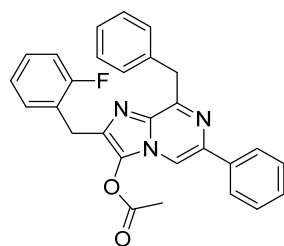
Obtained from **22j** as a white solid (0.16 g, 70%) after a recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.93–7.84 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.65–7.59 (m, 2H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.41–7.33 (m, 1H), 7.33–7.28 (m, 2H), 7.24–7.14 (m, 5H), 4.62 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 2.90 (hept, 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.13 (s, 3H), 1.25 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.2, 153.0, 147.2, 139.2, 138.0, 137.0, 135.6, 135.4, 133.8, 129.9, 129.2, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 126.7, 126.6, 126.6, 109.0, 39.5, 34.1, 33.9, 24.2, 20.0. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{31}H_{30}N_3O_2$, 476.2338; found, 476.2337.

8-Benzyl-2-(4-methylbenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z55)

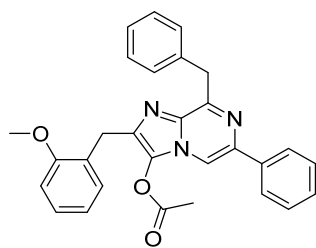


Obtained from **22m** as a white solid (0.21 g, 60%) after a recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.91 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.49–7.13 (m, 10H), 4.65 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.20 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.1, 152.9, 139.0, 137.9, 136.9, 135.9, 135.5, 134.9, 133.6, 129.8, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.3, 126.5, 126.4, 108.8, 39.4, 33.8, 21.0, 19.9. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{26}N_3O_2$, 448.2025; found, 448.2034.

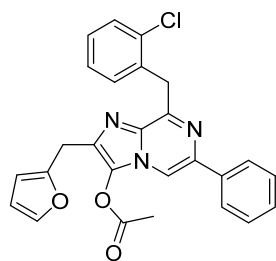
8-Benzyl-2-(2-fluorobenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z56)



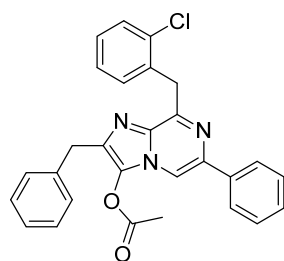
Obtained from **22n** as a white solid (0.22 g, 71%) after a recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.90 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.48–7.21 (m, 8H), 7.10 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.1, 160.9 (244 Hz), 153.0, 139.1, 137.9, 136.8, 133.9 (32 Hz), 131.3 (4 Hz), 129.7 (two signals), 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 126.5, 126.4, 125.1 (16 Hz), 124.1 (4 Hz), 115.1 (21 Hz), 108.9, 39.5, 26.8 (4 Hz), 19.9. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{23}FN_3O_2$, 452.1774; found, 452.1769.

8-Benzyl-2-(2-methoxybenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z57)

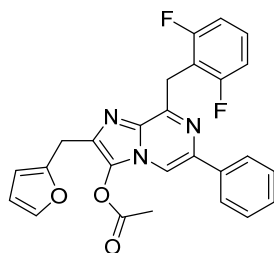
Obtained from **22p** as a white solid (0.23 g, 72%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.90 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.24 (m, 3H), 6.92 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.16 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.2, 157.6, 152.8, 138.9, 138.0, 137.0, 135.1, 133.6, 130.6, 129.8, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 127.9, 126.4 (two signals), 126.3, 120.5, 110.4, 108.9, 55.4, 39.4, 28.5, 19.8. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₉H₂₆N₃O₃, 464.1974; found, 464.1978.

8-(2-Chlorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z87)

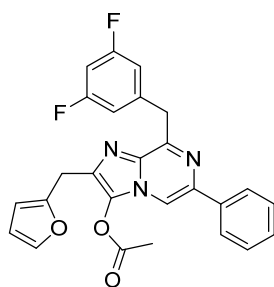
Obtained from **22y** as a white solid (0.27 g, 70%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.88 (s, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.46-7.34 (m, 6H), 7.23 (m, 2H), 6.36 (m, 1H), 6.18 (m, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.1, 151.7, 151.5, 141.7, 138.9, 136.6, 135.6, 134.9, 133.7, 132.4, 131.8, 129.3, 128.9, 128.7, 128.6, 127.9, 126.5, 126.2, 110.5, 108.8, 106.9, 36.6, 27.3, 20.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₀ClN₃O₃, 458.1271; found, 458.1266.

2-Benzyl-8-(2-chlorobenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z88)

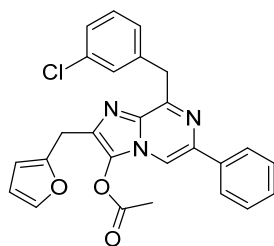
Obtained from **22x** as a white solid (0.12 g, 67%) after a recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.84 (s, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.50-7.20 (m, 12H), 4.82 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.20 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.1, 151.5, 138.8, 138.0, 136.6, 135.7, 135.1, 134.9, 133.7, 131.8, 129.3, 129.1, 128.8, 128.7, 128.5 (two signals), 127.9, 126.5 (two signals), 126.2, 108.8, 36.6, 34.3, 19.9. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₃ClN₃O₂, 468.1479; found, 468.1489.

8-(2,6-Difluorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z102)

Obtained from **22ab** as a white solid (0.26 g, 69%) after a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.35 (m, 5H), 6.96 (m, 2H), 6.36 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.19 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.2, 162.1 (dd, $J = 248, 8$ Hz), 151.4, 150.3, 141.7, 138.6, 136.4, 133.4, 132.3, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3 (t, $J = 10$ Hz), 126.1, 113.1 (t, $J = 20$ Hz), 110.9, 110.5, 108.8, 106.9, 27.3, 26.1, 20.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 460.1473; found, 460.1469.

8-(3,5-Difluorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z103)

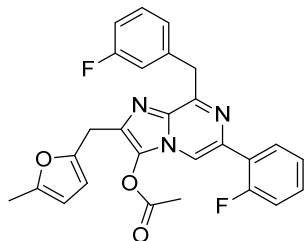
Obtained from **22ag** as an off-white solid (0.29 g, 61%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.90 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.38 (dd, $J = 1.9, 0.9$ Hz, 1H), 7.14 (m, 2H), 6.68 (tt, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 6.36 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.17 (m, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.1, 162.8 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 151.6, 151.3, 141.7, 141.4 (t, $J = 9$ Hz), 139.2, 136.5, 133.4, 132.9, 129.0, 128.9, 128.8, 126.4, 112.5 (m), 110.5, 109.2, 106.9, 102.0 (t, $J = 25$ Hz), 38.9 (t, $J = 2$ Hz), 27.2, 20.1. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 460.1473; found, 460.1473.

8-(3-Chlorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z104)

Obtained from **22z** as a white solid (0.05 g, 32%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 6:1) followed by a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.91 (m, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.48 (m, 3H), 7.40 (m, 2H), 7.24 (m, 2H), 6.36 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.17 (m, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 152.2, 151.4, 141.7, 139.7, 139.2, 136.6, 134.0, 133.5, 132.7, 129.8, 129.5, 129.0, 128.8, 128.7, 127.9, 126.7, 126.4,

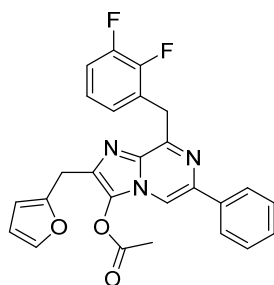
110.5, 109.1, 106.9, 38.9, 27.2, 20.1. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{21}ClN_3O_3$: 458.1271; found, 458.1270.

8-(3-Fluorobenzyl)-6-(2-fluorophenyl)-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z105)

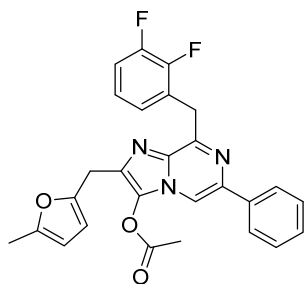


Obtained from **22aa** as a red solid (0.35 g, 70%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 97:3). 1H NMR ($CDCl_3$): 8.17 (m, 2H), 7.32 (m, 5H), 7.16 (ddd, $J = 11.9, 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 6.94 (m, 1H), 6.03 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.0, 162.8 (d, $J = 245$ Hz), 160.1 (d, $J = 248$ Hz), 152.3, 151.2, 149.4, 140.1 (d, $J = 8$ Hz), 133.4 (d, $J = 3$ Hz), 133.3 (d, $J = 3$ Hz), 130.7 (d, $J = 3$ Hz), 129.9 (d, $J = 9$ Hz), 129.6 (d, $J = 8$ Hz), 129.0, 125.4 (d, $J = 3$ Hz), 124.7 (d, $J = 3$ Hz), 124.2 (d, $J = 11$ Hz), 116.6 (d, $J = 22$ Hz), 116.0 (d, $J = 23$ Hz), 113.4 (d, $J = 21$ Hz), 113.2, 113.0, 107.5, 106.2, 38.9 (d, $J = 2$ Hz), 27.3, 20.0, 13.5. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{22}F_2N_3O_3$: 474.1629; found, 474.1620.

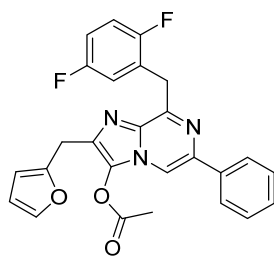
8-(2,3-Difluorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z107)



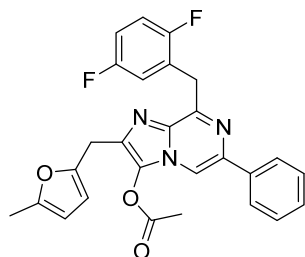
Obtained from **22ac** as an off-white solid (0.24 g, 63%) after recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.88 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.41 (m, 4H), 7.22 (tt, $J = 6.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 6.36 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.18 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.1, 151.4, 151.1, 150.7 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 149.4 (dd, $J = 248, 12$ Hz), 141.7, 139.0, 136.4, 133.5, 132.6, 129.0, 128.8, 128.7, 127.1 (d, $J = 13$ Hz), 126.5 (t, $J = 3$ Hz), 126.2, 123.5 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.5 (d, $J = 17$ Hz), 110.5, 109.0, 106.9, 32.0 (t, $J = 2$ Hz), 27.2, 20.1. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{20}F_2N_3O_3$: 460.1473; found, 460.1473.

8-(2,3-Difluorobenzyl)-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z108)

Obtained from **22ad** as an off-white solid (0.22 g, 73%) after recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.88 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 7.23 (tt, *J* = 6.1, 1.7 Hz, 1H), 7.05 (m, 2H), 6.04 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.0, 151.2, 151.1 (dd, *J* = 247, 13 Hz), 151.0, 149.4 (dd, *J* = 248, 13 Hz), 149.4, 138.9, 136.5, 133.4, 133.0, 129.0, 128.8, 128.6, 127.1 (d, *J* = 13 Hz), 126.5 (t, *J* = 3 Hz), 126.2, 123.5 (dd, *J* = 7, 5 Hz), 115.5 (d, *J* = 17 Hz), 109.0, 107.5, 106.2, 32.0 (t, *J* = 2 Hz), 27.3, 20.1, 13.5. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₂₂F₂N₃O₃: 474.1629; found, 474.1629.

8-(2,5-Difluorobenzyl)-2-(furan-2-ylmethyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z109)

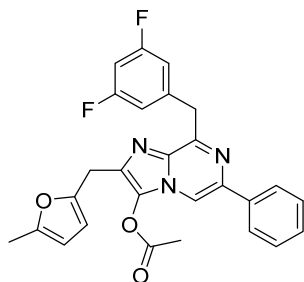
Obtained from **22ae** as a pinkish solid (0.15 g, 54%) after recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.89 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.41 (m, 4H), 7.21 (ddd, *J* = 8.9, 5.7, 3.2 Hz, 1H), 7.05 (td, *J* = 8.9, 4.5 Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.36 (dd, *J* = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 6.18 (dd, *J* = 3.2, 1.0 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.1, 158.4 (dd, *J* = 241, 2 Hz), 157.3 (dd, *J* = 242, 2 Hz), 151.4, 151.0, 141.7, 139.0, 136.4, 133.5, 132.7, 129.0, 128.8, 128.7, 126.3 (dd, *J* = 19, 8 Hz), 126.3, 118.2 (dd, *J* = 24, 5 Hz), 116.0 (dd, *J* = 25, 9 Hz), 114.5 (dd, *J* = 24, 8 Hz), 110.5, 109.0, 106.9, 32.1, 27.2, 20.1. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₀F₂N₃O₃: 460.1473; found, 460.1473.

8-(2,5-Difluorobenzyl)-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z110)

Obtained from **22af** as an off-white solid (0.13 g, 77%) after recrystallization from *n*-heptane. ¹H NMR (CDCl₃): 7.89 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.21 (ddd, *J* = 8.9, 5.7, 3.2 Hz, 1H), 7.05 (td, *J* = 8.9, 4.6 Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.04 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.19 (s, 2H),

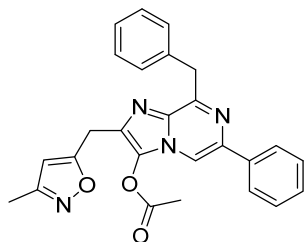
2.38 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 158.4 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 157.3 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 151.2, 151.0, 149.4, 139.0, 136.5, 133.4, 133.0, 129.0, 128.8, 128.6, 126.3 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 126.2, 118.2 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.0 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.5 (dd, $J = 24, 8$ Hz), 109.0, 107.5, 106.2, 32.1 (m), 27.3, 20.1, 13.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 474.1629; found, 474.1630.

8-(3,5-Difluorobenzyl)-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z113)



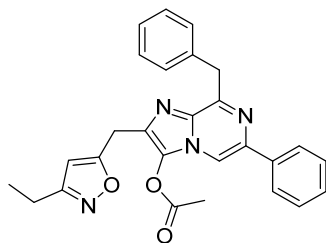
Obtained from **22ar** as an off-white solid (0.24 g, 81%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.90 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 6.68 (tt, $J = 9.1, 2.3$ Hz, 1H), 6.03 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.8 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 151.5, 151.3, 149.3, 141.4 (t, $J = 9$ Hz), 139.2, 136.5, 133.3, 133.2, 129.0, 128.9, 128.7, 126.4, 112.6 (m), 109.2, 107.5, 106.2, 102.0 (t, $J = 25$ Hz), 38.9, 27.3, 20.1, 13.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 474.1629; found, 474.1631.

8-Benzyl-2-((3-methylisoxazol-5-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z114)



Obtained from **22q** as a white solid (0.10 g, 59%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.93 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.27 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 168.9, 167.0, 160.0, 153.2, 139.4, 137.7, 136.6, 133.7, 130.6, 129.7, 129.0, 128.8, 128.7, 128.3, 126.5, 126.4, 109.0, 103.1, 39.5, 25.7, 20.1, 11.4. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$: 439.1770; found, 439.1778.

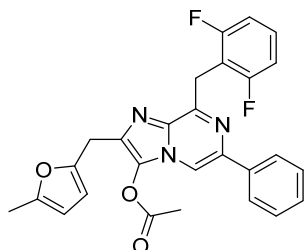
8-Benzyl-2-((3-ethylisoxazol-5-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z115)



Obtained from **22r** as a white solid (0.21 g, 73%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.93 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.32

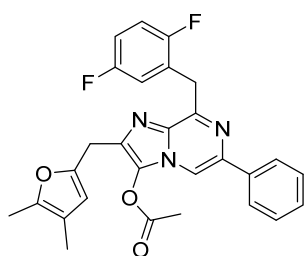
(m, 2H), 7.25 (m, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.28 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H), 2.68 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 168.8, 167.0, 165.4, 153.2, 139.4, 137.7, 136.6, 133.7, 130.6, 129.7, 129.0, 128.8, 128.7, 128.3, 126.5, 126.4, 109.0, 101.8, 39.5, 25.7, 20.1, 19.6, 12.6. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$: 453.1927; found, 453.1938.

8-(2,6-Difluorobenzyl)-2-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z121)

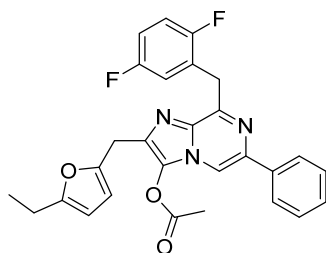


Obtained from **22ak** as an off-white solid (0.29 g, 83%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 6.96 (m, 2H), 6.05 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.92 (dd, $J = 3.0, 1.1$ Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.1 (dd, $J = 248, 8$ Hz), 151.2, 150.2, 149.3, 138.7, 136.4, 133.1, 132.5, 128.9, 128.6, 128.5, 128.3 (t, $J = 10$ Hz), 126.1, 113.1 (t, $J = 20$ Hz), 110.8 (m), 108.8, 107.5, 106.2, 27.3, 26.2 (t, $J = 2$ Hz), 20.1, 13.5. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 474.1629; found, 474.1620.

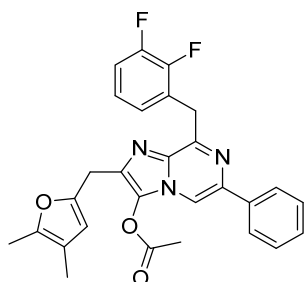
8-(2,5-Difluorobenzyl)-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z122)



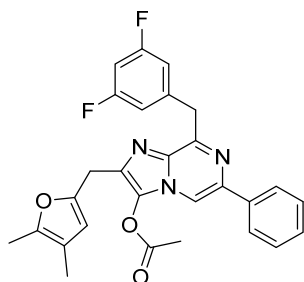
Obtained from **22ap** as a solid (0.17 g, 71%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane-ethyl acetate 5:1) and a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.89 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.21 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 5.94 (s, 1H), 4.67 (s, 3H), 4.14 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.92 (s, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 158.4 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 157.3 (dd, $J = 242, 2$ Hz), 150.9, 148.0, 146.3, 139.0, 136.4, 133.3, 133.0, 129.0, 128.8, 128.7, 126.3 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 126.3, 118.2 (dd, $J = 24, 5$ Hz), 116.0 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.6, 114.5 (dd, $J = 24, 8$ Hz), 110.1, 109.0, 32.2, 27.1, 20.0, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1785.

8-(2,5-Difluorobenzyl)-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z123)

Obtained from **22aq** as a solid (0.08 g, 58%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1) and a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.89 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 7.21 (ddd, $J = 8.9, 5.7, 3.2$ Hz, 1H), 7.05 (td, $J = 8.9, 4.5$ Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.05 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.63 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 158.4 (dd, $J = 241, 2$ Hz), 157.3 (dd, $J = 243, 3$ Hz), 157.1, 150.9, 149.1, 139.1, 136.4, 133.3, 132.9, 129.0, 128.8, 128.7, 126.3, 126.2 (dd, $J = 19, 8$ Hz), 118.2 (dd, $J = 24, 4$ Hz), 116.0 (dd, $J = 25, 9$ Hz), 114.5 (dd, $J = 24, 8$ Hz), 109.0, 107.4, 104.6, 32.2, 27.3, 21.3, 20.1, 12.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1786.

8-(2,3-Difluorobenzyl)-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z124)

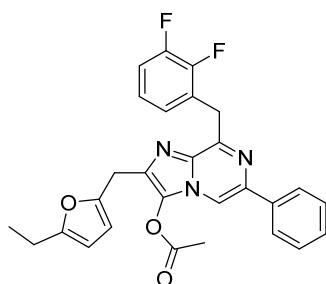
Obtained from **22an** as a solid (0.14 g, 74%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1) and a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.22 (m, 1H), 7.05 (m, 2H), 5.94 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 150.9, 150.7 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 149.4 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 148.0, 146.3, 139.0, 136.4, 133.3, 133.0, 128.9, 128.8, 128.7, 127.1 (d, $J = 13$ Hz), 126.5 (t, $J = 3$ Hz), 126.2, 123.5 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.5 (d, $J = 17$ Hz), 114.6, 110.1, 109.0, 32.1 (t, $J = 2$ Hz), 27.1, 20.0, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1784.

8-(3,5-Difluorobenzyl)-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z125)

Obtained from **22as** as a solid (0.15 g, 72%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 5:1) and a recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.91 (m,

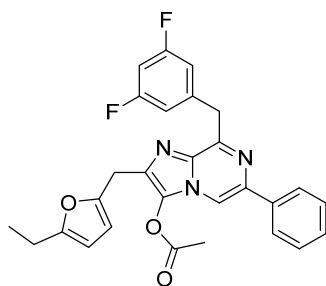
2H), 7.87 (s, 1H), 7.46 (m, 3H), 7.15 (m, 2H), 6.68 (tt, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.8 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 151.4, 148.0, 146.4, 141.4 (t, $J = 9$ Hz), 139.3, 136.5, 133.3, 129.0, 128.8, 128.7, 126.4, 114.6, 112.5 (m), 110.1, 109.2, 102.0 (t, $J = 25$ Hz), 38.9, 27.1, 20.0, 11.2, 9.8. (One signal missing) HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1781.

8-(2,3-Difluorobenzyl)-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z127)



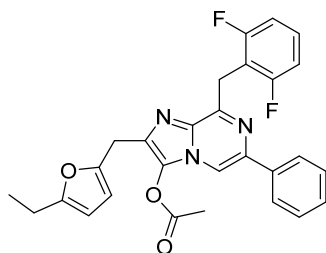
Obtained from **22ao** as an off-white solid (0.32 g, 75%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.05 (m, 2H), 6.05 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.63 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 157.1, 151.0, 150.7 (dd, $J = 247, 13$ Hz), 149.4 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 149.2, 138.9, 136.5, 133.4, 133.0, 129.0, 128.8, 128.6, 127.1 (d, $J = 13$ Hz), 126.5 (t, $J = 3$ Hz), 126.2, 123.5 (dd, $J = 7, 5$ Hz), 115.5 (d, $J = 17$ Hz), 109.0, 107.3, 104.6, 32.0 (m), 27.4, 21.4, 20.1, 12.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1783.

8-(3,5-Difluorobenzyl)-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z128)



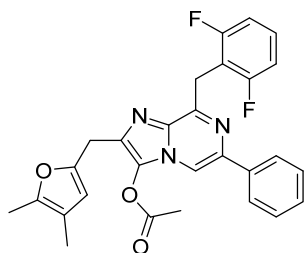
Obtained from **22at** as an off-white solid (0.13 g, 45%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.91 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 6.68 (tt, $J = 9.1, 2.4$ Hz, 1H), 6.04 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.93 (dt, $J = 3.2, 1.0$ Hz, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.63 (qd, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.8 (dd, $J = 248, 13$ Hz), 157.1, 151.5, 149.2, 141.4 (t, $J = 10$ Hz), 139.2, 136.5, 133.4, 133.3, 129.0, 128.8, 128.7, 126.4, 112.6 (m), 109.2, 107.3, 104.6, 102.0 (t, $J = 25$ Hz), 38.9 (t, $J = 2$ Hz), 27.3, 21.3, 20.1, 12.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1776.

8-(2,6-Difluorobenzyl)-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z129)



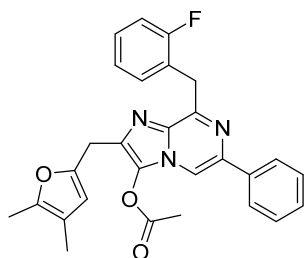
Obtained from **22am** as an off-white solid (0.18 g, 70%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.33 (m, 4H), 6.97 (m, 2H), 6.06 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 2.64 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.1 (dd, $J = 248$, 9 Hz), 157.0, 150.3, 149.3, 138.5, 136.5, 133.3, 132.6, 128.9, 128.6, 128.5, 128.3 (t, $J = 10$ Hz), 126.1, 113.2 (t, $J = 20$ Hz), 110.8 (m), 108.8, 107.3, 104.6, 27.4, 26.1 (m), 21.4, 20.1, 12.2. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1785.

8-(2,6-Difluorobenzyl)-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z130)



Obtained from **22al** as an off-white solid (0.23 g, 75%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.88 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 6.96 (m, 2H), 5.95 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 162.1 (dd, $J = 248$, 9 Hz), 150.3, 148.2, 146.3, 138.5, 136.5, 133.3, 132.7, 128.9, 128.6, 128.5, 128.2 (t, $J = 10$ Hz), 126.1, 114.6, 113.2 (t, $J = 20$ Hz), 110.8 (m), 110.1, 108.8, 27.2, 26.1 (t, $J = 2$ Hz), 20.0, 11.3, 9.8. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$: 488.1786; found, 488.1787.

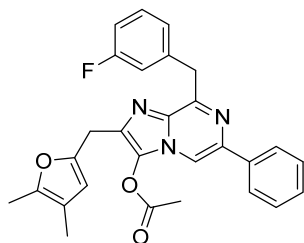
2-((4,5-Dimethylfuran-2-yl)methyl)-8-(2-fluorobenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z131)



Obtained from **22ah** as an off-white solid (0.19 g, 64%) after recrystallization from *n*-heptane. ^1H NMR (CDCl_3): 7.87 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.43 (m, 4H), 7.25 (m, 1H), 7.10 (m, 2H), 5.93 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.0, 161.4 (d, $J = 246$ Hz), 151.7, 148.2, 146.3, 138.9, 136.6, 133.5, 132.9, 131.9 (d, $J = 4$ Hz), 128.9, 128.7, 128.5, 128.2 (d, $J = 8$ Hz), 126.2, 124.7 (d, $J = 16$ Hz), 123.7 (d, $J = 4$ Hz), 115.2 (d, $J = 22$ Hz), 114.6,

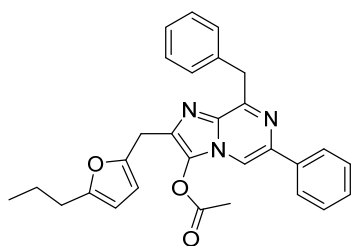
110.1, 108.8, 32.2 (d, $J = 3$ Hz), 27.2, 20.0, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{25}FN_3O_3$: 470.1880; found, 470.1870.

2-((4,5-Dimethylfuran-2-yl)methyl)-8-(3-fluorobenzyl)-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z132)



Obtained from **22aj** as an off-white solid (0.18 g, 55%) after recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.91 (m, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.38 (m, 3H), 7.27 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.0, 162.7 (d, $J = 245$ Hz), 152.2, 148.2, 146.3, 140.2 (d, $J = 8$ Hz), 139.1, 136.7, 133.4, 133.2, 129.6 (d, $J = 8$ Hz), 128.9, 128.8, 128.6, 126.4, 125.4 (d, $J = 3$ Hz), 116.6 (d, $J = 22$ Hz), 114.6, 113.4 (d, $J = 21$ Hz), 110.1, 109.0, 39.0 (d, $J = 2$ Hz), 27.2, 20.0, 11.2, 9.8. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{28}H_{25}FN_3O_3$: 470.1880; found, 470.1880.

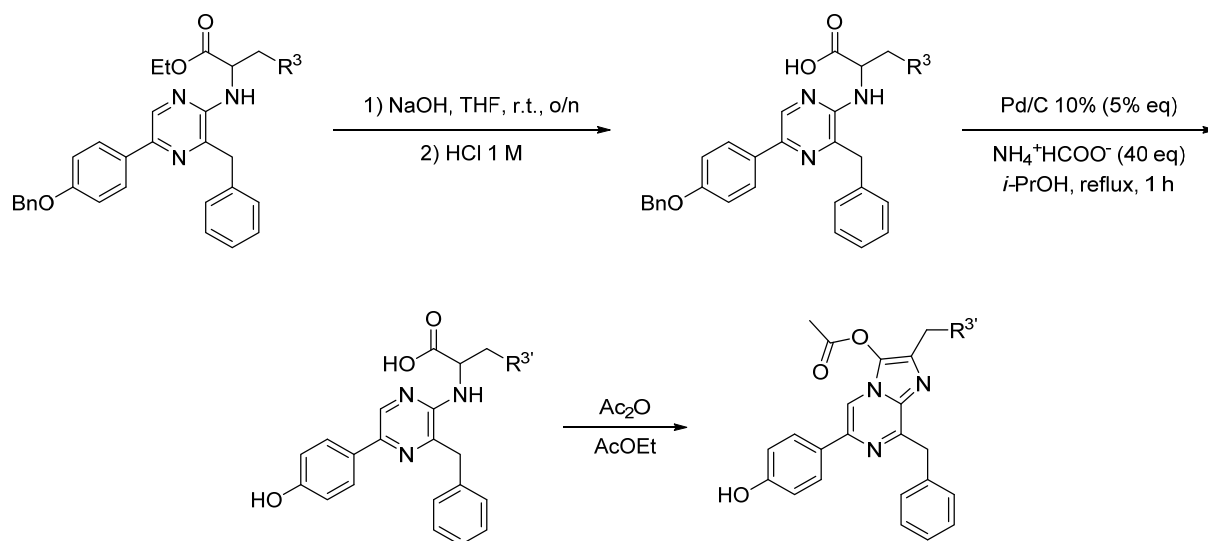
8-Benzyl-6-phenyl-2-((5-propylfuran-2-yl)methyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z133)



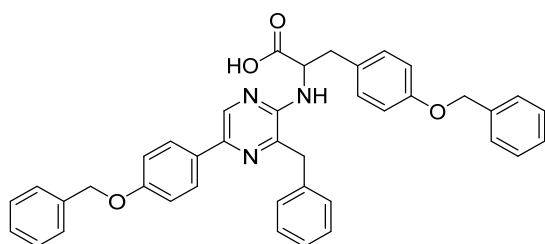
Obtained from **22ah** as an off-white solid (0.15 g, 54%) after recrystallization from *n*-heptane. 1H NMR ($CDCl_3$): 7.92 (m, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.29 (m, 3H), 6.03 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 2.58 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.67 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 167.0, 155.6, 153.0, 149.3, 139.1, 137.8, 136.8, 133.5, 132.9, 129.7, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3, 126.4, 126.4, 108.8, 107.2, 105.4, 39.3, 30.1, 27.4, 21.4, 20.1, 13.7. HRMS (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{28}N_3O_3$: 466.2131; found, 466.2141.

IV.M. Preparations of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetates bearing free hydroxyls (III.B.2.b)

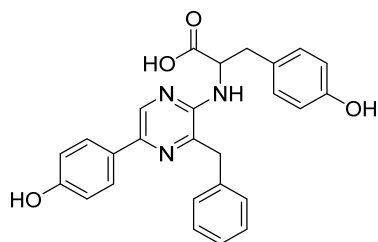
Representative synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yle acetates bearing a free hydroxyl



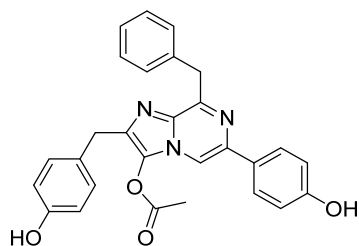
Step 1–Saponification of ethyl ester: 2-((3-Benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(4-benzyloxyphenyl)propanoic acid (108a)



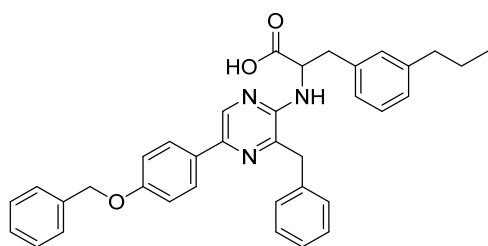
Under an argon atmosphere, **22s** (1.48 g, 1 eq) and powdered sodium hydroxide (0.27 g, 3 eq) were dissolved in dry tetrahydrofuran (20 mL) and stirred overnight at room temperature. This was diluted in ethyl acetate and made acidic with 1 N hydrochloric acid. The organic phase was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness to yield the desired product as a solid (0.97 g, 68%). ^1H NMR (CDCl_3): 8.31 (s, 1H), 7.88–7.81 (m, 2H), 7.49–7.29 (m, 11H), 7.24–7.16 (m, 3H), 7.13–7.08 (m, 2H), 7.08–7.01 (m, 2H), 6.95–6.87 (m, 2H), 6.86–6.79 (m, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.86–4.76 (m, 1H), 4.71 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 14.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 14.2, 6.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.9, 159.1, 158.0, 150.0, 141.7 (2 signals), 137.1 (2 signals), 136.4, 135.5, 130.4, 130.2, 129.0, 128.7 (3 signals), 128.4, 128.1 (2 signals), 127.6, 127.2, 127.1, 115.4, 115.2, 70.2, 60.6, 55.5, 40.8, 36.5, 14.3. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$, 622.2706; found, 622.2753.

Step 2–Deprotection of hydroxyl moiety:**(3-Benzyl-5-(4-hydroxyphenyl)pyrazin-2-yl)tyrosine (109a)**

108a (0.97 g, 1 eq) and ammonium formate (1.97 g, 20 eq) were dissolved in propan-2-ol (40 mL) in a stainless steel reactor. Palladium adsorbed over carbon (10%, 0.16 g, 10% eq) was added, the reactor was sealed and heated 1 h at 100 °C. The palladium over carbon was filtered out, then the filtrate was dispersed in water. The consequent precipitate was filtered, washed with water, and dried under vacuum to yield the desired product as a yellow solid (0.37 g, 54%). ¹H NMR (DMSO): 8.31 (s, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.22 (m, 5H), 7.02 (m, 2H), 6.82 (m, 2H), 6.61 (m, 2H), 6.54 (bs, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.28 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 4.02 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 3.06 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO): 174.6, 157.8, 156.3, 150.7, 141.6, 140.0, 138.5, 135.4, 130.5, 129.3, 128.7, 128.7, 128.4, 126.8, 126.6, 116.0, 115.4, 56.6, 38.8, 36.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₄N₃O₄: 442.1767; found, 442.1773.

