



**HAL**  
open science

# Synthèse et études de modélisation moléculaire dans l'optimisation de la sélectivité de nouveaux agents antiparasitaires inspirés de produits naturels

Mohamed Dit Mady Traore

► **To cite this version:**

Mohamed Dit Mady Traore. Synthèse et études de modélisation moléculaire dans l'optimisation de la sélectivité de nouveaux agents antiparasitaires inspirés de produits naturels. Génétique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV027 . tel-01528690

**HAL Id: tel-01528690**

**<https://theses.hal.science/tel-01528690v1>**

Submitted on 29 May 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**« Mohamed Dit Mady TRAORE »**

Thèse dirigée par « **Yung-Sing WONG** » et  
codirigée par « **Hélène JAMET** »

préparée au sein du **Laboratoire : Département de  
Pharmacochimie Moléculaire (DPM)**

dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

### **Synthèse et études de modélisation moléculaire dans l'optimisation de la sélectivité de nouveaux agents antiparasitaires inspirés de produits naturels**

Thèse soutenue publiquement le « **15 novembre 2016** »,  
devant le jury composé de :

**Docteur Anne IMBERTY**

Directeur de Recherche au CERMAV Grenoble (Président)

**Docteur Bruno FIGADERE**

Directeur de Recherche à BioCIS Châtenay-Malabry (Rapporteur)

**Professeur Jana SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS**

Professeur au CERMN Caen (Rapporteur)

**Docteur Claudia SIMOES-PIRES**

Maître assistant à l'université de Genève (Examinateur)

**Docteur Hélène JAMET**

Maître de conférences au DCM Grenoble (Membre et co-directrice de  
thèse)

**Docteur Yung-Sing WONG**

Chargé de Recherche CNRS au DPM Grenoble, rôle (Membre et  
directeur de thèse)



# Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du département de pharmacochimie moléculaire (DPM, UMR5063 CNRS-UGA) actuellement dirigé par le professeur AHCÈNE BOUMENDJEL et au sein du département de chimie moléculaire (DCM, UMR5250 CNRS-UGA) dirigé par le professeur Serge COSNIER à l'Université Grenoble Alpes. Je tiens à les remercier pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire respectif.

Mes sincères remerciements s'adressent à mon directeur de thèse Yung-Sing WONG, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et pour son suivi permanent des travaux réalisés durant cette thèse. J'ai particulièrement apprécié ta disponibilité, tes nombreux conseils mais jamais de trop et ton ouverture à la discussion qui m'a permis d'apprendre tant de choses. Un grand merci pour ta confiance et ton soutien.

J'adresse ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de thèse HÉLÈNE JAMET pour son intérêt constant pour ce travail. Un grand merci pour m'avoir fait découvrir et former à la modélisation moléculaire. De par ta disponibilité, ton enthousiasme et surtout ta patience, tu as su rendre cet enseignement très agréable.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie également les membres du comité de suivi des travaux de cette thèse : Serge Crouzy et Olivier Hamelin. Je suis ravie d'avoir partagé mes travaux avec vous malgré vos plannings respectifs.

Je remercie les personnes dont les compétences scientifiques et/ou sportives ont été essentielles au bon déroulement de ces travaux, Flaviane Hilário, Nicolas Fantozzi et Rostom Belkacem.

Mes remerciements vont également aux différents partenaires qui ont contribué à la réalisation de ces travaux. A Alessandra Nurisso pour son aide dans la construction des modèles par homologie de séquence, à Claudia Simoe-Pires et Vincent Zwick pour les tests biologiques sur HDAC. A toute l'équipe d'Henri Vial à Montpellier, Marjorie Maynardier, pour les tests sur *P. falciparum* et Sharon Wein pour les études de localisation cellulaire.

Je ne saurais finir sans remercier, tous les membres du DPM et du DCM pour leurs disponibilités et pour leur agréable compagnie. Marie-Ange qui porte si bien son nom et qui a rendu ces années de thèse tellement belles à travers sa bonne humeur. Martine pour ses conseils et les petits cadeaux qui m'ont tant touché et presque fait oublier que j'étais loin de ma famille. Antoine pour ses conseils en docking. Serge et Marck pour toutes les discussions intéressantes aussi bien autour qu'en dehors de la science. Mon Lolo qui a été mon compagnon de route pendant cette thèse. Merci pour toutes les douces nuits que nous avons partagées. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je remercie infiniment mes parents et mes frères pour leur soutien indéfectible qui m'a toujours permis d'avancer et de ne rien lâcher.

Enfin, je remercie le Labex ARCANE pour son financement. Je remercie également le ministère des affaires étrangères (France) et le ministère de l'enseignement supérieur du Mali pour m'avoir accordé la bourse d'excellence afin de réaliser des études universitaires en France.

## Liste des abréviations

Ac	Acétyle
Ar	Aryle
AIBN	2,2'-Azo-bis-isobutyronitrile
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
( <i>t</i> )Bu	( <i>tert</i> -)Butyle
Cat	Catalytique
<i>m</i> CPBA	Acide <i>m</i> -chloroperoxybenzoïque
CSA	Acide camphorsulfonique
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Bicarbonate de césium
DEA	Diéthylamine
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCE	Dichloroéthane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DLP	Dilauroylperoxyde
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMDO	Diméthylidioxirane
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	1-Ethyle-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
<i>épi</i> -	Epimère
equiv.	Equivalent
Et <sub>2</sub> O	Diéthyl éther
Et	Ethyle
HAT	Histone acétyle transférase
HATU	[ <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate]
HDAC	Histone désacétylase
HDACi	Inhibiteur d'histone désacétylase
HDLP	Histone désacétylase-like protéine
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
IC <sub>50</sub>	Concentration de produit nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité
<i>i</i> Pr	Isopropyle

IR	Infra-rouge
MeOH	Méthanol
NMO	Oxyde de <i>N</i> -méthylmorpholine
Nu	Nucléophile
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCC	Chlorochromate de pyridinium
PDB	Protein data bank
Ph	Phényle
PIDA	Phényliodonium (III) diacétate
PIFA	Phényliodonium (III) bis (trifluoroacétate)
<i>p</i> TsOH	Acide <i>para</i> -toluène sulfonique
R <sub>f</sub>	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SI	Index de sélectivité
t.a	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
TMSE	Triméthylsilyl éthyle
ZBG	Zinc binding group

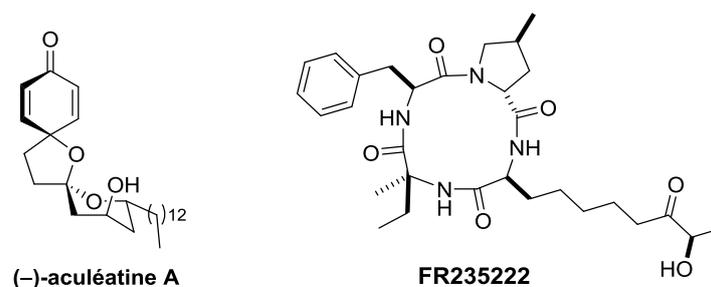
# Sommaire

<b><u>Préambule</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Chapitre I : Introduction générale &amp; description des outils de modélisation moléculaire</u></b> .....	<b>3</b>
Introduction générale.....	4
I. Le paludisme .....	4
II. La toxoplasmose .....	12
III. Avancés dans la recherche de nouveaux traitements contre le paludisme et la toxoplasmose .....	18
Description des outils de modélisation moléculaire .....	25
I. Construction de modèle par homologie de séquence .....	26
II. Docking moléculaire ligand/protéine.....	28
III. Dynamique moléculaire.....	31
IV. Evaluation de l'énergie d'interaction ligand/protéine par calcul MM-PBSA .....	32
<b><u>Chapitre II : Etude d'une nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique dans la synthèse de nouveaux composés antipaludiques et antitoxoplasmoses dérivés de produits naturels aculéatines</u></b> .....	<b>34</b>
Partie A : Etude bibliographique sur les aculéatines et contexte des travaux effectués .....	34
I. Bibliographie sur les aculéatines.....	35
II. Objectifs des travaux .....	41
Partie B : Nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » .....	43
I. Synthèse des précurseurs.....	44
II. Réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » dans les conditions catalytiques.....	46
III. Conclusion et perspectives .....	51
<b><u>Chapitre III : Optimisation de la sélectivité d'un agent antiparasitaire visant les mécanismes épigénétiques</u></b> .....	<b>53</b>
Partie A : Etudes bibliographiques sur les HDACs et les HDACi .....	54
I. Epigénétique.....	55
II. Les histones désacétylases (HDACs) : structures et fonctions .....	58
II.1. Les HDACs humaines .....	58
II.2. Les HDACs apicomplexes : <i>P. falciparum</i> et <i>T. gondii</i> .....	61
III. Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) .....	63
III.1. Les HDACi isoformes/classes sélectifs chez l'homme .....	65
III.2. Les HDACi antiparasitaires et la sélectivité entre espèces.....	72
Partie B : Etudes de pénétration et de localisation cellulaire de FR235222 .....	77
I. Introduction.....	78

II. Résultats et discussion .....	79
II.1. Synthèse d'un analogue FR235222 fluorescent.....	79
II.2. Pénétration cellulaire .....	84
II.3. Localisation cellulaire.....	86
II.4. Activités biologiques .....	88
III. Conclusion et perspectives .....	91
Partie C : Sélectivité de la tête chélatante « céto-hydroxyle » sur les HDACs de la classe I par rapport à l'HDAC6 de la classe IIb humaine .....	
	92
I. Introduction.....	93
II. Résultats et discussion .....	94
II.1. Synthèse d'analogues simplifiés de FR235222 .....	94
II.2. Résultats biologiques .....	95
II.3. Modélisation moléculaire.....	99
III. Conclusion.....	103
Partie D : Optimisation de la sélectivité du produit naturel FR235222 sur les parasites apicomplexes .....	
	107
I. Introduction.....	108
II. Construction et validation du modèle <i>Tg</i> HDAC3.....	109
III. Etudes de prédictions <i>in silico</i> .....	112
IV. Synthèse d'un HDACi potentiellement sélectif sur les parasites apicomplexes .....	120
V. Conclusion.....	122
<b><u>Conclusion générale et perspectives.....</u></b>	<b>123</b>
<b><u>Partie expérimentale .....</u></b>	<b>126</b>
<b><u>Références bibliographiques.....</u></b>	<b>172</b>

# Préambule

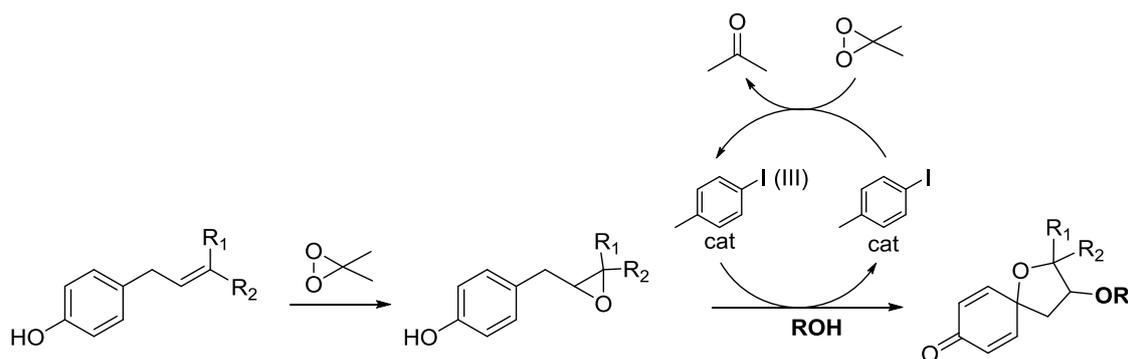
Les produits d'origine naturelle sont une source importante de découverte de nouvelles entités chimiques dont sont issus bons nombres de candidats médicaments. Les travaux de recherche réalisés lors de cette thèse touchent à des méthodes d'optimisation des structures de produits naturels dans le but de comprendre les relations structure-activité, et d'obtenir de meilleures activités biologiques antiparasitaires. Deux familles de molécules d'origine naturelle, les aculéatines et FR235222 (Figure 1), agissent de façons très efficaces sur les parasites intracellulaires de la famille des apicomplexes, responsables notamment du paludisme ou de la toxoplasmose. En développant des stratégies de synthèses flexibles et hautement modulables en peu d'étapes, le but est d'accroître l'accessibilité vers de nouveaux analogues ciblés bioactifs. Un autre aspect, qui sera abordée durant ce projet de thèse, sera d'accroître la sélectivité hôte/parasite de ces composés bioactifs.



**Figure 1.** Produits naturels aux propriétés antipaludiques et antitoxoplasmoses

Les travaux effectués dans cette thèse s'articuleront autour de deux thématiques principales : aculéatines et FR235222.

Dans la première partie, nous chercherons à élaborer une nouvelle stratégie de synthèse permettant d'accéder facilement et en peu d'étapes à de nouveaux analogues d'aculéatines à la fois efficaces, sélectifs et bon marchés. Dans cette optique, une nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » utilisant un réactif à base d'iode hypervalent en quantité catalytique sera mis au point et pourra permettre d'obtenir ces nouveaux composés bioactifs en seulement une étape à partir de composés phénoliques très simples (Schéma 1).

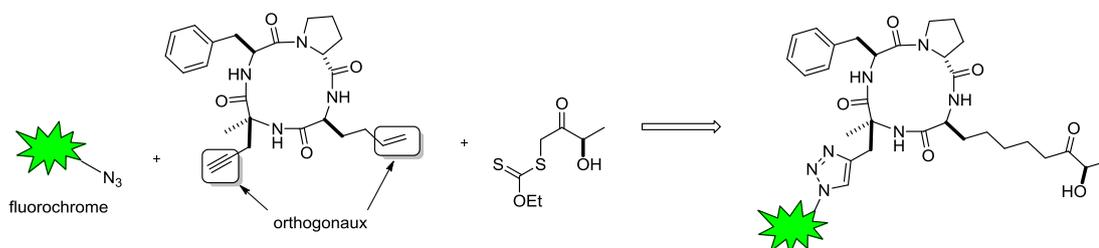


**Schéma 1.** Réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot »

Dans la deuxième partie, nous nous intéresserons à FR235222 qui possède d'excellentes propriétés antitoxoplasmoses avec comme cible identifiée, HDAC3 de *Toxoplasma gondii* (le parasite responsable de la toxoplasmose). Un des défis à relever est l'amélioration de son faible index de sélectivité ( $SI = IC_{50} \text{ cellules hôtes} / IC_{50} \text{ parasite} = 12$ ).

Dans ce contexte cette partie du projet s'articule autour de trois axes :

- L'étude des propriétés de pénétration cellulaire du cyclotérapeptide et la localisation de la cible du produit naturel FR235222 dans la cellule humaine grâce à un analogue fluorescent (schéma 2). La mise au point d'une nouvelle approche modulable qui puisse combiner trois fragments variables à la fois, par l'installation sur le cyclopeptides de deux fonctions à réactivité orthogonale nous permettra d'accéder à un analogue fluorescent du produit naturel.



**Schéma 2.** Analogue fluorescent de FR235222

- La synthèse de nouveaux analogues de FR235222 et des études de modélisation moléculaire seront faites pour comprendre la sélectivité du produit naturel sur les isoformes HDACs de la classe I humaine par rapport à HDAC6 de la classe IIb.
- Enfin, nous nous intéressons à la sélectivité entre espèces (parasites et homme). Grâce à des études de prédiction *in silico* sur *TgHDAC3* et *HsHDAC3*, nous chercherons à dégager les caractéristiques essentielles pour l'obtention d'un HDACi analogue de FR235222, sélectif sur les parasites apicomplexes.