Step 3–Cyclization and O-acetylation:**8-Benzyl-2-(4-hydroxybenzyl)-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z86)**

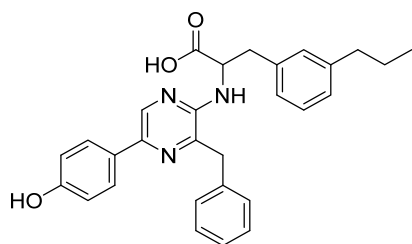
109a (0.13 g, 1 eq) was dissolved in ethyl acetate (15 mL) and heated at reflux. The evolution of the reaction after successive additions of 1 equivalent of acetic anhydride (28 μL) and 30 min heating periods was monitored by ¹H NMR, and eventually led to a satisfying conversion after 7 eq of acetic anhydride and 3.5 h. The desired product was obtained as a solid (0.10 g, purity 93%, 68%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 2:1). ¹H NMR (DMSO): 9.65 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.24 (m, 3H), 7.07 (m, 2H), 6.87 (m, 2H), 6.69 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.96 (s, 2H), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO): 168.5, 158.4, 156.2, 151.8, 138.5, 138.2, 136.0, 133.2, 130.2, 129.7, 129.1, 128.9, 128.7, 127.9, 127.6, 126.8, 115.9, 115.5, 109.3, 39.2, 32.3, 20.7. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₄N₃O₄: 466.1767; found, 466.1758.

2-((3-Benzyl-5-(4-(benzyloxy)phenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(3-propylphenyl)propanoic acid (108b)

Prepared as described above (step 1). Obtained as a yellow solid (0.76 g, 82%). ¹H NMR (CDCl₃): 8.33 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.34 (m, 11H), 7.09 (m, 5H), 6.96 (s,

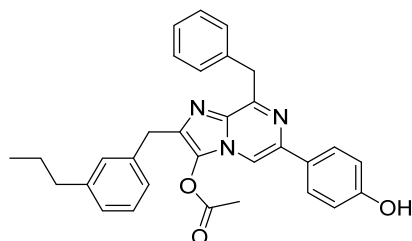
1H), 6.87 (m, 1H), 4.81 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.07 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 3.93 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 14.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 14.2, 7.6$ Hz, 1H), 2.56 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 175.2, 159.1, 149.8, 143.2, 141.8 (two signals), 136.9, 136.1, 135.9, 135.0, 130.0, 129.4, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.0, 127.5, 127.3, 127.0, 126.5, 115.3, 70.1, 55.6, 40.6, 37.9, 37.2, 24.5, 13.8. (One signal missing). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3$: 558.2757; found, 558.2746.

2-((3-Benzyl-5-(4-hydroxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(3-propylphenyl)propanoic acid (109b)†

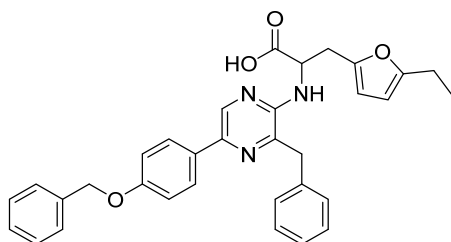


Prepared as described above (step 2). Obtained as a glass (0.50 g, 71%) still containing a small amount of ethyl acetate. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 9.56 (s(br), 1H), 8.38 (s, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.20 (m, 6H), 7.04 (m, 5H), 6.80 (m, 2H), 6.52 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.20 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz), 3.98 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz), 3.14 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 0.83 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 174.9, 157.7, 150.8, 142.1, 141.4, 139.7, 138.9, 138.4, 135.5, 129.6, 129.3, 128.6, 128.5, 128.3, 127.0, 126.7, 126.5, 115.9, 56.5, 38.9, 37.7, 37.2, 24.4, 14.1 (one signal missing). HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$: 468.2287; found, 468.2286.

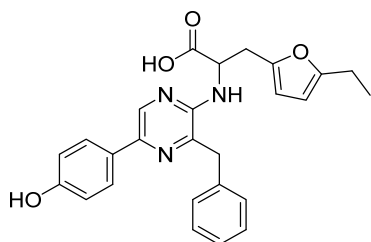
8-Benzyl-6-(4-hydroxyphenyl)-2-(3-propylbenzyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z76)



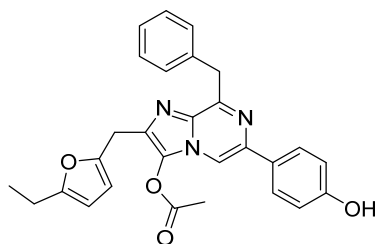
109b (0.20 g) was dissolved in neat acetic anhydride (5 mL) and stirred at room temperature for 30 min. The desired product was obtained as a solid (0.02 g, purity 90%, 8%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 4:1), along with di-acetylated compound (0.13 g, 57%). ^1H NMR (CDCl_3): 7.76 (m, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 7.07 (m, 3H), 6.90 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.56 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.65 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3): 167.1, 156.7, 152.6, 143.0, 139.2, 137.8, 137.6, 135.1, 133.3, 129.7, 129.3, 129.1, 128., 128.3, 128.3, 127.9, 126.6, 126.5, 126.4, 115.8, 107.8, 39.3, 38.0, 34.1, 24.5, 19.8, 13.9. HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3$: 492.2287; found, 492.2260.

2-((3-Benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoic acid (108c)[†]

Prepared as described above (step 1). Obtained as a yellow solid (0.59 g, 98%). ¹H NMR (CDCl₃): 9.16 (s(br), 1H), 8.32 (s, 1H), 7.87 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.37–7.22 (m, 9H), 7.08 (m, 2H), 5.89 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.96 (d(br), 1H, *J* = 6.4 Hz), 4.80 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.23 (dd, 1H, *J* = 4.9, 15.2 Hz), 3.14 (dd, 1H, *J* = 7.1, 15.2 Hz), 2.57 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 1.19 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 175.2, 159.0, 157.4, 149.9, 148.2, 141.7, 136.9, 136.3, 135.2, 130.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.0, 127.4, 127.0, 126.9, 115.2, 108.7, 104.7, 70.1, 53.9, 40.5, 30.1, 21.0, 12.0 (one signal missing). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₃₃H₃₂N₃O₄, 534.2393; found, 534.2405.

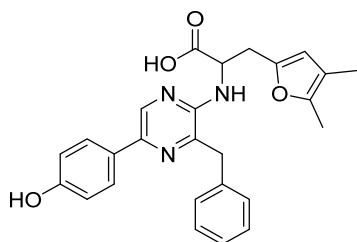
2-((3-Benzyl-5-(4-hydroxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(5-ethylfuran-2-yl)propanoic acid (109c)[†]

Prepared as described above (step 2). Obtained as a yellow solid (0.11 g, 22%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 9.54 (s(br), 1H), 8.29 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.41–7.16 (m, 6H), 6.80 (m, 2H), 5.79 (s(br), 2H), 4.37 (m, 1H), 4.08 (d, 1H, *J* = 14.5 Hz), 3.98 (d, 1H, *J* = 14.5 Hz), 3.24 (dd, 1H, *J* = 4.6, 15.2 Hz), 3.07 (dd, 1H, *J* = 6.6, 15.2 Hz), 2.45 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 1.06 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₆N₃O₄, 444.1923; found, 444.1930.

8-Benzyl-2-((5-ethylfuran-2-yl)methyl)-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetate (Z78)

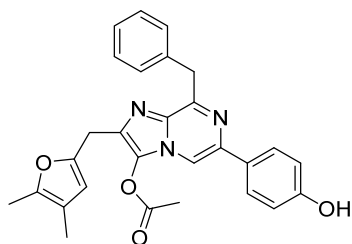
Prepared as described above (step 3). Obtained as a solid (0.05 g, 43%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 3:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.76 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.26 (m, 4H (including OH at high concentration)), 6.91 (m, 2H), 6.01 (m, 1H), 5.90 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.61 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.1, 157.1, 157.0, 152.7, 149.1, 139.4, 137.7, 133.2, 132.7, 129.7, 128.9 (two signals), 128.3, 127.9, 126.5, 115.9, 107.8, 107.4, 104.6, 39.2, 27.1, 21.3, 20.1, 12.2. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₆N₃O₄, 468.1923; found, 468.1929.

2-((3-Benzyl-5-(4-hydroxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(4,5-dimethylfuran-2-yl)propanoic acid (109d)[†]



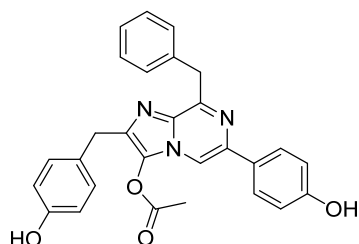
Prepared as described above (steps 2 and 3) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 1:1 to 0:1) to give the compound as a glass (0.21 g, 42% from the corresponding ester). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 12.4 (s, 1H), 9.49 (s(br), 1H), 8.33 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.32–7.16 (m, 6H), 6.80 (m, 2H), 6.54 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 5.82 (s, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.23 (d, 1H, *J* = 14.8 Hz), 4.04 (d, 1H, *J* = 14.8 Hz), 3.10 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.81 (s, 3H). HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₆N₃O₄: 444.1923; found, 444.1937.

8-Benzyl-2-((4,5-dimethylfuran-2-yl)methyl)-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yl acetate (Z79)



Prepared as described above (step 3). Obtained as a solid (0.05 g, 20%) after a chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 3:1). ¹H NMR (CDCl₃): 7.75 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.26 (m, 4H), 6.91 (m, 2H), 5.89 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.90 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃): 167.1, 157.0, 152.6, 148.0, 146.3, 139.4, 137.7, 133.2, 132.8, 129.7, 128.8, 128.3, 127.9, 126.5, 115.9, 114.6, 110.2 (two signals), 107.8, 39.2, 27.0, 20.0, 11.2, 9.8. HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₆N₃O₄: 468.1923; found, 468.1922.

**Unoptimized alternative synthesis of
8-benzyl-2-(4-hydroxybenzyl)-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl acetate (Z86)**



Isopropyl 2-(((3-benzyl-5-(4-benzyloxyphenyl)pyrazin-2-yl)amino)-3-(4-benzyloxyphenyl)propanoate (**111**, 5.16 g, 1.0 eq) and powdered sodium hydroxide (1.24 g, 4.0 eq) were introduced in a flask that was then purged with a stream of argon. Anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) was injected and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. An excess of acetic anhydride (8.8 mL, 12 eq) was injected, then the solution was stirred at room temperature for 2 h. This was diluted with water and extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with water, brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness. The residue was then diluted in cyclohexane and concentrated again to dryness to co-evaporate remaining acetic acid and acetic anhydride. The solid was then recrystallized in cyclohexane to yield 8-benzyl-2-(4-benzyloxybenzyl)-6-(4-benzyloxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]-pyrazin-3-yl acetate **112** as a pinkish solid (3.87 g, 99% pure, 76% yield).

This product (0.90 g, 1.0 eq) was then diluted in anhydrous ethanol (50 mL) with palladium over activated carbon (0.08 g, 5% eq) and stirred under a hydrogen atmosphere for 8 hours. Monitoring by NMR of an aliquote showed minute conversion. Ethyl acetate was added (100 mL) and the resulting mixture was stirred under hydrogen for 36 hours. Monitoring by NMR of an aliquote showed again a limited conversion. Glacial acetic acid (4 mL) and an extra amount of palladium over activated carbon (0.08 eq, 5% eq) were added and the solution was stirred once again for 24 hours under hydrogen.

The mixture was then filtered and concentrated to dryness, then purified by chromatography over silica gel (cyclohexane–ethyl acetate 2:1) to yield the desired product as a pinkish solid (**Z86**, 0.25 g, 38%).

Partie III : Évaluation des analogues **Q**

Les imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones **Q**, dont les précurseurs *O*-acétylés **Z** ont été synthétisés selon les méthodes présentées dans la partie précédente, ont été évaluées pour leur signal en bioluminescence et en chimioluminescence (bruit de fond) par l'auteur, après une formation précieuse par notre collaborateur à l'Institut Pasteur Yves Jacob. Quarante-et-un substrats potentiels synthétisés par l'auteur ont été décrits dans la partie précédente, mais les tests ont été effectués avec l'intégralité des molécules faites au laboratoire à ce jour, et une sélection des exemples pertinents est présentée ci-après.

Nous décrirons tout d'abord la méthode utilisée au laboratoire pour comparer nos substrats potentiels et les limitations identifiées des analyses effectuées. Enfin, nous exposerons les relations « structure – luminescence » obtenues avec l'enzyme nanoKAZ.

I - MÉTHODES

De nombreux groupes académiques et industriels ont travaillé (et travaillent encore) à la synthèse de nouveaux substrats potentiels pour les luciférase marines (GLuc, RLuc, NanoLuc®/nanoKAZ) et ont rapporté leurs résultats dans la littérature. Comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce manuscrit, la meilleure combinaison commerciale existante à l'heure actuelle pour des études en bioluminescence en l'absence d'ATP est à notre connaissance la luciférase nanoKAZ¹⁰⁰ (commercialisée sous le nom NanoLuc® par Promega Corporation) associée au substrat artificiel furimazine (7/**Q1**).⁹⁹

Ce couple furimazine/nanoKAZ présente des propriétés extraordinairement améliorées relativement à la luciférase naturelle d'*Oplophorus gracilirostris* couplée à la coelentérazine (**4**), avec une intensité beaucoup plus importante (cf. Partie I : I.D.2.c.ii(a), p. 13) et un temps de demi-vie du signal revendiqué à deux heures (dans un tampon assez particulier). L'utilisation de coelentérazine (**4**) avec nanoKAZ est également possible, avec toutefois une intensité maximale environ 30 fois moins importante.⁹⁹ C'est pourquoi nous nous étonnons que certains auteurs d'article ou brevet,^{165, 368} y compris par les découvreurs de la furimazine, comparent toujours les nouveaux substrats synthétisés à l'étalon du plus mauvais des deux substrats, en affichant parfois de surcroît des graphiques représentant l'évolution du signal bioluminescent sur quelques (milli)secondes...

Nous avons au cours des tests de luminescence essayé de transcrire une utilisation réaliste de nos substrats potentiels **Q**, aussi bien concernant le choix du milieu que dans les délais de lecture des plaques.

I.A. Enzyme

Nous avons utilisé pour nos tests une solution d'enzyme nanoKAZ de concentration inconnue fournie par Yves Jacob à l'Institut Pasteur, générée en utilisant un kit commercial permettant l'expression *in vitro* d'une protéine. Cette solution a été diluée 400 fois dans un tampon Gibco® DPBS 1X (pH 7,0–7,2) contenant 0,1 % v/v Tween® 20, puis divisée en aliquotes conservées à -80 °C et décongelées au besoin.

Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que l'enzyme utilisée pour comparer nos substrats n'a pas été purifiée, cette purification s'étant avérée plus ardue qu'espérée par nos collaborateurs et nous-même. Par conséquent, le milieu comportait lors des évaluations des quantités inconnues de lysat cellulaire, protéines, acides nucléiques et acides aminés présents dans le kit d'expression *in vitro*, tout de même dilués au final près de 16 000 fois dans la solution tampon. Il n'est cependant pas à exclure que ceci ait pu avoir une influence sur les résultats observés.

Nous avons observé sur le long terme (plusieurs mois à -80 °C) que la luciférase pouvait produire avec la furimazine **Q1** des niveaux variables de luminescence. Cela nous a incités à inclure de la furimazine **Q1** fraîchement générée par désacétylation de **Z1** dans chaque test afin de servir de standard interne. Cela explique cependant les variations d'intensité observées dans les résultats présentés ci-après, même avec des dilutions d'enzyme et de substrats constantes.

I.B. Substrats

Les solutions mères de substrats potentiels **Q** ont été générées par hydrolyse acide des composés *O*-acétylés **Z**, tel que décrit page 97. La concentration de 4,5 mM de la solution mère a été choisie de manière arbitraire, étant proche de la dilution de 1 mg de **Z1** (437,50 g·mol⁻¹) dans 500 µL du mélange DMSO–éthanol–acide chlorhydrique utilisé pour la déprotection.

Ces solutions mères ont été autant que possible préparées peu de temps avant les évaluations des substrats potentiels afin de limiter au maximum leur dégradation. Toutefois, les substrats étaient relativement stabilisés par la présence d'acide dans la solution mère et pouvaient être stockés si besoin quelques semaines dans un congélateur à -80 °C tout en conservant de bonnes propriétés de bioluminescence. *A contrario*, la dilution de la solution mère dans une solution tamponnée à un pH neutre ou basique ne permet plus la stabilisation du substrat, qui doit alors être utilisé dans l'heure qui suit.

Afin d'évaluer les substrats potentiels **Q** avec une activité enzymatique maximale, nous avons souhaité nous placer à une concentration saturante de substrat, une dizaine de fois supérieure à leurs constantes de Michaelis K_m (inconnues). Nous avons supposé que les substrats possédaient des propriétés proches de la furimazine **Q1** dont le K_m a été rapporté par Hall *et al.*⁹⁹ être aux alentours de 10 µM et mesuré par des collaborateurs entre 2 et 4 µM, et avons choisi d'effectuer nos évaluations à une concentration finale de substrats dans le milieu de 45 µM (correspondant à une dilution au 1/100^{ème} de la solution mère).

Toutefois, un récent brevet de Promega Corporation¹⁶⁷ décrivant de nouvelles imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones rapporte des constantes de Michaelis pour ces molécules comprises entre 1 et 15 fois celle de la furimazine **Q1**, soit entre 10 et 150 µM. Il est par conséquent possible que certains de nos substrats **Q** moins affins pour nanoKAZ que la furimazine n'aient pas été évalués à leur véritable potentiel. Nous proposons donc dans les résultats une comparaison à conditions égales entre nos molécules, sans prétendre toutefois que les conditions utilisées soient optimales.

I.C. Choix de la solution tampon

La furimazine **Q1** est proposée commercialement en combinaison avec une solution tampon optimisée pour des tests *in vitro* (Promega Nano-Glo® Luciferase Assay System) permettant d'observer un signal lumineux soutenu pendant près de deux heures, avec une décroissance quasi-linéaire, et un bruit de fond réduit. Cette solution est tamponnée avec 100 mM de MES (acide 2-(*N*-morpholino)-éthanesulfonique) à pH 6 et contient notamment un chélatant de métaux (1 mM CDTA), un agent réducteur (1 mM DTT, dithiothréitol) et un antioxydant (35 mM thiourée), ainsi qu'un tensioactif (0.5 % v/v Tergitol®).^{99, 166}

Nous avons considéré que la composition de cette solution était malheureusement fort éloignée de conditions courantes d'essais biochimiques : le pH acide empêche d'emblée son utilisation avec des

cellules vivantes, de même que l'utilisation de Tergitol® qui est souvent utilisé pour lyser les cellules. Par ailleurs, l'utilisation de thiourée et de dithiothréitol limite aussi le champ d'application de ces conditions.

Nous avons par conséquent essayé de déterminer des conditions de tests moins restrictives. Pour cela, nous avons procédé à l'évaluation de la luminescence de la furimazine **Q1** dans divers tampons plus ou moins élaborés. Les données rassemblées dans la Figure 20 ont immédiatement montré deux comportements distincts selon la présence ou non de tensioactifs (Tergitol® ou Tween® 20).

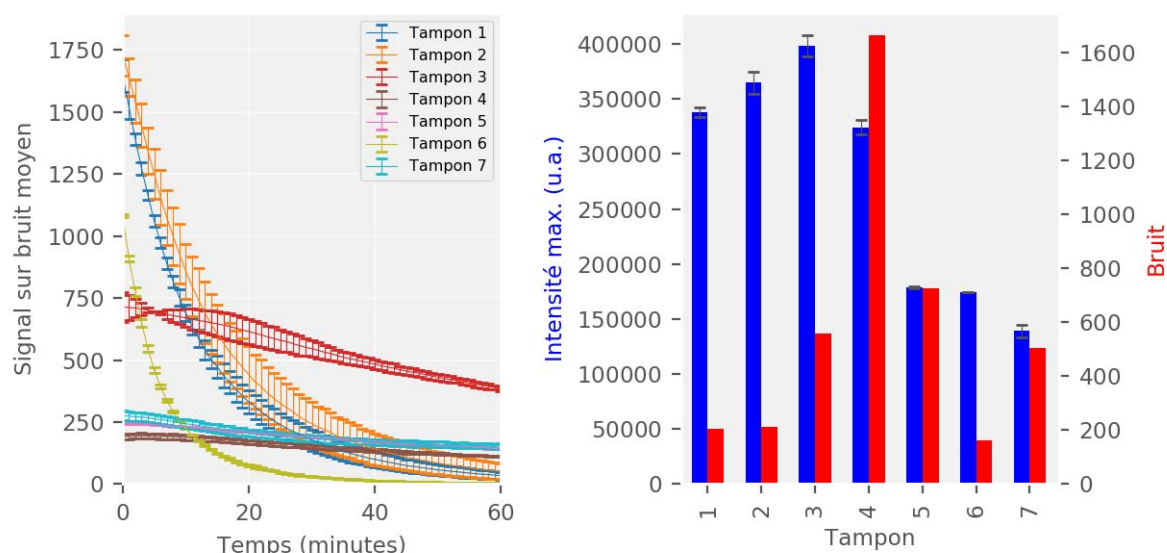


Figure 20 : comparaison du signal-bruit moyen (gauche) et de l'intensité maximale et du bruit moyen (droite) de nanoKAZ/furimazine **Q1** (80 µM) dans les tampons **1**) Gibco® DPBS 1X ; **2**) Gibco® DPBS 1X + CaCl₂ (0.9 mM) + MgCl₂ (0,5 mM) ; **3**) Gibco® DPBS 1X + 0,1 % v/v Tween® 20 ; **4**) Gibco® DPBS 1X + 1 % v/v FBS ; **5**) 100 mM MES pH 6 + 0,5 % v/v Tergitol® ; **6**) 100 mM MES pH 6 + 150 mM KCl + 1 mM DTT ; **7**) 100 mM MES pH 6 + 150 mM KCl + 1 mM DTT + 0,5 % v/v Tergitol®

Ainsi, dans le DPBS 1X (tampon phosphate à environ 10 mM, pH 7,0–7,2, confectionné par Gibco®), avec ou sans supplément d'ions calcium et magnésium (respectivement tampons **1** et **2**), ou dans le tampon **6**, le signal initial est intense mais faiblit assez rapidement, avec des temps de demi-vie inférieurs à 10 minutes. Cette décroissance rapide en l'absence de tout tensioactif suggère une désactivation de l'activité enzymatique par agrégation. Nous pouvons également observer l'effet très modeste des ions divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ sur la luminescence (tampons **1** et **2**), contrairement à ce qui a été décrit pour le composant catalytique KAZ sauvage,⁹⁷ ce qui nous a amené à abandonner l'utilisation de CDTA ou d'EDTA dans les tampons.

Les autres signaux présentent des décroissances plus lentes, quasi-linéaires. Les tests effectués dans les tampons **5** et **7** ont montré l'influence minimale de la salinité ou de l'ajout de dithiothréitol dans le tampon commercial, avec des résultats similaires dès lors que le milieu réactionnel est acide (grâce au MES pH 6). Par ailleurs, l'utilisation de 1 % en volume de sérum de veau foetal (FBS, *fetal bovine serum*, tampon **4**) à la place des tensioactifs rend le système compatible avec des cellules vivantes, mais génère un important bruit de fond grevant le rapport signal-bruit moyen.

Enfin, l'utilisation de DPBS 1X comportant du Tween® 20 (tampon **3**) a semblé un bon compromis, avec un bon rapport signal-bruit et une décroissance « raisonnable », pour une quantité relativement faible

de tensioactif et aucune modification à la formulation commerciale du DPBS. Nous avons par conséquent adopté ces conditions pour l'évaluation et la comparaison *in vitro* de nos analogues.

I.D. Protocole de comparaison des analogues de luciférines synthétisés au laboratoire

Notre protocole d'évaluation des substrats potentiels **Q** devait prendre en compte les comportements parfois très différents des signaux lumineux émis par le système luciférine/luciférase (avec des vitesses de décroissance très variables). Il devait également être suffisamment robuste pour pouvoir être répété à plusieurs semaines d'intervalle, afin d'évaluer l'impact des modifications structurales effectuées sur les substrats au fur et à mesure de leurs synthèses.

Les mesures de luminescence ont par conséquent été effectuées en plaques 96 puits (Greiner LUMITRAC™ 200, en polystyrène blanc) par un luminomètre Berthold Centro XS³. Les solutions mères de luciférines **Q** diluées au 1/50^{ème} dans le tampon (Gibco® DPBS 1X + 0,1 % v/v Tween® 20) étaient ajoutées manuellement dans les puits à raison de 50 µL/puit. Les puits permettant l'évaluation de l'autoluminescence du substrat recevaient 50 µL supplémentaires de tampon.

Une solution au 1/20^{ème} dans le tampon d'une aliquote d'enzyme décongelée étaient ensuite injectée par le luminomètre à raison de 50 µL/puit. Afin de pouvoir observer l'intensité maximale des signaux même s'ils présentaient une décroissance rapide, l'injection de l'enzyme et la première lecture par le luminomètre n'étaient séparés que par une seconde d'agitation de la plaque.

Comme expliqué précédemment, la furimazine **Q1** a été utilisée dans tous nos tests afin de permettre une certaine normalisation entre analyses, mais aussi pour pouvoir détecter d'éventuelles variabilités entre nos lots d'enzyme. Le signal de bioluminescence a été évalué dans trois puits par substrat et le signal d'autoluminescence (bruit de fond) a été mesuré dans deux puits par substrat. Sur les conseils de nos collègues, un soin particulier a été apporté au plan de plaque pour éviter les pollutions lumineuses inter-puits, limitant à dix le nombre de substrats évaluables sur une plaque (**Q1** inclus).

L'évolution du signal lumineux était mesurée toutes les trois minutes durant deux heures grâce au logiciel de contrôle des luminomètres MikroWin 2000. Les données brutes exportées par le logiciel étaient alors exploitées grâce à un module Python 3 développé par l'auteur (950 lignes) permettant l'analyse rapide des propriétés des substrats (intensité maximale, temps de demi-vie, rapport signal-bruit ; voir « Critères de quantification » ci-après) et l'export des graphiques correspondants.

Il est important de noter que malgré l'attention portée aux facteurs susceptibles d'influencer les résultats, des variations de comportement ont parfois été observées même pour la furimazine entre plaques, traduisant le vieillissement des aliquotes d'enzyme. Nous avons par conséquent essayé de comparer avec précaution les résultats obtenus lors de tests utilisant des lots d'enzyme différents.

I.E. Critères de quantification

La comparaison des résultats pour les nombreux substrats synthétisés en s'appuyant uniquement sur les courbes de décroissance du signal de bioluminescence s'est avérée délicate et nous avons donc déterminé des critères quantitatifs permettant de « trier » nos molécules.

Comme nous avons pu l'observer dans la littérature ainsi que dans nos premiers résultats, les courbes de décroissance du signal lumineux sont le plus souvent similaires à des fonctions exponentielles ou affines décroissantes, selon le substrat et le tampon utilisé (voir par exemple la Figure 20). Des critères évidents étaient donc l'intensité maximale de bioluminescence (I_{\max}) et le temps de demi-vie ($t_{1/2}$), ce dernier correspondant à la durée durant laquelle la bioluminescence est supérieure à la moitié d' I_{\max} . Ces deux valeurs permettent d'avoir des indications sur le signal lumineux spécifique à l'activité enzymatique pour un substrat.

Étant donné les nombreuses utilisations des systèmes luciférine/luciférase en imagerie, il nous a également semblé pertinent d'étudier l'aire sous les courbes de bioluminescence, qui est proportionnelle à la quantité totale de photons émis. Plus particulièrement, l'aire sous la courbe entre le temps 0 (injection de l'enzyme) et le temps de demi-vie est aisément calculable à partir de I_{\max} et $t_{1/2}$ avec des résultats très proches pour les deux types de courbes.* L'aire sous la courbe dans les 10 premières minutes peut quant à elle donner une bonne idée du signal exploitable dans des conditions classiques d'utilisation.

Enfin, l'intensité du signal d'autoluminescence mesuré pour chaque substrat, sans enzyme, nous a semblé être un indicateur important de sa stabilité chimique. À de rares exceptions près que nous préciserons dans les résultats, le bruit s'est avéré être quasi-constant sur les deux heures de mesure pour la plupart de nos substrats.

Les données mesurées ou calculées ont ensuite été normalisées par rapport à la furimazine **Q1** présente dans chaque plaque afin de pouvoir comparer les essais entre eux (avec les précautions évoquées plus tôt).

* Pour une décroissance exponentielle, $\int_0^{t_{1/2}} I_{\max} e^{-\lambda t} dt = \frac{I_{\max} \cdot t_{1/2}}{2 \cdot \ln(2)} \approx 0.72 \times I_{\max} \cdot t_{1/2}$ avec $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$;
pour une décroissance linéaire, $\int_0^{t_{1/2}} I_{\max} \left(1 - \frac{t}{2 \cdot t_{1/2}}\right) dt = \frac{3}{4} I_{\max} \cdot t_{1/2} = 0.75 \times I_{\max} \cdot t_{1/2}$

II - RÉSULTATS

Nous avons essayé lors des études de relations « structure – luminescence » d'effectuer des modifications sur les trois noyaux aromatiques pour former des analogues de furimazine **Q1** (« séries furanes ») ou de bisdésoxycoérentérazine **Q2** (« séries phényles ») (figure ci-dessous). Nous détaillerons tout d'abord les modifications apportées au noyau aromatique « en α » de la position 2 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, suivi de celles effectuées en position 6 puis celles « en α » de la position 8.

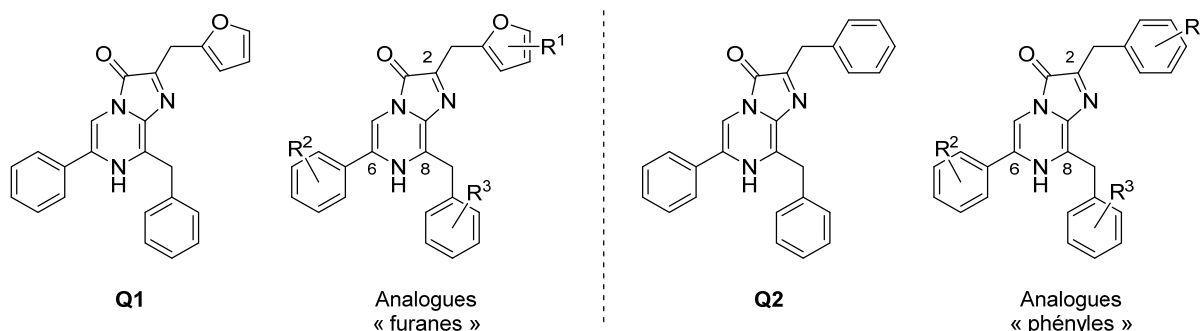


Figure 21 : furimazine (**Q1**), bisdésoxycoérentérazine (**Q2**) et analogues en séries furane et phényle

Nous présenterons en vis-à-vis une description qualitative des modifications structurales introduites sur le noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one et les données expérimentales obtenues lors de l'évaluation des analogues **Q**.

Ces dernières sont exposées sous plusieurs formes :

- un graphique montrant l'évolution du rapport signal – bruit moyen durant 120 minutes ;
- un diagramme en barres rassemblant pour les substrats d'une même plaque ou de plaques comparables l'intensité lumineuse maximale mesurée et le bruit de fond moyen sur 120 minutes. Ces deux valeurs sont exprimées dans une même unité arbitraire (u.a.) et n'ont pas été normalisées, permettant le cas échéant de détecter des bioluminescences ou autoluminescences aberrantes ;
- un tableau récapitulant les critères de quantification exposés p. 188 (intensité lumineuse maximale I_{\max} , temps de demi-vie $t_{1/2}$, bruit moyen, aire sous la courbe de bioluminescence à 10 min et au temps de demi-vie). Les valeurs des tableaux ont été normalisées par rapport à la furimazine **Q1** afin de pouvoir comparer les substrats entre séries d'analogues et en fonction de l'usage envisagé.

II.A. Modifications en α de la position 2 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one

II.A.1. Alkylphényles

La bisdésoxycoelentérazine (**Q2**) a été décrite dans la littérature par l'équipe d'Osamu Shimomura comme étant relativement efficace avec la luciférase sauvage d'*Oplophorus*,⁹⁶ avec une intensité maximale de bioluminescence aux alentours de 60 % de celle obtenue avec la coelentérazine (**4**). Dans le cas de nanoKAZ, nous avons pu observer pour **Q2** un signal près de 25 % plus lumineux que la furimazine dans les premiers instants, mais avec une décroissance rapide et un temps de demi-vie trois fois plus court.

Relativement à **Q2**, la substitution du noyau benzène par des alkyles linéaires ou cycliques a entraîné une chute de plus de 50 % de l'intensité maximale et d'au moins 30 % des temps de demi-vie, à l'exception des substitutions en position *mé*ta qui conservent les meilleurs temps de demi-vie de la série (**Q39**, **Q50**) et, dans le cas du *m*-méthyle (**Q14**), permet une augmentation importante du signal lumineux initial (mais aussi du bruit de fond). Un cyclopropyle (**Q50**) semble marginalement mieux toléré qu'un propyle linéaire (**Q39**), tendance observable également entre **Q49** et **Q44**.

La présence d'un radical méthyle en *ortho* (**Q62**) est délétère envers la production de lumière catalysée par l'enzyme, ainsi que celle d'un alkyle en *para* et ce d'autant plus que le radical est encombrant.

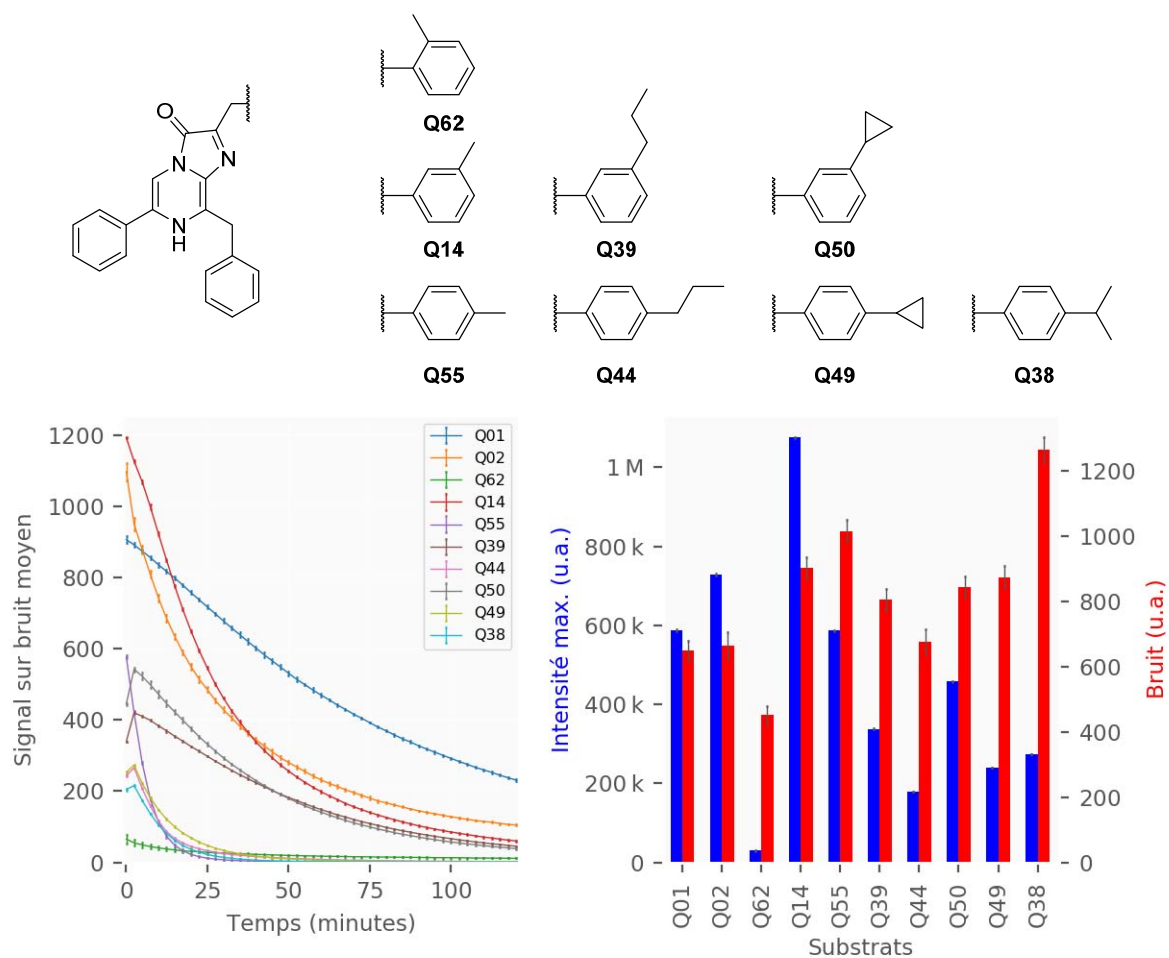


Figure 22 : structures et signaux des composés présentant des alkylphényles en α de la position 2

Tableau 15 : valeurs caractéristiques pour les substrats possédant des alkylphényles en α de la position 2

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q2	1,2	0,3	1,0	0,4	1,0
Q62	0,1	0,2	0,7	0,0*	0,0*
Q14	1,8	0,3	1,4	0,6	1,7
Q55	1,0	0,0*	1,6	0,0*	0,5
Q39	0,6	0,7	1,2	0,4	0,6
Q44	0,3	0,1	1,0	0,0*	0,2
Q50	0,8	0,5	1,3	0,4	0,8
Q49	0,4	0,2	1,3	0,1	0,3
Q38	0,5	0,1	1,9	0,0*	0,4

* Valeur inférieure à 5 % de celle de **Q1**

II.A.2. Halogénophényles, trifluorométhylphényles et méthoxyphényles

La substitution du noyau benzène en α de la position 2 par un atome de fluor est plutôt bénéfique à l'intensité maximale observée (**Q56**, **Q41** et **Q15**) mais entraîne à l'exception de **Q56** (substitué en *ortho*) une augmentation de l'autoluminescence des substrats, ainsi qu'une baisse du temps de demi-vie (même relativement à **Q2**).

Similairement à ce qui a été décrit pour **Q62** et **Q14** avec un radical méthyle, la présence d'un groupe trifluorométhyle en *ortho* (**Q30**) inhibe quasi-complètement la production catalysée de lumière, alors qu'il est mieux toléré en *méta* (**Q31**). De manière étonnante, un méthoxyle placé en *ortho* (**Q57**) n'a pas entraîné la chute drastique de bioluminescence « attendue » malgré un encombrement nettement plus conséquent que les autres groupements exposés. C'est toutefois le seul exemple sur cette position de groupe possédant un effet mésomère donneur ou capable de participer à des liaisons hydrogènes, ce qui pourrait expliquer une telle différence de comportement.

Les substitutions en position *para* ont de manière générale augmenté le bruit moyen et diminué de manière conséquente le temps de demi-vie des substrats. La substitution en *para* du fluor de **Q15** par un atome de chlore (**Q47**) n'a pas fondamentalement modifié la stabilité du substrat avec une autoluminescence similaire, mais a entraîné une chute de 60 % du signal lumineux.

Nous pouvons également observer une tendance à l'augmentation du signal d'autoluminescence entre les positions *ortho*, *méta* et *para*, particulièrement marquée avec les groupements méthyles et trifluorométhyles.

Les analogues **Q2** et **Q15** avaient déjà été décrits dans la littérature par Inouye *et al.*³⁶⁸ et testés sur une enzyme nanoKAZ excrétée dans le milieu de culture cellulaire. Les résultats publiés sont partiellement compatibles avec nos expériences, avec des intensités maximales plus importantes que la furimazine, mais sans observer toutefois de différence entre celles de **Q2** et **Q15**. Cela peut cependant s'expliquer par un délai différent entre la mise en contact des substrats et de l'enzyme et la première lecture de bioluminescence. Les auteurs de ce brevet revendiquent cependant une stabilité exceptionnelle du substrat, ce qui peut s'avérer exact sur une minute, mais semble tout de même une vision très restrictive de la stabilité temporelle.

Le meilleur représentant de cette série est probablement **Q18**, qui comporte un méthoxyle en *méta*, avec un bruit de fond seulement légèrement supérieur à la furimazine **Q1** et émettant 30 % de lumière en plus durant les 10 premières minutes mais seulement 10 % de moins sur deux heures (pour comparaison, la bisdésoxycœlentérazine **Q2** émet la même quantité de photons dans les 10 premières minutes mais 35 % de moins que **Q1** en deux heures).

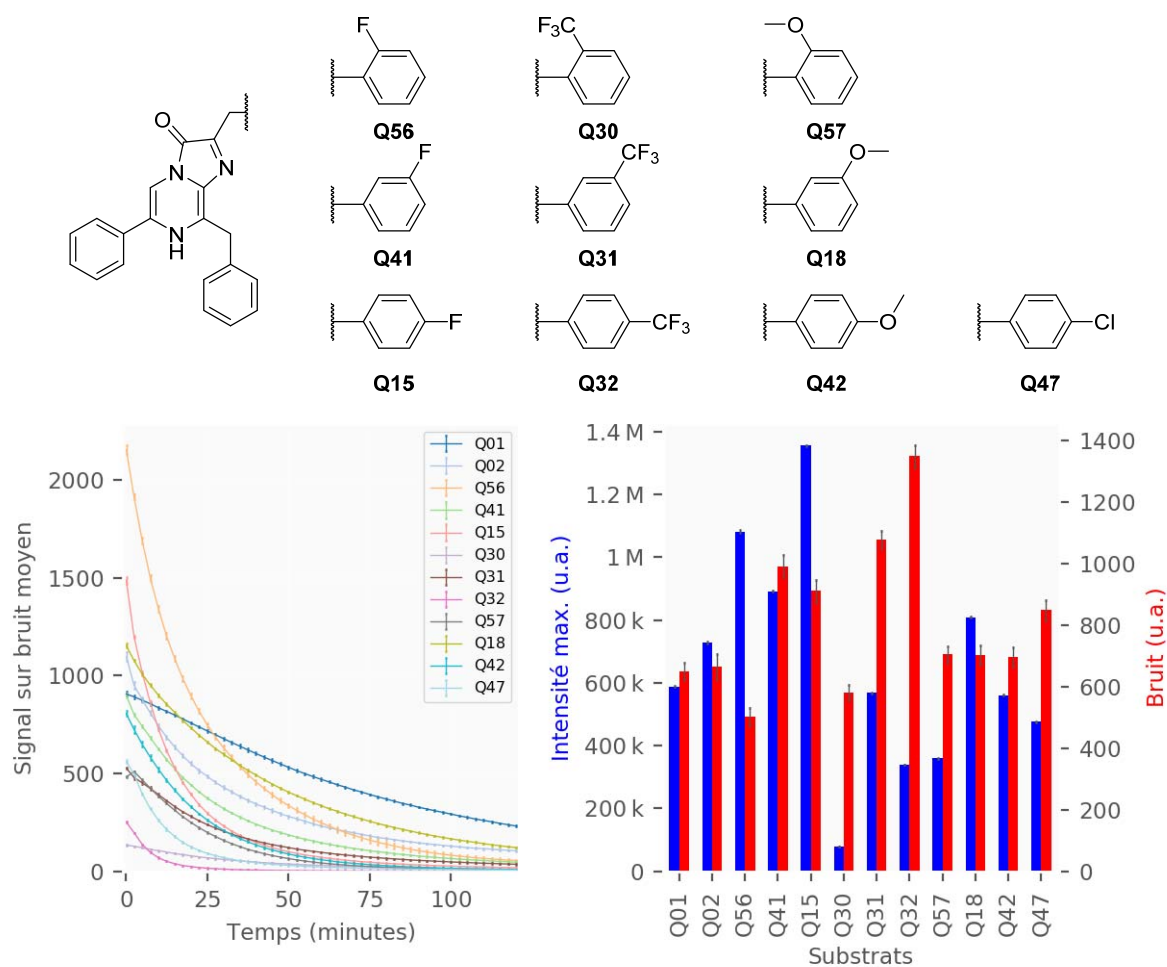


Figure 23 : structures et signaux des composés présentant des halogéno-, trifluorométhyl- ou méthoxyphényles en α de la position 2

Tableau 16 : valeurs caractéristiques des substrats possédant des halogéno-, trifluorométhyl- ou méthoxyphényles en α de la position 2

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q2	1,2	0,3	1,0	0,4	1,0
Q56	1,8	0,2	0,8	0,4	1,5
Q41	1,5	0,3	1,5	0,4	1,3
Q15	2,3	0,1	1,4	0,2	1,7
Q30	0,1	0,4	0,9	0,1	0,1
Q31	1,0	0,3	1,7	0,3	0,9
Q32	0,6	0,1	2,1	0,1	0,4
Q57	0,6	0,3	1,1	0,2	0,6
Q18	1,4	0,5	1,1	0,7	1,3
Q42	1,0	0,2	1,1	0,2	0,8
Q47	0,8	0,1	1,3	0,1	0,6

II.A.3. Alkylfuranes et trifluorométhylfurane

Nous avons préparé de proches analogues de la furimazine **Q1** pour tenter d'observer des différences de luminescence en combinaison avec nanoKAZ, sachant que cette dernière a été optimisée pour ce substrat en particulier.⁹⁹

Une « rotation » de la position de l'oxygène du noyau furane, en remplaçant le substituant fur-2-yle (**Q1**) par un fur-3-yle (**Q4**), a entraîné une diminution de près de 40 % de l'intensité maximale observée ainsi que le triplement du bruit moyen d'autoluminescence. Ce signal d'autoluminescence a d'ailleurs montré un comportement assez inédit, avec un bruit entre 6 et 8 fois celui de **Q1** dans les dix premières minutes de l'analyse, avant de baisser progressivement durant les cent-dix minutes suivantes pour atteindre finalement à peu près le même que celui des autres analogues de cette série. Si un certain nombre de substrats ont un bruit de fond qui augmente durant leur évaluation, il s'agit de la seule occasion où nous avons pu observer un signal d'autoluminescence qui décroissait ; cette mesure non répétée est par conséquent à considérer avec une certaine circonspection.

La présence d'alkyle(s) sur le noyau furane s'est quant à elle avérée avoir un effet dramatique sur le signal lumineux, avec des intensités maximales mesurées lors d'une première évaluation entre 2,7 et 2,1 fois plus importantes pour **Q3**, **Q12** et **Q16** qu'avec la furimazine et un bruit moyen similaire ou moindre. Ici encore, cependant, l'amélioration de la bioluminescence s'accompagne d'une baisse de sa stabilité, avec des temps de demi-vie de l'ordre de 20 à 30 minutes.

Comme nous pourrions l'observer plus loin, les intensités maximales mesurées ont été évaluées différemment avec un autre lot d'enzyme, avec des luminescences entre 2,1 et 1,5 fois celle de la furimazine **Q1** (respectant toutefois le même ordre **Q3** > **Q12** > **Q16**). Nous n'avons malheureusement pas pour le moment d'autre explication à fournir pour ces variations qu'une différence d'efficacité de l'enzyme entre les deux lots utilisés, dont l'origine reste à déterminer.

La présence en position 5 d'un cyclopropyle (**Q36**) ou d'un groupement trifluorométhyle (**Q28**) permet également une amélioration de l'intensité maximale, mais ici au détriment d'une augmentation du bruit de fond. La difficulté synthétique supplémentaire introduite par le cyclopropyle ou le coût du précurseur trifluorométhylé ne nous ont pas incités à conserver ces motifs pour la suite de nos études « structure – bioluminescence ».

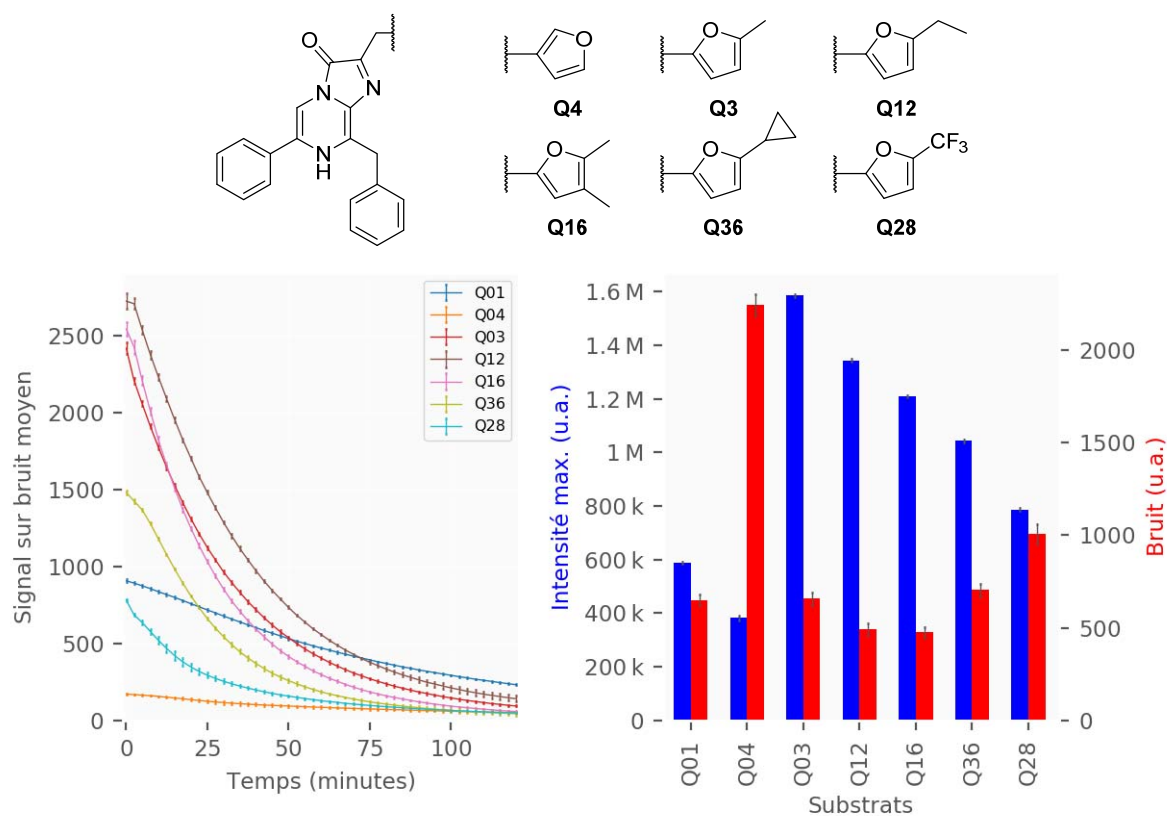


Figure 24 : structures et signaux des composés présentant des furanes substitués en α de la position 2

Tableau 17 : valeurs caractéristiques des substrats possédant des furanes substitués en α de la position 2

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q4	0,6	0,9	3,5	0,6	0,6
Q3	2,7	0,4	1,0	0,9	2,4
Q12	2,3	0,4	0,8	1,0	2,2
Q16	2,1	0,3	0,7	0,5	1,8
Q36	1,8	0,3	1,1	0,6	1,7
Q28	1,3	0,2	1,6	0,3	1,1

II.A.4. Thiophène et alkylthiophènes

Nous avons également tenté de remplacer le noyau furane par un thiophène (**Q13**). Ce composé a montré une intensité maximale 70 % plus importante que la furimazine (**Q1**), mais avec encore une décroissance du signal plus rapide.

L'analogue **Q58** s'est avéré beaucoup moins intéressant que son homologue furane **Q12**, avec un bruit de fond plus important et une intensité maximale moindre (l'évaluation de cette série a été effectuée avec le même lot d'enzyme que les tests initiaux des composés de la série « alkylfuranes » et est donc comparée à l'aune de ceux-ci).

Enfin, l'analogue **Q60** présentant un méthyle en position 3 du noyau thiophène a été le premier analogue synthétisé possédant une stabilité du signal dans le temps similaire à la furimazine **Q1** avec un temps de demi-vie légèrement supérieur, malheureusement au prix d'une intensité maximale (et moyenne) moindre. Il aurait été extrêmement intéressant de pouvoir comparer ce substrat à son pendant furane, mais nous n'avons jamais pu le synthétiser à cause du prix prohibitif du 3-méthyl-2-furfuraldéhyde précurseur.

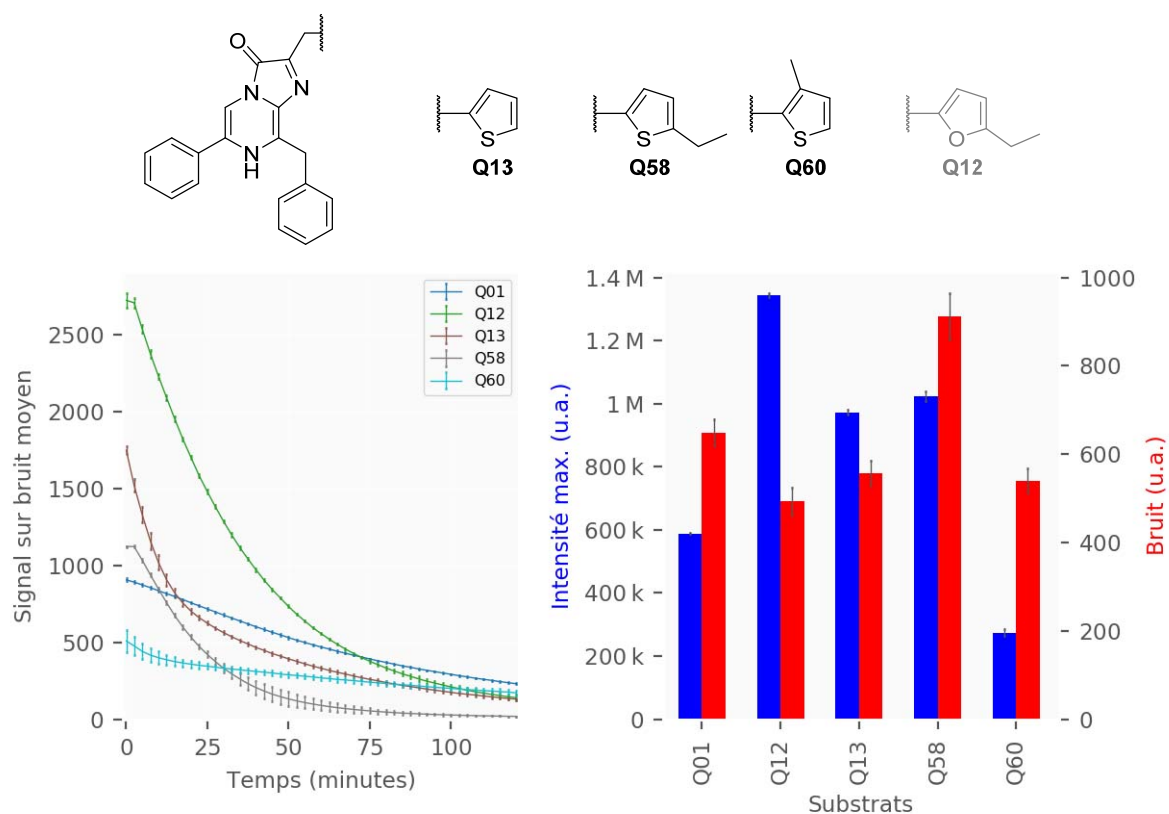


Figure 25 : structures et signaux des composés présentant des thiophènes substitués en α de la position 2

Tableau 18 : valeurs caractéristiques des substrats possédant des thiophènes substitués en α de la position 2

	I _{max}	t _{1/2}	Bruit moyen	Aire à t _{1/2}	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q13	1,7	0,2	0,9	0,3	1,3
Q58	1,7	0,3	1,4	0,5	1,6
Q60	0,5	1,1	0,8	0,4	0,4

II.B. Modifications sur la position 6 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one

Les modifications en α de la position 2 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)one ont montré une augmentation possible du signal de bioluminescence, souvent néanmoins au détriment de sa stabilité temporelle, notamment en alkylant le noyau furane (en position 4 et/ou 5) ou le noyau benzène (en *mé*ta). Ces changements ont donc par la suite été testés en cumulant ces modifications avec les nouvelles, afin de pouvoir observer d'éventuelles synergies.

II.B.1. Fluorophényles

Nous avons tout d'abord observé l'influence d'un atome de fluor en position *ortho* sur le phényle de la position 6. Pour la série « phényles » en α de la position 2, nous avons pu observer une augmentation de l'intensité maximale accompagnée d'une augmentation du bruit entre **Q2** et **Q20**, avec une décroissance plus rapide pour ce dernier, mais avec une conservation du rapport signal-bruit moyen. Le même constat a été fait passant de **Q15** à **Q53** (non montré sur le graphique).

Dans la série « furanes », la fluoration du phényle en position 6 a permis une augmentation de 40 % de l'intensité maximale de **Q21**, mais avec un doublement en parallèle du bruit de fond par rapport à la furimazine **Q1**. Il est toutefois à souligner que cette augmentation de bioluminescence ne s'est pas ici traduite par la chute importante du temps de demi-vie habituellement observé. La fluoration des deux positions *ortho* (**Q27**, non montré) du phényle en position 6 a quant à elle entraînée un triplement du bruit de fond sans impacter significativement ni la bioluminescence ni le temps de demi-vie, traduisant peut-être une instabilité exacerbée du substrat mais une affinité pour l'enzyme intouchée.

L'intensité maximale des analogues présentant des furanes alkylés (**Q34**, **Q51** et **Q61**) est toujours plus importante que la furimazine **Q1**, mais l'augmentation du bruit de fond moyen par rapport à **Q3**, **Q12** et **Q16** n'a pas entraîné une amélioration importante du ratio signal-bruit.

Nous avons également étudié l'effet de la fluoration sur les autres positions du phényle, avec un noyau 5-méthylfurane en α de la position 2. La fluoration en *mé*ta (**Q54**) n'a pas d'influence particulière sur le signal observé par rapport à **Q3**, mais celle en *para* inhibe quasi-totalement la production de lumière.

Tableau 19 : valeurs caractéristiques pour les substrats possédant un fluorophényle en position 6

	I_{max}	t_{1/2}	Bruit moyen	Aire à t_{1/2}	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q2	1,2	0,3	0,7	0,4	1,0
Q20	2,0	0,2	1,1	0,4	1,6
Q21	1,4	0,7	2,2	0,9	1,3
Q34	2,2	0,4	1,4	0,8	1,9
Q51	2,6	0,3	1,0	0,9	2,3
Q53*	2,2	0,1	1,1	0,2	1,5
Q16*	2,1	0,3	0,7	0,6	2,0
Q54	2,7	0,3	0,9	0,7	2,3
Q35	0,1	2,0	0,9	0,2	0,1

* Substrats testés sur une autre plaque et comparés à leur référence **Q1** propre

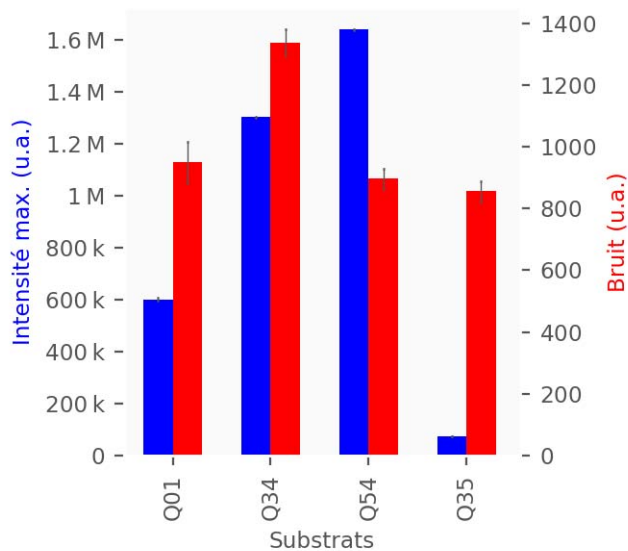
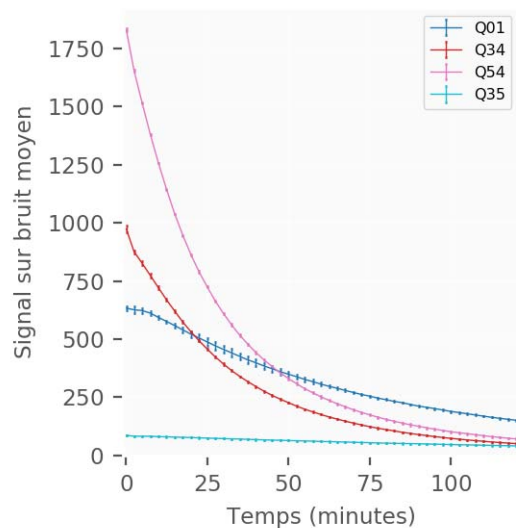
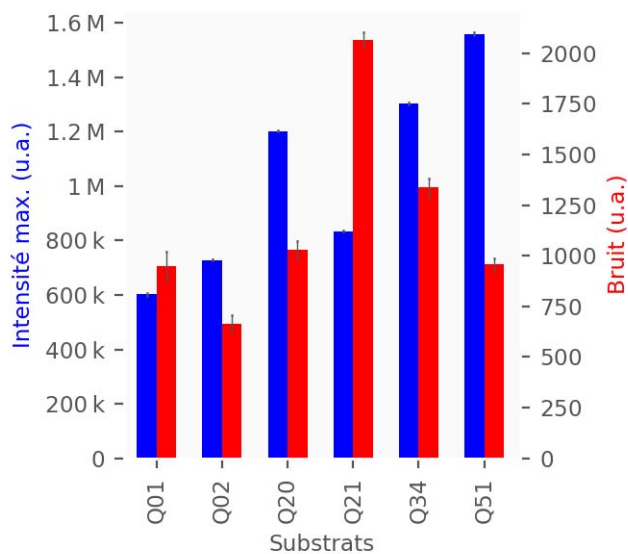
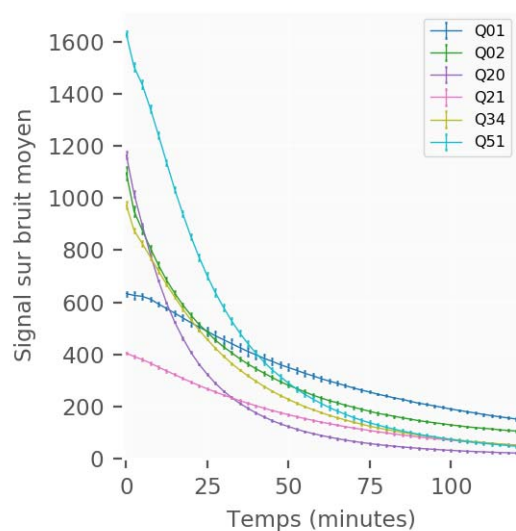
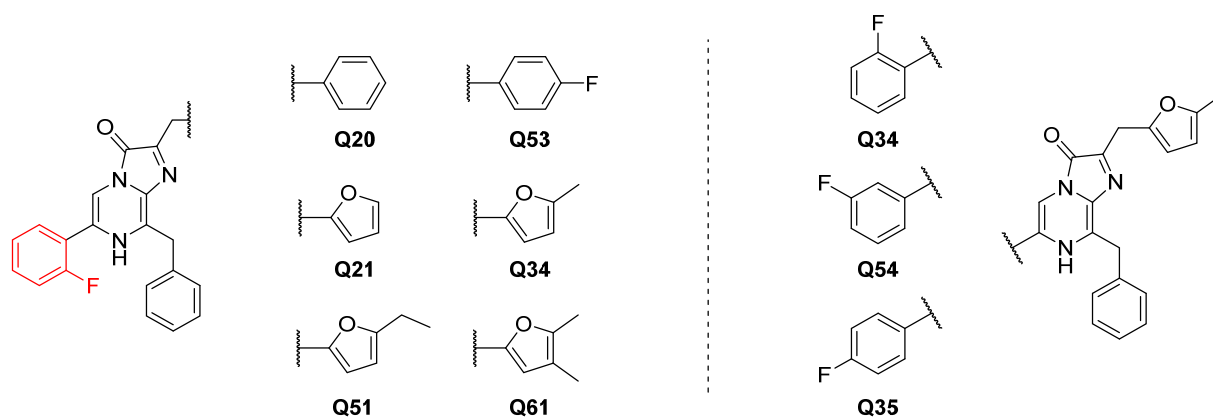


Figure 26 : structures et signaux des composés présentant un fluorophényle en position 6

II.B.2. Alkylphényles, méthoxyphényles et hydroxyphényles

Un nombre plus restreint de modifications ont été faites sur le phényle de la position 6 qu'en position 2, notamment car les quelques essais effectués ont tous eu un impact dramatique sur l'allure de la bioluminescence. Ainsi, l'introduction d'un méthoxyle en *ortho* (**Q09**) ou en *para* (**Q37**) a entraîné une réduction de plus de 90 % de la bioluminescence par rapport à leurs contreparties non substituées (respectivement **Q1** et **Q3**), avec une instabilité particulièrement accrue (presque dix fois supérieure) pour **Q37**.

De même, la substitution en *para* par un groupement méthyle (**Q45**) annihile quasiment la production de lumière catalysée par l'enzyme, en ne montrant toutefois pas le même accroissement du bruit de fond qu'observé avec **Q37**. Étonnamment, la présence d'un méthyle en *méta* s'est traduite de manière assez différente en série « furane » (**Q52**) et « 5-méthylfurane » (**Q48**), avec un bruit de fond légèrement plus important pour le premier mais une bioluminescence quasi-nulle, alors que le second conserve une intensité maximale certes plus faible que **Q1** (et *a fortiori* que **Q3**) mais avec toujours un temps de demi-vie de près de 40 minutes et un bruit faible.