# **Chapitre I**

Introduction générale

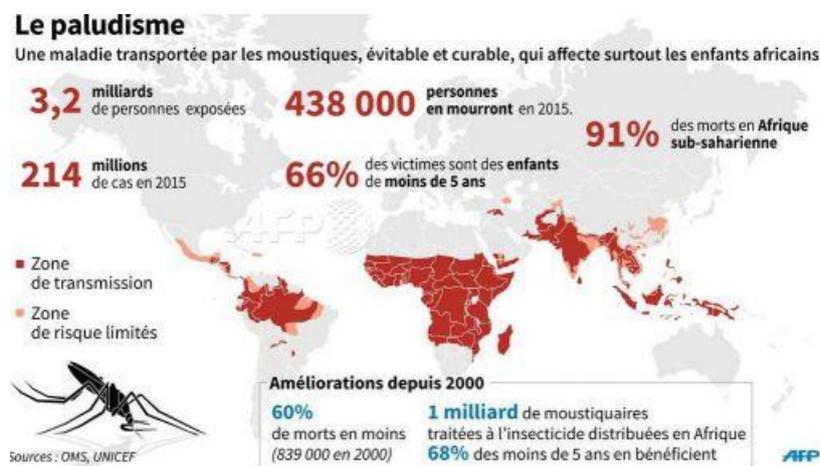
&

Description des outils de modélisation  
moléculaire

# I. Le paludisme

## I.1. Généralités

Le paludisme (malaria en anglais) est une maladie infectieuse causée par un parasite du genre *Plasmodium* et se transmet à l'homme par la piqûre des moustiques femelles *Anophèles*. Cette maladie infectieuse est responsable de plusieurs millions de morts par an à travers le monde. Les personnes les plus vulnérables sont les enfants âgés de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Sa prévalence chez l'homme varie également d'une région à l'autre. Les régions tropicales et subtropicales favorisant le développement du moustique sont les plus concernées. Selon les estimations de l'OMS en 2015, les 15 pays les plus touchés, dont la plupart se trouvent en Afrique subsaharienne, enregistraient à eux seuls 80% des cas de paludisme et 78% des décès associés dans le monde<sup>1</sup> (**Figure I.1**). En plus du réel problème de santé publique, le paludisme représente une charge financière conséquente pour les populations concernées (notamment l'Afrique) et constitue un obstacle au développement de ces régions, et par répercussion, au ralentissement du développement mondial.<sup>1</sup> De ce fait, lors de la réunion de l'assemblée générale de l'ONU en 2000, les dirigeants mondiaux se sont engagés à stopper et à inverser la tendance entre les années 2000 et 2015, par les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD).<sup>2</sup>



**Figure I.1.** Pourcentage national et cumulé du nombre de cas de paludisme et de décès associés en 2015

(source : Mohamed Berkani, Geopolis, 18/09/2015)

Qu'en est-il de ce projet en 2016 ? Selon le rapport de l'OMS de 2015, une baisse du nombre de cas de paludisme est observée et estimée à 18% (de 262 millions en 2000 à 214 millions en 2015) et une baisse du nombre décès est estimée à 48% (839000 en 2000 contre 438000 en 2015) au niveau mondial. En tenant compte de la croissance démographique, entre 2000 et 2015 le nombre de cas de paludisme aurait baissé de 37% et le nombre de décès dus au paludisme de 60%. La région Afrique reste la plus touchée avec environ 88% de cas et 90% des décès associés dans le monde, loin devant la

région d'Asie du Sud-Est qui enregistre 10% de cas et enfin la région Méditerranée orientale avec 2% de cas de paludisme.<sup>1,2</sup>

Même si ce rapport montre une baisse considérable de l'incidence du paludisme dans le monde, un travail considérable reste encore à faire surtout en Afrique subsaharienne où un enfant meurt de cette maladie toutes les deux minutes.

Pour poursuivre la lutte contre le paludisme et aller vers son éradication, un nouveau programme a récemment été élaboré par l'OMS avec plusieurs parties prenantes et avec le partenariat Roll Back Malaria.<sup>3</sup> Ce programme, avec des cibles et des objectifs les plus ambitieux, vise à réduire, d'ici 2030, l'incidence des cas de paludisme et le taux de mortalité associé d'au moins 90% (**Tableau 1**). Il s'agit, entre autre, d'assurer l'accès universel aux outils de prévention, au diagnostic et au traitement du paludisme, en particulier pour les populations les plus vulnérables et difficiles à atteindre. Chaque pays doit accélérer les efforts vers l'élimination et vers l'obtention du statut d'exempt de paludisme au moyen de combinaisons d'interventions adaptées au contexte local. Les autorités compétentes doivent faire de la surveillance du paludisme une intervention de base, ce qui permettra de lancer une intervention adaptée aux circonstances locales à chaque fois que l'efficacité des outils baisse, ou que des flambées économiques éclatent. Pour optimiser les interventions nationales, il est nécessaire de renforcer les systèmes de santé et de favoriser un environnement propice. Enfin, il faut mettre à profit l'innovation et développer la recherche.

Vision	Un monde sans paludisme		
Buts	Objectifs intermédiaires		Cibles
	2020	2025	2030
1. Réduire le taux de mortalité liée au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40%	Au moins 75%	Au moins 90%
2. Réduire l'incidence des cas au plan mondial par rapport à 2015	Au moins 40%	Au moins 75%	Au moins 90%
3. Eliminer le paludisme des pays où il y avait transmission en 2015	Au moins 10 pays	Au moins 10 pays	Au moins 10 pays
4. Empêcher la réapparition du paludisme dans tous les pays exempts	Réapparition évitée	Réapparition évitée	Réapparition évitée

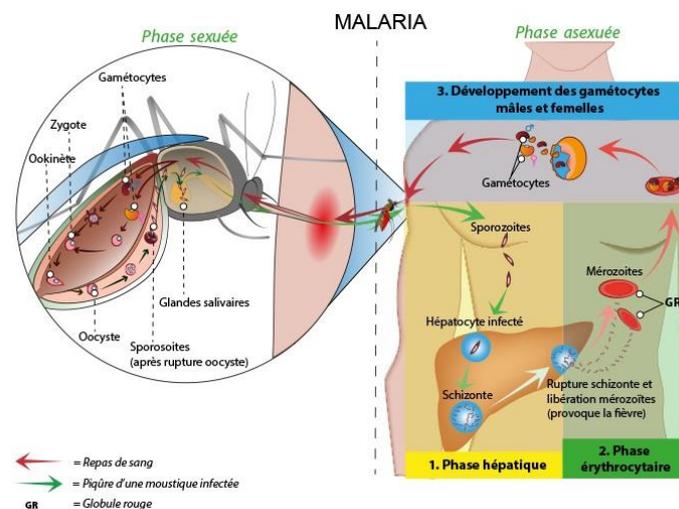
**Tableau 1.** Buts, objectifs intermédiaires et cibles du programme de lutte contre le paludisme 2016 – 2030

## I.2. Le parasite *Plasmodium* (agent pathogène) : cycle de développement

Le paludisme est causé par quatre espèces de parasite du genre *Plasmodium* : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* qui sont transmis à travers plus de 70 espèces de moustiques *Anophèles*.<sup>4</sup> Une cinquième espèce, *P. knowlesi* a été récemment diagnostiqué par microscopie mais représente un faible pourcentage des infections.<sup>4,5</sup> Ce dernier (*P. knowlesi*) est essentiellement présent chez les singes et on parle de paludisme du singe. Il ne peut infecter l'homme que si celui-ci se rapproche de l'habitat des singes (forestiers, chasseurs) ou lorsque, inversement, les singes se rapprochent de celui de l'homme (déforestation, plantation). A ce jour, aucune transmission homme – moustique – homme n'a été établie pour *P. knowlesi*. *P. falciparum* est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde et est considérée comme la plus virulente car elle est responsable de 80% des infections malariques et 90% des décès. De ce fait, *P. falciparum* constitue la première cible dans la lutte contre le paludisme.

Le cycle de développement de *Plasmodium* peut être divisé en deux parties (Figure I.2):

- Le cycle asexué ou schizogonie se produit chez l'être humain (hôte intermédiaire).
- Le cycle sexué ou sporogonie se produit chez le moustique *Anophèle* (vecteur et hôte définitif).



**Figure I.2.** Cycle de développement de *Plasmodium*<sup>6</sup>

### a) Cycle asexué (chez l'homme)

Le cycle de vie de *Plasmodium* est subdivisé en deux phases chez l'homme : une phase hépatique et une phase érythrocytaire.<sup>6</sup>

**Phase hépatique :** Lorsque le moustique (*Anophèle femelle*) pique l'homme pour prélever son repas sanguin, il lui transmet le parasite sous forme **sporozoïte**. Les sporozoïtes gagnent les cellules du foie

(hépatocytes) où ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires (formes multinucléées) qui éclatent pour libérer les **mérozoïtes** dans le sang.

Le foie est un lieu de développement pour le parasite, mais aussi, un lieu où le parasite peut résider (**hypnozoïtes**) et réapparaître plus tard lorsqu'il s'agit d'une infection par *P. vivax* ou *P. ovale*.<sup>6,7</sup>

**Phase érythrocytaire :** Très rapidement (48 heures pour *P. falciparum* et *P. vivax*, contre 72 heures pour *P. malariae*), les mérozoïtes envahissent les globules rouges où ils se multiplient et provoquent l'éclatement des érythrocytes. Les mérozoïtes libérés pénètrent dans d'autres globules rouges et débutent un nouveau cycle de réplication. Cette partie du cycle correspond à la phase clinique et la personne infectée devient fébrile. En l'absence de traitement, tous les mérozoïtes évoluent progressivement au même rythme (ils deviennent synchrones) et provoquent l'éclatement d'un grand nombre de globules rouges de manière périodique. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes se transforment en **gamétocytes** et restent en circulation dans le sang pendant 10 à 15 jours.

#### **b) Cycle sexué (chez l'*Anophèle*)**

Lorsque le moustique (*Anophèle femelle*) pique une personne infectée pour prélever son repas sanguin, il ingère des gamétocytes. Ces derniers se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent en un œuf libre et mobile appelé **ookinète**. Cet ookinète évolue ensuite en **oocyte** dans lequel se multiplient plusieurs cellules parasitaires produisant des sporozoïtes. Ces derniers migrent vers les glandes salivaires du moustique qui peut infecter à nouveau une personne saine et débiter ainsi un cycle de transmission homme – moustique – homme.

### **I.3. Les moyens de lutte contre le paludisme**

Il existe deux grandes méthodes pour lutter contre le paludisme,

La méthode préventive qui consiste à empêcher la transmission du parasite par le moustique vecteur, de l'être humain au moustique, puis à nouveau à l'être humain. Cette méthode, qui constitue la première étape dans la lutte contre le paludisme s'articule autour de trois axes : la recherche d'un vaccin (même s'il n'existe pas encore de vaccins contre le paludisme, de nombreux projets de recherche sont financés dans ce sens), la chimioprophylaxie (prévention médicamenteuse) et la lutte antivectorielle (la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides, l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) ou de sprays anti-moustiques).

La méthode curative qui intervient après l'infection consiste à traiter la personne infectée. Elle commence par un test de diagnostic qui est suivi du traitement de l'infection au moyen de médicaments antipaludiques.

### **I.3.1. Méthodes préventives**

#### ➤ **Vaccins antipaludiques**

A ce jour, plus d'une trentaine de vaccins contre le paludisme (*P. falciparum*) sont en phase d'évaluation clinique ou préclinique avancée. Parmi ces candidats à la lutte contre le paludisme se démarque le vaccin RTS,S/AS01 (Mosquirix), le seul à avoir complété la phase 3 d'essai clinique et à avoir obtenu un avis réglementaire favorable de l'OMS en 2014.<sup>8</sup> Ce vaccin, à base de protéine recombinante (utilisant l'antigène recombinant RTS,S) associée à l'adjuvant AS01, a été développé par GlaxoSmithKline (GSK) en partenariat avec le PATH MVI (Malaria Vaccine Initiative) et avec le soutien de la fondation Bill and Melinda Gates.<sup>9</sup> Les essais cliniques ont montré que le vaccin RTS,S/AS01 requiert l'administration de 4 doses (les 3 premières espacées d'un mois et la 4<sup>ème</sup> administrée 18 mois après) pour une efficacité de 27% chez les enfants âgés de 6 – 12 semaines contre 39% sur le groupe 5 – 17 mois.<sup>10</sup> Compte tenu de cette efficacité plutôt modeste, des effets indésirables, et du faible rapport coût/efficacité du RTS,S/AS01, la recherche d'un vaccin efficace contre le paludisme est toujours d'actualité.

#### ➤ **La chimioprophylaxie (ou chimioprévention)**

Elle consiste à suivre un traitement médicamenteux dans le but de prévenir la maladie. Ce moyen de lutte qui est périodique concerne généralement les touristes, les femmes enceintes et les enfants de bas âges. Les médicaments utilisés dans la chimioprévention sont variables d'une région à l'autre à cause des phénomènes de chimiorésistances (qui sera discuté plus bas) et aussi de la durée du séjour pour les touristes. En 2015, les chimioprophylaxies disponibles sur le marché sont entre autres la chloroquine (avec comme exemples, Chlorochin, Vivaquine), la méfloquine (Lariam, Méphaquine), la doxycycline (Supracycline), la chloroquine + proguanil, et enfin l'atovaquone + proguanil (Malarone).<sup>6, 11, 12</sup> La chimioprévention doit toujours être combinée avec les autres moyens de prévention car elle n'est pas efficace à 100%.

#### ➤ **La lutte antivectorielle**

Il faut savoir que le moustique (*Anophèle femelle*) pique l'homme généralement à la nuit tombée. La lutte antivectorielle consiste donc à se protéger des moustiques pendant cette période. Plusieurs moyens sont couramment utilisés tels que :

- la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides dans le but d'éliminer les moustiques à l'intérieur d'une pièce. Comme dans le cas de la chimioprévention, le type d'insecticide utilisé varie selon les régions à cause de phénomènes de résistances. Cette méthode n'est pas infaillible car l'efficacité des insecticides diminue avec le temps (au cours de la nuit) et d'autres moustiques peuvent donc pénétrer dans la pièce pour piquer.

- l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (telle que la perméthrine). Cette méthode est la plus utilisée et voire la plus efficace dans la lutte contre le paludisme. La moustiquaire protège l'homme en formant une barrière physique entre celui-ci et les moustiques et aussi parce qu'elle est imprégnée d'insecticides, elle diminue la durée de vie des moustiques donc permet de réduire le risque de transmission. Il est nécessaire de ré-imprégner régulièrement les moustiquaires pour qu'elles gardent leur efficacité. D'après le dernier rapport de l'OMS,<sup>1</sup> en 2015, environ 67% de la population des pays d'Afrique subsaharienne avait accès à une moustiquaire imprégnée.

Dans certaines régions où les moustiques ne piquent pas pendant les heures de sommeil, l'utilisation de moustiquaires imprégnées est moins fréquente. D'autres alternatives existent telles que le port de vêtements imprégnés de perméthrine, l'utilisation de spray anti-moustiques à nébuliser sur le corps ou sur les vêtements et enfin des crèmes ou lotions répulsives.<sup>6</sup>

### **I.3.2. Méthodes curatives**

Comme toutes les fièvres ne sont pas des cas de paludisme, lorsqu'une personne est fébrile, un test de diagnostic est recommandé avant de commencer tout traitement antipaludique. Dans le cas où l'infection est confirmée cela permet d'administrer un traitement approprié à la personne infectée.

#### **➤ Tests de diagnostic**

A ce jour, plusieurs méthodes (complémentaires) sont utilisées pour diagnostiquer le paludisme chez un patient.<sup>12</sup> L'une d'elles, la plus ancienne, est basée sur l'utilisation d'un microscope afin de mettre en évidence la présence du parasite dans le sang. Cette méthode, toujours utilisée, a pour avantage d'identifier la souche de *Plasmodium* responsable de l'infection et donc d'administrer le traitement approprié au malade. Une autre méthode, la plus récente, est un test de diagnostic rapide (TDR).<sup>2, 12</sup> Ce test est basé sur la détection de protéines sécrétées par le parasite dans le sang et localisées à la surface des hématies parasitées. Si la sensibilité des TDR est variable selon la souche de *Plasmodium*, ils présentent l'avantage d'être utilisable par tout le monde, ce qui permet une prise en charge rapide du malade afin d'éviter que l'infection évolue vers une forme sévère. Selon le dernier rapport de l'OMS 2015, l'utilisation des TDR aurait fortement contribué à la baisse du nombre de décès liés au paludisme sur les dix dernières années.