Enfin, nous avons synthétisé au laboratoire la coelentérazine **Q86**, le substrat naturel de la luciférase d'*Oplophorus gracilirostris* sauvage, ainsi que des analogues conservant le *p*-hydroxyphényle en position 6, la *h*-coelentérazine **Q75**¹⁵⁴ et l'homologue de furimazine **Q80**. La coelentérazine **Q86** a émis à son apex quinze fois moins de lumière que la furimazine **Q1** (un facteur 30 avait été rapporté par Hall *et al.*),⁹⁹ mais a aussi montré un bruit moyen douze fois supérieur. Cette explosion du signal d'autoluminescence a également été observée pour **Q75** et **Q80**, ces derniers ayant présenté une intensité maximale entre deux et trois fois celle de la furimazine, mais avec une décroissance du signal parmi les plus rapides mesurées.

La présence d'un groupement mésomère donneur en *para* du phényle en position 6 (méthoxyle pour **Q37** ou hydroxyle pour **Q75**, **Q80** et **Q86**) semble être le point commun entre tous les substrats ayant montré une instabilité chimique exacerbée.

Tableau 20 : valeurs caractéristiques pour les substrats possédant un phényle en position 6 substitué par Me, MeO, OH

	I _{max}	t _{1/2}	Bruit moyen	Aire à t _{1/2}	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (60 min)	1,0	1,0	1,0
Q9	0,1	1,3	2,9	0,1	0,1
Q52	0,0	2,1	1,1	0,1	0,0
Q37	0,0	2,1	9,4	0,0	0,0
Q48	0,7	0,7	0,8	0,4	0,6
Q45	0,0	0,1	1,0	0,0	0,0
Q1*	1,0	1,0 (69 min)	1,0	1,0	1,0
Q75*	1,9	0,0	9,5	0,0	0,4
Q86*	0,1	0,6	12,3	0,0	0,1
Q80*	2,7	0,0	10,6	0,0	0,7

* Substrats testés sur une autre plaque et comparés à leur référence **Q1*** propre

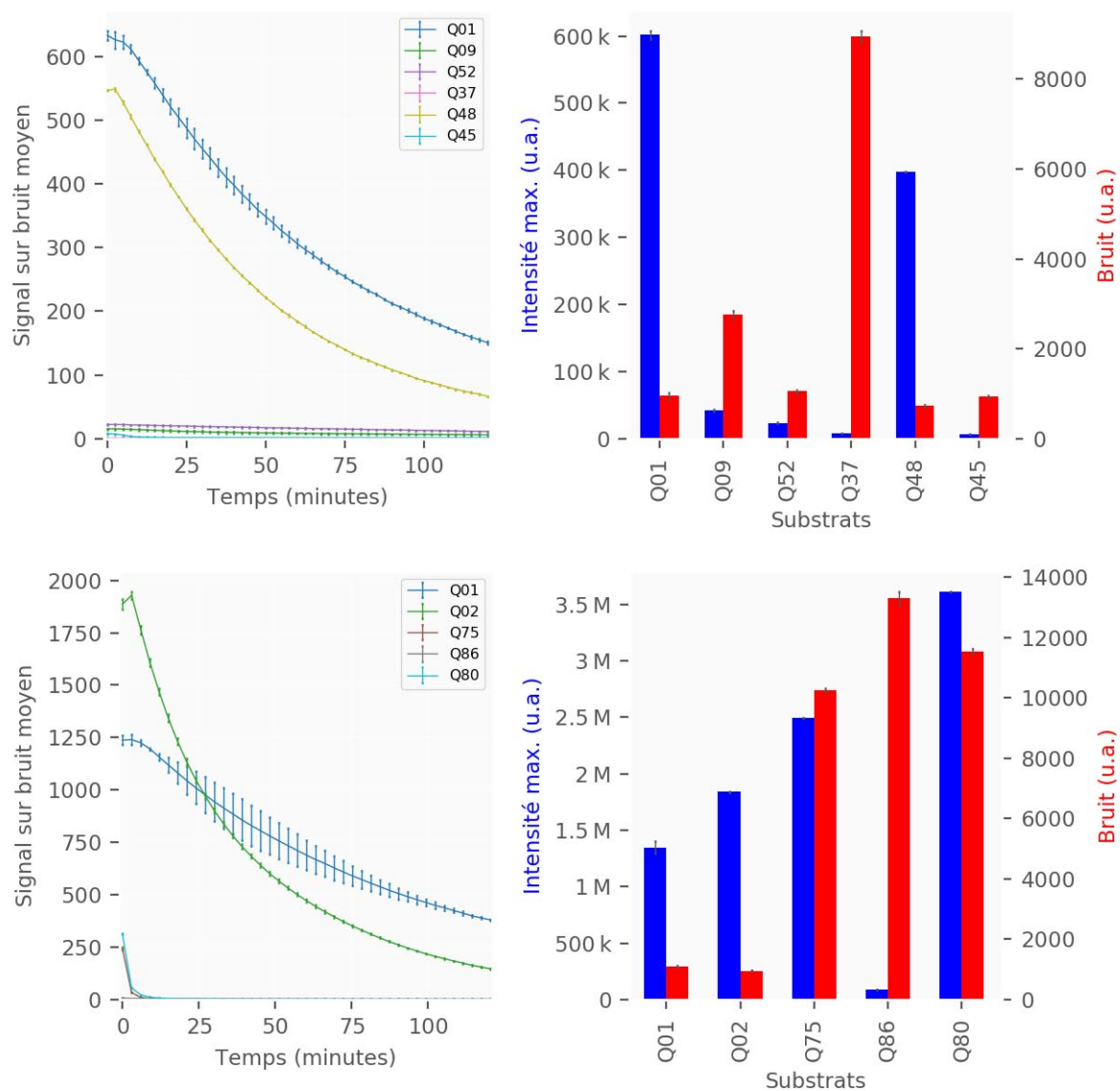
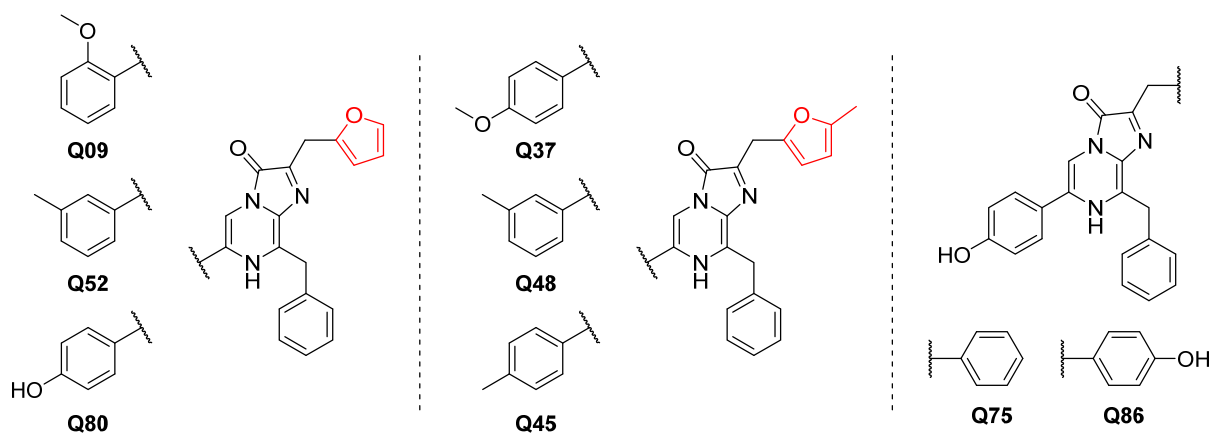


Figure 27 : structures et signaux des composés présentant un phényle en position 6 substitué par un méthyle, un méthoxy ou un hydroxyle

II.C. Modifications en position 8 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one

Les modifications apportées en position 6 ne se sont pas traduites positivement en termes d'augmentation de l'intensité de bioluminescence ou du temps de demi-vie. Elles ont également montré l'influence importante de la position *para*.

Nous avons finalement souhaité étudier l'impact de la substitution du noyau aromatique en α de la position 8 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one. Si plusieurs groupes de recherche se sont récemment intéressés au remplacement du pont méthylène par un hétéroatome,¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ voire à sa suppression,^{166, 168} notamment pour influencer la longueur d'onde émise, nous avons fait le choix de le conserver dans la structure de nos analogues.

II.C.1. Alkylbenzyles

Nous avons en premier lieu testé l'ajout de méthyles en *ortho* et en *méta* sur le noyau benzène, en série « furane » et en série « phényle ».

La présence d'un groupe méthyle en *méta* a entraîné une réduction importante de la bioluminescence de **Q93** par rapport à son homologue furimazine **Q1** et de **Q95** par rapport à son homologue **Q2** (non montré ci-contre), avec des autoluminescences toutefois légèrement réduites.

La substitution en *ortho* a également entraîné une baisse de luminescence de presque 80 % de **Q93** et **Q92** par rapport à **Q1** et **Q2**, avec toutefois une stabilisation remarquable de leurs signaux, qui ont montré une décroissance quasi-linéaire.

Les données obtenues lors de cette évaluation sont cependant sujets à caution, notamment concernant les temps de demi-vie relatifs, notre standard interne **Q1** ayant affiché une « allure de courbe » du signal de bioluminescence tout à fait étonnante. L'intensité maximale pour **Q1** est par contre dans la fourchette de ce qui a pu être observée lors d'autres évaluations effectuées à la même période. Cette variation des signaux observés pour **Q1** sera discutée plus loin dans ce chapitre.

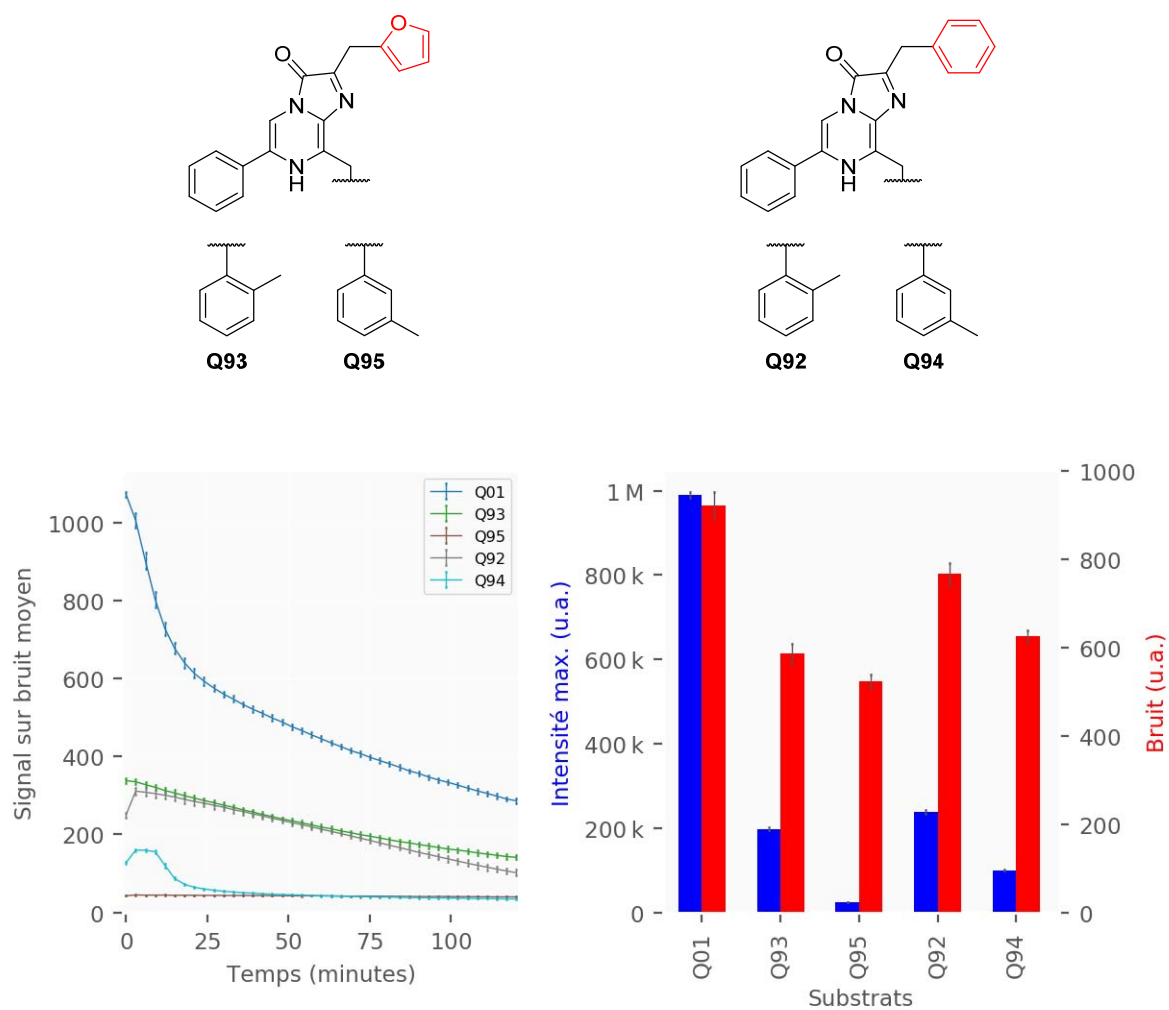


Figure 28 : structures et signaux des composés présentant un méthylbenzyle en position 8

Tableau 21 : valeurs caractéristiques des substrats possédant un méthylbenzyle en position 8

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (35 min)	1,0	1,0	1,0
Q93	0,2	2,8	0,6	0,6	0,2
Q95	0,0*	3,6	0,6	0,1	0,0*
Q92	0,2	2,6	0,8	0,7	0,3
Q94	0,1	0,5	0,7	0,1	0,1

* Valeur inférieure à 5 % de celle de **Q1**

II.C.2. Halogénobenzyles

Nous avons également étudié l'influence de l'ajout d'un halogène sur le benzyle en position 8. Un premier essai en série phényle de substitution en *para* (**Q74**, non montré) a montré une chute drastique de l'intensité lumineuse qui nous a conduit à ne plus introduire de modifications sur cette position.

En série furane, l'introduction d'un atome de chlore en position *ortho* (**Q87**) a entraîné une baisse de 40 % du signal lumineux et de 30 % du bruit moyen, permettant de conserver un rapport signal-bruit intéressant, mais a également permis une augmentation de 20 % du temps de demi-vie (66 min). La substitution en *méta* (**Q104**) plutôt qu'en *ortho*, cependant, a entraîné une suppression presque totale de la bioluminescence. Une même chute dans l'intensité du signal lumineux a déjà été décrite pour l'homologue méthylé **Q95**, laissant supposer que la présence d'un groupe encombrant à cette position est rédhibitoire pour l'enzyme.

La préparation d'analogues comportant des benzyles en position 8 fluorés en *ortho* ou en *méta* a toutefois conduit à des résultats très intéressants, avec une bioluminescence de **Q84** et **Q81** abaissée de 20 à 25 %, mais un temps de demi-vie dépassant les 90 minutes et une décroissance quasi-linéaire.

Enfin, deux substrats arborant un 5-méthylfurane en α de la position 2 ont également éveillé notre intérêt. Une substitution en *ortho* sur le benzyle par un atome de chlore (**Q98**) a ainsi permis d'obtenir un substrat ayant une bioluminescence aussi intense que la furimazine **Q1**, mais avec un bruit de fond presque deux fois moindre. De même, un atome de fluor en *ortho* sur le benzyle (**Q85**) a entraîné une légère baisse de luminosité par rapport aux précédentes évaluations de **Q3**, mais avec un temps de demi-vie presque doublée. L'analogue *méta*-fluoré **Q97** a également été synthétisé mais n'a pas été évalué sur la même plaque que ceux présentés ci-avant ; il est par conséquent décrit page 210.

Ces bons résultats obtenus grâce à la présence d'un atome de fluor sur le benzyle en position 8 (par ailleurs totalement originaux) nous ont incités à explorer un peu plus d'éventuels effets cumulatifs avec plusieurs atomes de fluor.

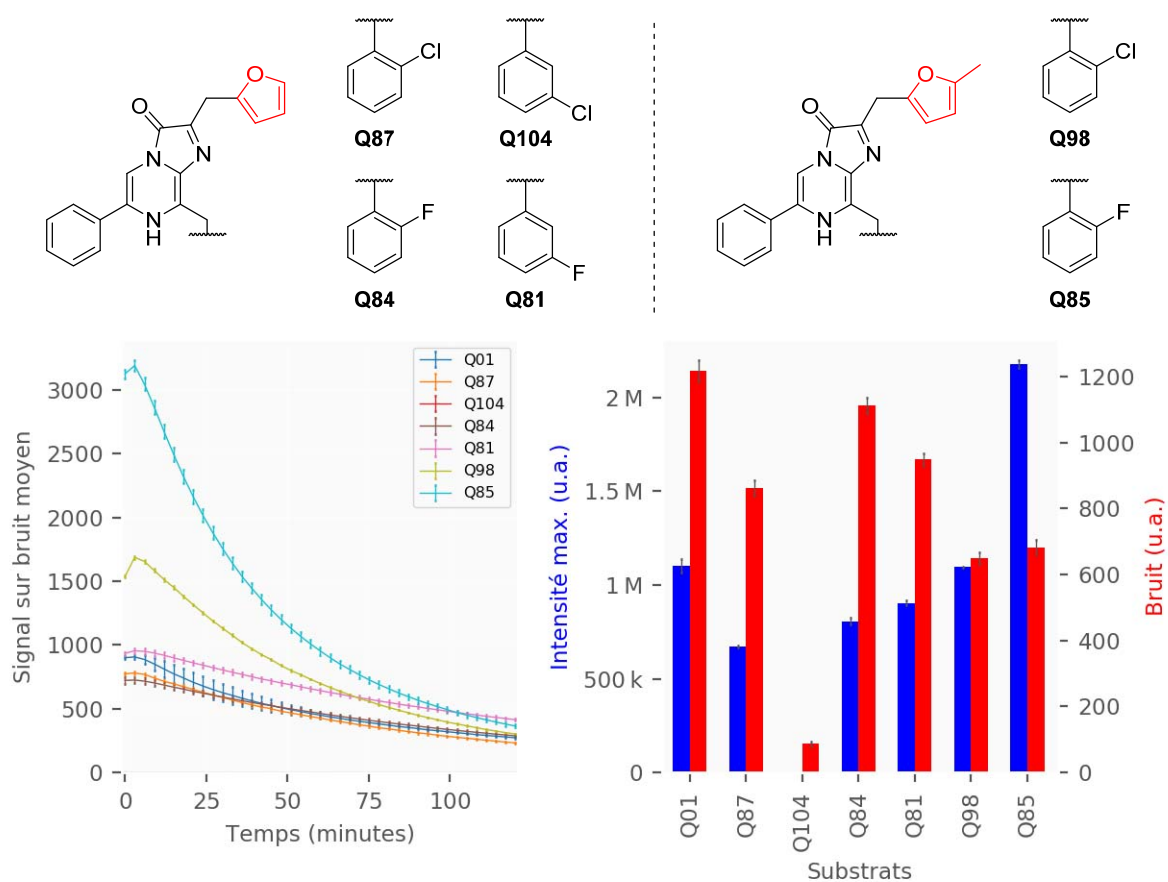


Figure 29 : structures et signaux des composés présentant un halogénobenzyle en position 8

Tableau 22 : valeurs caractéristiques des substrats possédant un halogénobenzyle en position 8

	I_{max}	t_{1/2}	Bruit moyen	Aire à t_{1/2}	Aire à 10 min
Q1	1,0	1,0 (57 min)	1,0	1,0	1,0
Q87	0,6	1,2	0,7	0,7	0,6
Q104	0,0*	0,1	0,1	0,0*	0,0*
Q84	0,7	1,6	0,9	1,2	0,7
Q81	0,8	1,7	0,8	1,5	0,8
Q98	1,0	0,8	0,5	0,9	1,0
Q85	2,0	0,6	0,6	1,2	1,9

* Valeur inférieure à 5 % de celle de **Q1**

II.C.3. Fluorobenzyles et difluorobenzyles

a. en série furane

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la substitution en *méta* du benzyle en position 8 avec un atome de fluor (**Q81**) a permis une augmentation de 60 à 70 % du temps de demi-vie du signal au détriment d'une baisse modérée de la bioluminescence ainsi que du bruit de fond de l'ordre de 20 %. Une amélioration similaire a été observée en substituant en *ortho* avec un fluor (**Q81**) et nous avons essayé de déterminer si des effets cumulatifs étaient observables en disubstituant le noyau benzène.

La fluoration des deux positions *ortho* (**Q102**) a entraîné une baisse de 30 % de la bioluminescence, sans amélioration particulière du temps de demi-vie ou du bruit de fond par rapport à la furimazine **Q1**.

La disubstitution en positions 2 et 3 (**Q107**), par contre, a permis d'observer une intensité maximale de bioluminescence similaire à **Q1**, mais avec un bruit moyen 20 % moindre et un temps de demi-vie allongé de 60 % (environ 90 minutes). *A contrario*, une disubstitution en 2,5 (**Q109**) ou en 3,5 (**Q103**) a entraîné une chute de 70 à 80 % de l'intensité maximale observée, mais également une stabilité du signal dans le temps remarquable, avec des temps de demi-vie calculés supérieurs à deux heures et demie ! Les variations du signal de bioluminescence observées entre ces différents substrats laissent supposer l'existence d'interactions particulières avec la poche enzymatique, en supplément de « simples » effets électroniques.

Plus généralement, une substitution en *méta* par un atome de fluor a permis d'obtenir des substrats possédant un temps de demi-vie plus important.

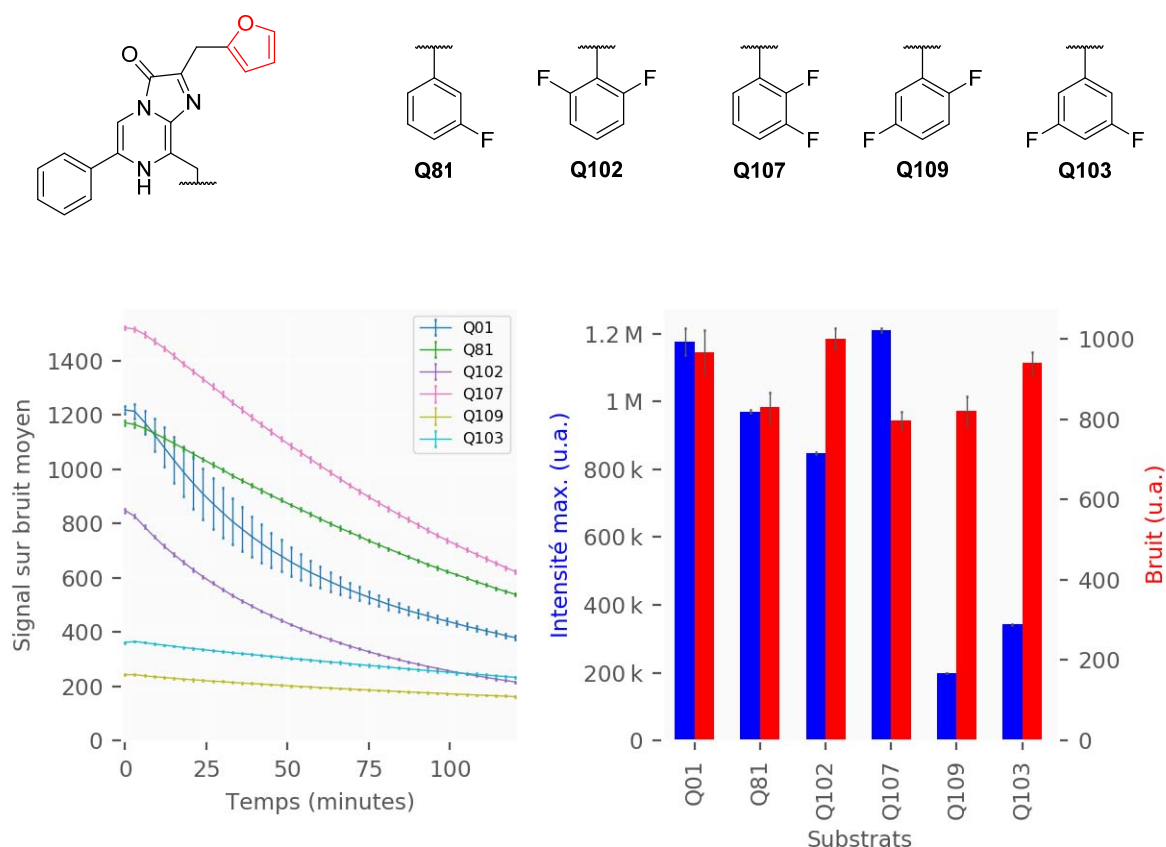


Figure 30 : structures et signaux des composés en série furane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

Tableau 23 : valeurs caractéristiques des substrats en série furane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q01	1,0	1,0 (57 min)	1,0	1,0	1,0
Q81	0,8	1,8	0,9	1,6	0,8
Q102	0,7	0,9	1,0	0,7	0,7
Q107	1,0	1,6	0,8	1,8	1,0
Q109	0,2	2,1 (180 min) [‡]	0,8	0,4	0,2
Q103	0,3	2,1 (160 min) [‡]	1,0	0,7	0,3

[‡] Les temps de demi-vie relatifs présentés dans le tableau correspondent au dernier instant où l'intensité de bioluminescence était supérieure ou égale à son intensité maximale, d'où une même valeur relative de 2,1 pour les substrats très stables dans le temps (120 minutes, durée de l'expérience, comparées à 57 min pour **Q1**). Les valeurs entre parenthèses ont été calculées pour chaque substrat à partir de l'équation de leurs courbes de régressions linéaires respectives ($R^2 = 0,99$).

b. en série 5-méthylfurane

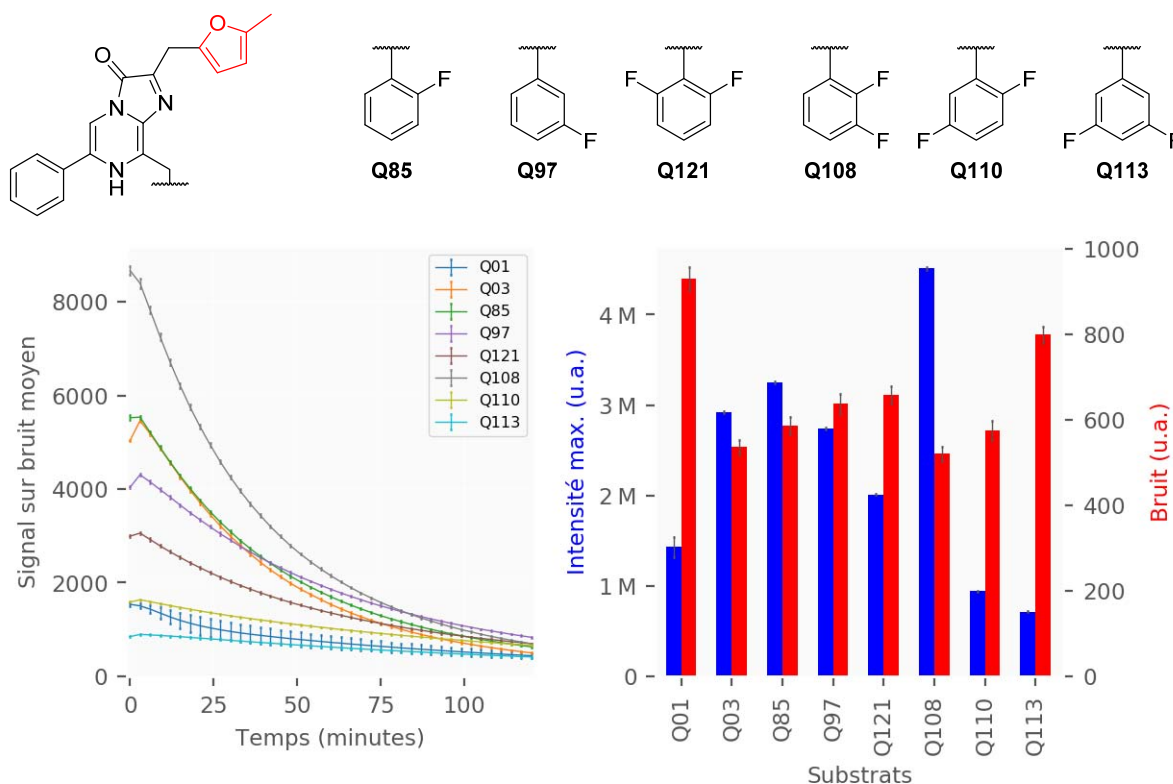


Figure 31 : structures et signaux des composés en série 5-méthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

Tableau 24 : valeurs caractéristiques des substrats en série 5-méthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q01	1,0	1,0 (51 min)	1,0	1,0	1,0
Q03	2,0	0,6	0,6	1,4	2,0
Q85	2,3	0,6	0,6	1,6	2,3
Q97	1,9	0,9	0,7	1,9	1,9
Q121	1,4	0,9	0,7	1,4	1,4
Q108	3,2	0,5	0,6	1,8	3,1
Q110	0,7	1,8	0,6	1,2	0,7
Q113	0,5	2,1 (108 min)	0,9	1,1	0,5

Comme nous l'avons mentionné en II.A.3, l'analogue méthylé **Q3** a ici été évalué avec une intensité maximale de bioluminescence plus faible qu'initialement, avec un signal « seulement » deux fois celui de la furimazine **Q1**.

Les relations structure–bioluminescence observées précédemment en série furane (Partie III : II.C.3.a) ont été confirmées dans cette série « 5-méthylfurane », avec des intensités de bioluminescence comparables entre **Q3**, **Q85** et **Q97**, et une augmentation sensible du temps de demi-vie pour le composé fluoré en *méa* (**Q97**). De même, les composés difluorés en 2,5 (**Q110**) et 3,5 (**Q113**) ont également montré des niveaux de bioluminescence réduits de 70 % relativement à leur homologue **Q3** avec des allongements du temps de demi-vie importants.

Enfin, l'analogue difluoré en 2,3 (**Q108**) a montré une intensité maximale en bioluminescence plus de trois fois supérieure à celle de la furimazine **Q1**, pour un rapport signal-bruit dans les premières minutes cinq fois plus important.

c. en série 5-éthylfurane

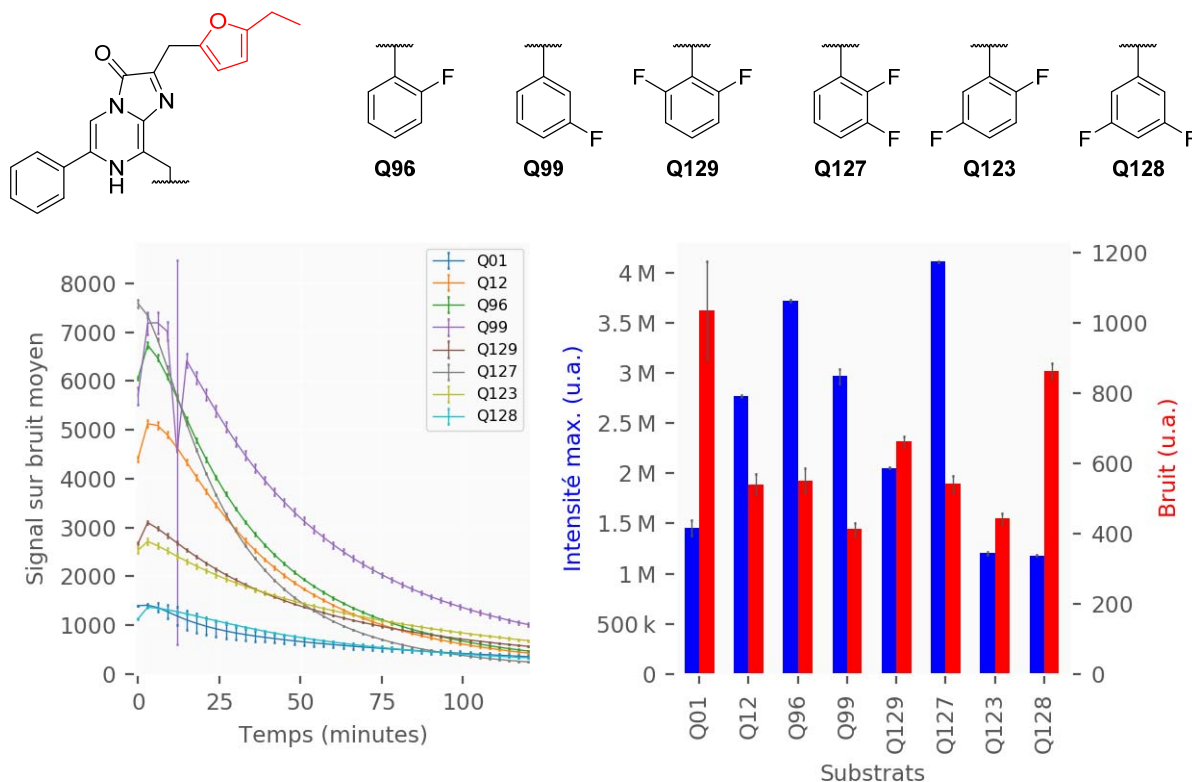


Figure 32 : structures et signaux des composés en série 5-éthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

Tableau 25 : valeurs caractéristiques des substrats en série 5-éthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

	I_{\max}	$t_{1/2}$	Bruit moyen	Aire à $t_{1/2}$	Aire à 10 min
Q01	1,0	1,0 (42 min)	1,0	1,0	1,0
Q12	1,9	0,8	0,5	1,6	1,9
Q96	2,5	0,7	0,5	1,9	2,5
Q99	2,0	1,0	0,4	2,1	2,0
Q129	1,4	1,0	0,6	1,4	1,4
Q127	2,8	0,5	0,5	1,5	2,7
Q123	0,8	1,3	0,4	1,0	0,8
Q128	0,8	1,3	0,8	1,0	0,8

Les relations structure-bioluminescence décrits ci-avant ont également été confirmées en série « 5-éthylfurane », avec néanmoins un gain nettement moins important en termes de durée du signal lumineux pour **Q123** et **Q128**. La courbe de **Q99** présente un point aberrant en bioluminescence entraînant une augmentation drastique de l'erreur sur la mesure à 10 minutes, qui ne devrait toutefois influencer que modérément les valeurs caractéristiques de ce substrat (principalement les aires mesurées).

d. en série 4,5-diméthylfurane

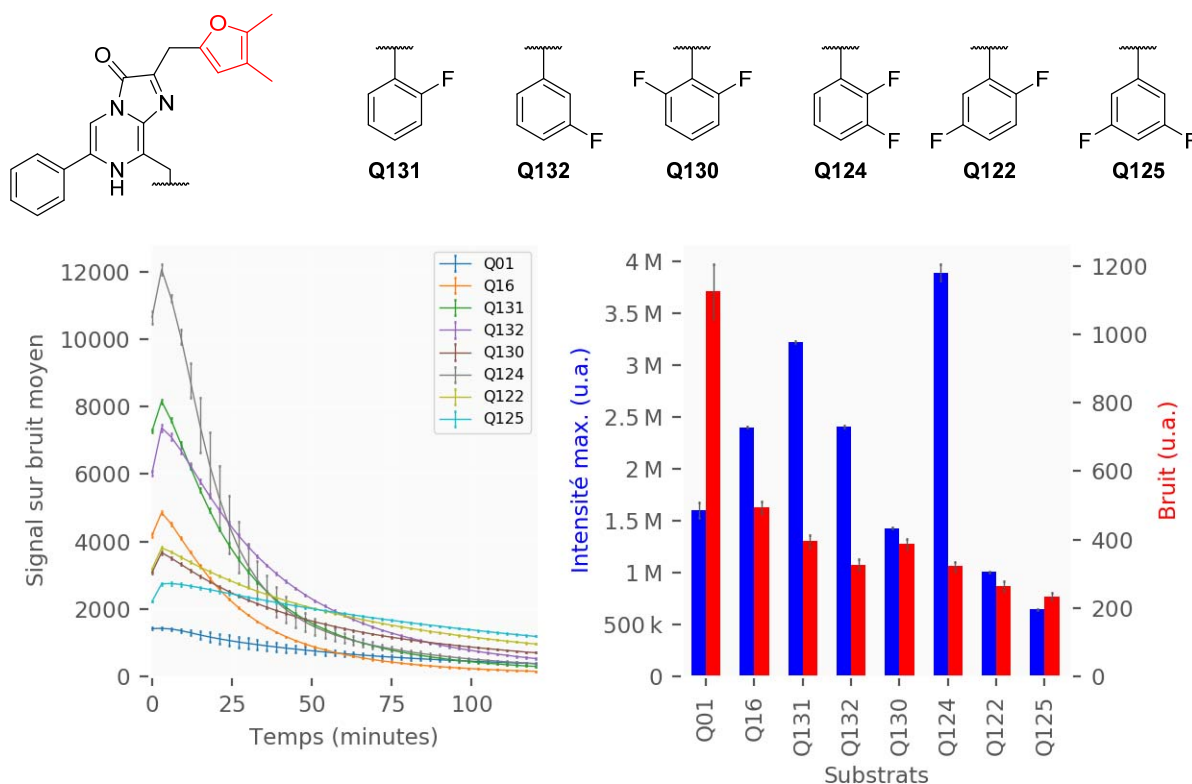


Figure 33 : structures et signaux des composés en série 4,5-diméthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

Tableau 26 : valeurs caractéristiques des substrats en série 4,5-diméthylfurane présentant un (di)fluorobenzyle en position 8

	I _{max}	t _{1/2}	Bruit moyen	Aire à t _{1/2}	Aire à 10 min
Q01	1,0	1,0 (54 min)	1,0	1,0	1,0
Q16	1,5	0,4	0,4	0,6	1,4
Q131	2,0	0,4	0,4	0,9	1,9
Q132	1,5	0,6	0,3	0,9	1,4
Q130	0,9	0,8	0,3	0,7	0,9
Q124	2,4	0,3	0,3	0,9	2,3
Q122	0,6	1,0	0,2	0,6	0,6
Q125	0,4	1,8	0,2	0,8	0,4

Le même profil que ce que nous avons décrits en série « 5-méthylfurane » et « 5-éthylfurane » a été retrouvé dans cette série « 4,5-diméthylfurane ».

Les intensités maximales observées sont légèrement plus faibles que les séries précédentes, ce qui a été néanmoins compensé par un bruit moyen remarquablement plus faible (entre 60 et 80 %) pour ces substrats.

II.C.4. Fluorobenzyles et trifluorométhylbenzyles en série phényle

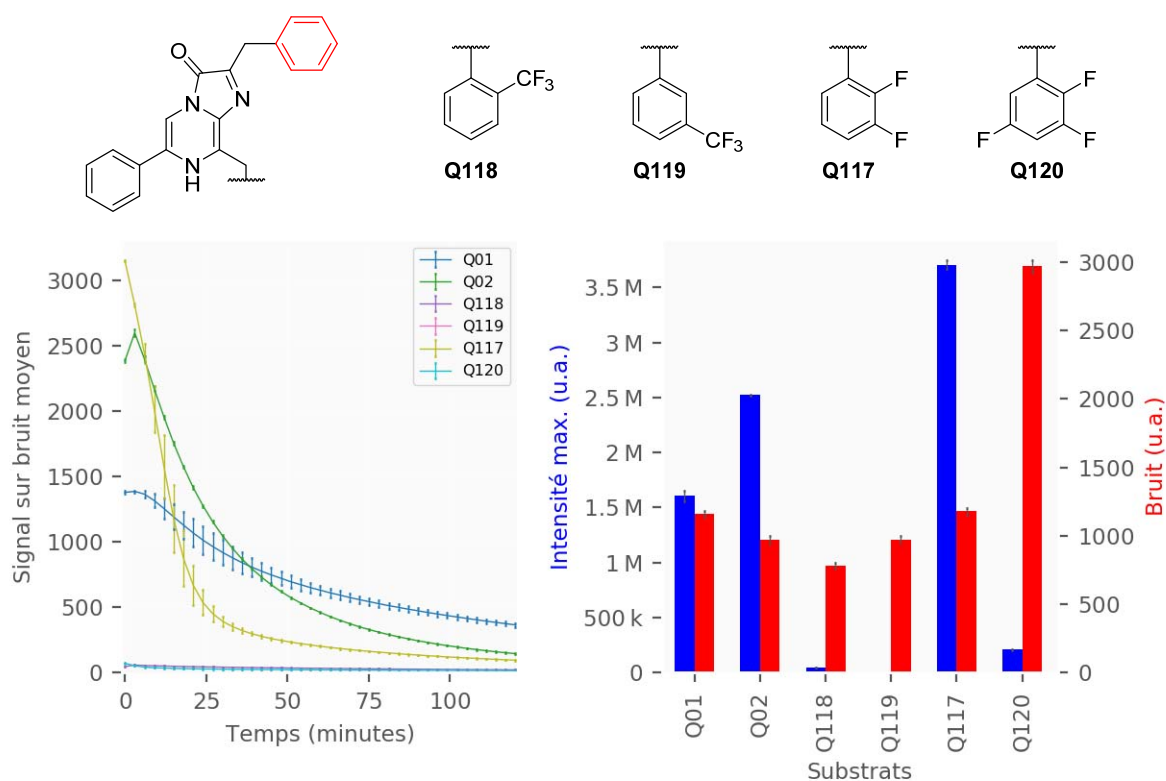


Figure 34 : structures et signaux des composés en série phényle présentant des benzyles en position 8 substitués

Tableau 27 : valeurs caractéristiques des substrats en série phényle présentant des benzyles en position 8 substitués

	I _{max}	t _{1/2}	Bruit moyen	Aire à t _{1/2}	Aire à 10 min
Q01	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Q02	1,6	0,4	0,8	0,7	1,5
Q118	0,0	1,4	0,7	0,0	0,0
Q119	0,0	2,4	0,8	0,0	0,0
Q117	2,3	0,2	1,0	0,5	1,9
Q120	0,1	0,2	2,6	0,0	0,1

L'amélioration de l'intensité maximale observée en séries « furane » grâce à un 2,3-difluorobenzène en α de la position 8 a été également mesurée en série phényle. Ainsi, **Q117** permet une augmentation de 30 % du signal relativement à **Q2**, avec toutefois une décroissance relativement rapide du signal.

Nous avons également essayé un composé trifluoré **Q120** avec l'espoir de combiner l'intensité des composés 2,3 difluorés et la stabilité des analogues 3,5 difluorés. Malheureusement, ce substrat n'a montré qu'une très faible bioluminescence, avec par contre un triplement du bruit de fond non observé dans le reste de ces séries fluorées.

Enfin, la trifluorométhylation du noyau aromatique en *ortho* (**Q118**) comme en *méta* (**Q119**) a entraîné une chute quasi-totale de la bioluminescence. Si cela était prévisible pour la position *méta* où la gêne stérique semble être un facteur crucial (voir par exemple **Q94**, **Q95** et **Q104**), il semble plus difficile de tirer des conclusions pour l'analogue **Q118**.

III - DISCUSSION

De nombreux substrats ont pu être testés au laboratoire grâce à une voie de synthèse permettant un accès à une très grande variété d'analogues, comportant des modifications sur tous les cycles aromatiques substituant le noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one. La possibilité de tester les substrats par lots (dix par dix, au maximum), l'automatisation de l'injection d'enzyme juste avant la première lecture et le suivi de la décroissance de la bioluminescence sur deux heures ont permis de définir le comportement de nos substrats de façon plus précise que ce que l'on peut habituellement trouver dans la littérature.

Nous regrettons en effet que les auteurs de publications scientifiques n'indiquent que rarement le signal d'autoluminescence (bruit de fond) observé dans les conditions des tests rapportés, préférant plutôt (dans les meilleurs des cas) « corriger » la bioluminescence en soustrayant ce bruit de fond du signal mesuré. Il est dans ces conditions impossible de choisir sciemment entre deux substrats ayant une même intensité décrite (par exemple 200 u.a.), mais pouvant avoir des ratios bioluminescence–autoluminescence très différents (201:1 ou 400:200, par exemple). C'est pourtant cette dernière valeur qui majore la probabilité durant un test biochimique d'observer un signal bioluminescent statistiquement différent du bruit de fond.*

Il convient toutefois pour commencer cette discussion d'aborder quelques problèmes rencontrés avec notre protocole d'évaluation des substrats après l'expression *in vitro* d'un nouveau lot de nanoKAZ au beau milieu du projet. Nous avons en effet obtenu avec les aliquotes de ce nouveau lot des signaux de bioluminescence pour notre standard interne **Q1** présentant des allures inhabituelles (p. ex. Figure 28), sur un ou plusieurs puits, entraînant parfois des écarts types très importants sur la valeur de bioluminescence observée et rendant la comparaison des autres substrats au standard extrêmement délicate. Il nous a été possible connaissant l'allure habituelle du signal de bioluminescence de la furimazine d'écarter des données certains puits manifestement aberrants afin de réussir à évaluer nos substrats originaux et d'orienter la synthèse de nouveaux composés, ce qui n'est toutefois pas acceptable pour la publication de résultats sans étude supplémentaire.

La résolution de ces problèmes de reproductibilité est bien évidemment une des priorités du laboratoire avec plusieurs pistes en cours d'exploration. Nous avons tout d'abord supposé une possible accumulation d'enzyme en tête du dispositif d'injection du luminomètre entraînant l'injection dans les premiers puits des plaques (contenant habituellement la furimazine **Q1**) de quantités variables d'enzyme selon les puits et, par conséquent, des variations conséquentes de luminosité. Malheureusement, des changements sur le plan de plaque n'ont pas supprimé les variations, réfutant cette hypothèse. Une seconde hypothèse en cours d'examen est que la concentration de substrat utilisée ne soit pas saturante (comme brièvement évoqué en Partie III : I.B) et que de faibles variations dans les volumes de substrats prélevés entraînent des changements importants de bioluminescence. Cette hypothèse n'est cependant pas privilégiée actuellement, car impliquerait probablement d'observer ces comportements pour d'autre substrats que **Q1**. Enfin, il est possible que des problèmes d'agréations aient lieu, ce qui pourrait

* Si l'on considère par exemple un test d'interactions protéine–protéine (voir Partie I : II.B.2, p. 20) où la reconstitution d'une activité luciférase ne s'effectue qu'une fois sur dix, le substrat à 201:1 permettra au mieux d'observer un signal vingt fois plus important que le bruit de fond, quand le second à 400:200 ne permettra probablement jamais de conclure.

expliquer les courbes à l'allure parfois « chaotiques », mais ne traduit pas non plus pourquoi ce problème n'apparaît quasi-exclusivement qu'avec la furimazine.

La synthèse de nombreux analogues a néanmoins permis de faire ressortir des tendances, exposées dans la Figure 35, relatives aux intensités maximales de bioluminescence, aux bruits moyens mesurés ou à l'évolution du signal lumineux dans le temps. Ces tendances ont été confirmées par ailleurs par Sophie Goyard et Thierry Rose, à l'Institut Pasteur, qui ont effectué des évaluations de ces mêmes substrats sur une chimère contenant la luciférase nanoKAZ produite *in cellulo* et excrétée dans le milieu, ainsi que pour quelques substrats sur cellule entière.

Nous avons ainsi découvert que l'alkylation du noyau furane de la furimazine **Q1** permettait une augmentation conséquente de l'intensité maximale de bioluminescence, avec en contrepartie une baisse du temps de demi-vie. Étonnamment, ces substitutions n'avaient jamais été explorées par Promega lors du développement de la furimazine, ni revendiquées dans les brevets originaux.^{99, 163, 369} Un brevet plus récent par Shakhmin *et al.*¹⁶⁷ revendique désormais la « méthylfurimazine » **Q3**, sans toutefois fournir de données de bioluminescence pour ce substrat.

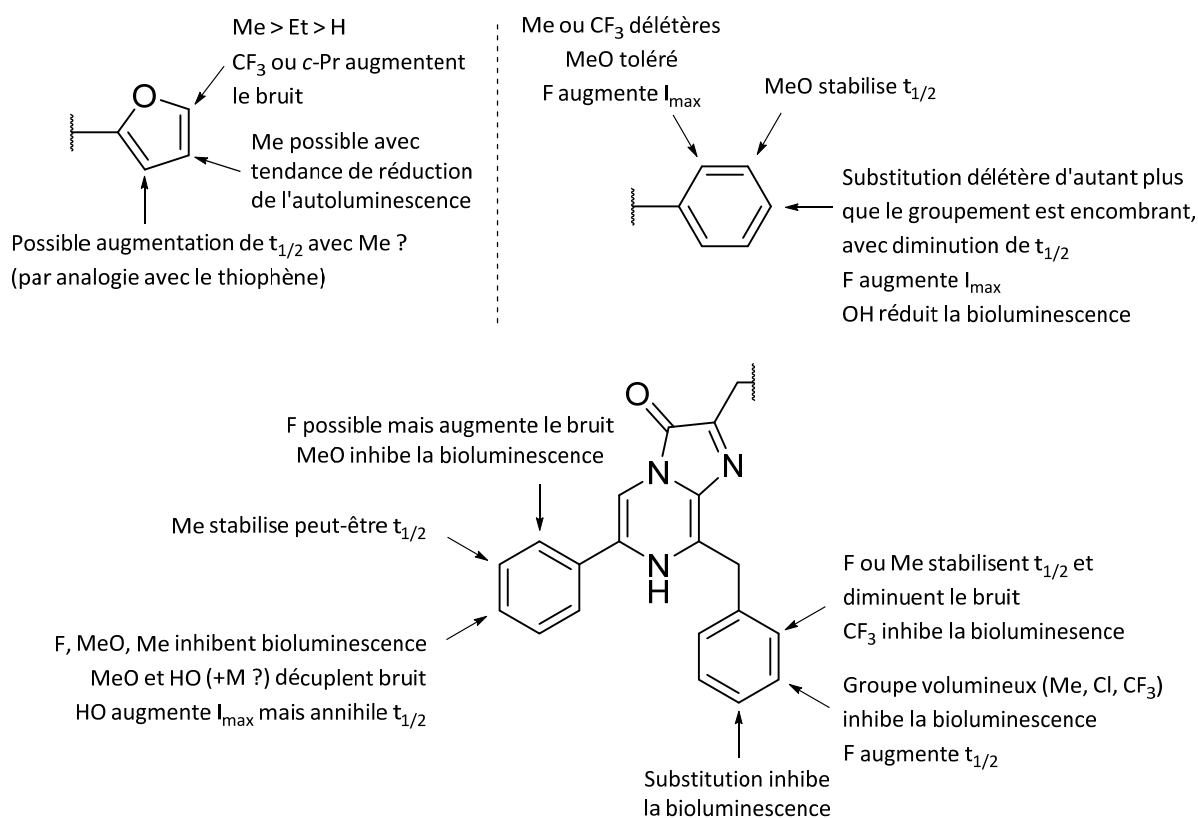


Figure 35 : récapitulatif des relations structure-luminescence observées

La substitution en *ortho* du phényle en α de la position 2 s'est avérée délétère pour le signal lumineux dans certains cas (méthyle, trifluorométhyle) mais tolérée avec des substituants mésomères donneurs (fluor, méthoxy), ce qui pourrait traduire l'établissement de liaisons hydrogène ou d'interactions π dans le site actif de l'enzyme. Un article récent³⁷⁰ rapportant une augmentation de la propension de l'oxygène du furane à établir des liaisons hydrogène lorsqu'il est alkylé et le fait que le noyau aromatique en α de la position 2 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one soit forcément proche des résidus protéiques

permettant la réaction du substrat avec le dioxygène peuvent être un faisceau d'indices soutenant cette hypothèse.

Les modifications que nous avons apportées sur le benzyle en position 8 se sont également montrées intéressantes, avec des relations structure–bioluminescence reproductibles sur plusieurs séries de substrats. Ainsi, la présence d'un atome (chlore) ou groupe d'atomes (méthyle, trifluorométhyle) volumineux en *méta* sur le benzyle a systématiquement entraîné une chute importante de la bioluminescence, probablement causée par une gêne stérique dans le site actif de l'enzyme, et un comportement similaire a pu être observé en substituant en *para*.

Nous avons été très agréablement surpris par l'influence nette d'un fluor positionné en *méta* ou en *ortho* du benzyle en position 8, qui permet un allongement significatif du temps de demi-vie en série furane. Ceci a également été observé en séries alkylfuranes, dont les substrats perdent en demi-vie ce qu'ils gagnent en luminescence, mais où une synergie avec ce *m*-fluorobenzyle a permis d'observer une luminescence soutenue plus longtemps qu'avec un simple benzyle.

La substitution par deux atomes de fluor du benzyle a également permis d'observer sur une même série des comportements radicalement différents, avec une très forte intensité et un temps de demi-vie réduit (substitutions 2,3) ou des intensités faibles à moyennes mais avec des temps de demi-vies importants (substitutions 2,5 ou 3,5). La synergie avec les modifications en position 2 a ainsi permis l'obtention de substrats originaux affichant des rapports signal–bruit moyen entre 5 à 10 fois celui de la furimazine, et d'autres entre 20 à 60 % moins intenses mais avec des temps de demi-vie doublés voire triplés.

Enfin, l'enzyme s'est montrée assez restrictive envers les modifications apportées au noyau aromatique en position 6, la plupart des substitutions inhibant la bioluminescence. Il est toutefois intéressant de remarquer l'influence drastique d'un groupement méthoxyle ou hydroxyle en *para*, qui entraîne un décuplement de l'autoluminescence du substrat, traduisant une stabilité moindre dans le milieu en présence d'oxygène. De même, la simple présence d'un hydroxyle transforme la furimazine **Q1** en **Q80**, passant d'un composé avec un temps de demi-vie de près d'une heure à un trois fois plus lumineux mais dont la bioluminescence chute de moitié en moins de trois minutes.

Cette différence nous amène à une considération plus générale portant sur l'ensemble des analogues synthétisés : plus le signal de bioluminescence est intense à son maximum, plus le temps de demi-vie semble court. Nous avons tout d'abord pensé que le déclin de la bioluminescence correspondait à la consommation du substrat qui finissait par se trouver en quantité trop peu suffisante pour soutenir la luminescence. Cependant, nos collègues nous ont souligné que si un rajout de luciférase entraîne de nouveau une luminescence soutenue, l'ajout de substrat supplémentaire ne le permet pas, ce qui traduit une perte de l'activité luciférase par une dégradation de l'enzyme. Dès lors, si l'intensité maximale de bioluminescence observée est probablement fonction de l'affinité du substrat pour la luciférase, la demi-vie du signal est sans doute influencée par bien d'autres paramètres dont la détermination exacte nous semble être un enjeu crucial pour l'évolution des tests *in vitro* utilisant la bioluminescence comme système rapporteur, et que nous détaillerons plus avant dans les perspectives ouvertes par ce projet de thèse.

Conclusion et perspectives

La multiplication des criblages à haut débit ou de l'imagerie sur cellule unique, par exemple, a été rendue possible par l'essor à partir de 1972³⁷¹ de la recombinaison génétique permettant l'expression par des organismes vivants de protéines ne faisant pas initialement partie de leur patrimoine génétique. Il était dès lors possible de faire exprimer par un organisme (et désormais *in vitro*) des chimères protéiques ou encore d'inhiber certaines fonctions fondamentales de lignées cellulaires, et il devenait indispensable de pouvoir observer à l'échelle macroscopique les modifications effectuées à l'échelle cellulaire, même si l'organisme ne présentait pas de changement phénotypique majeur. Cela a mené au développement de nombreux systèmes rapporteurs permettant la mesure du niveau d'expression, notamment par radioactivité, fluorescence ou bioluminescence. La découverte de la protéine fluorescente verte (GFP, *Green Fluorescent Protein*) par Osamu Shimomura en 1962^{44, 170} permettra ainsi 30 années plus tard l'observation directe de l'expression de la β -tubuline dans les larves du ver *C. elegans*¹¹¹ à divers stades de son développement. Les avantages innombrables de cette protéine par rapport à d'autres techniques mèneront au développement de nombreux mutants de la GFP,¹¹³ aboutissant en 2008 à l'attribution du Prix Nobel de Chimie à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien.

Parallèlement, les recherches sur la faune marine bioluminescente mèneront à l'identification et à la purification d'enzymes, appelées luciférase, capables de catalyser l'oxydation de substrats et aboutissant à l'émission de lumière. Des luciférase structurellement différentes ont ainsi pu être isolées de *Gaussia princeps* (GLuc), *Vargula hilgendorfii* (VLuc), *Renilla reniformis* (RLuc) ou encore *Oplophorus gracilirostris* (OLuc), et ont chacune été utilisées comme système rapporteur, par exemple pour visualiser l'expression de gènes.^{95, 372-373} Toutes ces luciférase se sont avérées posséder des substrats partageant un noyau commun imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one.^{40, 42, 155, 178, 199} L'engouement pour les systèmes rapporteurs bioluminescents d'origine marine, ne nécessitant pas d'ATP comme cofacteur, a amené à la création de mutants plus stables, plus lumineux ou émettant à des longueurs d'ondes différentes ; parmi eux, nanoKAZ/NanoLuc®, un mutant du cœur catalytique de la luciférase d'*Oplophorus gracilirostris*, a été décrit en 2012 par Hall *et al.*⁹⁹ et se caractérise par sa petite taille (19 kDa), une intensité lumineuse et un temps de luminescence importants, une stabilité thermique accrue et une utilisation possible sur une large gamme de pH.

Il est intéressant de noter que les caractéristiques améliorées de nanoKAZ ne sont pas que le fruit des mutations apportées à l'enzyme mais également de l'élaboration d'un nouveau substrat, la furimazine, plus stable que le substrat d'OLuc sauvage, la coelentérazine. C'est cette amélioration conséquente du signal lumineux « simplement » en modifiant le substrat qui a amené notre groupe, à l'initiative d'un collègue biologiste de l'Institut Pasteur, à entreprendre la synthèse de nouvelles imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones dont le potentiel en bioluminescence serait ensuite évalué sur nanoKAZ, permettant l'établissement de relations structure-bioluminescence ; ce qui a fait l'objet de ce travail de thèse.

Nous avons développé au laboratoire une synthèse de ces luciférines potentielles dans laquelle les α -aminoesters ont occupé une place prépondérante, que ce soit comme partenaires de couplage des 2-chloropyrazines, mais aussi dans la synthèse de ces dernières, et nous avons par conséquent cherché à explorer les limites de plusieurs voies d'accès à ces α -aminoesters.

Les synthèses utilisant le nitroacétate d'éthyle, via la condensation d'un aldéhyde ou la réaction d'un acétal en présence d'anhydride acétique, se sont confrontées aux réactivités du groupement nitro ou du

furfural et la nécessité pour cette dernière méthode d'avoir des aldéhydes enrichis en électrons. Nous avons néanmoins pu synthétiser grâce à ces méthodes une dizaine d' α -aminoesters avec des rendements entre 5 et 57 % en trois ou quatre étapes.

Une autre voie d'accès aux α -aminoesters commençant par la réaction canonique de Knoevenagel entre des aldéhydes aromatiques et le malonate de diéthyle s'est montrée beaucoup plus permissive, avec cette première étape de condensation quantitative dans la plupart des cas. La réduction subséquente par hydrogénation catalytique de l'arylidènemalonate s'est également montrée robuste, alors que son alternative au tétrahydruroborate de sodium pour les réactifs incompatibles avec une hydrogénation au palladium s'est avérée les sur-réduire partiellement. Il semble néanmoins qu'il soit possible de limiter les réactions secondaires en employant d'autres sources d'hydrures (le tétrahydruroborate de tétraméthylammonium, par exemple), ce qui laisse penser qu'on pourra optimiser cette étape dans le futur. La transformation des 2-(arylméthyl)malonates en α -hydroxyiminoesters à l'aide d'alkylnitrites a également été précieuse, permettant d'éviter une mono-saponification suivie d'une réaction de Curtius, mais reste probablement l'étape limitante de cet accès synthétique aux α -aminoesters ; la réduction de l'oxime en amine procédant généralement avec d'excellents rendements. Nous avons ainsi pu synthétiser au laboratoire une quarantaine d' α -aminoesters (dont la moitié par l'auteur) avec des rendements depuis l'aldéhyde aromatique entre 22 et 81 % (avec un « accident » à 9 %).

Enfin, une dernière voie d'accès permettant d'obtenir des alkylfurylalaninates d'éthyle à partir d'alkylfuranes et de 3-bromo-2-hydroxyiminopropanoate d'éthyle a été explorée. Cette réaction de cycloaddition [4+2] a malheureusement résisté à nos tentatives d'optimisation, avec des rendements plafonnant autour de 50 %. Si cette limite découle d'une isomérisation *cis/trans* du 2-nitrosoacrylate d'éthyle formé *in situ* par élimination de bromure d'hydrogène (dont seul l'isomère *cis* est susceptible de procéder à une cycloaddition), il est envisageable que le rendement de cette réaction puisse être amélioré par son chauffage ; la réactivité du furane en présence d'acide nous ayant pour l'instant découragé d'essayer. Cette réaction est cependant, même avec 50 % de rendement, l'accès le plus aisé aux alkylfurylalaninates d'éthyle et les coûts plus modérés des alkylfuranes comparés aux alkylfurfurals renforcent encore son attractivité.

Les α -aminoesters ont ensuite été utilisés comme réactifs dans la synthèse des 2-hydroxypyrazines, soit après conversion en α -aminoamides pour procéder à une condensation sur un arylglyoxal, soit par une route originale que nous avons développée. Ce premier accès s'est révélé peu performant à cause des problèmes de régiosélectivité inhérents à cette double condensation, mais aussi car nous n'avons pas réussi à reproduire certaines synthèses d'arylglyoxals décrites dans la littérature. Le second accès a quant à lui permis d'accéder en quatre étapes aux 2-hydroxypyrazines, avec une succession de réussites non triviales : l'addition-1,4 réversible des α -aminoesters sur les β -nitrostyrènes rendue possible en l'absence de solvant, l'adduit-1,4 résultant qui est remis en solution mais néanmoins suffisamment stabilisé par l'acide chlorhydrique pour permettre la réduction du groupement nitro, et enfin le développement de deux méthodes d'aromatisation des pipérazin-2-ones, jamais décrites précédemment, pour obtenir au laboratoire une quarantaine de 2-hydroxypyrazines (dont sept par l'auteur) avec des rendements à partir des α -aminoesters correspondant compris entre 20 et 50 %.

L'étape d'activation des 2-hydroxypyrazines préalable au couplage de Buchwald-Hartwig a été rendue possible grâce à la différence de réactivité entre le trichlorure de phosphoryle, qui n'a donné que de

médiocres conversions, et le dichlorure de phénylphosphoryle, qui a abouti à des conversions complètes dans l'extrême majorité des cas, avec des rendements compris entre 43 % (purification par recristallisation) et 90 % (purification par chromatographie) de 2-chloropyrazines.

L'amination de Buchwald–Hartwig, cruciale dans le cadre de notre synthèse, a nécessité de nombreuses optimisations malgré la publication de précédents assez proches dans la littérature. Nous avons déterminé des conditions de couplage compatibles avec la fonction ester des α -aminoesters et la sensibilité thermique du produit de la réaction, en utilisant le carbonate de césium comme base à faible température dans l'acétonitrile. Nous avons par la suite dû effectuer à nouveau un changement de solvant afin de pouvoir procéder à l'amination des 2-chloropyrazines avec des rendements satisfaisants lorsque les réactifs étaient très lipophiles (polyfluorés, par exemple). Ces conditions ne nous ont toutefois pas permis la N-arylation d'amines possédant un carbone quaternaire (et non tertiaire) en α .

La détermination des conditions optimales pour effectuer ces réactions de couplage a été très chronophage, avec près de 130 réactions par l'auteur (240 au laboratoire), pour finalement obtenir une quarantaine de produits originaux (130 au laboratoire) avec des rendements non corrigés par rapport à la conversion entre 37 et 91 %. Comme la majorité des réactions de couplage au palladium, les rendements semblent proportionnels au temps que l'on peut consacrer à l'optimisation ; par conséquent, si de nombreuses conditions ont dû être évaluées pour obtenir nos cibles synthétiques, parfois avec des rendements faibles, il sera certainement possible pour des substrats particuliers d'obtenir d'excellents rendements si une montée en échelle devait être effectuée.

La dernière étape de notre voie de synthèse est la cyclisation des *N*-(pyrazin-2-yl)aminoesters en acétates d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles, ces derniers pouvant aisément être déprotégés afin d'obtenir les imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones souhaitées. Cette dérivatisation a déjà été évoquée dans la littérature comme un moyen de libérer au fil du temps le substrat *in vivo*, l'acétyle pouvant être clivé en milieu biologique par des estérases. Cependant, nous avons découvert que les substrats *O*-acétylés possédaient de nombreux avantages en comparaison avec leurs homologues déprotégés. Ils sont en effet stables à température ambiante pendant plusieurs années et inertes en présence d'oxygène quand les imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones doivent être conservées à -20 ou -80 °C et s'oxydent spontanément à l'air. De plus, ils sont pour la plupart solides et peuvent être purifiés par recristallisation ou par chromatographie sur gel de silice, pour obtenir finalement les substrats *O*-protégés avec des rendements entre 29 et 82 % (ces rendements sont hautement dépendants de la technique de purification utilisée et de l'échelle de la réaction). La déprotection « à la demande » des acétates d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-yles en milieu légèrement acide permet ainsi d'effectuer des tests biochimiques avec une solution mère dont le titre est parfaitement connu et reproductible.

De nombreuses améliorations de notre voie de synthèse restent possibles, notamment une optimisation globale des rendements qui sont acceptables pour la génération rapide de nombreux analogues mais très limités dans une optique de production à plus grosse échelle d'une ou de quelques luciférine(s) pour nos collègues biologistes. Fort heureusement, de nombreuses pistes peuvent être explorées à cette fin. La synthèse des 2-hydroxypyrazines selon Jones, par condensation entre des α -aminoamides et des glyoxals, mérite à notre avis d'être étudiée en détail tant elle simplifierait et accélérerait l'accès à cette classe de molécules (ce qui reste d'ailleurs vrai hors du cadre restreint de la synthèse des

imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones). L'étape de chloration des 2-hydroxypyrazines a pu présenter des rendements assez variables et il est raisonnable de penser qu'il est possible de résoudre cela avec une étude plus précise des temps et températures de réaction. De même, la synthèse de certains α -aminoesters mérite d'être optimisée plus avant, notamment la réduction des arylidènemalonates et l'oximation subséquente. La réduction par des sources d'hydrures différentes, voire avec des catalyseurs métalliques compatibles avec la présence d'halogènes, serait intéressante pour la synthèse d' α -aminoesters fluorés. Enfin, il conviendrait de réexplorer l'étape finale d'hydrogénolyse des éthers benzyliques dans le cas où nous souhaitons obtenir des composés hydroxylés. En effet, si ces substrats ont une tendance à ne pas être optimaux pour nanoKAZ, d'autres enzymes tolèrent bien ces substitutions présentes dans les substrats naturels (GLuc ou RLuc, par exemple).