#### **➤ Traitements**

Lorsque le paludisme est diagnostiqué chez un individu, un traitement médicamenteux permet de stopper l'évolution de l'infection, voire même sa disparition complète dans certains cas. Ce traitement, consiste à administrer au patient une certaine dose de médicaments antipaludiques (Figure I.3) qui va interrompre le cycle de vie du parasite et donc provoquer sa mort en stoppant son évolution. A cause

des phénomènes de résistances observés chez le parasite, de nombreux composés antipaludiques ont fait leur apparition au fil du temps.<sup>4</sup> Ces composés antipaludiques peuvent être classés en plusieurs groupes.

Les molécules de la famille des **quinolines** qui ciblent l'hème dans la vacuole digestive du parasite.<sup>13</sup> Cette famille est composée de la quinine et de ses dérivés tels que, la chloroquine, l'amodiaquine, la primaquine et la méfloquine. Pendant plus de trois siècles et jusque dans les années 1930, la quinine fut utilisée comme seul médicament dans le traitement contre le paludisme.<sup>4</sup> A cause de ses effets indésirables, il a fallu faire appel à des dérivés de la quinine tout aussi efficaces et sans effets secondaires. Ainsi, la chloroquine, l'un des meilleurs dérivés de la quinine pour son efficacité, sa faible toxicité et son faible coût de production, a été largement utilisée dans le traitement du paludisme depuis les années 1940. Mais l'apparition de problèmes de résistances notamment chez *P. falciparum* a rendu la chloroquine totalement inefficace dans plusieurs régions.

En réponse aux problèmes de résistances liés à la chloroquine, une deuxième famille de molécules antipaludiques a fait son apparition, les composés **antifolates**. Ces composés qui inhibent la biosynthèse de la pyrimidine chez le parasite et donc de l'ADN parasitaire sont classés en deux groupes<sup>14</sup> selon leurs cibles : la dihydroptéroate synthase (DHPS) pour les antifolates de la classe I et la dihydrofolate reductase (DHFR) pour les antifolates de la classe II. Dans les années 1960, les combinaisons d'antifolates antiDHPS et antiDHFR ont été introduites dans le traitement du paludisme. Parmi les plus connues, nous avons les combinaisons sulfadoxine/pyriméthamine et sulfalène/pyriméthamine commercialisées sous le nom de Fansidar et de Metakelfin. Mais très rapidement après leur utilisation comme médicaments antipaludiques, les parasites ont développé des résistances aux combinaisons d'antifolates.

Une troisième famille de molécules antipaludiques (**Endoperoxydes**), l'artémisinine (ART) et ses dérivés synthétiques (Dihydroartémisinine (DHA), artémether, artéether, artésunate, acide artélinique) ont fait leur apparition dans les années 1972. En 2015, Tu Youyou, directrice de recherche à l'académie de médecine traditionnelle chinoise a reçu le prix Nobel de médecine pour la découverte de l'artémisinine isolée de la plante *Artemisia annua*. En raison de leur rapidité d'action contre *Plasmodium*, ces molécules se sont révélées être à ce jour les plus efficaces dans le traitement contre le paludisme. Cependant, à cause de leur temps de demi-vie très limité (environ 2 heures) et de l'apparition des phénomènes de résistance chez *P. falciparum*, l'OMS a demandé le retrait des monothérapies à base d'artémisinine par voie orale sur les marchés en 2007. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) ont ainsi pris la relève et constituent actuellement le premier traitement dans les cas de paludisme causés par *P. falciparum*. Il s'agit d'associer l'artémisinine (ou un de ses dérivés) avec un autre composé antipaludique ayant un temps de demi-vie plus long. Cependant, bien qu'efficaces et sans effets secondaires, le coût élevé des CTA pour les pays

en voie de développement et les problèmes de résistance qui commencent à apparaître nécessitent la recherche de nouvelles classes de molécules antipaludiques efficaces et faciles d'accès.<sup>15</sup>

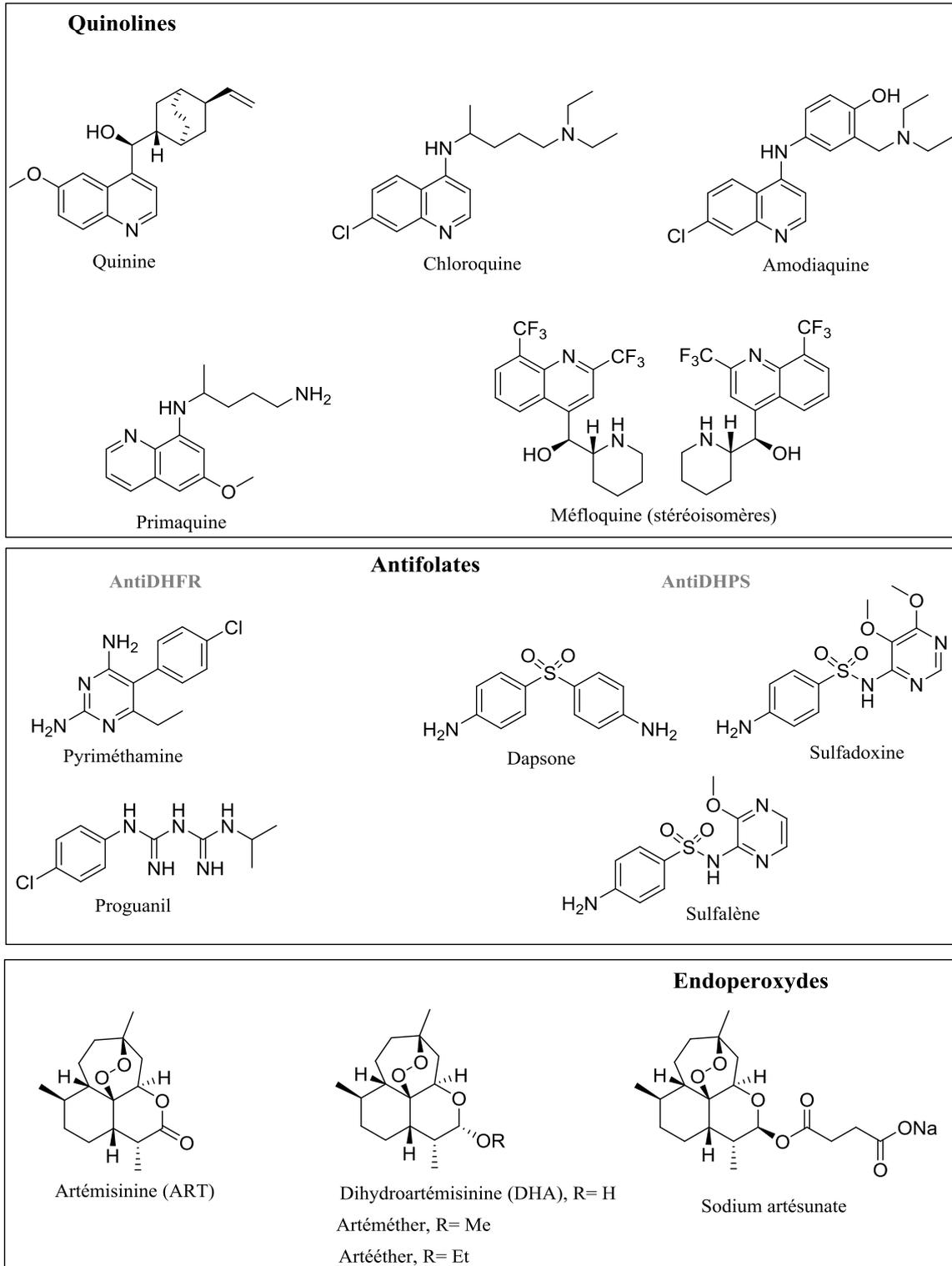


Figure I.3. Structure de quelques molécules utilisées en tant que médicaments antipaludiques

## **II. La toxoplasmose**

### **II.1. Généralités**

La toxoplasmose (comme le paludisme) est une maladie infectieuse causée par le parasite *Toxoplasma gondii* de la famille des *Apicomplexes*. Il y a maintenant plus d'un siècle (en 1908)<sup>16</sup> que le parasite *T. gondii* a été identifié pour la première fois dans les tissus d'un rongeur africain (*Ctenodactylus gundi*) par Nicolle et Manceux en Tunisie, et dans les tissus d'un lapin par Splendore au Brésil. Cependant, la toxoplasmose humaine n'a été décrite pour la première fois qu'en 1939 par Wolf, Cowen et Paige. Contrairement au paludisme qui est très présent chez l'homme (et peu chez les animaux), la toxoplasmose est peu connue chez l'homme mais constitue cependant l'infection parasitaire la plus commune chez les animaux à sang chaud, mammifères et oiseaux. Cette maladie parasitaire est responsable de nombreux avortement chez les animaux et représente par conséquent une perte économique considérable dans le secteur agroalimentaire. Le parasite *T. gondii* peut exister sous trois formes évolutives : oocystes, tachyzoïtes et kystes (bradyzoïtes).<sup>17</sup> L'homme s'infecte généralement à travers les oocystes provenant des fèces de chats souillant les fruits ou légumes mal lavés, les kystes contenues dans les viandes mal cuites, pendant les transplantations d'organes et enfin à travers les tachyzoïtes chez les femmes enceintes. Touchant plus d'un tiers de la population mondiale, l'infection d'ordinaire bénigne peut cependant présenter des risques sérieux en cas de grossesse ou d'immunodépression. Cela fait des personnes immunodéprimées et des femmes enceintes les personnes les plus vulnérables à cette infection parasitaire. Chez les femmes enceintes, la toxoplasmose peut dans certains cas provoquer l'avortement ou une naissance prématurée. Si la grossesse est maintenue, le nouveau-né peut présenter des déficiences intellectuelles, la cécité, des anomalies cardiaques et voire la mort. Chez les personnes immunodéprimées, principalement celles qui sont infectées par le VIH (SIDA) ou ayant subies une transplantation d'organes, la toxoplasmose peut provoquer des dysfonctionnements du système nerveux central conduisant à une encéphalite mortelle. La toxoplasmose est présente partout dans le monde mais l'infection étant généralement asymptomatique, il est très difficile d'obtenir des données exactes sur son incidence à travers le monde. Cela dit, chez l'homme, sa séroprévalence dans le monde est évaluée à environ 30-50%.<sup>18</sup> Cette séroprévalence augmente avec l'âge mais diminue dans les régions froides, chaudes et arides, et aussi sur les hautes altitudes. En générale, l'incidence de l'infection varie beaucoup selon les régions à cause de la différence du climat, des habitudes alimentaires et de l'hygiène.

### **II.2. *Toxoplasma gondii* : cycle de développement**

Le parasite *T. gondii*, agent pathogène de la toxoplasmose peut exister sous trois formes évolutives : oocyste, tachyzoïte et kystique. Le chat (les félins en générale) est défini comme étant son hôte définitif tandis que l'homme et les animaux à sang chaud constituent ses hôtes intermédiaires.

- Les **oocystes** résultent de la réplication du parasite dans l'intestin de l'hôte définitif (le chat).<sup>19</sup> Ils sont donc contenus dans les fèces de chats et étant particulièrement résistants, ils peuvent survivre plusieurs mois dans le sol. L'homme est infecté par les oocystes lorsqu'il ingère des aliments mal lavés souillés par les fèces de chats.
- Les **tachyzoïtes** sont le fruit de l'évolution des sporozoïtes contenus dans les oocytes. Ils se multiplient très rapidement dans les cellules de l'hôte intermédiaire et provoquent des lésions. L'homme est infecté par les tachyzoïtes pendant la grossesse (de la mère au fœtus), les transplantations d'organes et lors des transfusions sanguines.<sup>20</sup>
- Les **kystes** peuvent contenir des centaines et des milliers de **bradyzoïtes**. Sous pression de la réponse immunitaire de l'hôte intermédiaire, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes, formes à division lente. Cette transformation est réversible. Les kystes qui constituent ainsi la forme dormante du parasite sont localisés dans les endroits du corps où le système immunitaire est faible, tels que, les yeux, le cerveau, les muscles cardiaques et squelettiques. L'homme (hôte intermédiaire) s'infecte à travers des kystes présentés chez d'autres hôtes intermédiaires, par ingestion de viandes mal cuites.

Le cycle parasitaire de *T. gondii* a été décrit de manière complète en 1969 par Frenkel.<sup>19</sup> Tout comme le parasite *Plasmodium* responsable du paludisme, son cycle de développement fait intervenir trois acteurs : le parasite, l'homme (hôte intermédiaire) et le félin (hôte définitif). Ce cycle peut être divisé en deux parties (Figure II.1) : un cycle asexué (chez l'hôte intermédiaire) et un cycle sexué (chez l'hôte définitif).<sup>21</sup>

a) Cycle asexué (chez l'hôte intermédiaire)

Ce cycle débute avec l'ingestion par l'hôte intermédiaire, de kystes contenus dans les viandes crues ou mal cuites, et d'oocytes souillant les aliments mal lavés. Puisque les oocytes contiennent des sporozoïtes, une fois dans l'épithélium intestinal, ces derniers (ou les bradyzoïtes) se différencient en tachyzoïtes. Ces derniers envahissent les cellules épithéliales de l'intestin où ils se multiplient rapidement jusqu'à provoquer la rupture de ces dernières. Les tachyzoïtes ainsi libérés dans le sang vont ensuite envahir de nombreux tissus cellulaires en dehors de l'intestin. Cette forme du parasite (tachyzoïte) provoque une forte réponse inflammatoire, la destruction des tissus et par conséquent, une manifestation clinique de la maladie. De manière générale, chez l'homme, cette manifestation reste très faible et la maladie passe inaperçue. Après 7 à 10 jours, sous pression de la réponse immunitaire de l'hôte, les tachyzoïtes migrent vers les endroits où la réponse immunitaire est plus faible (yeux, cœur, muscles). Ils se multiplient moins rapidement et finit par se transformer en bradyzoïtes (kystes). Les kystes peuvent survivre jusqu'à la mort de l'hôte et lorsque le système immunitaire de ce dernier s'affaiblit (comme dans le cas d'une infection par le virus du VIH), les bradyzoïtes peuvent se reconvertir en tachyzoïtes pour provoquer à nouveau une infection.

La transmission directe de l'infection d'un hôte intermédiaire à un autre est possible par ingestion de bradyzoïtes enkystés dans les tissus d'un animal infecté.

b) Cycle sexué (chez l'hôte définitif)

Après ingestion de kystes par le félin (chat), les bradyzoïtes envahissent les cellules épithéliales de l'intestin grêle pour entamer une phase de multiplication asexuée par schizogonie. Les schizontes sont à l'origine de la formation des gamétocytes mâles et femelles qui, après fécondation, conduisent à la formation d'oocytes. Les oocytes excrétés dans les fèces du félin ne sont pas directement infectant (oocytes non sporulés), ils le deviennent après sporulation dans le milieu extérieur, 1 à 5 jours selon les conditions de température et d'aération. Les oocytes ainsi sporulés (infectieux) sont très résistants et peuvent survivre pendant plusieurs mois dans le sol et dans l'eau avant d'infecter un hôte intermédiaire.