Nous avons synthétisé au laboratoire plus de 130 nouvelles luciférines potentielles (dont 43 par l'auteur) qui ont été évaluées sur l'enzyme nanoKAZ ; l'utilisation des α -aminoesters comme intermédiaires réactionnels ayant permis d'accéder à une variété importante de substitutions sur les positions 2 et 8 de l'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one qui était plus difficilement accessibles avec les synthèses publiées jusqu'ici. Parmi ces luciférines originales, plusieurs séries se sont avérées dignes d'intérêt. Ainsi, les composés présentant « en α » de la position 2 un alkylfurane ont montré une bioluminescence de 2 à 3 fois plus importante que la furimazine, souvent avec un bruit de fond réduit. Par ailleurs, la substitution du benzyle en position 8 par un ou des atomes de fluor (en *ortho* et/ou en *méta*) a fait émerger des profils de luminescence opposés, avec une stabilisation remarquable du signal lumineux au détriment de l'intensité, ou l'inverse. Ces modifications en 2 et en 8 peuvent rentrer en synergie pour obtenir avec les substrats correspondants des rapports signal-bruit moyen entre cinq et dix fois supérieurs à celui de la furimazine, ou bien moins intenses mais avec des temps de demi-vie doublés ou triplés (c'est-à-dire entre 2 et 3 heures !). Ce travail d'étude des relations structure-bioluminescence et les découvertes effectuées dans ce cadre ont d'ailleurs fait l'objet d'une demande de protection auprès de l'Office Européen des Brevets, en cours d'examen.

Les propriétés de bioluminescence de nouveaux substrats sont assez complémentaires et permettent de répondre aux différentes problématiques rencontrées par les biologistes et biochimistes. En effet, des criblages effectués en plaques 96 ou 384 puits nécessiteront autant que faire se peut un signal (quasi-)constant lors de la lecture des plaques, sur plusieurs dizaines de minutes. Au contraire, l'utilisation d'une luciférase comme système rapporteur en imagerie optique (*in cellulo* ou *in vivo*) bénéficiera d'une intensité maximale de bioluminescence élevée avec un bruit de fond minimal, mais ne nécessitera probablement pas un signal lumineux soutenu longtemps.

Il serait bien évidemment optimal de combiner ces caractéristiques, peu d'applications pouvant souffrir *a priori* d'un excès de lumière ou de stabilité. Des résultats obtenus avec nanoKAZ par Sophie Goyard et Thierry Rose, cependant, montrent que la principale cause de diminution de l'intensité lumineuse au cours du temps n'est pas la consommation du substrat mais une désactivation de la luciférase. L'origine de cette désactivation reste à déterminer précisément, mais quelques hypothèses peuvent raisonnablement être envisagées.

Tout d'abord, les luciférases sont des enzymes capables de créer des entités peroxydées extrêmement réactives, et il n'est pas déraisonné d'imaginer que le peroxyde **113** créé lors du cycle catalytique puisse,

au lieu de cycliser et conduire à la bioluminescence, subir une élimination et créer *in situ* un accepteur de Michael **114** (Schéma 74). Alternativement, un tel hydroperoxyde peut parfaitement réagir avec des résidus protéiques et désactiver par là même la luciférase.

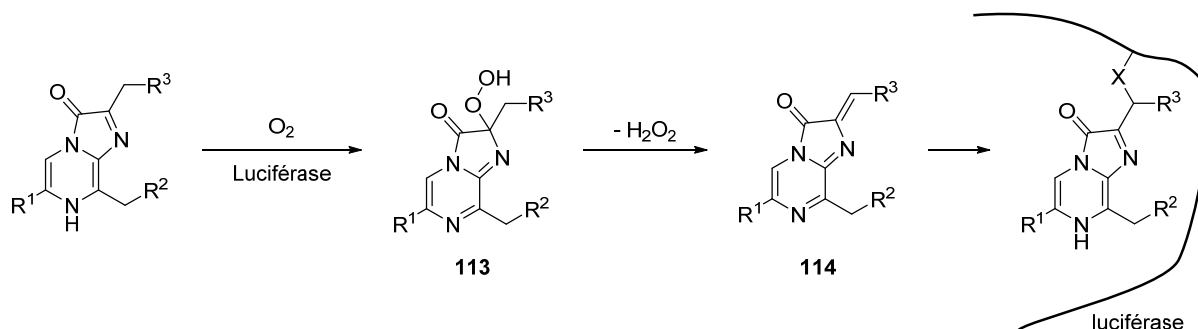


Schéma 74 : désactivation d'une luciférase par la formation d'une liaison covalente

De même, il est édifiant de comparer les bioluminescences des substrats présentant un *p*-hydroxyphényle en position 6, qui affichent des intensités maximales élevées mais conduisent à la désactivation totale de l'enzyme en quelques minutes, et celles de leurs homologues déshydroxylés qui montrent un signal soutenu pendant plus longtemps. Il est possible que ces substrats hydroxylés ou les coélucentéramides correspondantes sont suroxydés en un système conjugué « quinoïde » **115** pouvant également réagir avec de proches résidus et potentiellement bloquer le site actif de l'enzyme (Schéma 75).

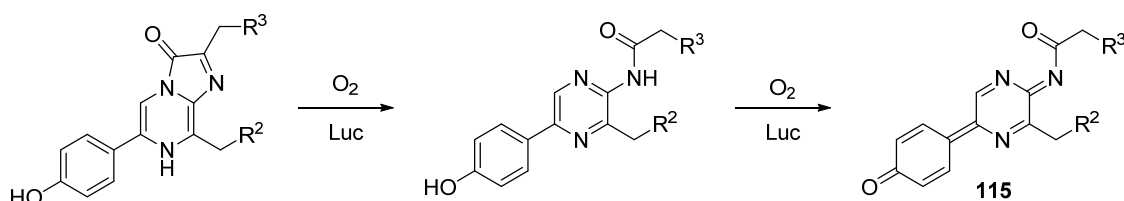


Schéma 75 : désactivation d'une luciférase via la formation d'un système « quinoïde » **115**

Nous pensons que la prochaine évolution majeure des systèmes luciférine(s)/luciférase(s) découlera de la compréhension de ce ou ces mécanismes de désactivation de l'enzyme et ne proviendra donc pas uniquement d'une modification des substrats mais de modifications combinées sur les deux éléments du couple. Nous souhaitons par conséquent mettre en place à l'Institut Pasteur des collaborations permettant des études structurales poussées. Ainsi, l'étude en spectrométrie de masse de solutions épuisées de luciférase pourrait permettre de déceler des enzymes ayant lié de manière covalente une molécule de substrat, voire même d'identifier le ou les résidus coupables ; ceci pourrait par la suite permettre de muter spécifiquement nanoKAZ afin d'éviter cette désactivation. De même, nous développons actuellement au laboratoire des inhibiteurs compétitifs des luciférines que nous espérons dans le futur pouvoir co-cristalliser avec nanoKAZ. En effet, si une structure cristallographique de cette enzyme a été publiée dans la *Protein Data Bank*, la co-cristallisation avec le substrat est évidemment impossible (ou impliquerait d'effectuer un criblage des conditions de cristallisation sous atmosphère inerte...) et ne permet pas de guider le développement de nouvelles luciférines. Toutes ces stratégies d'études structurales nécessitent cependant l'expression et la purification de quantités conséquentes de nanoKAZ, ce qui reste pour l'instant l'étape limitante de tous ces projets.

Enfin, il est important de noter que les nombreux analogues originaux de luciférines développés au laboratoire n'ont pour l'instant été évalués que sur une unique enzyme, nanoKAZ, dans des conditions *in vitro* relativement « clémentes ». Il sera intéressant dans le futur de développer des criblages croisés avec différentes enzymes (ou différents variants d'une enzyme) permettant d'identifier dans des conditions données le meilleur substrat à utiliser pour les analyses souhaitées.

D'ores et déjà, nous avons apporté à nos collaborateurs biologistes de nouveaux outils qui ont pu démontrer leur supériorité *in vitro*, en imagerie sur cellules entières ou avec des criblages à grande échelle sur des levures, et qui permettront, nous l'espérons, de nombreuses découvertes futures.

Bibliographie

1. Brecher, J., Graphical Representation Standards for Chemical Structure Diagrams (IUPAC Recommendations 2008). *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 277-411.
2. Clayden, J., *Organic Chemistry*. 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 2012; p 1234.
3. *The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information*. American Chemical Society: Washington, DC, 2006.
4. l'Ancien, P.; Littré, É., *Histoire Naturelle de Pline : avec la traduction en français*. Firmin-Didot et Cie: Paris, 1877; p 707.
5. Boyle, R., New Experiments Concerning the Relation between Light and Air (in Shining Wood and Fish). *Philos. Trans. Royal Soc.* **1666**, *2*, 581-600.
6. Boyle, R., Some Observations About Shining Flesh. *Philos. Trans. Royal Soc.* **1672**, *7*, 5108-5116.
7. Harvey, E. N., *Living Light*. Princeton University Press: Princeton, 1940.
8. Spallanzani, *Memorie di Matematica e di Fisica della società italiana*. Verona, 1794; Vol. VII.
9. Roda, A., A History of Bioluminescence and Chemiluminescence from Ancient Times to the Present. In *Chemiluminescence and Bioluminescence*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2010.
10. Dubois, R., Fonction photogénique chez le *Pholas dactylus*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **1887**, *39*, 564-566.
11. Dubois, R., La photogénèse ou production de la lumière par les êtres vivants. *Revue Gén. Sci. Pur. Appl.* **1916**, *27*, 511-516.
12. Shimomura, O., *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. Rev. ed.; World Scientific: Singapore; Hackensack, NJ, 2012; p 468.
13. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence: On the Presence of Luciferin in Luminous Bacteria. *Am. J. Physiol.* **1916**, *41*, 449-453.
14. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence: Light Production by a Japanese Pennatulid, *Cavernularia haberi*. *Am. J. Physiol.* **1917**, *42*, 349-358.
15. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence: The Chemistry of Light Production by the Fire-Fly. *Am. J. Physiol.* **1917**, *42*, 342-348.
16. Harvey, E. N., Studies on Bioluminescence: The Chemistry of Light Production in a Japanese Ostracod Crustacean, *Cypridina hilgendorffii*, Müller. *Am. J. Physiol.* **1917**, *42*, 318-341.
17. Harvey, E. N., *The Nature of Animal Light*. J. B. Lippincott: London, 1920.
18. Harvey, E. N., Bioluminescence and Fluorescence in the Living World. *Am. J. Physiol.* **1926**, *77*, 555-561.
19. Harvey, E. N., *Bioluminescence*. Academic Press: New York, 1952; p 649.
20. Devillers, I.; Dive, G.; De Tollenaere, C.; Falmagne, B.; De Wergifosse, B.; Rees, J.-F.; Marchand-Brynaert, J., Imidazolopyrazinones as Potential Antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2305-2309.
21. Dubuisson, M., Discovery and Validation of a New Family of Antioxidants: The Aminopyrazine Derivatives. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 421-435.

22. Haddock, S. H. D.; Moline, M. A.; Case, J. F., Bioluminescence in the Sea. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2010**, 2, 443-493.
23. Chew, A. L. C.; Desjardin, D. E.; Tan, Y.-S.; Musa, M. Y.; Sabaratnam, V., Bioluminescent Fungi from Peninsular Malaysia—a Taxonomic and Phylogenetic Overview. *Fungal Divers.* **2015**, 70, 149-187.
24. Airth, R. L.; McElroy, W. D., Light Emission from Extracts of Luminous Fungi. *J. Bacteriol.* **1959**, 77, 249-250.
25. Airth, R. L.; Foerster, G. E., The Isolation of Catalytic Components Required for Cell-Free Fungal Bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 97, 567-573.
26. Airth, R. L.; Foerster, G. E., Some Aspects of Fungal Bioluminescence. *J. Cell. Comp. Physiol.* **2005**, 56, 173-182.
27. Green, A. A.; McElroy, W. D., Crystalline Firefly Luciferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, 20, 170-176.
28. Bitler, B.; McElroy, W. D., The Preparation and Properties of Crystalline Firefly Luciferin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 72, 358-368.
29. Conti, E.; Lloyd, L. F.; Akins, J.; Franks, N. P.; Brick, P., Crystallization and Preliminary Diffraction Studies of Firefly Luciferase from *Photinus pyralis*. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **1996**, 52, 876-878.
30. McElroy, W. D.; Seliger, H. H.; White, E. H., Mechanism of Bioluminescence, Chemi-Luminescence and Enzyme Function in the Oxidation of Firefly Luciferin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1969**, 10, 153-170.
31. Seliger, H. H.; McElroy, W. D., Spectral Emission and Quantum Yield of Firefly Bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, 88, 136-141.
32. de Wet, J. R.; Wood, K. V.; Helinski, D. R.; DeLuca, M., Cloning of Firefly Luciferase cDNA and the Expression of Active Luciferase in *Escherichia coli*. *PNAS* **1985**, 82, 7870-7873.
33. Fan, F.; Wood, K. V., Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies* **2007**, 5, 127-136.
34. Martini, S.; Haddock, S. H. D., Quantification of Bioluminescence from the Surface to the Deep Sea Demonstrates Its Predominance as an Ecological Trait. *Scientific Reports* **2017**, 7, srep45750.
35. Shulman, I.; Moline, M. A.; Penta, B.; Anderson, S.; Oliver, M.; Haddock, S. H. D., Observed and Modeled Bio-Optical, Bioluminescent, and Physical Properties During a Coastal Upwelling Event in Monterey Bay, California. *J. Geophys. Res.* **2011**, 116.
36. Turkoglu, M., Red Tides of the Dinoflagellate *Noctiluca scintillans* Associated with Eutrophication in the Sea of Marmara (the Dardanelles, Turkey). *Oceanologia* **2013**, 55, 709-732.
37. Haygood, M. G., Light a Organ Symbioses in Fishes. *Critical Reviews in Microbiology* **1993**, 19, 191-216.
38. Dunlap, P. V.; Urbanczyk, H., Luminous Bacteria. In *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, Heidelberg: 2013.

39. Shimomura, O.; Goto, T.; Hirata, Y., Crystalline *Cypridina* Luciferin. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1957**, *30*, 929-933.
40. Kishi, Y.; Goto, T.; Hirata, Y.; Shimomura, O.; Johnson, F. H., *Cypridina* Bioluminescence I: Structure of *Cypridina* Luciferin. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7*, 3427-3436.
41. Hori, K.; Charbonneau, H.; Hart, R. C.; Cormier, M. J., Structure of Native *Renilla reniformis* Luciferin. *PNAS* **1977**, *74*, 4285-4287.
42. Inoue, S.; Kakoi, H.; Murata, M.; Goto, T.; Shimomura, O., Complete Structure of *Renilla luciferin* and Luciferyl Sulfate. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 2685-2688.
43. Shimomura, O., Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5590-5602.
44. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y., Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239.
45. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y., Further Data on the Bioluminescent Protein, Aequorin. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1963**, *62*, 1-8.
46. Kishi, Y.; Tanino, H.; Goto, T., The Structure Confirmation of the Light-Emitting Moiety of Bioluminescent Jellyfish *Aequorea*. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 2747-2748.
47. Shimomura, O.; Johnson, F. H., Chemical Nature of the Light Emitter in Bioluminescence of Aequorin. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 2963-2966.
48. Shimomura, O.; Johnson, F. H., Peroxidized Coelenterazine, the Active Group in the Photoprotein Aequorin. *PNAS* **1978**, *75*, 2611-2615.
49. Head, J. F.; Inouye, S.; Teranishi, K.; Shimomura, O., The Crystal Structure of the Photoprotein Aequorin at 2.3 Å Resolution. *Nature* **2000**, *405*, 372-376.
50. Liu, Z.-J.; Vysotski, E. S.; Vysotski, E. S.; Chen, C.-J.; Rose, J. P.; Lee, J.; Wang, B.-C., Structure of the Ca²⁺-Regulated Photoprotein Obelin at 1.7 Å Resolution Determined Directly from Its Sulfur Substructure. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2085-2093.
51. Vysotski, E. S.; Liu, Z.-J.; Rose, J.; Wang, B. C.; Lee, J., Preparation and X-Ray Crystallographic Analysis of Recombinant Obelin Crystals Diffracting to Beyond 1.1 Å. *Acta Cryst. D* **2001**, *57*, 1919-1921.
52. Deng, L.; Markova, S. V.; Vysotski, E. S.; Liu, Z.-J.; Lee, J.; Rose, J.; Wang, B.-C., Crystal Structure of a Ca²⁺-Discharged Photoprotein: Implications for Mechanisms of the Calcium Trigger and Bioluminescence. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33647-33652.
53. Toma, S.; Chong, K. T.; Nakagawa, A.; Teranishi, K.; Inouye, S.; Shimomura, O., The Crystal Structures of Semi-Synthetic Aequorins. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 409-416.
54. Deng, L.; Vysotski, E. S.; Markova, S. V.; Liu, Z.-J.; Lee, J.; Rose, J.; Wang, B.-C., All Three Ca²⁺-Binding Loops of Photoproteins Bind Calcium Ions: The Crystal Structures of Calcium-Loaded Apo-Aequorin and Apo-Obelin. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 663-675.
55. Liu, Z.-J.; Stepanyuk, G. A.; Vysotski, E. S.; Lee, J.; Markova, S. V.; Malikova, N. P.; Wang, B.-C., Crystal Structure of Obelin after Ca²⁺-Triggered Bioluminescence Suggests Neutral Coelenteramide as the Primary Excited State. *PNAS* **2006**, *103*, 2570-2575.

56. Natashin, P. V.; Markova, S. V.; Lee, J.; Vysotski, E. S.; Liu, Z. J., Crystal Structures of the F88Y Obelin Mutant before and after Bioluminescence Provide Molecular Insight into Spectral Tuning among Hydromedusan Photoproteins. *Febs J.* **2013**, 281, 1432-1445.
57. Stepanyuk, G. A.; Liu, Z. J.; Burakova, L. P.; Lee, J.; Rose, J.; Vysotski, E. S.; Wang, B. C., Spatial Structure of the Novel Light-Sensitive Photoprotein Berovin from the Ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca²⁺-Loaded Apoprotein Conformation State. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1834, 2139-2146.
58. Natashin, P. V.; Ding, W.; Ereemeeva, E. V.; Markova, S. V.; Lee, J.; Vysotski, E. S.; Liu, Z.-J., Structures of the Ca²⁺-Regulated Photoprotein Obelin Y138F Mutant before and after Bioluminescence Support the Catalytic Function of a Water Molecule in the Reaction. *Acta Cryst. D* **2014**, 70, 720-732.
59. Cormier, M. J., Studies on the Bioluminescence of *Renilla reniformis*. I. Requirements for Luminescence in Extracts and Characteristics of the System. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, 42, 333-343.
60. Cormier, M. J., Studies on the Bioluminescence of *Renilla reniformis*. II. Requirement for 3',5'-Diphosphoadenosine in the Luminescent Reaction. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 2032-2037.
61. Cormier, M. J.; Hori, K.; Karkhanis, Y. D., Studies on the Bioluminescence of *Renilla reniformis*. VII. Conversion of Luciferin into Luciferyl Sulfate by Luciferin Sulfokinase. *Biochemistry* **1970**, 9, 1184-1189.
62. Hori, K.; Nakano, Y.; Cormier, M. J., Studies on the Bioluminescence of *Renilla reniformis*. XI. Location of the Sulfate Group in Luciferyl Sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 256, 638-644.
63. Cormier, M. J.; Hori, K.; Karkhanis, Y. D.; Anderson, J. M.; Wampler, J. E.; Morin, J. G.; Hastings, J. W., Evidence for Similar Biochemical Requirements for Bioluminescence among the Coelenterates. *J. Cell. Physiol.* **1973**, 81, 291-297.
64. Fallon, T. R.; Li, F.-S.; Vicent, M. A.; Weng, J.-K., Sulfoluciferin Is Biosynthesized by a Specialized Luciferin Sulfotransferase in Fireflies. *Biochemistry* **2016**, 55, 3341-3344.
65. Titushin, M. S.; Markova, S. V.; Frank, L. A.; Malikova, N. P.; Stepanyuk, G. A.; Lee, J.; Vysotski, E. S., Coelenterazine-Binding Protein of *Renilla muelleri*: cDNA Cloning, Overexpression, and Characterization as a Substrate of Luciferase. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 189-196.
66. Stepanyuk, G. A.; Liu, Z.-J.; Markova, S. S.; Frank, L. A.; Lee, J.; Vysotski, E. S.; Wang, B.-C., Crystal Structure of Coelenterazine-Binding Protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: Why It Is Not a Calcium-Regulated Photoprotein. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 442-447.
67. Cormier, M. J.; Wampler, J. E.; Hori, K.; Lee, J. W., Bioluminescence of *Renilla reniformis*. IX. Structured Bioluminescence. Two Emitters During Both the in Vitro and the in Vivo Bioluminescence of the Sea Pansy, *Renilla*. *Biochemistry* **1971**, 10, 2903-2909.
68. Anderson, J. M.; Cormier, M. J., Lumisomes, the Cellular Site of Bioluminescence in Coelenterates. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 2937-2943.
69. Cormier, M. J.; Karkhanis, Y. D., Isolation and Properties of *Renilla reniformis* Luciferase, a Low Molecular Weight Energy Conversion Enzyme. *Biochemistry* **1971**, 10, 317-326.
70. Matthews, J. C.; Hori, K.; Cormier, M. J., Purification and Properties of *Renilla reniformis* Luciferase. *Biochemistry* **1977**, 16, 85-91.

71. Lorenz, W. W.; McCann, R. O.; Longiaru, M.; Cormier, M. J., Isolation and Expression of a cDNA Encoding *Renilla reniformis* Luciferase. *PNAS* **1991**, 88, 4438-4442.
72. Loening, A. M.; Fenn, T. D.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S., Consensus Guided Mutagenesis of *Renilla* Luciferase Yields Enhanced Stability and Light Output. *PEDS* **2006**, 19, 391-400.
73. Liu, J.; Escher, A., Improved Assay Sensitivity of an Engineered Secreted *Renilla* Luciferase. *Gene* **1999**, 237, 153-159.
74. Loening, A. M.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S., Red-Shifted *Renilla Reniformis* Luciferase Variants for Imaging in Living Subjects. *Nat. Methods* **2007**, 4, 641-643.
75. Loening, A. M.; Dragulescu-Andrasi, A.; Gambhir, S. S., A Red-Shifted *Renilla* Luciferase Variant Optimized for Transient Reporter Gene Expression. *Nat. Methods* **2010**, 7, 5-6.
76. Clarke, G. L.; Conover, R. J.; David, C. N.; Nicol, J. a. C., Comparative Studies of Luminescence in Copepods and Other Pelagic Marine Animals. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **1962**, 42, 541-564.
77. Barnes, A. T.; Case, J. F., Bioluminescence in the Mesopelagic Copepod, *Gaussia princeps* (T. Scott). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1972**, 8, 53-71.
78. Bryan, B. J.; Szent-Gyorgyi, C. Luciferases, Fluorescent Proteins, Nucleic Acids Encoding the Luciferases and Fluorescent Proteins and the Use Thereof in Diagnostics, High Throughput Screening and Novelty Items. US6232107 (B1), 2001.
79. Verhaegen, M.; Christopoulos, T. K., Recombinant *Gaussia* Luciferase. Overexpression, Purification, and Analytical Application of a Bioluminescent Reporter for DNA Hybridization. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4378-4385.
80. Markova, S. V.; Golz, S.; Frank, L. A.; Kalthof, B.; Vysotski, E. S., Cloning and Expression of cDNA for a Luciferase from the Marine Copepod *Metridia longa*: a Novel Secreted Bioluminescent Reporter Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 3212-3217.
81. Stepanyuk, G. A.; Xu, H.; Wu, C.-K.; Markova, S. V.; Lee, J.; Vysotski, E. S.; Wang, B.-C., Expression, Purification and Characterization of the Secreted Luciferase of the Copepod *Metridia longa* from SF9 Insect Cells. *PREP* **2008**, 61, 142-148.
82. Markova, S. V.; Larionova, M. D.; Burakova, L. P.; Vysotski, E. S., The Smallest Natural High-Active Luciferase: Cloning and Characterization of Novel 16.5 kDa Luciferase from Copepod *Metridia longa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 457, 77-82.
83. Inouye, S.; Sahara-Miura, Y.; Sato, J.-i.; Iimori, R.; Yoshida, S.; Hosoya, T., Expression, Purification and Luminescence Properties of Coelenterazine-Utilizing Luciferases from *Renilla*, *Oplophorus* and *Gaussia*: Comparison of Substrate Specificity for C2-Modified Coelenterazines. *PREP* **2013**, 88, 150-156.
84. Maguire, C. A.; Deliolanis, N. C.; Pike, L.; Niers, J. M.; Tjon-Kon-Fat, L.-A.; Sena-Esteves, M.; Tannous, B. A., *Gaussia* Luciferase Variant for High-Throughput Functional Screening Applications. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7102-7106.
85. Degeling, M. H.; Bovenberg, M. S. S.; Lewandrowski, G. K.; de Gooijer, M. C.; Vleggeert-Lankamp, C. L. A.; Tannous, M.; Maguire, C. A.; Tannous, B. A., Directed Molecular Evolution Reveals *Gaussia* Luciferase Variants with Enhanced Light Output Stability. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 3006-3012.

86. Takenaka, Y.; Noda-Ogura, A.; Imanishi, T.; Yamaguchi, A.; Gojobori, T.; Shigeri, Y., Computational Analysis and Functional Expression of Ancestral Copepod Luciferase. *Gene* **2013**, 528, 201-205.
87. Kim, S. B.; Suzuki, H.; Sato, M.; Tao, H., Superluminescent Variants of Marine Luciferases for Bioassays. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8732-8740.
88. Kim, S. B.; Torimura, M.; Tao, H., Creation of Artificial Luciferases for Bioassays. *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 2067-2075.
89. Kim, S. B.; Izumi, H., Functional Artificial Luciferases as an Optical Readout for Bioassays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 448, 418-423.
90. Kim, S. B.; Nishihara, R.; Citterio, D.; Suzuki, K., Fabrication of a New Lineage of Artificial Luciferases from Natural Luciferase Pools. *ACS Comb. Sci.* **2017**, 19, 594-599.
91. Horton, T.; Kroh, A.; Ah Yong, S.; Bailly, N.; Boury-Esnault, N.; Brandão, S. N.; Costello, M. J.; Gofas, S.; Hernandez, F.; Mees, J.; Paulay, G.; Poore, G. C. B.; Rosenberg, G.; Decock, W.; Dekeyser, S.; Lanssens, T.; Vandepitte, L.; Vanhoorne, B.; Verfaillie, K.; Adlard, R.; Adriaens, P.; Agatha, S.; Ahn, K. J.; Akkari, N.; Alvarez, B.; Anderson, G.; Angel, M.; Arango, C.; Artois, T.; Atkinson, S.; Bank, R.; Barber, A.; Barbosa, J. P.; Bartsch, I.; Bellan-Santini, D.; Bernot, J.; Berta, A.; Bieler, R.; Blanco, S.; Blasco-Costa, I.; Blazewicz, M.; Bock, P.; Böttger-Schnack, R.; Bouchet, P.; Boxshall, G.; Boyko, C. B.; Bray, R.; Breure, B.; Bruce, N. L.; Cairns, S.; Campinas Bezerra, T. N.; Cárdenas, P.; Carstens, E.; Chan, B. K.; Chan, T. Y.; Cheng, L.; Churchill, M.; Coleman, C. O.; Collins, A. G.; Corbari, L.; Cordeiro, R.; Cornils, A.; Coste, M.; Crandall, K. A.; Cribb, T.; Cutmore, S.; Dahdouh-Guebas, F.; Daly, M.; Daneliya, M.; Dauvin, J. C.; Davie, P.; De Broyer, C.; De Grave, S.; de Mazancourt, V.; de Voogd, N.; Decker, P.; Decraemer, W.; Defaye, D.; d'Hondt, J. L.; Dijkstra, H.; Dohrmann, M.; Dolan, J.; Domning, D.; Downey, R.; Drapun, I.; Ector, L.; Eisendle-Flöckner, U.; Eitel, M.; Encarnação, S. C. d.; Enghoff, H.; Epler, J.; Ewers-Saucedo, C.; Faber, M.; Feist, S.; Figueroa, D.; Finn, J.; Fišer, C.; Fordyce, E.; Foster, W.; Frank, J. H.; Fransen, C.; Furuya, H.; Galea, H.; Garcia-Alvarez, O.; Garic, R.; Gasca, R.; Gaviria-Melo, S.; Gerken, S.; Gheerardyn, H.; Gibson, D.; Gil, J.; Gittenberger, A.; Glasby, C.; Glover, A.; Gómez-Noguera, S. E.; González-Solís, D.; Gordon, D.; Grabowski, M.; Gravili, C.; Guerra-García, J. M.; Guidetti, R.; Guiry, M. D.; Hadfield, K. A.; Hajdu, E.; Hallermann, J.; Hayward, B.; Hendrycks, E.; Herbert, D.; Herrera Bachiller, A.; Ho, J. s.; Høeg, J.; Hoeksema, B.; Holovachov, O.; Hooper, J.; Houart, R.; Hughes, L.; Hyžný, M.; Iniesta, L. F. M.; Iseto, T.; Ivanenko, S.; Iwataki, M.; Jarms, G.; Jaume, D.; Jazdzewski, K.; Kantor, Y.; Karanovic, I.; Karthick, B.; Kim, Y. H.; King, R.; Kirk, P. M.; Klautau, M.; Kocielek, J. P.; Köhler, F.; Kolb, J.; Kotov, A.; Krapp-Schickel, T.; Kremenetskaia, A.; Kristensen, R.; Kulikovskiy, M.; Kullander, S.; La Perna, R.; Lambert, G.; Lazarus, D.; Le Coze, F.; LeCroy, S.; Leduc, D.; Lefkowitz, E. J.; Lemaitre, R.; Liu, Y.; Lörz, A. N.; Lowry, J.; Ludwig, T.; Lundholm, N.; Macpherson, E.; Madin, L.; Mah, C.; Mamos, T.; Manconi, R.; Mapstone, G.; Marek, P. E.; Marshall, B.; Marshall, D. J.; Martin, P.; McInnes, S.; Meidla, T.; Meland, K.; Merrin, K.; Mesibov, R.; Messing, C.; Miljutin, D.; Mills, C.; Moestrup, Ø.; Mokievsky, V.; Molodtsova, T.; Monniot, F.; Mooi, R.; Morandini, A. C.; Moreira da Rocha, R.; Moretzsohn, F.; Mortelmans, J.; Mortimer, J.; Musco, L.; Neubauer, T. A.; Neubert, E.; Neuhaus, B.; Ng, P.; Nguyen, A. D.; Nielsen, C.; Nishikawa, T.; Norenburg, J.; O'Hara, T.; Okahashi, H.; Opresko, D.; Osawa, M.; Ota, Y.; Páll-Gergely, B.; Patterson, D.; Paxton, H.; Peña Santiago, R.; Perrier, V.; Perrin, W.; Petrescu, I.; Picton, B.; Pilger, J. F.; Pisera, A.; Polhemus, D.; Potapova, M.; Pugh, P.; Read, G.; Reimer, J. D.; Reip, H.; Reuscher, M.; Reynolds, J. W.; Richling, I.; Rimet, F.; Ríos, P.; Rius, M.; Rogers, C.; Rützler, K.; Rzhavsky, A.; Sabbe, K.; Saiz-Salinas, J.; Sala, S.; Santos, S.; Sar, E.; Sartori, A. F.; Satoh, A.; Schatz, H.; Schierwater, B.; Schmidt-Rhaesa, A.;

- Schneider, S.; Schönberg, C.; Schuchert, P.; Senna, A. R.; Serejo, C.; Shaik, S.; Shamsi, S.; Sharma, J.; Shear, W. A.; Shenkar, N.; Shinn, A.; Short, M.; Sicinski, J.; Siegel, V.; Sierwald, P.; Simmons, E.; Sinniger, F.; Sivell, D.; Sket, B.; Smit, H.; Smit, N.; Smol, N.; Souza-Filho, J. F.; Spelda, J.; Sterrer, W.; Stienen, E.; Stoev, P.; Stöhr, S.; Strand, M.; Suárez-Morales, E.; Summers, M.; Suttle, C.; Swalla, B. J.; Taiti, S.; Tanaka, M.; Tandberg, A. H.; Tang, D.; Tasker, M.; Taylor, J.; Taylor, J.; Tchesunov, A.; ten Hove, H.; ter Poorten, J. J.; Thomas, J.; Thuesen, E. V.; Thurston, M.; Thuy, B.; Timi, J. T.; Timm, T.; Todaro, A.; Turon, X.; Tyler, S.; Uetz, P.; Utevsky, S.; Vacelet, J.; Vachard, D.; Vader, W.; Väinölä, R.; Van de Vijver, B.; van der Meij, S. E.; van Haaren, T.; van Soest, R.; Van Syoc, R.; Vanreusel, A.; Venekey, V.; Vinarski, M.; Vonk, R.; Vos, C.; Walker-Smith, G.; Walter, T. C.; Watling, L.; Wayland, M.; Wesener, T.; Wetzel, C.; Whipps, C.; White, K.; Williams, D.; Williams, G.; Wilson, R.; Witkowski, A.; Witkowski, J.; Wyatt, N.; Wylezich, C.; Xu, K.; Yasuhara, M.; Zanol, J.; Zeidler, W., World Register of Marine Species (Worms). WoRMS Editorial Board: 2018.
92. Johnson, F. H.; Stachel, H. D.; Shimomura, O.; Haneda, Y., Partial Purification of Luminescence System of a Deep-Sea Shrimp, *Hoplophorus graciliorostris*. In *Bioluminescence in Progress*, Johnson, F. H.; Haneda, Y., Eds. Princeton University Press: Princeton, NJ, 1966.
 93. Shimomura, O.; Masugi, T.; Johnson, F. H.; Haneda, Y., Properties and Reaction Mechanism of the Bioluminescence System of the Deep-Sea Shrimp *Oplophorus graciliorostris*. *Biochemistry* **1978**, *17*, 994-998.
 94. Inouye, S.; Watanabe, K.; Nakamura, H.; Shimomura, O., Secretional Luciferase of the Luminous Shrimp *Oplophorus graciliorostris*: cDNA Cloning of a Novel Imidazopyrazinone Luciferase. *FEBS Lett.* **2000**, *481*, 19-25.
 95. Inouye, S.; Shimomura, O., The Use of *Renilla* Luciferase, *Oplophorus* Luciferase, and Apoequorin as Bioluminescent Reporter Protein in the Presence of Coelenterazine Analogues as Substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *233*, 349-353.
 96. Nakamura, H.; Wu, C.; Murai, A.; Inouye, S.; Shimomura, O., Efficient Bioluminescence of Bisdeoxycoelenterazine with the Luciferase of a Deep-Sea Shrimp *Oplophorus*. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6405-6406.
 97. Inouye, S.; Sasaki, S., Overexpression, Purification and Characterization of the Catalytic Component of *Oplophorus* Luciferase in the Deep-Sea Shrimp, *Oplophorus graciliorostris*. *PREP* **2007**, *56*, 261-268.
 98. Binkowski, B.; Encell, L.; Hall, M.; Robers, M.; Slater, M.; Wood, K.; Wood, M. *Oplophorus*-Derived Luciferases, Novel Coelenterazine Substrates, and Methods of Use. WO2012061530 (A2), 2012.
 99. Hall, M. P.; Unch, J.; Binkowski, B. F.; Valley, M. P.; Butler, B. L.; Wood, M. G.; Otto, P.; Zimmerman, K.; Vidugiris, G.; Machleidt, T.; Robers, M. B.; Benink, H. A.; Eggers, C. T.; Slater, M. R.; Meisenheimer, P. L.; Klaubert, D. H.; Fan, F.; Encell, L. P.; Wood, K. V., Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1848-1857.
 100. Inouye, S.; Sato, J.-i.; Sahara-Miura, Y.; Yoshida, S.; Hosoya, T., Luminescence Enhancement of the Catalytic 19 kDa Protein (KAZ) of *Oplophorus* Luciferase by Three Amino Acid Substitutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *445*, 157-162.