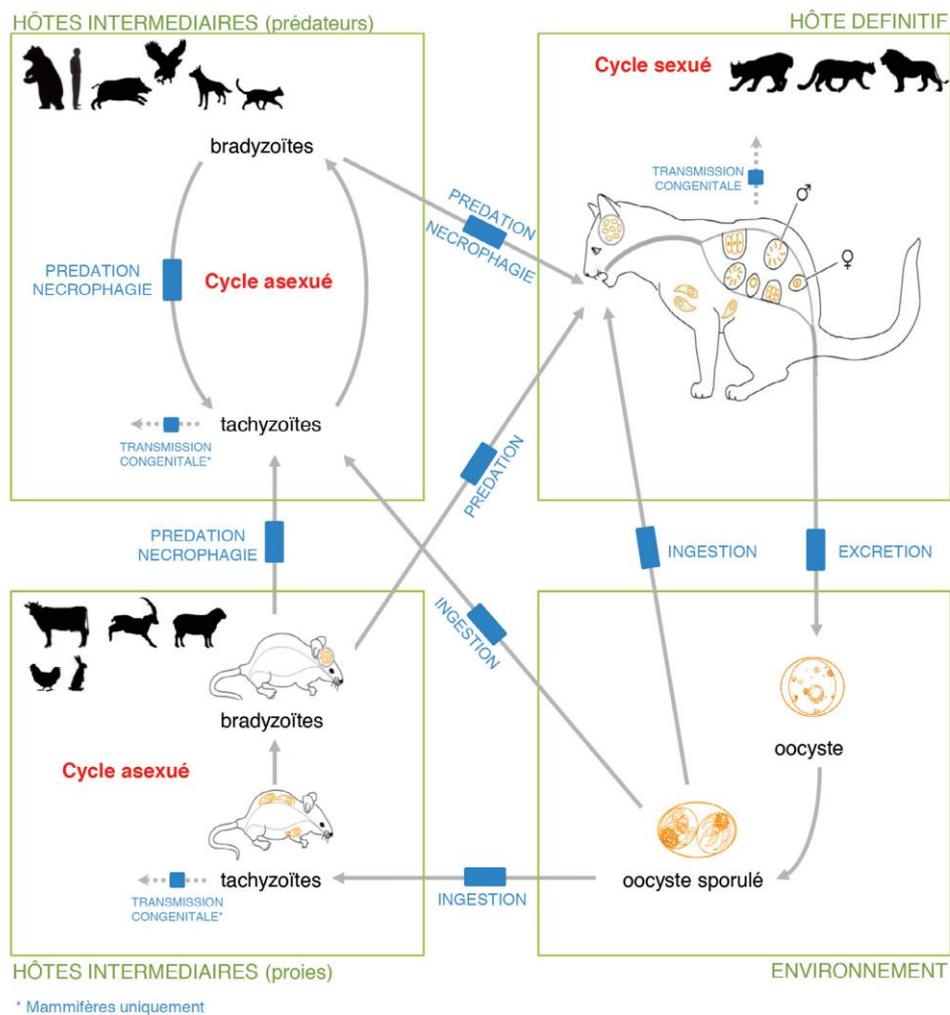


Figure II.1. Cycle de développement de *T. gondii* (d'après Mercier. A)<sup>22</sup>

## **II.3. Les moyens de lutte contre la toxoplasmose**

### **II.3.1. Prévention de l'infection**

Les méthodes de prévention contre la toxoplasmose sont très variables selon les personnes (femmes enceintes, immunodéprimées, immunocompétentes). Cependant, quelques précautions à prendre restent générales. Il faut soigneusement laver les fruits et légumes ayant été en contact avec la terre potentiellement souillées par les chats, éviter la charcuterie crue, manger de la viande bien cuite, et se laver régulièrement les mains. Pour les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées, plusieurs prophylaxies médicamenteuses sont disponibles sur les marchés.<sup>17</sup> Ces prophylaxies sont différents selon les régions et aussi de l'avancement de la grossesse pour les femmes enceintes. La mise en place de dépistage sérologique systématique chez les femmes enceintes a fortement contribué dans la baisse du nombre de cas de toxoplasmose dans certains pays (tels que, la France et l'Australie). Même si des recherches sont financées dans ce sens, actuellement il n'existe aucun vaccin contre la toxoplasmose humaine.<sup>23</sup> Cependant, un vaccin (Toxovax) faisant intervenir la souche atténuée S48 du parasite (tachyzoïtes) est commercialisé pour usage vétérinaire en Europe et en Nouvelle-Zélande pour prévenir l'avortement des brebis.<sup>24</sup> A cause de la courte durée de l'immunisation et d'un risque de réactivation des tachyzoïtes en une forme pathogène, ce vaccin n'est pas approprié pour une utilisation chez l'homme.

### **II.3.2. Diagnostic de l'infection**

La toxoplasmose étant généralement asymptomatique, elle est rarement diagnostiquée ou déclarée. Dans les rares cas où il y a apparition de symptômes, très proche de ceux de la grippe, des tests de diagnostic doivent être faits pour confirmer qu'il s'agit bien d'un cas de toxoplasmose. Deux méthodes sont couramment utilisées pour diagnostiquer une infection à *T. gondii* : la méthode indirecte et la méthode directe.<sup>25</sup>

- La méthode indirecte ou dépistage sérologique,<sup>18</sup> est basée sur la détection de la variation du taux de certains anticorps produits lors d'une réponse immunitaire de l'hôte intermédiaire au parasite *T. gondii*. Ces anticorps étant produits de manière chronologique après une première infection, de nombreux tests sérologiques basés sur différents anticorps (IgA, IgM, IgE et IgG) ont été mis au point, dans le but de diagnostiquer la maladie mais aussi de déterminer la date de l'infection.
- La méthode directe<sup>25</sup> est quant à elle basée sur l'utilisation d'outils de biologie moléculaire. Il s'agit de mettre en évidence la présence du parasite par l'intermédiaire de son ADN. L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) est l'une des techniques les plus utilisées.

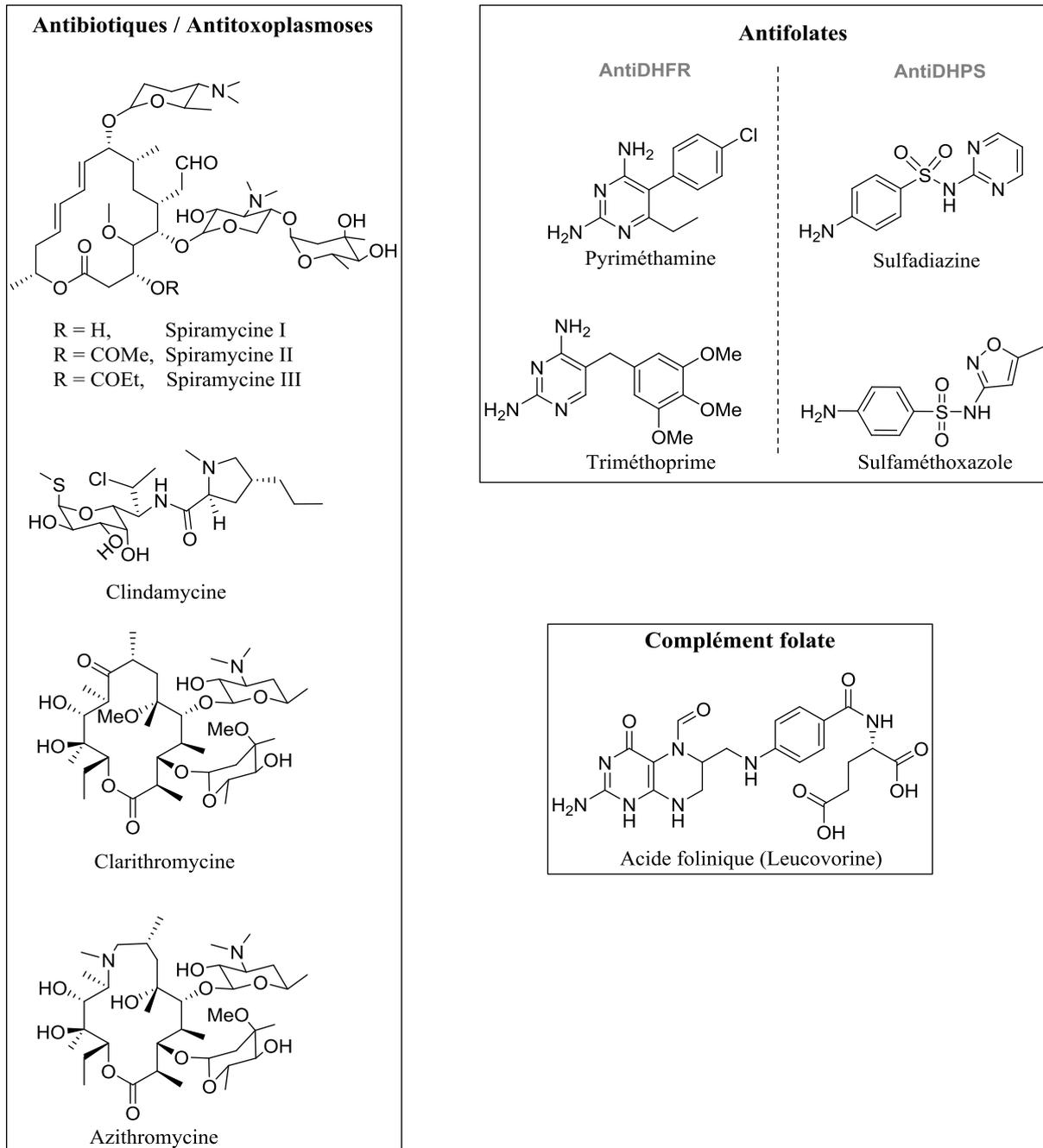
### **II.3.3. Traitement de l'infection**

Il existe aujourd'hui plusieurs médicaments contre la toxoplasmose (Figure II.2). Cependant, la prise en charge dépend fortement du profil du malade et du type de l'infection (toxoplasmose congénitale, acquise, oculaire, etc.).<sup>26</sup> Chez les personnes immunocompétentes (toxoplasmose acquise), l'infection ne nécessite aucune prise en charge médicamenteuse à moins que les symptômes ne se révèlent sévères ou persistants. La plus part des traitements qui existent aujourd'hui visent à inhiber la prolifération du parasite sous sa forme tachyzoïte (pendant la phase aigüe) et très peu ciblent la forme bradyzoïte qui est responsable de la toxoplasmose chronique.

La spiramycine (pour les femmes enceintes) et les combinaisons d'antifolates qui sont également utilisées dans le traitement du paludisme, constituent l'une des premières lignes de défense dans le traitement de la toxoplasmose.<sup>17</sup> La prescription d'une combinaison d'antifolates antiDHPS/antiDHFR chez l'homme doit être accompagnée d'une complémentation en folates (la leucovérine). L'enzyme DHFR étant présent chez l'homme, son inhibition peut provoquer une carence en folates.

Chez les femmes enceintes, lorsque l'infection survient avant la grossesse (toxoplasmose acquise), aucun traitement n'est nécessaire mais un suivi sérologique (tests de diagnostic) doit être mis en place jusqu'à la fin de la grossesse. Dans certains pays comme la France et l'Australie, un traitement préventif avec la spiramycine est systématique dès le début de la grossesse. Lorsque l'infection survient pendant la grossesse (toxoplasmose congénitale), un traitement avec la spiramycine et la combinaison d'antifolates pyriméthamine/sulfadiazine est recommandé.

Chez les personnes immunodéprimées, la combinaison pyriméthamine/sulfadiazine est le traitement le plus courant. La clindamycine peut remplacer la sulfadiazine chez les patients intolérants aux sulfonamides. D'autres molécules (souvent des antibiotiques), telles que, la clarithromycine, l'azithromycine et le dapsonne peuvent éventuellement être utilisées comme médicaments antitoxoplasmose à condition d'être combiné avec la pyriméthamine.



**Figure II.2.** Structure de quelques molécules utilisées comme médicaments antitoxoplasmoses

### III. Avancés dans la recherche de nouveaux traitements contre le paludisme et la toxoplasmose

Les parasites responsables du paludisme et de la toxoplasmose, respectivement *Plasmodium* et *Toxoplasma*, appartenant à la même famille des *Apicomplexes*, un composé antipaludique peut potentiellement être antitoxoplasmose et inversement. De nombreux antibiotiques (Atovaquone) sont utilisés dans le traitement de ces deux parasitoses.

Depuis l'artémisinine, aucune nouvelle molécule n'a été mise sur le marché pour le traitement du paludisme. En 2009, une résistance aux CTA a été observée aux alentours des régions Thai-Cambodge.<sup>27</sup> Cette constante apparition des phénomènes de résistance<sup>4</sup> aux médicaments antipaludiques nécessite un effort continu dans la recherche de nouvelles molécules ayant un nouveau mode d'action. Contrairement à *Plasmodium*, très peu de résistances sont observées chez *Toxoplasma*. En effet, l'homme étant moins touché par la toxoplasmose et du fait qu'elle est souvent asymptomatique, l'utilisation des traitements antitoxoplasmose est moindre et de ce fait, très peu de phénomènes de résistance se développent.

Dans l'optique de développer de nouveaux traitements contre le paludisme et la toxoplasmose, de nombreuses molécules dérivées de produits naturels et visant de nouvelles cibles ou des cibles déjà explorées sont actuellement en cours d'études.<sup>28</sup> Il s'agit soit, de faire de nouveaux dérivés ou des combinaisons de dérivés des produits naturels déjà utilisés dans le traitement du paludisme, soit d'explorer la piste de nouveaux produits naturels utilisés dans la médecine traditionnelle pour leur activité antipaludique.

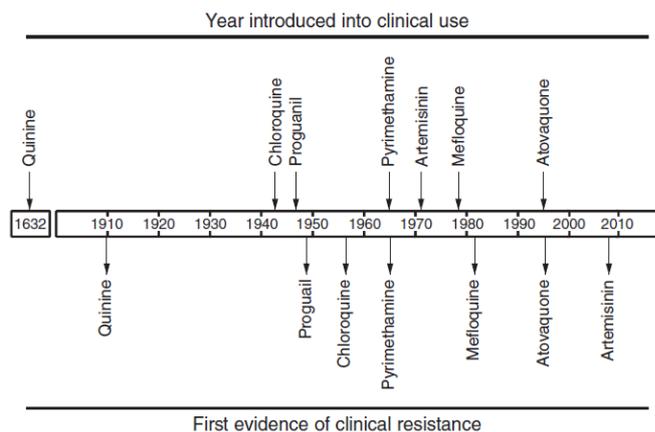
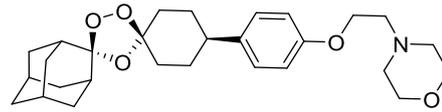


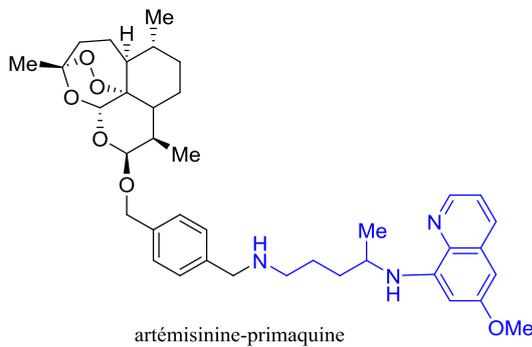
Figure III.1. Introduction des médicaments sur le marché et apparitions des résistances.<sup>28a</sup>



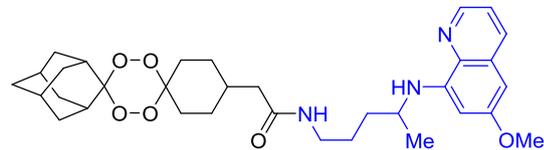


artéménomel (OZ439)

Des molécules hybrides endopéroxyde/quinoline comme, **tétraoxanes ou artémisinine/primaquine** sont actuellement en cours d'étude afin de pouvoir cibler simultanément les phases hépatique et érythrocytaire.<sup>33</sup> L'artémisinine et ses dérivés étant les seuls traitements antipaludiques à montrer une activité sur les gamétocytes dans la phase érythrocytaire, ce genre de traitement aura pour avantage de bloquer partiellement la transmission de l'infection (homme-moustique) mais aussi d'éviter une rechute grâce à la primaquine (ou dérivés) qui est active contre les hypnozoïtes.