101. Binkowski, B.; Encell, L. P.; Hall, M.; Robers, M. B.; Slater, M. R.; Wood, K. V.; Wood, M. G. *Oplophorus*-Derived Luciferases, Novel Coelenterazine Substrates, and Methods of Use. US8669103 (B2), 2014.
102. Inouye, S.; Sato, J.-i.; Sahara-Miura, Y.; Yoshida, S.; Kurakata, H.; Hosoya, T., C6-Deoxy Coelenterazine Analogues as an Efficient Substrate for Glow Luminescence Reaction of nanoKAZ: The Mutated Catalytic 19 kDa Component of *Oplophorus* Luciferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *437*, 23-28.
103. Inouye, S.; Sahara, Y., Soluble Protein Expression in *E. coli* Cells Using IgG-Binding Domain of Protein a as a Solubilizing Partner in the Cold Induced System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *376*, 448-453.
104. Inouye, S.; Sahara, Y., Expression and Purification of the Calcium Binding Photoprotein Mitrocomin Using ZZ-Domain as a Soluble Partner in *E. coli* Cells. *PREP* **2009**, *66*, 52-57.
105. Inouye, S.; Sato, J.-i.; Sahara-Miura, Y.; Hosoya, T.; Suzuki, T., Unconventional Secretion of the Mutated 19 kDa Protein of *Oplophorus* Luciferase (nanoKAZ) in Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1313-1319.
106. Francis, W. R.; Powers, M. L.; Haddock, S. H. D., Characterization of an Anthraquinone Fluor from the Bioluminescent, Pelagic *Polychaete tomopteris*. *Luminescence* **2014**, *29*, 1135-1140.
107. Jacob, F.; Perrin, D.; Sánchez, C.; Monod, J., L'opéron : groupe de gènes à expression coordonnée par un opérateur. *Comptes Rendus Biologies* **2005**, *328*, 514-520.
108. Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Winant, J., Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of *Aequorea*. *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656-2662.
109. Morin, J. G.; Hastings, J. W., Energy Transfer in a Bioluminescent System. *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313-318.
110. Morin, J. G.; Hastings, J. W., Biochemistry of the Bioluminescence of Colonial Hydroids and Other Coelenterates. *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 305-311.
111. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C., Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, *263*, 802-805.
112. Inouye, S.; Tsuji, F. I., *Aequorea* Green Fluorescent Protein: Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein. *FEBS Lett.* **1994**, *341*, 277-280.
113. Tsien, R. Y., The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem* **1998**, *67*, 509-544.
114. Niswender, K. D.; Blackman, S. M.; Rohde, L.; Magnuson, M. A.; Piston, D. W., Quantitative Imaging of Green Fluorescent Protein in Cultured Cells: Comparison of Microscopic Techniques, Use in Fusion Proteins and Detection Limits. *J. Microsc.* **1995**, *180*, 109-116.
115. Hanson, M. R.; Köhler, R. H., GFP Imaging: Methodology and Application to Investigate Cellular Compartmentation in Plants. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 529-539.
116. Feilmeier, B. J.; Iseminger, G.; Schroeder, D.; Webber, H.; Phillips, G. J., Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4068-4076.
117. Cormack, B., Green Fluorescent Protein as a Reporter of Transcription and Protein Localization in Fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 406-410.

118. Hoffman, R. M., Fluorescent Proteins as Visible *In Vivo* Sensors. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Morris, M. C., Ed. Academic Press: 2013; Vol. 113.
119. Tavaré, J. M.; Fletcher, L. M.; Welsh, G. I., Using Green Fluorescent Protein to Study Intracellular Signalling. *J. Endocrinol.* **2001**, *170*, 297-306.
120. Arun, K. H. S.; Kaul, C. L.; Ramarao, P., Green Fluorescent Proteins in Receptor Research: An Emerging Tool for Drug Discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2005**, *51*, 1-23.
121. Greenbaum, L.; Rothmann, C.; Lavie, R.; Malik, Z., Green Fluorescent Protein Photobleaching: A Model for Protein Damage by Endogenous and Exogenous Singlet Oxygen. *Biol. Chem.* **2005**, *381*, 1251-1258.
122. Brini, M., Calcium-Sensitive Photoproteins. *Methods* **2008**, *46*, 160-166.
123. Rogers, K. L.; Martin, J.-R.; Renaud, O.; Karplus, E.; Nicola, M.-A.; Nguyen, M.; Picaud, S.; Shorte, S. L.; Brûlet, P., Electron-Multiplying Charge-Coupled Detector-Based Bioluminescence Recording of Single-Cell Ca^{2+} . *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 031211.
124. Whitehead, K. A.; Smith, L. A.; Verran, J., The Detection of Food Soils and Cells on Stainless Steel Using Industrial Methods: UV Illumination and ATP Bioluminescence. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *127*, 121-128.
125. Satoh, T.; Kato, J.; Takiguchi, N.; Ohtake, H.; Kuroda, A., ATP Amplification for Ultrasensitive Bioluminescence Assay: Detection of a Single Bacterial Cell. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2004**, *68*, 1216-1220.
126. Santos, E. B.; Yeh, R.; Lee, J.; Nikhamin, Y.; Punzalan, B.; Punzalan, B.; Perle, K. L.; Larson, S. M.; Sadelain, M.; Brentjens, R. J., Sensitive *In Vivo* Imaging of T Cells Using a Membrane-Bound *Gaussia princeps* Luciferase. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 338-344.
127. Xiong, Y. Q.; Willard, J.; Kadurugamuwa, J. L.; Yu, J.; Francis, K. P.; Bayer, A. S., Real-Time *In Vivo* Bioluminescent Imaging for Evaluating the Efficacy of Antibiotics in a Rat *Staphylococcus aureus* Endocarditis Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 380-387.
128. Karlsson, E. A.; Meliopoulos, V. A.; Savage, C.; Livingston, B.; Mehle, A.; Schultz-Cherry, S., Visualizing Real-Time Influenza Virus Infection, Transmission and Protection in Ferrets. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6378.
129. Wood, K. V., The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays. *Promega Notes* **1998**, *65*, e20.
130. Boute, N.; Lowe, P.; Berger, S.; Malissard, M.; Robert, A.; Tesar, M., NanoLuc Luciferase – a Multifunctional Tool for High Throughput Antibody Screening. *Front. Pharmacol.* **2016**, *27*.
131. Lucas-Hourani, M.; Munier-Lehmann, H.; Helynck, O.; Komarova, A.; Desprès, P.; Tangy, F.; Vidalain, P.-O., High-Throughput Screening for Broad-Spectrum Chemical Inhibitors of RNA Viruses. *JoVE* **2014**, e51222.
132. Villalobos, V.; Naik, S.; Bruinsma, M.; Dothager, R. S.; Pan, M.-H.; Samrakandi, M.; Moss, B.; Elhammali, A.; Piwnicka-Worms, D., Dual-Color Click Beetle Luciferase Heteroprotein Fragment Complementation Assays. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1018-1029.
133. Luker, G. D.; Luker, K. E., Luciferase Protein Complementation Assays for Bioluminescence Imaging of Cells and Mice. In *Molecular Imaging*, Shah, K., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 680.

134. Stynen, B.; Tournu, H.; Tavernier, J.; Van Dijck, P., Diversity in Genetic *In Vivo* Methods for Protein-Protein Interaction Studies: From the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, 76, 331-382.
135. Dixon, A. S.; Schwinn, M. K.; Hall, M. P.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Lubben, T. H.; Butler, B. L.; Binkowski, B. F.; Machleidt, T.; Kirkland, T. A.; Wood, M. G.; Eggers, C. T.; Encell, L. P.; Wood, K. V., NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 400-408.
136. Bertrand, L.; Parent, S.; Caron, M.; Legault, M.; Joly, E.; Angers, S.; Bouvier, M.; Brown, M.; Houle, B.; Ménard, L., The BRET²/Arrestin Assay in Stable Recombinant Cells: A Platform to Screen for Compounds That Interact with G Protein-Coupled Receptors (GPCRs). *J. Recept. Signal Transduct.* **2002**, 22, 533-541.
137. Galés, C.; Rebois, R. V.; Hogue, M.; Trieu, P.; Breit, A.; Hébert, T. E.; Bouvier, M., Real-Time Monitoring of Receptor and G-Protein Interactions in Living Cells. *Nat. Methods* **2005**, 2, 177-184.
138. Hoshino, H.; Nakajima, Y.; Ohmiya, Y., Luciferase-YFP Fusion Tag with Enhanced Emission for Single-Cell Luminescence Imaging. *Nat. Methods* **2007**, 4, 637-639.
139. Gambhir, S. S.; Levi, J.; De, A. Bisdeoxycoelenterazine Derivatives, Methods of Use, and BRET² Systems. US2009075309 (A1), 2009.
140. Michelini, E.; Cevenini, L.; Calabretta, M. M.; Calabria, D.; Roda, A., Exploiting *In Vitro* and *In Vivo* Bioluminescence for the Implementation of the Three Rs Principle (Replacement, Reduction, and Refinement) in Drug Discovery. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 5531-5539.
141. Machleidt, T.; Woodroffe, C. C.; Schwinn, M. K.; Méndez, J.; Robers, M. B.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Daniels, D. L.; Kirkland, T. A.; Wood, K. V., NanoBRET—a Novel BRET Platform for the Analysis of Protein–Protein Interactions. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1797-1804.
142. Mo, X.-L.; Luo, Y.; Ivanov, A. A.; Su, R.; Havel, J. J.; Li, Z.; Khuri, F. R.; Du, Y.; Fu, H., Enabling Systematic Interrogation of Protein–Protein Interactions in Live Cells with a Versatile Ultra-High-Throughput Biosensor Platform. *JMCB* **2016**, 8, 271-281.
143. Johnsson, K.; Hiblot, J.; Yu, Q.; Sabbadini, M.; Raymond, L.; Xue, L.; Sallin, O.; Schena, A.; Griss, R.; Hill, N., Luciferases with Tunable Emission Wavelengths. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 14556-14560.
144. Roda, A.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Mirasoli, M., Bioluminescence in Analytical Chemistry and *In Vivo* Imaging. *TrAC* **2009**, 28, 307-322.
145. Nakajima, Y.; Ohmiya, Y., Bioluminescence Assays: Multicolor Luciferase Assay, Secreted Luciferase Assay and Imaging Luciferase Assay. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, 5, 835-849.
146. Cevenini, L.; Calabretta, M. M.; Calabria, D.; Roda, A.; Michelini, E., Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? In *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 3*, Thouand, G.; Marks, R., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 154.
147. Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Yampolsky, I. V., 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, Their Mechanisms of Action and Applications in Chemical Analysis, Biology and Medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 6048-6077

148. Oba, Y.; Kato, S.-i.; Ojika, M.; Inouye, S., Biosynthesis of Luciferin in the Sea Firefly, *Cypridina hilgendorffii*: L-Tryptophan Is a Component in *Cypridina* Luciferin. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2389-2392.
149. Kato, S.-I.; Oba, Y.; Ojika, M.; Inouye, S., Identification of the Biosynthetic Units of *Cypridina* Luciferin in *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* by LC/ESI-TOF-MS. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11427-11434.
150. Kato, S.-I.; Oba, Y.; Ojika, M., Biosynthesis of *Cypridina* Luciferin in *Cypridina noctiluca*. *Heterocycles* **2007**, *72*, 673-676.
151. Oba, Y.; Kato, S.-i.; Ojika, M.; Inouye, S., Biosynthesis of Coelenterazine in the Deep-Sea Copepod, *Metridia pacifica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 684-688.
152. Haddock, S. H. D.; Rivers, T. J.; Robison, B. H., Can Coelenterates Make Coelenterazine? Dietary Requirement for Luciferin in Cnidarian Bioluminescence. *PNAS* **2001**, *98*, 11148-11151.
153. Francis, W. R.; Shaner, N. C.; Christianson, L. M.; Powers, M. L.; Haddock, S. H. D., Occurrence of Isopenicillin-N-Synthase Homologs in Bioluminescent Ctenophores and Implications for Coelenterazine Biosynthesis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128742.
154. Shimomura, O.; Musicki, B.; Kishi, Y., Semi-Synthetic Aequorins with Improved Sensitivity to Ca^{2+} Ions. *Biochem. J.* **1989**, *261*, 913-920.
155. Teranishi, K.; Goto, T., Synthesis and Chemiluminescence of Coelenterazine (*Oplophorus* Luciferin) Analogues. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1990**, *63*, 3132-3140.
156. Hart, R. C.; Matthews, J. C.; Hori, K.; Cormier, M. J., *Renilla Reniformis* Bioluminescence: Luciferase-Catalyzed Production of Nonradiating Excited States from Luciferin Analogs and Elucidation of the Excited State Species Involved in Energy Transfer to *Renilla* Green Fluorescent Protein. *Biochemistry* **1979**, *18*, 2204-2210.
157. Giuliani, G.; Cappelli, A.; Vomero, S.; Anzini, M. Imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one Derivatives Bearing a New Electron-Rich Structure. WO2011007314 (A1), 2011.
158. Giuliani, G.; Molinari, P.; Ferretti, G.; Cappelli, A.; Anzini, M.; Vomero, S.; Costa, T., New Red-Shifted Coelenterazine Analogues with an Extended Electronic Conjugation. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5114-5118.
159. Yuan, M.-L.; Jiang, T.-Y.; Du, L.-P.; Li, M.-Y., Luminescence of Coelenterazine Derivatives with C8 Extended Electronic Conjugation. *Chin. Chem. Lett.* **2016**, 550-554.
160. Yeh, H.-W.; Karmach, O.; Ji, A.; Carter, D.; Martins-Green, M. M.; Ai, H.-w., Red-Shifted Luciferase-Luciferin Pairs for Enhanced Bioluminescence Imaging. *Nat. Methods* **2017**, 971-974.
161. Inouye, S.; Sahara, Y.; Iimori, R.; Hosoya, T. Coelenterazine Analogs and Manufacturing Method Thereof. US2012035070 (A1), 2012.
162. Inouye, S.; Miura, Y.; Yohsida, S.; Hosoya, T. Processes for the Production of Coelenteramines and Coelenterazines. GB2488894 (A), 2012.
163. Klaubert, D.; Meisenheimer, P.; Unch, J. Novel Coelenterazine Substrates and Methods of Use. WO2012061529 (A1), 2012.
164. Klaubert, D.; Meisenheimer, P.; Unch, J.; Zhou, W. Coelenterazine Derivatives and Methods of Using Same. WO2012061477 (A1), 2012.

165. Shakhmin, A.; Hall, M. P.; Walker, J. R.; Machleidt, T.; Binkowski, B. F.; Wood, K. V.; Kirkland, T. A., Three Efficient Methods for Preparation of Coelenterazine Analogues. *Chem. Eur. J.* **2016**, 10369-10375.
166. Shakhmin, A.; Hall, M. P.; Machleidt, T.; Walker, J. R.; Wood, K. V.; Kirkland, T. A., Coelenterazine Analogues Emit Red-Shifted Bioluminescence with NanoLuc. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 8559-8567.
167. Shakhmin, A.; Kirkland, T.; Walker, J.; Machleidt, T.; Hall, M.; Wood, K. V. Coelenterazine Analogues. US2017233789 (A1), 2017.
168. Hall, M.; Kirkland, T.; Machleidt, T.; Shakhmin, A.; Walker, J. R. Coelenterazine Analogues. US2018030059 (A1), 2018.
169. Hart, R. C.; Stempel, K. E.; Boyer, P. D.; Cormier, M. J., Mechanism of the Enzyme-Catalyzed Bioluminescent Oxidation of Coelenterate-Type Luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 81, 980-986.
170. Johnson, F. H.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L. C.; Reynolds, G. T.; Waters, J. R., Quantum Efficiency of *Cypridina* Luminescence, with a Note on That of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 60, 85-103.
171. Shimomura, O.; Johnson, F. H., Mechanisms in the Quantum Yield of *Cypridina* Bioluminescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1970**, 12, 291-295.
172. Shimomura, O.; Johnson, F. H., Calcium Binding, Quantum Yield, and Emitting Molecule in *Aequorin* Bioluminescence. *Nature* **1970**, 227, 1356-1357.
173. Liu, Z. J.; Vysotski, E. S.; Deng, L.; Lee, J.; Rose, J.; Wang, B. C., Atomic Resolution Structure of Obelin: Soaking with Calcium Enhances Electron Density of the Second Oxygen Atom Substituted at the C2-Position of Coelenterazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 311, 433-439.
174. Shimomura, O.; Teranishi, K., Light-Emitters Involved in the Luminescence of Coelenterazine. *Luminescence* **2000**, 15, 51-58.
175. Hirano, T.; Gomi, Y.; Takahashi, T.; Kitahara, K.; Feng Qi, C.; Mizoguchi, I.; Kyushin, S.; Ohashi, M., Chemiluminescence of Coelenterazine Analogues-Structures of Emitting Species. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5771-5774.
176. Hirano, T.; Nisibuchi, S.; Yoneda, M.; Tsujimoto, K.; Ohashi, M., Mass Spectrometric Studies on Chemiluminescence of Coelenterate Luciferin Analogues. *Tetrahedron* **1993**, 49, 9267-9276.
177. Nakai, S.; Yasui, M.; Nakazato, M.; Iwasaki, F.; Maki, S.; Niwa, H.; Ohashi, M.; Hirano, T., Fundamental Studies on the Structures and Spectroscopic Properties of Imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-one Derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **2003**, 76, 2361-2387.
178. Hori, K.; Wampler, J. E.; Cormier, M. J., Chemiluminescence of *Renilla* (Sea Pansy) Luciferin and Its Analogues. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 492.
179. Teranishi, K., Luminescence of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7H)-one compounds. *Bioorg. Chem.* **2007**, 35, 82-111.
180. McCapra, F.; Beheshti, I.; Burford, A.; A. Hann, R.; A. Zaklika, K., Singlet Excited States from Dioxetan Decomposition. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 0, 944-946.

181. McCapra, F., Alternative Mechanism for Dioxetan Decomposition. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 946-948.
182. Pinto da Silva, L.; Magalhães, C. M.; Esteves da Silva, J. C. G., Interstate Crossing-Induced Chemiexcitation Mechanism as the Basis for Imidazopyrazinone Bioluminescence. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3343-3356.
183. Shabat, D.; Hananya, N.; Green, O.; Blau, R.; Satchi-Fainaro, R., Highly-Efficient Chemiluminescence Probe for Detection of Singlet Oxygen in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 11793-11796.
184. Min, C.-G.; Ferreira, P. J. O.; Pinto da Silva, L., Theoretically Obtained Insight into the Mechanism and Dioxetanone Species Responsible for the Singlet Chemiexcitation of Coelenterazine. *J. Photochem. Photobiol.* **2017**, *174*, 18-26.
185. Johnson, F. H.; Stachel, H. D.; Shimomura, O., Chemiluminescence and Fluorescence of *Cypridina* Luciferin and of Some New Indole Compounds in Dimethylsulfoxide. In *Bioluminescence in Progress*, Johnson, F. H.; Haneda, Y., Eds. Princeton University Press: Princeton, NJ, 1967.
186. Goto, T.; Inoue, S.; Sugiura, S., *Cypridina* Bioluminescence IV. Synthesis and Chemiluminescence of 3,7-Dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one and Its 2-Methyl Derivative. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 3873-3876.
187. Goto, T.; Fukatsu, H., *Cypridina* Bioluminescence VII. Chemiluminescence in Micelle Solutions — a Model System for *Cypridina* Bioluminescence. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 4299-4302.
188. McCapra, F.; Chang, Y. C., The Chemiluminescence of a *Cypridina* Luciferin Analogue. *Chem. Commun. (London)* **1967**, 1011-1012.
189. McCapra, F.; Manning, M. J., Bioluminescence of Coelenterates: Chemiluminescent Model Compounds. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 467-468.
190. Roca-Sanjuán, D.; Delcey, M. G.; Navizet, I.; Ferré, N.; Liu, Y.-J.; Lindh, R., Chemiluminescence and Fluorescence States of a Small Model for Coelenteramide and *Cypridina* Oxyluciferin: A CASSCF/CASPT2 Study. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 4060-4069.
191. Chen, S.-F.; Navizet, I.; Roca-Sanjuán, D.; Lindh, R.; Liu, Y.-J.; Ferré, N., Chemiluminescence of Coelenterazine and Fluorescence of Coelenteramide: A Systematic Theoretical Study. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 2796-2807.
192. Ishii, Y.; Hayashi, C.; Suzuki, Y.; Hirano, T., Chemiluminescent 2,6-Diphenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones: A New Entry to *Cypridina* Luciferin Analogues. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 182-189.
193. Lourenço, J. M.; Esteves da Silva, J. C. G.; Pinto da Silva, L., Combined Experimental and Theoretical Study of Coelenterazine Chemiluminescence in Aqueous Solution. *J. Lumin.* **2018**, *194*, 139-145.
194. Lucas, M.; Solano, F., Coelenterazine Is a Superoxide Anion-Sensitive Chemiluminescent Probe: Its Usefulness in the Assay of Respiratory Burst in Neutrophils. *Anal. Biochem.* **1992**, *206*, 273-277.
195. Teranishi, K.; Shimomura, O., Coelenterazine Analogs as Chemiluminescent Probe for Superoxide Anion. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 37-43.

196. Zhao, H.; Doyle, T. C.; Wong, R. J.; Cao, Y.; Stevenson, D. K.; Piwnica-Worms, D.; Contag, C. H., Characterization of Coelenterazine Analogs for Measurements of *Renilla* Luciferase Activity in Live Cells and Living Animals. *Molecular Imaging* **2004**, 3, 43-54.
197. Vassel, N.; Cox, C.; Naseem, R.; Morse, V.; Evans, R.; Power, R.; Brancale, A.; Wann, K.; Campbell, A., Enzymatic Activity of Albumin Shown by Coelenterazine Chemiluminescence. *Luminescence* **2012**, 27, 234-241.
198. Andreu, N.; Zelmer, A.; Fletcher, T.; Elkington, P. T.; Ward, T. H.; Ripoll, J.; Parish, T.; Bancroft, G. J.; Schaible, U.; Robertson, B. D.; Wiles, S., Optimisation of Bioluminescent Reporters for Use with *Mycobacteria*. *PLoS ONE* **2010**, 5, e10777.
199. Coutant, E. P.; Janin, Y. L., Synthetic Routes to Coelenterazine and Other Imidazo[1,2-a]pyrazin-3-one Luciferins: Essential Tools for Bioluminescence-Based Investigations. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 17158-17171.
200. McCapra, F.; Roth, M., Cyclisation of a Dehydropeptide Derivative: A Model for *Cypridina* Luciferin Biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 894-895.
201. Devillers, I.; Arrault, A.; Olive, G.; Marchand-Brynaert, J., A Biomimetic Synthesis of Coelenterazine Analogs. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3161-3164.
202. Kishi, Y.; Goto, T.; Inoue, S.; Sugiura, S.; Kishimoto, H., *Cypridina* Bioluminescence III: Total Synthesis of *Cypridina* Luciferin. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 7, 3445-3450.
203. Kishi, Y.; Sugiura, S.; Inoue, S.; Goto, T., Synthesis of *Cypridina* Luciferin and Related Compounds. III. Synthesis of *Cypridina* Luciferin. *Yakugaku Zasshi* **1969**, 89, 1657-1660.
204. Sharp, W.; Spring, F. S., 209. Pyrazine Derivatives. Part XIII. Synthesis of 2-Aminopyrazine 1-Oxides by the Condensation of α -Amino-Nitriles with Oximinomethyl Ketones. *J. Chem. Soc.* **1951**, 0, 932-934.
205. Shimomura, O.; Musicki, B.; Kishi, Y., Semi-Synthetic Aequorin. An Improved Tool for the Measurement of Calcium Ion Concentration. *Biochem. J.* **1988**, 251, 405-410.
206. Inoue, S.; Sugiura, S.; Kakoi, H.; Goto, T., *Cypridina* Bioluminescence VI: A New Route for the Synthesis of *Cypridina* Luciferin and Its Analogs. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 1609-1610.
207. Sugiura, S.; Kakoi, H.; Inoue, S.; Goto, T., Synthesis of *Cypridina* Luciferin and Related Compounds. VII. Condensation of Glyoxals with 2-Aminopyridines or Aminopyrazines. *Yakugaku Zasshi* **1970**, 90, 441-444.
208. Inoue, S., Squid Bioluminescence II. Isolation from *Watasenia scintillans* and Synthesis of 2-(*p*-Hydroxybenzyl)-6-(*p*-hydroxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one. *Chem. Lett* **1975**, 141-144.
209. Wu, C.; Kawasaki, K.; Ohgiya, S.; Ohmiya, Y., Syntheses and Evaluation of the Bioluminescent Activity of (S)-*Cypridina* Luciferin and Its Analogs. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 753-756.
210. Coutant, E.; Janin, Y., A Study of Negishi Cross-Coupling Reactions with Benzylzinc Halides- to Prepare Original 3-Ethoxypyrazoles. *Synthesis* **2015**, 47, 511-516.
211. Hervin, V.; Coutant, E.; Gagnot, G.; Janin, Y., Synthesis of α -Amino Esters Via α -Nitro or α -Oxime Esters: A Review. *Synthesis* **2017**, 49, 4093-4110.

212. Choura, M.; Belgacem, N. M.; Gandini, A., Acid-Catalyzed Polycondensation of Furfuryl Alcohol: Mechanisms of Chromophore Formation and Cross-Linking. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3839-3850.
213. Kitagawa, T.; Akiyama, N., An Improved Method for the Synthesis of DL-3-(2-Furyl) Alanine. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1865-1866.
214. Watanabe, H.; Kuwata, S.; Nakajima, S.; Koshida, K.; Hayashi, M., A Study of Unnatural Amino Acids and Their Peptides. I. The Synthesis of DL- β -(2-Furyl)- α -Alanine. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1965**, *38*, 1461-1464.
215. Manning, D. T.; Cappy, J. J.; See, R. M.; Cooke, A. R.; Fritz, C. D.; Wheeler, T. N. Use of Malonic Acid Derivative Compounds for Retarding Plant Growth. US5292937 (A), 1994.
216. Gogte, V. N.; Natu, A. A.; Pore, V. S., Alkylation of Alkyl Nitroacetates under PTC Conditions. *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 1421-1429.
217. Snider, B. B.; Che, Q., Oxidative and Dehydrative Cyclizations of Nitroacetate Esters with $\text{Mn}(\text{OAc})_3$. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7821-7827.
218. Aïssa, C., Improved Julia–Kocienski Conditions for the Methylenation of Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 360-363.
219. Burrell, A. J. M.; Martinez, C. A.; Mcdaid, P. O.; O'Neill, P. M.; Wong, J. W. Process for the Preparation of (S)-3-Cyano-5-Methylhexanoic Acid Derivatives ADN of Pregabalin. WO2012025861 (A1), 2012.
220. Kondaskar, A.; Kondaskar, S.; Fishbein, J. C.; Carter-Cooper, B. A.; Lapidus, R. G.; Sadowska, M.; Edelman, M. J.; Hosmane, R. S., Structure-Based Drug Design and Potent Anti-Cancer Activity of Tricyclic 5:7:5-Fused Diimidazo[4,5-d:4',5'-f][1,3]diazepines. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 618-631.
221. Dauzonne, D.; Royer, R., A Convenient Route to Substituted Phenylalanines. *Synthesis* **1987**, *1987*, 399-401.
222. Hull, H. M.; Bradley, N.; Knight, D. W., Diastereospecific Approach to (\pm)-Samin and 2,6-Diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane (Furofuran) Lignans Using the Ireland–Claisen Rearrangement of Unsaturated Oxamacrolides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, *0*, 857-864.
223. Ploypradith, P.; Kagan, R. K.; Ruchirawat, S., Utility of Polymer-Supported Reagents in the Total Synthesis of Lamellarins. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5119-5125.
224. Wakchaure, P. B.; Bremberg, U.; Wannberg, J.; Larhed, M., Synthesis of Enantiopure Angiotensin II Type 2 Receptor [At2r] Antagonist EMA401. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 6881-6887.
225. Baichurin, R. I.; Baichurina, L. V.; Aboskalova, N. I.; Berestovitskaya, V. M., Synthesis and Structure of β -Aryl- α -Nitroacrylates. *Russ. J. Gen. Chem.* **2013**, *83*, 1764-1770.
226. Baichurina, L. V.; Baichurin, R. I.; Aboskalova, N. I.; Berestovitskaya, V. M., Synthesis of Pyrrole- and Indole-Containing Nitropropanoates on the Basis of β -Hetaryl- α -Nitroacrylates. *Russ. J. Gen. Chem.* **2010**, *80*, 2022-2026.
227. Fornicola, R. S.; Oblinger, E.; Montgomery, J., A New Synthesis of α -Amino Acid Derivatives Employing Methyl Nitroacetate as a Versatile Glycine Template. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3528-3529.