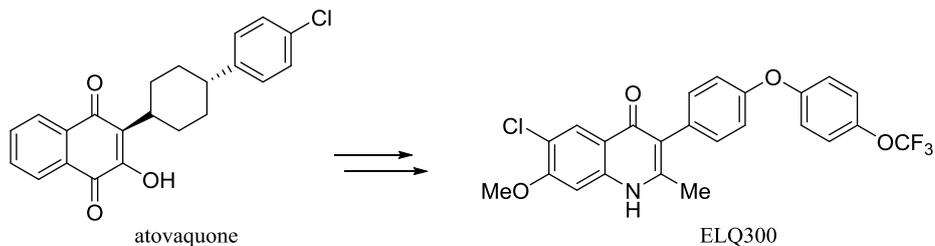
artémisinine-primaquine



tétraoxane-primaquine

### L'atovaquone, un antibiotique qui cible la mitochondrie

A la fois un antipaludique et une antitoxoplasmose, l'atovaquone a longtemps été utilisé comme prophylaxie en combinaison avec d'autres molécules dans la lutte contre le paludisme. Cette molécule inhibe le complexe cytochrome  $bc_1$  de *Plasmodium* et bloque ainsi la chaîne de transfert des électrons (Electron Transport Chain, ETC) mitochondriales.<sup>34</sup> A cause de la toxicité de l'atovaquone, qui est associée à l'inhibition non sélective du cytochrome  $b$  humain, et de l'apparition des phénomènes de résistances, des nouveaux dérivés de l'atovaquone sont en cours de développement. Un de ces dérivés, **ELQ300**, a montré une forte activité sur des souches de *P. falciparum* résistantes à l'atovaquone.<sup>35</sup> En plus, cette molécule qui est en phase I d'essai clinique présenterait moins de toxicité car elle a l'avantage d'être sélective sur le complexe cytochrome  $bc_1$  des mitochondries parasitaires.

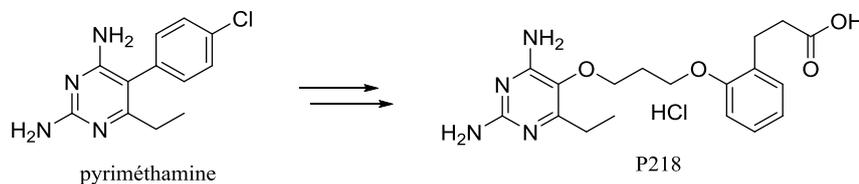


atovaquone

ELQ300

Les antifolates, inhibiteurs de DHFR/DHPS

Généralement utilisés en combinaison thérapeutique pour leur effet synergique, ces molécules inhibent la biosynthèse des pyrimidines et entraînent la mort du parasite. L'enzyme DHFR étant présent chez l'homme, son inhibition provoque des carences en folates. Cette toxicité, plus les phénomènes de résistances observés à la pyriméthamine (un antiDHFR), a conduit à la découverte d'un nouvel inhibiteur antiDHFR efficace et sélectif sur le parasite, le **P218**.<sup>36</sup> Cette molécule a été développée par BIOTEC (un centre de recherche Thaïlandais) en faisant des études de simulations sur la structure cristalline de DHFR humain et de DHFR *P. falciparum*. Les outils de modélisation moléculaire constituent donc une grande aide dans la recherche de nouveaux traitements antipaludiques et antitoxoplasmoses.



### III.2. Quelques nouvelles molécules visant de nouvelles cibles (ou cibles inconnues)

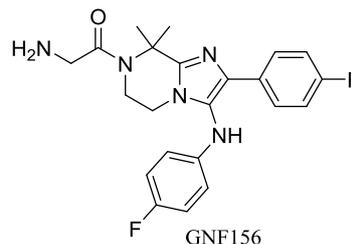
#### Les spiroindolones (NITD609) inhibiteur de PfATP4

Cette famille de molécule a été découverte par Novartis suite à un screening de 12000 molécules (produits naturels et synthétiques) sur des cellules infectées par *Plasmodium*. Pendant ce screening, un spiroindolone a montré une forte activité de l'ordre du nanomolaire sur des souches sensibles de *P. falciparum* (NF54), mais aussi, sur des souches résistantes à la chloroquine et à la pyriméthamine (K1). Ce spiroindolone a par la suite été optimisé pour conduire au dérivé **NITD609** (renommé KAE609), qui se trouve actuellement en phase II d'essai clinique.<sup>37</sup> Des études ont montré que les spiroindolones ciblent *PfATP4*,<sup>38</sup> une pompe à proton vacuolaire (V-H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>) qui régule l'homéostasie de sodium chez *Plasmodium*. KAE609 est actif sur la phase érythrocytaire (correspond à la phase clinique de l'infection) mais aussi sur les gamétocytes, ce qui a pour avantage de bloquer la transmission de l'infection homme-moustique. Cette nouvelle famille de molécule, visant une nouvelle cible, représentent un espoir dans la recherche de nouveaux traitements antipaludiques. Le projet Spiroindolone a été sélectionné comme projet de l'année en 2009 par MMV (Medicines for Malaria Ventures).



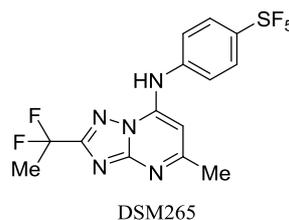
### Imidazolopipérazines (GNF156) inhibiteurs de PfPI(4)K

**GNF156** (appelé aussi KAF156), un nouveau composé antipaludique, est le fruit de l'optimisation d'une molécule sélectionnée par Novartis après un screening sur cellule.<sup>39</sup> Cette molécule est la seule de la famille des imidazolopipérazines actuellement en phase II d'essai clinique. Elle cible le phosphatidylinositol-4-OH kinase (PI(4)K) de *Plasmodium* et inhibe le développement intracellulaire de plusieurs souches de *Plasmodium*.<sup>40</sup> Les imidazolopipérazines ont une forte activité sur plusieurs phases du cycle de développement du parasite. Ils peuvent donc potentiellement bloquer la transmission de l'infection en agissant sur les gamétoocytes, mais aussi éviter une rechute en agissant sur les hypnozoïtes dans le cas d'une infection par *P.vivax*. GNF156 pourrait être utilisé dans le traitement comme dans la prévention contre le paludisme.



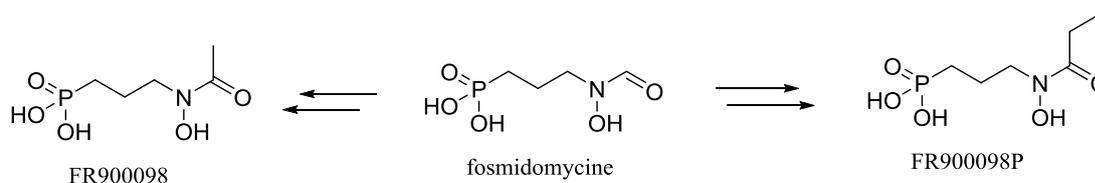
### DSM265 inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH)

DHOH est une enzyme clé dans la biosynthèse des pyrimidines.<sup>34</sup> Un screening effectué sur la protéine recombinante PfDHOH a permis d'identifier le motif triazolopyrimidine comme un inhibiteur potentiel de l'activité enzymatique de PfDHOH et de la prolifération du parasite. A travers des études de simulation, l'optimisation des premiers hits provenant du screening a permis d'accéder à un inhibiteur sélectif de PfDHOH, le **DSM265**. Cette nouvelle molécule qui a montré une forte activité sur plusieurs souches résistantes de *P. falciparum* est actuellement en phase II d'essai clinique.<sup>41</sup>



### La fosmidomycine et ses dérivés, inhibiteurs de PfDxr

Plusieurs antibiotiques dérivés de produits naturels sont connus pour avoir une activité contre *Plasmodium* et *Toxoplasma*. Ils peuvent potentiellement être utilisés dans la recherche de nouveaux traitements. La fosmidomycine et son dérivé acétylé (**FR900098**), représentent une de ces classes d'antibiotiques à avoir une activité antipaludique. Ces composés inhibent la voie du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) dans la biosynthèse de l'isoprène, en ciblant l'enzyme DXP réductoisomérase (appelée Dxr ou IspC).<sup>42</sup> Ce mécanisme qui est essentiel pour beaucoup de microorganismes y compris *Plasmodium* est absent chez l'homme, ce qui fait de la PfDxr une cible très prometteuse dans la lutte contre le paludisme. Cependant, il se trouve que *Plasmodium* peut augmenter son nombre de Dxr pour développer une résistance aux inhibiteurs ciblant ce mécanisme. Récemment, un nouveau dérivé *N*-propionyl de la fosmidomycine, **FR900098P**, a montré une meilleure activité sur *P. falciparum* comparé à ses analogues.<sup>43</sup> La très forte solubilité de la fosmidomycine et ses dérivés fait de ces composés, des candidats très prometteurs dans le traitement de cas de paludisme sévère (administration intraveineuse). A ce jour, aucune de ces molécules n'est entrée en phase d'essai clinique.



## Conclusion

Le paludisme et la toxoplasmose sont deux maladies causées respectivement par *Plasmodium* et *Toxoplasma*, des parasites de la famille des *Apicomplexes*. Ces deux infections, causant plusieurs millions de décès par an dont majoritairement des enfants (le paludisme) et des millions d'avortements chez le bétail (la toxoplasmose), représentent un réel problème de santé publique et économique, surtout dans les pays en voie de développement. Au fil du temps, de nombreux traitements ont été développés ou sont en cours de développement contre ces parasitoses. Mais en l'absence de vaccins, la capacité des parasites à développer une résistance aux médicaments rend la lutte très difficile et nous amène à la recherche perpétuelle de nouvelles molécules visant de nouvelles cibles. Les travaux de recherche qui sont décrits dans ce manuscrit s'inscrivent dans ce cadre. La nature ayant toujours été une source généreuse dans la recherche de nouveaux médicaments, il s'agit ici, d'explorer deux produits naturels visant de nouvelles cibles avec une forte activité antipaludique et antitoxoplasmose.

Les travaux effectués dans cette thèse font intervenir aussi bien, des outils de synthèse organique que des outils de modélisation moléculaire. Ces derniers seront utilisés pour faire de la construction de modèle (structure 3D d'une protéine) par homologie de séquence, des études de docking et enfin de la dynamique moléculaire.

## Description des outils de modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est la description des molécules et de leurs interactions dans l'espace à l'aide de calculs. Pour chaque structure, on peut calculer une énergie et la structure moléculaire la plus probable correspond à celle ayant l'énergie potentielle la plus basse. Les méthodes de calculs utilisées peuvent être classées en deux groupes selon la molécule étudiée :

- **la mécanique quantique**, qui permet une description relativement précise des systèmes de petites tailles (environ 100 atomes) tels que les molécules organiques. C'est l'étude de la structure électronique, de la liaison et réactivité chimique. Elle est basée sur la résolution de l'équation de Schrödinger, une équation différentielle fonction des coordonnées électroniques du système.
- **La mécanique moléculaire**, qui permet une description plus approximative des systèmes de grandes tailles (plus de 1000 atomes) telles que, les protéines, l'ADN, l'ARN et bien d'autres. Ici, le système est simplifié. On assimile les atomes à des sphères chargées, les liaisons covalentes à des ressorts et l'énergie potentielle du système est donnée à travers l'expression d'un **champ de force**. Il correspond à un ensemble d'équations et de paramètres décrits ci-dessous. Il existe plusieurs types de champs de force selon le système qu'on souhaite étudier. AMBER et CHARMM sont les plus couramment utilisés pour la modélisation des systèmes biologiques.

$$E_{MM} = E_{\text{Liaisons}} + E_{\text{Angles}} + E_{\text{Dièdres}} + E_{\text{Dièdres Impropres}} + E_{\text{Electrostatiques}} + E_{\text{Van Der Waals}}$$

Termes liants

Termes non liants

Equation de mécanique moléculaire permettant de calculer l'énergie potentielle d'un système

Dans le cadre des travaux effectués dans cette thèse, essentiellement la mécanique moléculaire a été utilisée.

## **I. Construction de modèle par homologie de séquence**

Les études de modélisation moléculaire nécessitent la disponibilité des coordonnées spatiales des molécules à étudier. La base de données PDB (Protein Data Bank) regroupe l'ensemble des structures tridimensionnelles (structures 3D) des protéines biologiques, résolues par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie RMN ou par cryomicroscopie.

Lorsque la structure 3D d'une protéine n'est pas résolue expérimentalement, il est possible de construire un modèle à partir d'une protéine homologue dont la structure 3D a été définie expérimentalement et qui présente une séquence similaire à celle de la protéine à modéliser. Deux protéines sont dites homologues, lorsque leurs séquences ont divergé à partir d'un ancêtre commun. Elles peuvent avoir les mêmes fonctions et une structure 3D très proche. La modélisation par homologie de séquence repose sur le principe que la structure 3D de protéines homologues est relativement bien conservée à travers l'évolution. La protéine dont la structure 3D sert de support pour construire un modèle est appelée « empreinte ».

La construction d'un modèle par homologie de séquence nécessite plusieurs étapes : le choix de l'empreinte, l'alignement des séquences, la construction du modèle et la validation du modèle.

### ➤ Choix de l'empreinte

Le choix de la protéine qui servira d'empreinte constitue la première étape dans la construction d'un modèle par homologie de séquence. Il est obtenu par un alignement local avec la séquence de la protéine d'intérêt. L'alignement local permet de rechercher dans la séquence d'une protéine, des régions similaires à la séquence de la protéine d'intérêt (ou à des parties de cette séquence). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un programme d'alignement local utilisé pour trouver une ou plusieurs empreintes. Il permet de retrouver rapidement dans des bases de données, les séquences ayant des zones de similitudes avec une séquence donnée. Le degré d'identité ou de similitude est quantifié par un score.

En pratique, il faut récupérer dans un premier temps la séquence de la protéine d'intérêt sur UniProt (une base de données de séquences de protéines) et ensuite rechercher avec BLAST des séquences similaires (empreintes) avec la séquence d'intérêt. La séquence la plus similaire (ayant le plus haut score) avec celle de la protéine d'intérêt et dont la structure 3D a été définie expérimentalement est choisie comme empreinte. Plus l'empreinte présente des similitudes avec la protéine d'intérêt, plus fiable sera le modèle construit pour cette dernière. Il est à noter que, la construction d'un modèle par homologie de séquence nécessite au minimum 30% d'identité entre l'empreinte et la protéine d'intérêt. Toutefois, lorsque ce pourcentage n'est pas atteint, il est possible de construire un modèle à partir d'une combinaison de plusieurs empreintes.

➤ Alignement des séquences

Il s'agit de faire un alignement global de la séquence à modéliser avec la séquence de l'empreinte. L'alignement global consiste à comparer des séquences homologues sur toute leur longueur pour identifier les régions conservées et les régions ayant subi une modification (insertion, délétion) appelées « gap ». Dans cette thèse, cet alignement sera effectué avec le logiciel de modélisation de protéine MOE. Cette étape est très importante pour l'obtention d'un modèle fiable car si l'alignement est incorrect, le modèle généré sera probablement faux. Il convient de vérifier que les régions non conservées (gap) ne sont pas localisées dans le site catalytique (dans le cœur de la protéine) car il vaut mieux choisir une empreinte qui présente globalement peu d'identité avec la séquence à modéliser mais dont le site catalytique est conservé que le contraire. En effet, il est plus facile de modéliser les résidus situés à la surface de la protéine car ils sont plus flexibles et il y a moins d'encombrements stériques.

➤ Construction du modèle avec MOE

Après l'alignement des séquences, cette étape consiste à générer une structure 3D pour la protéine cible à partir de celle de l'empreinte. Elle est réalisée avec le logiciel MOE dans le cadre de cette thèse. Le principe est de calquer dans un premier temps les régions conservées de la protéine à modéliser sur le squelette carboné de l'empreinte. Les régions non conservées correspondent généralement à des boucles, qui contrairement aux hélices  $\alpha$  et aux feuillets  $\beta$  sont très flexibles et peuvent adopter différentes conformations. Ainsi, dans un second temps, plusieurs promodèles sont générés en tenant compte de la flexibilité des boucles et des chaînes latérales. C'est la moyenne de ces promodèles qui constituera le modèle. Une superposition du modèle avec la structure 3D de l'empreinte est effectuée pour faire une comparaison et identifier les différences majeures. La première étape dans l'analyse du modèle consiste à vérifier son diagramme de Ramachandran fourni par PROCHECK. Ce diagramme représente sous forme d'aires, les différentes combinaisons d'angles tolérées pour la structure secondaire d'une liaison peptidique. Il comporte trois zones favorables et les acides aminés sont représentés par des points.