228. Nakamura, S.; Uchiyama, M.; Ohwada, T., 4*H*-1,2-Benzoxazines with Electron-Withdrawing Substituents on the Benzene Ring: Synthesis and Application as Potent Intermediates for Oxygen-Functionalized Aromatic Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5282-5283.
229. Sugimoto, H.; Nakamura, S.; Ohwada, T., Retro-Diels–Alder Reaction of 4*H*-1,2-Benzoxazines to Generate *O*-Quinone Methides: Involvement of Highly Polarized Transition States. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 10088-10095.
230. Fioravanti, S.; Pellacani, L.; Vergari, M. C., Domino Reactions for the Synthesis of Various α -Substituted Nitro Alkenes. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 524-528.
231. Babievskii, K. K.; Chernoglazova, N. I.; Andrianov, V. G.; Bakhmutov, V. I.; Belikov, V. M.; Struchkov, Y. T., Reduction of Aliphatic Nitro Compounds. *Russ. Chem. Bull.* **1982**, *31*, 2450-2456.
232. Goldberg, D.; Abeywardane, A.; Miller, C.; Morwick, T.; Netherton, M.; Snow, R.; Wang, J.; Wu, J.-P.; Xiong, Z. Anti-Cytokine Heterocyclic Compounds. US2006276496 (A1), 2006.
233. Do, Q.-Q.; Guo, C.; Humphries, P.; Marakovits, J.; Dong, L.; Hou, X.; Johnson, M. Benzimidazole or Indole Amides as Inhibitors of PIN1. WO2006040646 (A1), 2006.
234. Kochetkov, K. A.; Babievskii, K. K.; Belikov, V. M.; Garbalinskaya, N. S.; Bakhmutov, V. I., The Reaction of Acetals with Aliphatic Nitro Compounds. 1. The Synthesis of α -Nitrosuccinic Esters. *Russ. Chem. Bull.* **1980**, *29*, 458-461.
235. Kochetkov, K. A.; Babievskii, K. K.; Nalivaiko, E. V.; Garbalinskaya, N. A.; Belikov, V. M., Reaction of Acetals with Aliphatic Nitro Compounds. *Russ. Chem. Bull.* **1981**, *30*, 466-469.
236. Klein, J.; Bergmann, E. D., The Reaction of Acetals with Malonic Acid and Its Derivatives. A Contribution to the Knowledge of the Knoevenagel-Doebner Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3452-3454.
237. Knoevenagel, E., Condensationen zwischen Malonester und Aldehyden unter dem Einfluss von Ammoniak und organischen Aminen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 2585-2595.
238. Dieckmann, W.; Groeneveld, A., Über Nitrosierungsprodukte und Constitution des durch Condensation von β -Methyladipinsäureester Entstehenden Methyl- β -Ketomethylencarbonsäureesters. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 595-605.
239. Wislicenus, W.; Grützner, R., Über die Kondensation von Alkylnitrat und Alkylnitrit mit Phenyl-Essigester. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 1930-1940.
240. Fischer, E.; Weigert, F., Synthese der α,ϵ -Diaminocaprinsäure (Inactives Lysin). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3772-3778.
241. Wacker, D. a.; Rossi, K. a.; Wang, Y. Pyridone Gpr119 G Protein-Coupled Receptor Agonists. US2009023702 (A1), 2009.
242. Munier-Lehmann, H.; Lucas-Hourani, M.; Guillou, S.; Helynck, O.; Zanghi, G.; Noel, A.; Tangy, F.; Vidalain, P.-O.; Janin, Y. L., Original 2-(3-Alkoxy-1*H*-pyrazol-1-yl)pyrimidine Derivatives as Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH). *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 860-877.
243. Lehnert, W., 3-Aryl-2-nitropropansäure-ester aus 3-Aryl-2-Nitro-2-Propensäure-estern. *Synthesis* **1976**, *1976*, 827-829.

244. Kazancioglu, E. A.; Kazancioglu, M. Z.; Fistikci, M.; Secen, H.; Altundas, R., Photooxygenation of Azidoalkyl Furans: Catalyst-Free Triazole and New Endoperoxide Rearrangement. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4790-4793.
245. Harabe, T.; Matsumoto, T.; Shioiri, T., Conformational Analysis and Selective Hydrolysis of 2,5-Disubstituted-1,3-dioxane-2-carboxylic Acid Esters. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1443-1446.
246. Yoo, J. S.; Pandya, D. Novel Tetra-Aza Macrocyclic Compound, Method for Preparing Same, and Use Thereof. EP2476683 (A2), 2012.
247. He, L.; Jiang, W. Preparation of Famciclovir and Other Purine Derivatives. US2006264629 (A1), 2006.
248. Haydon, D.; Czaplewski, L.; Stokes, N.; Davies, D.; Collins, I.; Palmer, J.; Mitchell, J.; Pitt, G. R. W.; Offermann, D. Aromatic Amides and Uses Thereof. WO2012142671 (A1), 2012.
249. Meyer, V.; Züblin, J., Über Nitrosoverbindungen der Fettreihe. II. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1878**, *11*, 692-697.
250. Giese, B.; Linker, T.; Muhn, R., Biomimetic Chain Elongation of Carbohydrates Via Radical Carbon-Carbon Bond Formation. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 935-940.
251. Laumen, K.; Machauer, R.; Tintelnot-Blomley, M.; Veenstra, S. J. Macrocyclic Compounds Useful as BACE Inhibitors. WO2008009750 (A2), 2008.
252. Wieland, T.; Georgi, V., Über die Inhaltsstoffe des Grünen Knollenblätterpilzes, XXVIII. Synthesen von β -Methyl- γ -hydroxy-leucin und β -Methyl- γ . δ -dihydroxy-leucin, Zwei Vermuteten Amanitin-Bausteinen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1966**, *700*, 133-148.
253. Floyd, D. E.; Miller, S. E., The Synthesis of DL-Lysine by Oxalate Condensation. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 1764-1767.
254. Okamoto, K. T.; Clardy, J., Studies on a Biomimetic Approach to Aerothionin and Psammaphysin-A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4969-4972.
255. Shivers, J. C.; Hauser, C. R., Synthesis of Certain α -Amino Acid Esters from Malonic Ester. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1264-1265.
256. Olynky, P.; Camp, D. B.; Griffith, A. M.; Woislowski, S.; Helmkamp, R. W., The Synthesis of DL-Lysine with C14 in the Epsilon Position. *J. Org. Chem.* **1948**, *13*, 465-470.
257. Kotake, M.; Sakan, T.; Miwa, T., Studies on Amino Acids. III. The Synthesis of α -Hydroxytryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5085-5087.
258. Pohanish, R. P.; Greene, S. A., *Wiley Guide to Chemical Incompatibilities*. 3rd ed.; Wiley: Hoboken, N.J, 2009; p 1110.
259. Japp, F. R.; Klingemann, F., Über die Constitution einiger sogenannten Gemischten Azoverbindungen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1888**, *247*, 190-225.
260. Li, J. J., Japp-Klingemann Hydrazone Synthesis. In *Name Reactions*, Springer: Berlin, Heidelberg, 2003.
261. Gilchrist, T. L.; Lingham, D. A.; Roberts, T. G., Ethyl 3-Bromo-2-hydroxyiminopropanoate, a Reagent for the Preparation of Ethyl Esters of α -Amino Acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 1089-1090.

262. Gilchrist, T. L.; Roberts, T. G., Addition and Cycloaddition Reactions of the Electrophilic Vinyl Nitroso Compounds 3-Nitrosobut-3-en-2-one, 2-Nitrosopropenal, and Ethyl 2-Nitrosopropenoate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 0, 1283-1292.
263. Gilchrist, T. L.; Hughes, D.; Stretch, W.; Chrystal, E. J. T., Formation of 2-Acetylpyridines by the Base-Catalysed Ring Opening of Dihydro-4*H*-furo[2,3-*e*]oxazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 2505-2509.
264. Sakaizumi, T.; Tanaka, H.; Hirano, K.; Kuze, N.; Ohashi, O., Generation, Microwave Spectrum, and Ab Initio MO Calculation of Trans-1-Nitrosopropene, CH₃CHCHNO (Syn-Form). *J. Mol. Spectrosc.* **1999**, 194, 79-86.
265. Maxson, R. N.; Booth, H. S.; Rehmar, S. J., Hydrogen Chloride. In *Inorg. Synth.*, Booth, H. S., Ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 1939.
266. Arnáiz, F. J., A Convenient Way to Generate Hydrogen Chloride in the Freshman Lab. *J. Chem. Educ.* **1995**, 72, 1139.
267. Cheruvallath, Z.; Feng, J.; Guntupalli, P.; Gwaltney, S. L.; Miura, J.; Sabat, M.; Tang, M. Glucokinase Activators. US2009099163 (A1), 2009.
268. Jones, R. G., Pyrazines and Related Compounds. I. A New Synthesis of Hydroxypyrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 78-81.
269. Jones, R. G. Process of Preparing Pyrazines. US2520088 (A), 1950.
270. Karmas, G.; Spoerri, P. E., The Preparation of Hydroxypyrazines and Derived Chloropyrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1580-1584.
271. Eftekhari-Sis, B.; Zirak, M.; Akbari, A., Arylglyoxals in Synthesis of Heterocyclic Compounds. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 2958-3043.
272. Riley, H. A.; Gray, A. R., Phenylglyoxal. *Org. Syn.* **1935**, 15, 67.
273. Riley, H. L.; Morley, J. F.; Friend, N. A. C., 255. Selenium Dioxide, a New Oxidising Agent. Part I. Its Reaction with Aldehydes and Ketones. *J. Chem. Soc.* **1932**, 0, 1875-1883.
274. Dudley, H. W.; Ochoa, S., 157. Benzoylphenacylcarbinol. *J. Chem. Soc.* **1933**, 0, 625-626.
275. Young, R. M.; Davies-Coleman, M. T., Microwave-Assisted Selenium Dioxide Oxidation of Aryl Methyl Ketones to Aryl Glyoxals. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 4036-4038.
276. Floyd, M. B.; Du, M. T.; Fabio, P. F.; Jacob, L. A.; Johnson, B. D., The Oxidation of Acetophenones to Arylglyoxals with Aqueous Hydrobromic Acid in Dimethyl Sulfoxide. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5022-5027.
277. Duan, W.; Geng, M.; Chen, F.; Ai, J.; Chen, Y.; Zhan, Z.; Lv, Y.; Wang, Y.; Ding, J. [1,2,4]Triazolo[4,3- β][1,2,4]triazine Compound, Preparation Method and Use Thereof. EP2650293 (A1), 2013.
278. Song, Z.; DeMarco, A.; Zhao, M.; Corley, E. G.; Thompson, A. S.; McNamara, J.; Li, Y.; Rieger, D.; Sohar, P.; Mathre, D. J.; Tschaen, D. M.; Reamer, R. A.; Huntington, M. F.; Ho, G.-J.; Tsay, F.-R.; Emerson, K.; Shuman, R.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J., Highly Chemoselective Trichloroacetimidate-Mediated Alkylation of Ascomycin: A Convergent, Practical Synthesis of the Immunosuppressant L-733,725. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1859-1867.

279. Ritzen, A.; Kehler, J.; Langgaard, M.; Nielsen, J.; Kilburn, J. P.; Farah, M. M. Novel Phenylimidazole Derivatives as PDE10A Enzyme Inhibitors. WO2009152825 (A1), 2009.
280. Kornblum, N.; Powers, J. W.; Anderson, G. J.; Jones, W. J.; Larson, H. O.; Levand, O.; Weaver, W. M., A New and Selective Method of Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6562-6562.
281. Konakahara, T.; Takagi, Y., Studies of Pyrazines. II. Synthetic Study of Hydroxypyrazine. *Heterocycles* **1978**, 9, 1733.
282. Jones, D. E.; South, M. S., Synthesis of a Versatile 2(1*H*)-Pyrazinone Core for the Preparation of Tissue Factor-Factor VIIa Inhibitors. *Tetrahedron* **2010**, 66, 2570-2581.
283. Henry, L., Formation synthétique d'alcools nitrés. In *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, CNRS: Paris, 1895; Vol. 120.
284. Rodríguez, J. M.; Dolors Pujol, M., Straightforward Synthesis of Nitroolefins by Microwave- or Ultrasound-Assisted Henry Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2629-2632.
285. Jung, F. H. Cephalosporin Derivatives. US4463173 (A), 1984.
286. Tanaka, K.; Yamamoto, E.; Watanabe, N. Pyridine Derivatives Substituted by Heterocyclic Ring and Phosphonoamino Group, and Anti-Fungal Agent Containing Same. US2009082403 (A1), 2009.
287. Nakao, A.; Suzuki, H.; Tatsumi, R.; Setsuta, T.; Seki, M.; Iwasaki, H.; Tanaka, M. Therapeutic Agent for Cerebral Infarction. US2012196824 (A1), 2012.
288. Raiford, C. L.; Fox, D. E., Condensation of Vanillin Substitution Products with Nitromethane. *J. Org. Chem.* **1944**, 09, 170-174.
289. Ramirez, F. A.; Burger, A., The Reduction of Phenolic β -Nitrostyrenes by Lithium Aluminum Hydride. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2781-2782.
290. Chen, Y.; Zhong, C.; Petersen, J. L.; Akhmedov, N. G.; Shi, X., One-Pot Asymmetric Synthesis of Substituted Piperidines by Exocyclic Chirality Induction. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2333-2336.
291. Gabrielli, S.; Ballini, R.; Palmieri, A., β -Nitroacrylates as Key Building Blocks for the Synthesis of Alkyl 3-substituted 5-oxopiperazine-2-carboxylates under Fully Heterogeneous Conditions. *Monatsh. Chem.* **2013**, 144, 509-514.
292. Pollini, G. P.; Baricordi, N.; Benetti, S.; De Risi, C.; Zanirato, V., A Simple Entry to Chiral Non-Racemic 2-Piperazinone Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3699-3701.
293. Mouhtaram, M.; Jung, L.; Stambach, J. F., Novel Synthesis of Substituted C-Phenylpiperazines by Addition of Benzylamine or Methylamine to β -Nitrostyrene. *Tetrahedron* **1993**, 49, 1391-1400.
294. Blass, B. E.; Fensome, A.; Trybulski, E.; Magolda, R.; Gardell, S. J.; Liu, K.; Samuel, M.; Feingold, I.; Huselton, C.; Jackson, C. M.; Djandjighian, L.; Ho, D.; Hennen, J.; Janusz, J. M., Selective Kv1.5 Blockers: Development of (R)-1-(Methylsulfonylamino)-3-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-4-(4-methoxyphenyl)-2-imidazolidinone (KVI-020/WYE-160020) as a Potential Treatment for Atrial Arrhythmia. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6531-6534.
295. Josien, H.; Clader, J.; Bara, T.; Xu, R.; Li, H.; Pissarnitski, D.; Zhao, Z. Substituted *N*-Arylsulfonylheterocyclic Amines as Gamma-Secretase Inhibitors. WO2006004880 (A2), 2006.

296. Kessler, H.; Oschkinat, H.; Griesinger, C.; Bermel, W., Transformation of Homonuclear Two-Dimensional NMR Techniques into One-Dimensional Techniques Using Gaussian Pulses. *J. Magn. Reson.* (1969) **1986**, 70, 106-133.
297. Stonehouse, J.; Adell, P.; Keeler, J.; Shaka, A. J., Ultrahigh-Quality NOE Spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6037-6038.
298. Stott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T.-L.; Shaka, A. J., Excitation Sculpting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Selective NOE Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4199-4200.
299. Aikawa, H.; Yano, A.; Nakatani, K., A 2,7-Diamino-1,4,8-Triazanaphthalene Derivative Delectively Binds to Cytosine Bulge DNA Only at a Weakly Acidic pH. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 1313-1316.
300. Barfoot, C.; Davies, D.; Miles, T.; Pearson, N. Compounds. WO2008128961 (A1), 2008.
301. Katoch, R.; Inagaki, H.; Fujisawa, T. Pyrrolidine Derivatives with Antibacterial Properties. WO2014024056 (A1), 2014.
302. Zhang, X.; Zheng, X.; Chupak, L. S. Aryl Substituted Bicyclic Heteroaryl Compounds. WO2017019828 (A1), 2017.
303. Markham, J. L.; Sammes, P. G., Pyrazine Chemistry. Part 10. Synthesis of Alkylated Derivatives of Piperazine-2,5-diones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 1889.
304. Willardsen, J. A.; Dudley, D. A.; Cody, W. L.; Chi, L.; McClanahan, T. B.; Mertz, T. E.; Potoczak, R. E.; Narasimhan, L. S.; Holland, D. R.; Rapundalo, S. T.; Edmunds, J. J., Design, Synthesis, and Biological Activity of Potent and Selective Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4089-4099.
305. Bui, M.; Cushing, T. D.; Gonzalez, L. D. T. F.; Hao, X.; Lucas, B. Heterocyclic Compounds and Their Uses. US2013267524 (A1), 2013.
306. Blake, K. W.; Porter, A. E. A.; Sammes, P. G., Pyrazine Chemistry. Part IV. Thermal [1,4] Eliminations from 3,6-Dihydropyrazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1972**, 2494-2497.
307. Filipan-Litvić, M.; Litvić, M.; Vinković, V., An Efficient, Metal-Free, Room Temperature Aromatization of Hantzsch-1,4-Dihydropyridines with Urea-Hydrogen Peroxide Adduct, Catalyzed by Molecular Iodine. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5649-5656.
308. Swan, G. A., 318. The Constitution of Yohimbine and Related Alkaloids. Part IV. A Synthesis of Yohimbone. *J. Chem. Soc.* **1950**, 0, 1534-1539.
309. Lucchini, V.; Prato, M.; Scorrano, G.; Tecilla, P., Cycloaddition Reactions of Ketoimines. Part II. Synthesis of Substituted Phenanthridines and Cyclopenta[c]quinolines. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, 23, 1135-1139.
310. Hoekstra, W.; Schotzinger, R.; Rafferty, S. Metalloenzyme Inhibitor Compounds. WO2012064943 (A2), 2012.
311. Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Hou, X.; Guan, H.; Chen, Q.; Ma, Y.; Xu, A., Synthesis and *In Vitro* Cytotoxic Evaluation of 1,3-Bisubstituted and 1,3,9-Trisubstituted β -Carboline Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 249-257.

312. Meisenheimer, J., Über Pyridin-, Chinolin- und Isochinolin-*N*-oxyd. *Chem. Ber.* **1926**, 59, 1848-1853.
313. Lin, D. W.; Masuda, T.; Biskup, M. B.; Nelson, J. D.; Baran, P. S., Synthesis-Guided Structure Revision of the Sarcodonin, Sarcoviolin, and Hydnellin Natural Product Family. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1013-1030.
314. Usui, I.; Lin, D. W.; Masuda, T.; Baran, P. S., Convergent Synthesis and Structural Confirmation of Phellodonin and Sarcodonin E. *Org. Lett.* **2013**, 15, 2080-2083.
315. Ohta, A.; Imazeki, A.; Itoigawa, Y.; Yamada, H.; Suga, C.; Takagai, C.; Sano, H.; Watanabe, T., Reactions of the Monoxides of 2,6-Disubstituted Pyrazines with Phosphoryl Chloride and Acetic Anhydride. *J. Heterocyclic Chem.* **1983**, 20, 311-320.
316. Ohta, A.; Kojima, A.; Aoyagi, Y., Emeheterone: Synthesis and Structural Revision. *Heterocycles* **1990**, 31, 1655-1662.
317. Sato, N.; Matsumoto, K.; Takishima, M.; Mochizuki, K., Studies on Pyrazines. Part 34. Synthetic Approach, Stability and Tautomerism of 2,6-Dihydroxypyrazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3167-3172.
318. Sato, N.; Miwa, N.; Suzuki, H.; Sakakibara, T., Studies on Pyrazines. Part 28. Deoxydative Acetoxylation of Pyrazine *N*-Oxides. *J. Heterocyclic Chem.* **1994**, 31, 1229-1233.
319. Sato, N.; Narita, N., Studies on Pyrazines. 35. An Improved Synthesis of Bromopyrazines from Hydroxypyrazines. *J. Heterocyclic Chem.* **1999**, 36, 783-786.
320. Campeau, L.-C.; Rousseaux, S.; Fagnou, K., A Solution to the 2-Pyridyl Organometallic Cross-Coupling Problem: Regioselective Catalytic Direct Arylation of Pyridine *N*-Oxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18020-18021.
321. Leclerc, J.-P.; Fagnou, K., Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Diazine *N*-Oxides with Aryl Chlorides, Bromides, and Iodides. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7945-7950.
322. Lai, J. T., Hindered Amines; III. Highly Regioselective Syntheses of 1,3,3,5,5-Pentasubstituted 2-Piperazinones and Their Nitroxyl Radicals. *Synthesis* **1981**, 1981, 40-42.
323. Rychnovsky, S. D.; Beauchamp, T.; Vaidyanathan, R.; Kwan, T., Synthesis of Chiral Nitroxides and an Unusual Racemization Reaction. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6363-6374.
324. Stoller, S.; Sicoli, G.; Baranova, T. Y.; Bennati, M.; Diederichsen, U., Topp: A Novel Nitroxide-Labeled Amino Acid for EPR Distance Measurements. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9743-9746.
325. Jing, Y.; Mardyukov, A.; Bergander, K.; Daniliuc, C. G.; Studer, A., Synthesis of Bulky Nitroxides, Characterization, and Their Application in Controlled Radical Polymerization. *Macromolecules* **2014**, 47, 3595-3602.
326. Karmas, G.; Spoerri, P. E., Displacements and Nuclear Substitutions on Hydroxypyrazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4071-4077.
327. Schneller, S. W.; May, J. L., Formycin Analogs. I. Model Studies in the Preparation of an Isomer of Formycin and Related Derivatives ((*S*)-Triazolo[4,3-*a*]pyrazines). *J. Heterocyclic Chem.* **1978**, 15, 987-992.
328. Andreotti, D.; Bacchi, S.; Delpogetto, M.; Guelfi, S.; Perboni, A.; Ribecai, A.; Spada, S.; Stabile, P.; Tampieri, M. Process for Preparing Bicyclic Compounds. WO2006108689 (A2), 2006.

329. 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.* **1995**, *34*, 1348-1350.
330. 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.
331. Shekhar, S.; Ryberg, P.; Hartwig, J. F.; Mathew, J. S.; Blackmond, D. G.; Strieter, E. R.; Buchwald, S. L., Reevaluation of the Mechanism of the Amination of Aryl Halides Catalyzed by BINAP-Ligated Palladium Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3584-3591.
332. Singh, U. K.; Strieter, E. R.; Blackmond, D. G.; Buchwald, S. L., Mechanistic Insights into the Pd(BINAP)-Catalyzed Amination of Aryl Bromides: Kinetic Studies under Synthetically Relevant Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14104-14114.
333. Alcazar-Roman, L. M.; Hartwig, J. F.; Rheingold, A. L.; Liable-Sands, L. M.; Guzei, I. A., Mechanistic Studies of the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and the Oxidative Addition of Aryl Bromides to Pd(BINAP)₂ and Pd(dppf)₂: An Unusual Case of Zero-Order Kinetic Behavior and Product Inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4618-4630.
334. Surry, D. S.; Buchwald, S. L., Dialkylbiaryl Phosphines in Pd-Catalyzed Amination: A User's Guide. *Chemical Science* **2010**, *2*, 27-50.
335. Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L., Improved Functional Group Compatibility in the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Bromides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6359-6362.
336. Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L., Applications of Palladium-Catalyzed C–N Cross-Coupling Reactions. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12564-12649.
337. Birkholz, M.-N. B. n.; Freixa, Z.; Leeuwen, P. W. N. M. v., Bite Angle Effects of Diphosphines in C–C and C–X Bond Forming Cross Coupling Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1099-1118.
338. Tolman, C. A., Steric Effects of Phosphorus Ligands in Organometallic Chemistry and Homogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 313-348.
339. Ruiz-Castillo, P.; Blackmond, D. G.; Buchwald, S. L., Rational Ligand Design for the Arylation of Hindered Primary Amines Guided by Reaction Progress Kinetic Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3085-3092.
340. Hartwig, J. F., Transition Metal Catalyzed Synthesis of Arylamines and Aryl Ethers from Aryl Halides and Triflates: Scope and Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046-2067.
341. Mauger, C. C.; Mignani, G. A., Synthetic Applications of Buchwald's Phosphines in Palladium-Catalyzed Aromatic Bond Forming Reactions. *Aldrich* **2007**, *38* (27).
342. Surry, D. S.; Buchwald, S. L., Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338–6361.
343. Bruneau, A.; Roche, M.; Alami, M.; Messaoudi, S., 2-Aminobiphenyl Palladacycles: The “Most Powerful” Precatalysts in C–C and C–Heteroatom Cross-Couplings. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 1386-1396.
344. Corbett, J. W.; Rauckhorst, M. R.; Qian, F.; Hoffman, R. L.; Knauer, C. S.; Fitzgerald, L. W., Heteroatom-Linked Indanylpzrazines are Corticotropin Releasing Factor Type-1 Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6250-6256.

345. Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L., A Highly Active Catalyst for the Room-Temperature Amination and Suzuki Coupling of Aryl Chlorides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2413-2416.
346. Falcone, D.; Osimboni, E.; Guerin, D. J., N-Arylation of Carbamate-Protected Glycine Derivatives Via Palladium Catalysis. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2646-2648.
347. Sharif, S.; Rucker, R. P.; Chandrasoma, N.; Mitchell, D.; Rodriguez, M. J.; Froese, R. D. J.; Organ, M. G., Selective Monoarylation of Primary Amines Using the Pd-PEPPSI-IPentCl Precatalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 9507-9511.
348. Hammoud, H.; Schmitt, M.; Blaise, E.; Bihel, F.; Bourguignon, J.-J., N-Heteroarylation of Chiral α -Aminoesters by Means of Palladium-Catalyzed Buchwald-Hartwig Reaction. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7930-7937.
349. Ji, Y.; Plata, R. E.; Regens, C. S.; Hay, M.; Schmidt, M.; Razler, T.; Qiu, Y.; Geng, P.; Hsiao, Y.; Rosner, T.; Eastgate, M. D.; Blackmond, D. G., Mono-Oxidation of Bidentate Bis-Phosphines in Catalyst Activation: Kinetic and Mechanistic Studies of a Pd/Xantphos-Catalyzed C-H Functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 13272-13281.
350. Meyers, C.; Maes, B. U. W.; Loones, K. T. J.; Bal, G.; Lemi re, G. L. F.; Dommissie, R. A., Study of a New Rate Increasing "Base Effect" in the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Iodides. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6010-6017.
351. Sugiura, S.; Inoue, S.; Goto, T., Synthesis of *Cypridina* Luciferin and Related Compounds. VIII. Improvement in the Synthesis of *Cypridina* Luciferin. *Yakugaku Zasshi* **1970**, 90, 707-710.
352. Nakamura, H.; Aizawa, M.; Takeuchi, D.; Murai, A.; Shimoura, O., Convergent and Short-Step Syntheses of DL-*Cypridina* Luciferin and Its Analogues Based on Pd-Mediated Cross Couplings. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2185-2188.
353. Levi, J.; De, A.; Cheng, Z.; Gambhir, S. S., Bisdeoxycoelenterazine Derivatives for Improvement of Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11900-11901.
354. Wood, K.; Hawkins, E.; Scurria, M.; Klaubert, D. Compositions, Methods and Kits Pertaining to Luminescent Compounds. WO03040100 (A1), 2003.
355. Kimura, T.; Hiraoka, K.; Kasahara, N.; Logg, C. R., Optimization of Enzyme-Substrate Pairing for Bioluminescence Imaging of Gene Transfer Using *Renilla* and *Gaussia* Luciferases. *J. Gene. Med.* **2010**, 12, 528-537.
356. Zhou, W.; Binkowski, B.; Wang, H.; Butler, B.; Machleidt, T.; Wood, K. Pro-Substrates for Live Cell Applications. US2015212078 (A1), 2015.
357. Lindberg, E.; Mizukami, S.; Ibata, K.; Miyawaki, A.; Kikuchi, K., Development of Luminescent Coelenterazine Derivatives Activatable by β -Galactosidase for Monitoring Dual Gene Expression. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 14970-14976.
358. Kakoi, H.; Okada, K., Chemical Studies of Fish Bioluminescence. *ITE Lett. Batteries New Technol. Med* **2005**, 6, 38-45.
359. Williams, D. B. G.; Lawton, M., Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8351-8354.
360. Guin , M.; Hii, K. K. M., Wang-Aldehyde Resin as a Recyclable Support for the Synthesis of α,α -Disubstituted Amino Acid Derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3188-3193.

361. Backer, H. J.; de Jonge, J., De la préparation de quelques 2-sulfanilamido-thiazoles et -sélénazoles. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1941**, 60, 495-501.
362. Borrow, E. T.; Holland, D. O., 127. The Chemistry of the Pyrrocolines. Part V. The Action of Grignard Reagents and of Iodine on 3-Acetyl-2-phenylpyrrocoline. *J. Chem. Soc.* **1947**, 0, 670-672.
363. Meltzer, R. I.; Lewis, A. D.; King, J. A., Antitubercular Substances. IV. Thioamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 4062-4066.
364. Ottenheijm, H. C. J.; Plate, R.; Noordik, J. H.; Herscheid, J. D. M., N-Hydroxytryptophan in the Synthesis of Natural Products Containing Oxidized Dioxopiperazines. An Approach to the Neoechinulin and Sporidesmin Series. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 2147-2154.
365. Li, Q.; Woods, K.; Zhu, G.-D.; Fischer, J.; Gong, J.; Li, T.; Gandhi, V.; Thomas, S.; Packard, G.; Song, X.; Abrams, J.; Diebold, R.; Dinges, J.; Hutchins, C.; Stoll, V.; Rosenberg, S.; Giranda, V. Kinase Inhibitors. US20030199511A1, 2003.
366. Rokade, B. V.; Prabhu, K. R., Synthesis of Substituted Nitroolefins: A Copper Catalyzed Nitrodecarboxylation of Unsaturated Carboxylic Acids. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6713-6716.
367. Zhang, M.; Zhou, J.; Kan, J.; Wang, M.; Su, W.; Hong, M., Pd-Catalyzed Cross-Coupling of Carboxylic Acids with Nitroethane Via Combination of Decarboxylation and Dehydrogenation. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5455-5457.
368. Inouye, S.; Sato, J.; Miura, Y. Coelenterazine Analogs. US2014302539 (A1), 2014.
369. Klaubert, D.; Meisenheimer, P.; Unch, J. Novel Coelenterazine Substrates and Methods of Use. EP2635582 (B1), 2016.
370. Jiang, X.; Tsona, N. T.; Tang, S.; Du, L., Hydrogen Bond Docking Preference in Furans: OH $\cdots\pi$ vs. OH \cdots O. *Spectrochim. Acta, Pt. A: Mol. Spectrosc.* **2018**, 191, 155-164.
371. Jackson, D. A.; Symons, R. H.; Berg, P., Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *PNAS* **1972**, 69, 2904-2909.
372. Thompson, E. M.; Nagata, S.; Tsuji, F. I., *Vargula hilgendorffii* Luciferase: A Secreted Reporter Enzyme for Monitoring Gene Expression in Mammalian Cells. *Gene* **1990**, 96, 257-262.
373. Tannous, B. A., *Gaussia* Luciferase Reporter Assay for Monitoring Biological Processes in Culture and in Vivo. *Nat. Protoc.* **2009**, 4, 582-591.

Annexe I :

Synthetic Routes to Coelenterazine and Other
Imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one Luciferins: Essential
Tools for Bioluminescence-Based Investigations

Cet article n'est pas disponible dans la version publique de ce document :

Titre Synthetic Routes to Coelenterazine and Other Imidazo[1,2-a]pyrazin-3-one Luciferins:
Essential Tools for Bioluminescence-Based Investigations

Auteur Eloi P. Coutant

Auteur Yves L. Janin

URL <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201501531>

Volume 21

Numéro 48

Pages 17158-17171

Publication Chemistry - A European Journal

ISSN 09476539

Date 2015

DOI [10.1002/chem.201501531](http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201501531)

Annexe II :
Synthesis of α -Amino Esters via α -Nitro
or α -Oxime Esters: A Review

Cet article n'est pas disponible dans la version publique de ce document :

Titre Synthesis of α -Amino Esters via α -Nitro or α -Oxime Esters: A Review

Auteur Vincent Hervin

Auteur Eloi Coutant

Auteur Glwadys Gagnot

Auteur Yves Janin

URL <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1589506>

Volume 49

Numéro 18

Pages 4093-4110

Publication Synthesis

ISSN 0039-7881, 1437-210X

Date 09/2017

DOI [10.1055/s-0036-1589506](http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1589506)

Synthèse d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones originales et leurs évaluations comme substrats de la luciférase mutée d'*Oplophorus gracilirostris* nanoKAZ

Eloi COUTANT-FLEXER

Unité de Chimie et Biocatalyse, UMR CNRS 3523
Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris

L'utilisation massive des luciférases d'origine marine comme systèmes rapporteurs reste très limitée par le coût prohibitif de leurs substrats. Ces derniers sont constitués d'un noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, dont les synthèses publiées sont difficiles et dont le stockage et l'utilisation nécessitent des précautions importantes. Nous avons découvert dans le cadre de ce projet une synthèse alternative originale d'imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones en 5 à 10 étapes ayant permis l'obtention au laboratoire de plus d'une centaine de nouveaux substrats potentiels, ainsi qu'une dérivatisation permettant le stockage de ces composés sans précaution particulière, à température ambiante, pour de longues périodes de temps.

Ces luciférines originales ont ensuite été évaluées sur un variant de la luciférase d'*Oplophorus gracilirostris*, nanoKAZ, afin d'étudier les relations structure-luminescence de ces substrats. Nous avons ainsi obtenu des substrats originaux avec des temps de demi-vie du signal bioluminescent largement accrus (plus de deux heures) ou des rapports signal/bruit cinq à dix fois supérieurs au couple commercial furimazine/nanoKAZ.

The large-scale use of marine luciferases as reporter systems is still very impeded by the prohibitive costs of their substrates. These imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones are difficult to synthesize, and their instability make their storage and use cumbersome. In the course of this project, we have discovered a new synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones in 5 to 10 steps, which allowed us to synthesize more than one hundred original potential substrates of these luciferases, alongside a derivatization method providing shelf-stable precursors of these molecules. The structure-luminescence relationships of these original substrates have been assessed with nanoKAZ, a mutated luciferase of the shrimp *Oplophorus gracilirostris*. This led us to identify original substrates endowed with greatly improved half-life (more than two hours) or with signal-over-noise ratios enhanced five to ten times versus the commercial furimazine/nanoKAZ system.