Les glycines représentées par une croix, échappent à cette règle car elles ne comportent pas de chaîne latérale et possèdent une grande liberté conformationnelle. Une structure est considérée fiable, lorsqu'au moins 94% des acides aminés qui la composent se trouvent dans les zones favorables sur le diagramme de Ramachandran. Si certains résidus du modèle se trouvent dans la zone défavorable, selon leur localisation dans la protéine, il peut être nécessaire de faire une minimisation ou une dynamique afin d'optimiser leur structure. Le modèle ainsi affiné est généralement validé par des données expérimentales.

## II. Docking moléculaire protéine/ligand

### ➤ Principe général

Le docking (amarrage) moléculaire est une méthode empirique qui permet de prédire l'affinité entre deux molécules. Il est généralement utilisé pour prédire l'affinité d'un ligand pour une protéine, entre autre, la position et l'orientation la plus favorable pour un ligand venant en interaction avec une protéine cible. Cet outil est actuellement très sollicité dans la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Il est utilisé pour faire des criblages très rapides et peu coûteux afin d'identifier une molécule pouvant avoir une forte activité sur une protéine cible ou au contraire d'identifier la cible d'une molécule ayant des activités biologiques intéressantes. D'autres parts, lorsque la structure tridimensionnelle d'une protéine cible est définie, le docking permet de mettre en évidence les régions et les résidus à explorer pour optimiser l'affinité d'un ligand avec cette cible. Ainsi, il est également utilisé pour optimiser la sélectivité d'une molécule entre deux ou plusieurs protéines.

Le principe général est, considérant une cible de géométrie donnée, d'essayer de placer le ligand en interaction avec la protéine de la façon la plus favorable possible. Lors du docking, la protéine cible est généralement figée alors qu'une certaine flexibilité est attribuée au ligand (angle de torsion). Il existe de nombreux logiciels de docking, qu'on peut répartir en deux catégories selon la méthode utilisée : la simulation de trajectoire et l'ajustement de fragments. A partir d'une position initiale aléatoire, la simulation de trajectoire consiste à explorer plusieurs positions (avec différentes conformations du ligand) par évaluation de l'énergie d'interaction ligand/protéine. La meilleure position est celle qui est la plus basse en énergie, donc correspond au complexe ligand/protéine le plus stable. La seconde approche, ajustement de fragments, est basée sur la complémentarité des formes. Dans cette méthode, le ligand est décomposé en plusieurs fragments puis reconstruit dans le site actif, en essayant de faire correspondre les géométries et les fonctions chimiques. Cette méthode est beaucoup plus rapide que la simulation de trajectoire et permet généralement le criblage rapide de vastes bibliothèques de molécules. La méthode par simulation de trajectoire est plus lente mais prend mieux en compte la flexibilité du ligand et permet l'exploration de régions plus vastes.

Compte tenu des avantages et inconvénients de chaque méthode, deux logiciels seront utilisés dans cette thèse : **AUTODOCK 3.05** (la simulation de trajectoire), pour la validation du modèle construit par homologie de séquence et **GOLD** (ajustement de fragments), pour les études de prédiction.

### ➤ Docking avec AUTODOCK

L'interaction ligand/protéine est évaluée en suivant plusieurs étapes.

Préparation des sources : Il s'agit de vérifier et d'affiner la structure du ligand et de la cible (protéine) avant de les sauvegarder au bon format mol2. Tous les atomes d'hydrogène du ligand sont présents,

alors que seuls les hydrogènes essentiels (polaires) de la cible ne sont gardés. Les charges partielles sont assignées par la méthode qui convient (Gasteiger pour le ligand et KOLL UNI pour la cible). Cette étape est effectuée avec le logiciel SYBYL et son module BIOPOLYMER. Le fichier cible.mol2 est converti en format pdbq puis pdbqs avec le module convpdbq d'AUTODOCK dans lesquels on trouve les charges et paramètres de solvation des atomes de la cible. Pour le ligand.mol2, on définit avec le module deftors d'AUTODOCK les pivots qui sont en libre rotation durant la simulation et on génère le fichier ligand.pdbq.

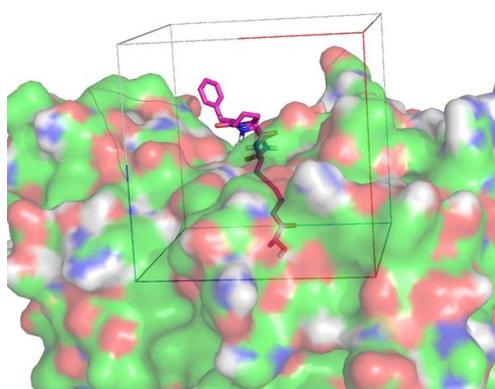
Génération d'une boîte contenant la grille et calcul des grilles de potentiels : Les deux fichiers ligand.pdbq et cible.pdbqs ayant des coordonnées spatiales différentes, on rapproche le ligand de la cible (site catalytique). Une boîte contenant une grille est définie autour de la cible (cible.pdbqs), qui correspond à la région où peut s'amarrer le ligand (ligand.pdbq). Cette boîte est généralement centrée sur le ligand et ses dimensions doivent être éditées afin de l'ajuster au mieux à la région de la cible qu'on souhaite étudier (site catalytique). Elle est générée par AUTODOCK et visualisée sur SYBYL (Figure II.1.(a)). Pour chaque type d'atome présent dans le ligand (C, O, N...), le programme AUTOGRID de AUTODOCK calcule l'énergie d'interaction avec la cible lorsqu'il est placé en un point donné de la grille. Cette évaluation est répétée pour chaque type d'atome et chaque point de la grille. Le but est d'évaluer très rapidement l'énergie pour les différentes configurations du ligand.

Génération des paramètres de recherche : On génère le fichier ligand.cible.dpf à partir du ligand.pdbq et cible.pdbqs. Ce fichier qui contient les paramètres de recherche est par la suite édité pour ajuster les paramètres tels que le nombre de conformations générés, la précision de recherche et bien d'autres.

Recherche et propositions de solutions par AUTODOCK : Le programme procède à la recherche du complexe ligand/cible le plus favorable en déplaçant et en changeant la conformation du ligand. La recherche est faite via un algorithme génétique qui permet de générer des configurations et positions du ligand rapidement. A chaque configuration, l'énergie d'interaction est évaluée en mécanique moléculaire avec un champ de force spécifique à AUTODOCK et en utilisant la grille calculée précédemment.

Analyse de résultats : A la fin du docking, un fichier ligand.cible.dlg est généré. Il contient des histogrammes (ou clusters) regroupant les solutions proposées par similitude et les classe par énergies croissantes (Figure II.1.(b)). La similarité entre deux solutions est calculée par la racine de la moyenne des carrés des écarts (Root Mean Square Deviation – RMSD). Deux solutions classées dans le même cluster, si le RMSD entre les deux est inférieur à une valeur seuil. Cette valeur est définie lors de la génération des paramètres, dans le fichier ligand.cible.dpf. Théoriquement, la meilleure solution est celle qui a l'énergie la plus basse et se trouve idéalement dans le cluster le plus peuplé.

On peut ensuite extraire les coordonnées des solutions trouvées pour les visualiser avec des logiciels de visualisation (VMD, PYMOL, SYBYL et d'autres).



(a) Boîte

Clus-ter Rank	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
	Docked Energy		Docked Energy	in Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-12.33	126	-10.30	19	#####						
2	-11.58	76	-10.52	4	####						
3	-11.05	147	-9.93	46	#####						
4	-11.01	188	-9.66	12	#####						
5	-10.95	50	-10.95	1	#						
6	-10.21	156	-10.21	1	#						
7	-10.10	104	-10.10	1	#						
8	-9.92	38	-9.02	2	##						
9	-9.69	166	-9.17	7	#####						
10	-9.61	27	-8.97	6	#####						

(b) Résultat de docking : Histogramme

**Figure II.1.** Docking moléculaire avec AUTODOCK

#### ➤ Docking avec GOLD :

GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) est un logiciel de docking basé sur la complémentarité de forme et il est généralement utilisé pour le docking de petites molécules organiques dans le site catalytique d'une protéine. En comparaison à AUTODOCK, GOLD est plus rapide et très simple d'utilisation. Le logiciel est fourni sous forme d'un ensemble de programme (HERMES) pour la visualisation et la manipulation des structures.

Pour faire un docking, on ouvre HERMES et on rentre dans le programme GOLD. La première étape consiste à charger la protéine cible sous format mol2 et de vérifier que tous les atomes d'hydrogène sont présents. On définit ensuite une région à étudier autour de la cible, qui correspond au site catalytique de la protéine. Dans la deuxième étape, comme pour la cible, on charge le ligand sous format mol2 et on vérifie que tous les atomes d'hydrogène sont présents. A cette étape, on définit le nombre de cycle (GA runs) qui correspond au nombre de solutions générées à la fin du docking. Contrairement à la cible qui est figée, on attribue une certaine flexibilité au ligand. La troisième étape consiste à définir une fonction de score, qui permet d'évaluer l'affinité entre le ligand et la cible. Il existe plusieurs fonctions de score et CHEMPLP, qui est la fonction de score par default de GOLD est celle qui a été utilisée dans cette thèse. C'est une fonction de score empirique qui tient compte de la complémentarité stérique entre le ligand et la cible, et inclut des termes de distance et d'angle pour les liaisons hydrogènes. Dans la dernière étape, GOLD procède à la recherche de la position du ligand qui exploite le mieux le site catalytique de la cible *via* un algorithme génétique. A la fin du docking, plusieurs solutions sont générées en fonction du nombre de cycle (GA runs) défini. Ces solutions sont

classées en fonction de leur score et la meilleure pose de docking correspond à celle qui a le score le plus haut (best ranking) et qui revient le plus de fois.

### III. Dynamique moléculaire

Dans le milieu biologique, les protéines sont très flexibles et existent sous plusieurs conformations en équilibre entre elles. Contrairement à la majorité des docking où la protéine est fixe, la dynamique moléculaire permet de tenir compte de cette grande flexibilité de la protéine. Elle peut donc être utilisée pour valider ou affiner une position de docking (complexe ligand/protéine).

En dynamique moléculaire, le mouvement des atomes d'une molécule est simulé en intégrant les équations de Newton  $F = ma$  ( $F$ , vecteur force,  $a$ , vecteur accélération et  $m$ , la masse) en fonction du temps. Par des méthodes d'intégration numérique, la dynamique moléculaire permet de calculer à chaque instant ( $t + dt$ ) la force exercée sur chaque atome, et fournit ainsi différentes informations sur leur trajectoire : accélération, vitesse et position. Etant donné que la force change suivant la position des atomes, il est nécessaire de calculer avec des pas petits (pas d'intégration «  $dt$  » de l'ordre de la femtoseconde à la nanoseconde). En effet, avec des pas trop grands, la force change pendant l'intégration et comme ce changement ne sera pas pris en compte, la simulation sera fautive.

D'un point de vue pratique, nos simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées par le logiciel AMBER et elles se sont déroulées en plusieurs étapes :

- En partant du complexe ligand/protéine obtenu par docking, la première étape consiste à préparer le ligand et la protéine. Pour le ligand, on calcule les charges RESP à partir du calcul quantique du potentiel électrostatique à l'aide du logiciel GAUSSIAN. Les autres paramètres (termes électrostatiques, liaison covalente, ...) sont générés avec le programme ANTECHAMBER en utilisant le champ de force GAFF (General Amber Force Field). Ce champ de force est utilisé pour les petites molécules pharmaceutiques et est compatible avec les autres champs de force d'AMBER (ff99SB pour la protéine et TIP3PBOX pour les molécules d'eau). On utilise XLEAP, l'interface du programme leap d'AMBER, pour préparer le système avant la dynamique. Le complexe ligand/protéine est placé dans une boîte d'eau et la charge globale du complexe est neutralisée par ajout d'ions  $\text{Na}^+$ .
- La deuxième étape (minimisation de l'énergie), consiste à déterminer l'état initial, qui correspond à une conformation optimisée par mécanique moléculaire dans des conditions statiques à 0° K.
- La mise en température, consiste à chauffer progressivement (par pallier) le système de 0° K à la température définie pour la simulation. La vitesse et la position des atomes sont recalculées à chaque pallier.

- La simulation proprement dite est faite à température constante. Le mouvement des atomes est recalculé jusqu'à ce que le système atteigne un état d'équilibre où les énergies cinétique et potentielle restent constantes.

Une fois l'équilibration atteinte l'analyse de la dynamique proprement dite peut se faire. Différentes analyses peuvent se faire selon le problème étudié : analyse de liaison hydrogène, stabilité de la structure, etc.

## IV. Evaluation de l'énergie d'interaction ligand/protéine par calcul

### MM-PBSA

Les études de dynamique moléculaire permettent uniquement de déterminer l'énergie potentielle d'un système. D'autres méthodes sont utilisées pour calculer l'énergie d'interaction d'un ligand avec une protéine (énergie libre de liaison). Une d'entre elles est l'approche MM-PBSA. A partir des coordonnées extraites de la dynamique moléculaire, la méthode MM-PBSA permet de calculer l'énergie libre d'un système placé dans un solvant implicite. Un solvant implicite correspond à un milieu continu avec une constante diélectrique.

Dans la théorie MM-PBSA, l'énergie libre d'un système dans le solvant est décomposée en deux termes :

- **L'énergie en phase gaz**, qui peut être assimilée à l'enthalpie (H) lorsqu'on néglige l'entropie, est calculée en mécanique moléculaire.
- **L'énergie de solvation** est liée à deux termes, le potentiel électrostatique qui est obtenu par la résolution de l'équation de Poisson Boltzman et l'énergie associée à la surface accessible au solvant.

Ainsi, ces deux termes sont calculés pour chaque élément de la réaction (ligand, protéine, complexe) et la différence conduit à l'énergie libre d'interaction du complexe ligand/protéine (Schéma 1).



$$\Delta G = G_{\text{complexe}} - G_{\text{ligand}} - G_{\text{protéine}}$$

$$G = G_{\text{gas}} + G_{\text{solvation}} - TS \quad G_{\text{gas}} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{Angles}} + E_{\text{dièdres}} + E_{\text{Torsions}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{Elec}}$$

$$G_{\text{solvation}} = G_{\text{PB}} + G_{\text{SA}}$$

$\downarrow$   $\downarrow$   
 Terme lié à l'équation de Poisson Boltzman Terme lié à la Surface Accessible au solvant

En pratique, l'énergie libre d'interaction n'est pas déterminée à partir d'une seule structure issue de la dynamique. Elle correspond en effet, à la moyenne de l'énergie calculée pour plusieurs structures stables. Par exemple, pour une dynamique de 2 ns qui a atteint l'équilibre à partir de 0,5 ns de temps de calcul, on peut récupérer une cinquantaine de structures entre 0,5 et 2 ns pour évaluer l'énergie libre d'interaction ligand/protéine. Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons le module MM-PBSA du logiciel AMBER pour déterminer l'énergie libre d'interaction de nos systèmes.

Les outils de modélisation moléculaire sont de nos jours très utilisés dans la chimie médicinale. Dans le cadre des travaux effectués dans cette thèse, ces outils seront utilisés d'une part pour comprendre et expliquer des phénomènes biologiques et d'autre part, pour faire des études de prédiction dans le but d'optimiser la sélectivité d'un agent antiparasitaire.

## **Chapitre II**

*Etude d'une nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique dans la synthèse de nouveaux composés antipaludiques et antitoxoplasmoses dérivés des produits naturels aculéatines*

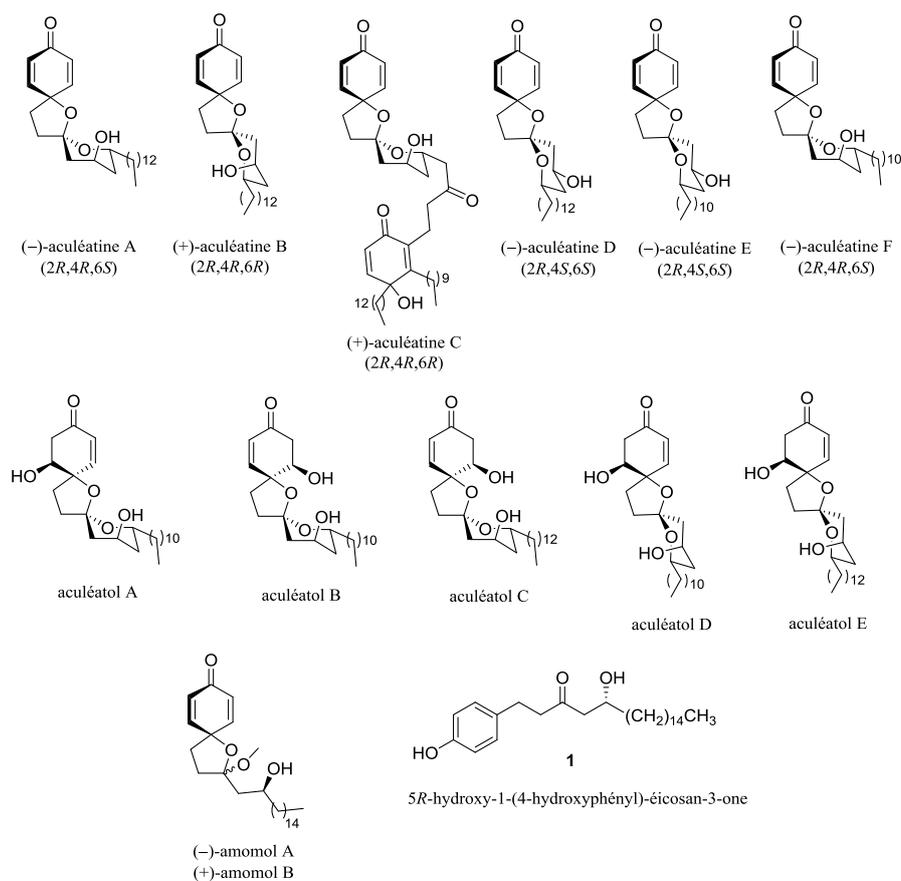
### **Partie A**

Etude Bibliographique sur les aculéatines et contexte des travaux effectués dans cette thèse

## I. Bibliographie sur les aculéatines

### I.1 Découverte des composés de la famille des aculéatines

*Amomum aculeatum* est une plante herbacée rencontrée en Indonésie, en Malaisie et en Nouvelle Guinée Papouasie. Cette plante a longtemps été utilisée dans ces régions pour le traitement de la fièvre et du paludisme en médecine traditionnelle. En 2000, Heilmann et son équipe ont isolé et caractérisé pour la première fois les aculéatines A, B et C des racines de cette plante (Figure I.1).<sup>44</sup> L'aculéatine D a été caractérisée par la même équipe une année plus tard.<sup>45</sup>



**Figure I.1.** Les aculéatines et analogues naturels

Du fait de leur activité antiparasitaire et de leur cytotoxicité, cette nouvelle famille de molécules a attiré l'intérêt de certains chercheurs à travers le monde. Ainsi, en 2007, Kinghorn et son équipe ont isolé et caractérisé les aculéatols A-D à partir des feuilles et des rachis d'*Amomum aculeatum*.<sup>46</sup> Une autre molécule acyclique a été isolée au cours de cette extraction. Il s'agit du composé **1**, qui pourrait éventuellement être un précurseur naturel des amomols. En 2008, la même équipe a identifié les derniers membres connus de cette famille des aculéatines.<sup>47</sup> Il s'agit des aculéatines E et F, l'aculéatol E et enfin les deux amomols A et B.

## I.2 Activités biologiques des aculéatines et analogues naturels

Avec leur caractérisation au cours du temps, l'activité biologique de ces composés a été évaluée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et sur des souches de certains parasites (Tableau I.1). D'abord connues pour leurs propriétés antipaludiques, les aculéatines A, B et C ont montré une activité inhibitrice de l'ordre de 0,20  $\mu\text{M}$  sur les souches K1 et NF54 de *P. falciparum*.<sup>44</sup> Pour ces mêmes composés, une activité légèrement plus faible de l'ordre de 1,7  $\mu\text{M}$  a été observée sur des lignées de cellules cancéreuses KB. Contrairement à ses analogues parents, l'aculéatine D s'est montrée légèrement plus active sur les cellules cancéreuses que sur *P. falciparum*.<sup>45</sup> Elle reste cependant, la seule à avoir une activité antibactérienne. Les composés isolés par Kinghorn ont également montré une cytotoxicité sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses mais leurs activités antiprotozoaires n'ont pas été évaluées.<sup>46, 47</sup>

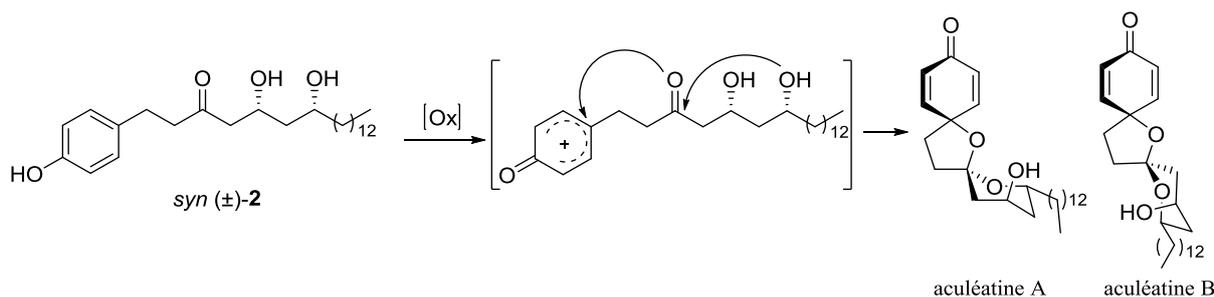
	Activités antipaludiques (IC <sub>50</sub> en $\mu\text{M}$ )		Cytotoxicité (lignées cellulaires) (IC <sub>50</sub> en $\mu\text{M}$ )				Activités antibactériennes (CMI en $\mu\text{M}$ )		
	<i>P. falciparum</i> K1	<i>P. falciparum</i> NF54	KB	Lu1	LNCaP	MCF-7	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. Epidermis</i>
Aculéatine A	0,18	0,20	1,7	1,0	0,5	0,2			
Aculéatine B	0,43	0,62	2,0	3,1	1,2	1,9			
Aculéatine C	0,37	0,51	1,6						
Aculéatine D	1,00	1,12	0,9				38	38	19
Aculéatol A				3,7	1,5	2,7			
Aculéatol B				1,5	1,2	2,7			
Aculéatol C				2,8	1,1	1,6			
Aculéatol D				5,4	2,2	1,7			
Aculéatine E				1,8	1,8	0,5			
Aculéatine F				1,0	0,7	0,5			
Aculéatol E				1,8	4,4	3,9			
Amomol A				0,9	0,7	0,9			
Amomol B				0,5	0,9	0,7			
Chloroquine	0,12	0,01							
Podophyllotoxine			0,01						
Chloramphenicol							4	2	4

**Tableau I.1.** Activités biologiques des aculéatines et analogues naturels

### I.3 Synthèses antérieures des aculéatines

En dehors de leurs activités biologiques, les aculéatines, par leur structure très originale ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique.

Ainsi, plusieurs aculéatines et analogues ont été synthétisés de façon racémique et stéréosélective. Ces synthèses passent par un mécanisme biomimétique hypothétique (Schéma I.1), qui repose sur une réaction cascade d'oxydation phénolique suivie d'une double cyclisation intramoléculaire en partant d'un précurseur de type **2**.



**Schéma I.1.** Hypothèse biomimétique de la synthèse des aculéatines

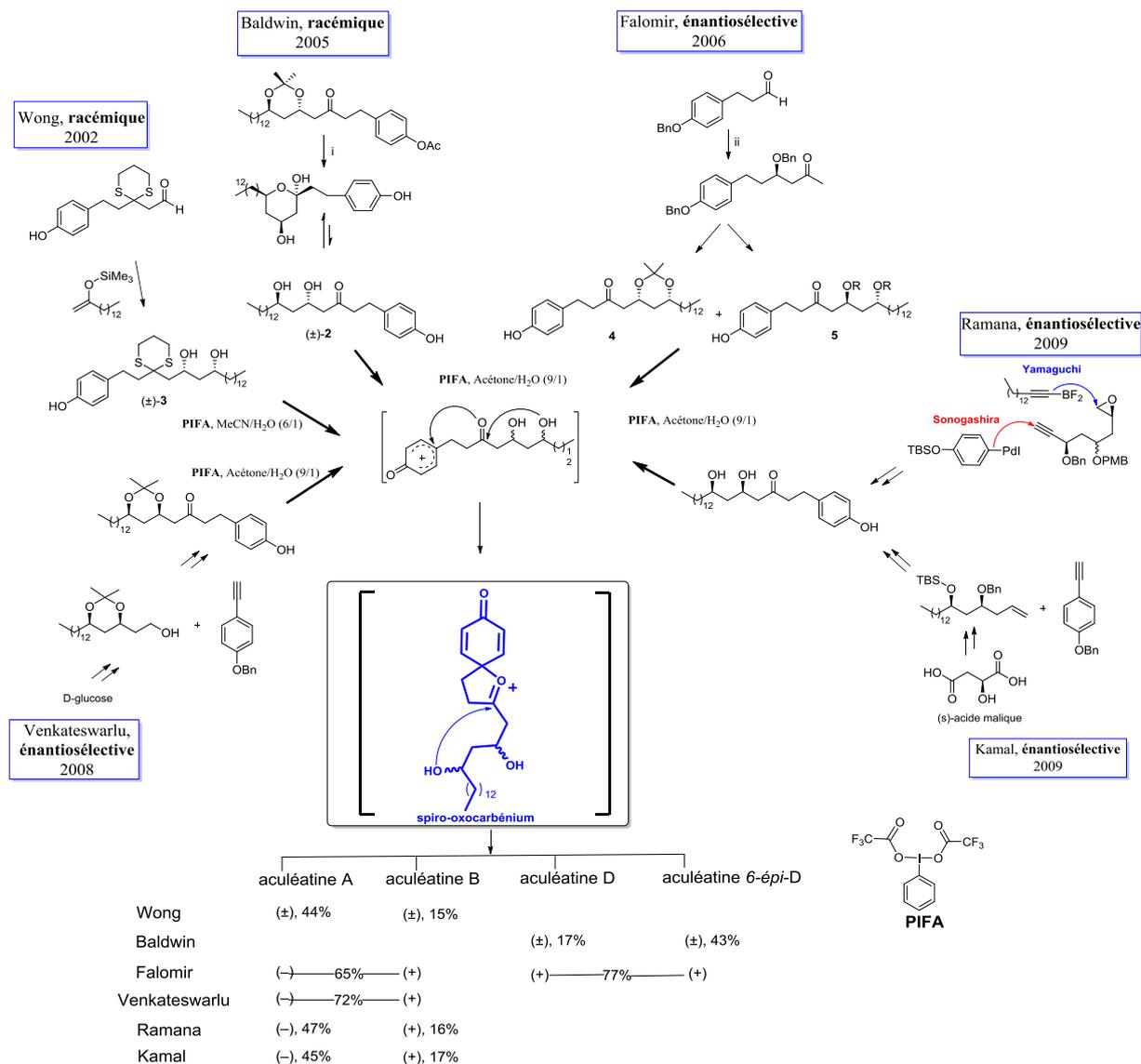
En 2002, le laboratoire a été le premier à décrire la synthèse totale des aculéatines A et B de façon racémique (Schéma I.2).<sup>48</sup> A partir du précurseur ( $\pm$ )-**3** obtenu préalablement à travers une aldolisation, une réaction tandem de déprotection du dithiane / oxydation phénolique en présence du PIFA a permis d'accéder aux aculéatines A et B sous forme racémique.

La synthèse racémique de l'aculéatine D et d'un analogue non naturel, le 6-*épi*-D a par la suite été décrite par Baldwin et son équipe en 2005.<sup>49</sup> Cette synthèse a été réalisée à travers une réaction d'oxydation phénolique en partant du composé *anti* ( $\pm$ )-**2** synthétisé préalablement. L'importance du solvant sur la stéréochimie du produit final a également été mise en évidence lors de cette étude.

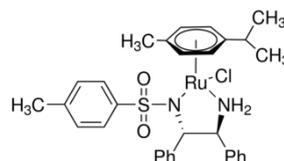
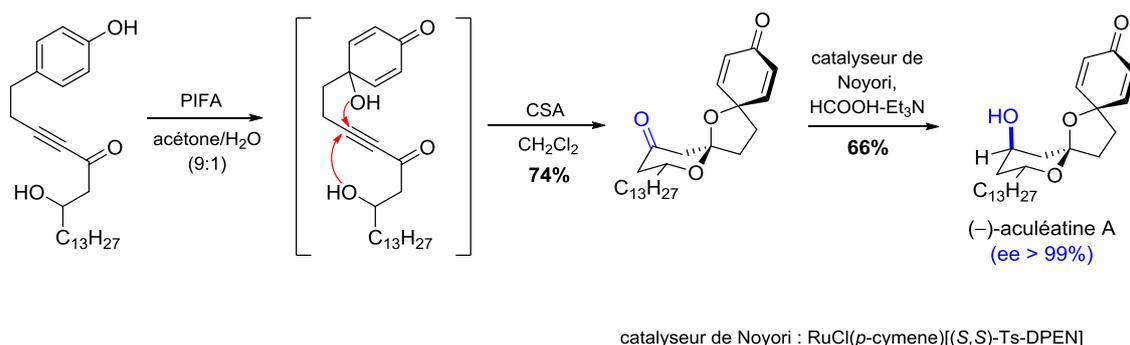
En 2006, Falomir et son équipe ont rapporté la première synthèse énantiosélective des aculéatines A, B, D et de l'analogue non naturel 6-*épi*-D.<sup>50</sup> Cette synthèse a été réalisée grâce une réaction d'allylation asymétrique suivie d'aldolisations stéréosélectives permettant d'accéder aux différents précurseurs **4** et **5**. Réalisées dans les conditions optimales décrites par Baldwin, l'oxydation phénolique du composé **4** a permis d'accéder aux aculéatines A et B dans un mélange où A est majoritaire. Dans les mêmes conditions, le composé **5** a conduit au mélange d'aculéatines D et 6-*épi*-D, cette dernière étant majoritaire.

Depuis, plusieurs synthèses stéréosélectives des aculéatines ont été décrites en gardant la même réaction clé d'oxydation phénolique mais en utilisant toujours des stratégies de plus en plus ingénieuses dans la synthèse des précurseurs.<sup>51</sup> Dans chacune de ces approches, le cation « spiro-

oxocarbénium » est donc resté l'intermédiaire clé pour accéder aux aculéatines. D'autre part, ces synthèses présentent l'inconvénient de toujours conduire à un mélange spiroisomérique d'aculéatines (A/B ou D/6-épi-D). En 2014, Tong et son équipe ont réussi à obtenir la (-)-aculéatine A en un seul spiroisomère (Schéma I.3).<sup>52</sup> A partir d'un précurseur contenant un phénol et une fonction alcyne, cette synthèse met en jeu une première réaction d'oxydation phénolique suivie d'une double addition intramoléculaire de Michael de deux hydroxyles sur la fonction alcyne. La réduction stéréosélective de la fonction cétone conduit ensuite à la (-)-aculéatine A.



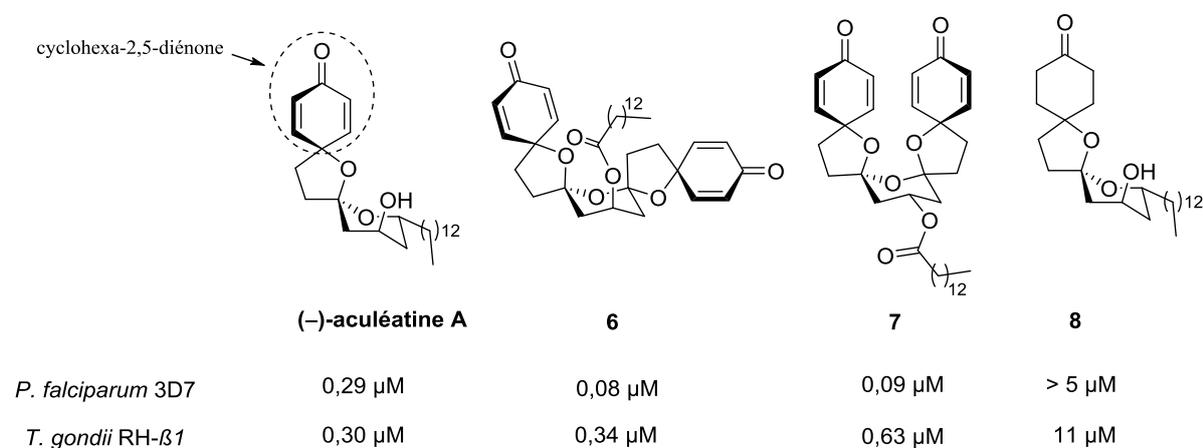
**Schéma I.2.** Synthèses racémiques et énantiosélectives des aculéatines via la formation d'un intermédiaire spiro-oxocarbénium. i. HCl 0,5 M, THF, 83% ; ii.(a) AllylBIPC<sub>2</sub> obtenu à partir de (-)-DIP-Cl et du bromure d'allylmagnésium, Et<sub>2</sub>O ; (b) NaH, THF puis BnBr, 85% ; (c) PdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, DMF aq, O<sub>2</sub>, 75%



**Schéma I.3.** Synthèse stéréosélective de la (-)-aculéatine A

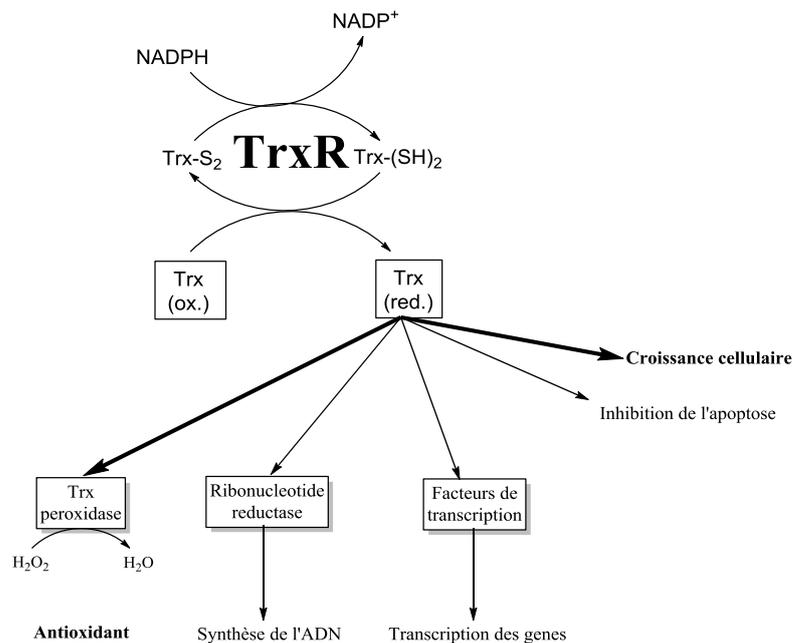
#### I.4 La thiorédoxine réductase : une cible potentielle des aculéatines

Grâce à la réalisation des premières synthèses des aculéatines et analogues naturels, plusieurs dérivés de ces produits naturels ont été synthétisés dans le but d'optimiser leurs activités antipaludiques ou anticancéreuses. Ainsi, en 2008 le laboratoire a réussi à améliorer l'activité antipaludique des aculéatines à travers les analogues synthétiques **6** et **7** présentant deux fonctions cyclohexa-2,5-diénone (Figure I.2).<sup>53</sup> Par la même occasion, le motif cyclohexa-2,5-diénone a été identifié comme très important dans l'activité antipaludique des aculéatines. En effet, la réduction de **8** a conduit à une perte de l'activité antipaludique. Les composés **6** et **7** ont également montré une activité antitoxoplasmose.



**Figure I.2.** Activités biologiques de nouveaux analogues de l'aculéatine A

Fort de ces informations et du caractère accepteurs de Michael des aculéatines, la thiorédoxine réductase (TrxR) a été identifiée comme une des cibles potentielles de ces produits naturels. La TrxR est une protéine constituée de deux sous-unités identiques possédant chacune un site actif qui contient un pont disulfure. Cette enzyme utilise la FAD comme coenzyme pour réduire la thiorédoxine (Trx) oxydée à partir de la NADPH (Figure I.3). Lorsque la Trx se trouve sous forme réduite, elle joue un rôle important dans plusieurs phénomènes biologiques tels que, la croissance cellulaire et le contrôle du stress oxydant.<sup>54</sup>

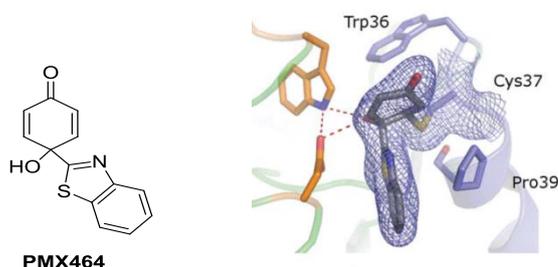


**Figure I.3.** Le système TrxR/Trx et quelques fonctions dans la cellule

Dans les cas de paludisme causés par *P. falciparum*, la multiplication du parasite dans les érythrocytes s'accompagne d'une augmentation du niveau de stress oxydant. Le système TrxR/Trx, identifié comme principal système de détoxification des espèces réactives oxygénées (ROS) chez *Plasmodium*, permet ainsi de contrôler l'homéostasie redox et joue un rôle essentiel dans la survie du parasite.<sup>55</sup>

L'hypothèse selon laquelle le système TrxR/Trx pourrait être une cible potentielle des aculéatines vient des travaux de Westwell<sup>56</sup> et d'Emsley<sup>57</sup> sur le composé PMX464. Ce dernier est un agent anticancéreux qui partage en commun avec les aculéatines la présence d'un motif cyclohexadiénone. En effet, les travaux de Westwell réalisés en 2005, ont montré que les anticancéreux de type cyclohexadiénone (quinols), entre autre le composé PMX464, exercent leur activité en ciblant le système TrxR/Trx. Plus récemment en 2010, l'équipe d'Emsley a rapporté une structure cristallographique du site actif mutant de la thiorédoxine C de *Mycobacterium tuberculosis*

(MtbTrxCC40S) en complexe avec PMX464 (Figure I.4). Sur cette structure, PMX464 est lié de façon covalente au Cys37 du site actif à travers une addition de Michael du thiol du Cys37 sur la cyclohexadiénone. PMX464 établit également des interactions non covalentes avec le site actif de la Trx.

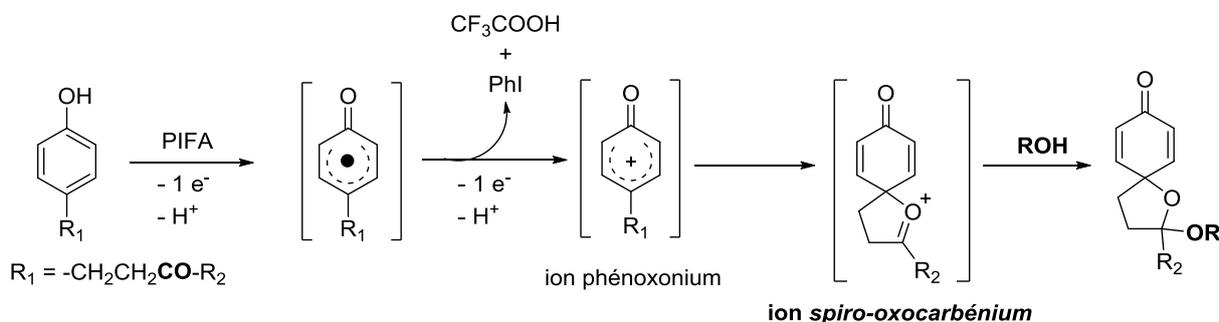


**Figure I.4.** Structure cristallographique de la Trx co-cristallisée avec le PMX464<sup>56</sup>

Au cours des travaux antérieurs à cette thèse, en 2015 le laboratoire avait montré que la (-)-aculéatine A bloque complètement le transfert des électrons de la *PfTrxR* à la macromolécule accepteur Trx.<sup>58</sup> Ainsi, ils confirment que les aculéatines sont capables de cibler la TrxR de *P. falciparum*.

## II. Objectifs des travaux

Jusqu'ici toutes les stratégies décrites pour la synthèse des aculéatines, que ce soient racémiques ou énantiosélectives, empruntent un mécanisme biomimétique de type cascade initié par oxydation phénolique. Ces réactions utilisent comme oxydant de choix, les réactifs à l'iode hypervalent (III). A partir du phénol, l'oxydation permet dans un premier temps de générer l'**ion phénoxonium** (via un mécanisme de double transfert d'électron de manière successive) qui est ensuite piégé par une fonction carbonyle intramoléculaire pour former un **ion spiro-oxocarbénium** (Schéma II.1). Ce dernier est piégé à son tour par un nucléophile pour conduire aux aculéatines ou dérivés d'aculéatines.

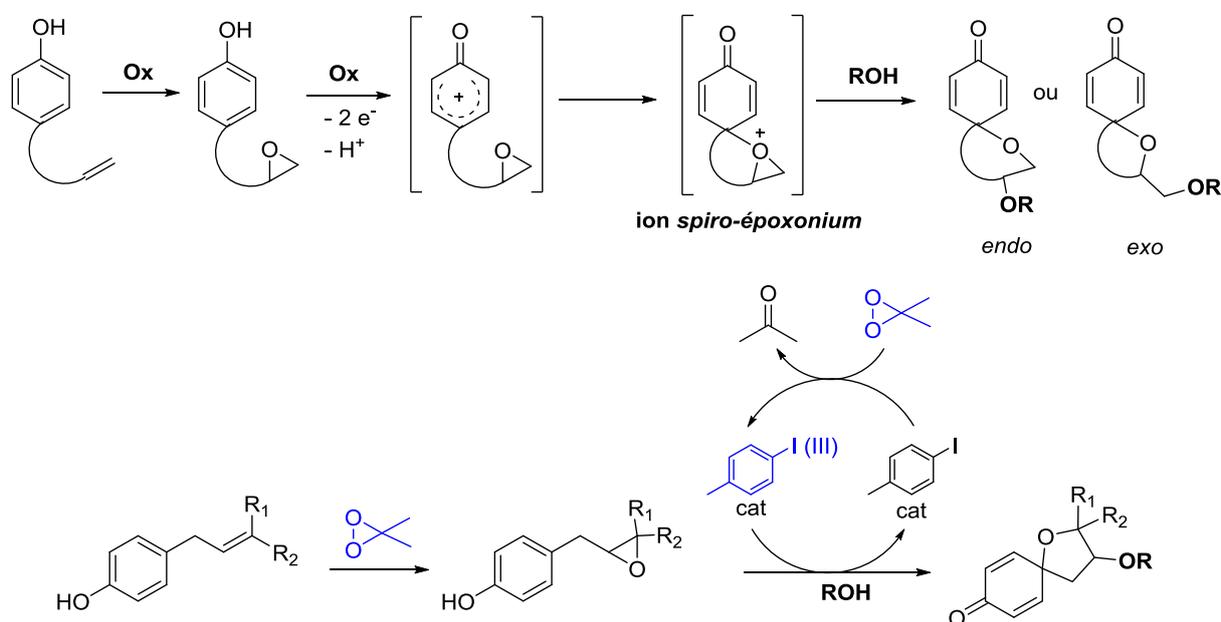


**Schéma II.1.** Réaction cascade d'oxydation phénolique passant par un cation *spiro-oxocarbénium*

Les aculéatines possèdent une fonction acétal, pas très stable et qui peut être hydrolysée en milieu biologique pour conduire aux dérivés de type amomols. Les travaux effectués dans cette thèse ont pour but de développer une nouvelle stratégie de synthèse permettant d'accéder rapidement et facilement à des analogues aculéatines plus stables « physiologiquement » (ayant une fonction éther à la place de l'acétal).

Le principe consiste à piéger l'ion phénoxonium formé lors de l'oxydation phénolique par un époxyde intramoléculaire au lieu d'une cétone. L'ion *spiro-époxonium* ainsi formé sera lui-même piégé par un nucléophile inter- ou intramoléculaire pour conduire à des analogues aculéatines plus stables avec une fonction éther (Schéma II.2). Contrairement à la réaction cascade impliquant une cétone, cette nouvelle réaction peut aboutir à deux produits régioisomères selon l'attaque *endo* ou *exo* du nucléophile sur le cation *spiro-époxonium*.

Cette nouvelle stratégie est basée sur une réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot ». A partir d'un précurseur phénol avec une fonction alcène, l'époxydation est réalisée en présence du DMDO (diméthylldioxirane). Ce même DMDO, utilisé en quantité stœchiométrique, servira de co-oxydant pour générer *in situ* et de façon catalytique l'iode hypervalent (III) à partir de l'iodotoluène qui va induire l'oxydation phénolique. Cette réaction réalisée en présence d'un nucléophile inter- ou intramoléculaire, conduit à un analogue aculéatine par piégeage du cation *spiro-époxonium* issu de l'oxydation phénolique.



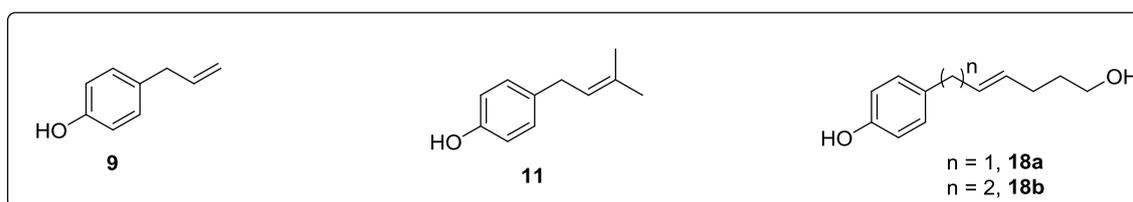
**Schéma II.2.** Nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » passant par un cation *spiro-époxonium* et utilisant des conditions catalytiques

## **Partie B**

Nouvelle réaction cascade d'oxydation  
phénolique en « un pot » passant par un ion  
*spiro-époxonium* et utilisant des conditions  
catalytiques

## I. Synthèse des molécules qui serviront de modèles pour la mise au point de la réaction cascade d'oxydation phénolique

La première étape dans la mise au point de cette nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique passe par la synthèse de précurseurs possédant à la fois une fonction alcène pour la formation de l'époxyde et un groupement phénol pour la réaction d'oxydation phénolique. Deux types de précurseurs seront élaborés pour étudier d'une part, le piégeage de l'intermédiaire *spiro-époxonium* par un nucléophile (alcool) intermoléculaire et d'autre part, par un alcool intramoléculaire (Figure I.1). Ces précurseurs permettront également d'étudier la régiosélectivité *endo/exo* de l'ouverture de l'intermédiaire *spiro-époxonium* par un nucléophile.



**Figure I.1.** Composés servant de précurseurs pour la réaction d'oxydation phénolique

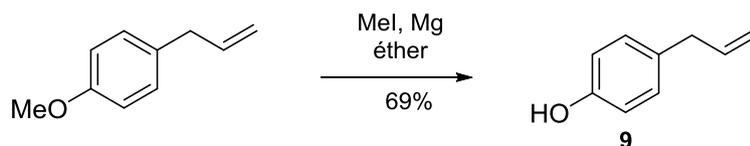
### Synthèse du composé 9

Plusieurs voies de synthèse ont été explorées pour obtenir le composé **9** en très peu d'étapes et avec le meilleur rendement possible. Ainsi, en partant toujours du produit commercial 4-allylanisole, plusieurs conditions de déprotection du groupement méthoxy ont été étudiées (Schéma I.1).

Dans les conditions acides, en présence du  $\text{BBr}_3$  dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,<sup>59</sup> le 4-allylanisole conduit à un mélange du composé **9** avec plusieurs produits secondaires. La polarité très rapprochée de ces derniers avec le composé **9** n'a pas permis de les identifier par purification chromatographique sur colonne.

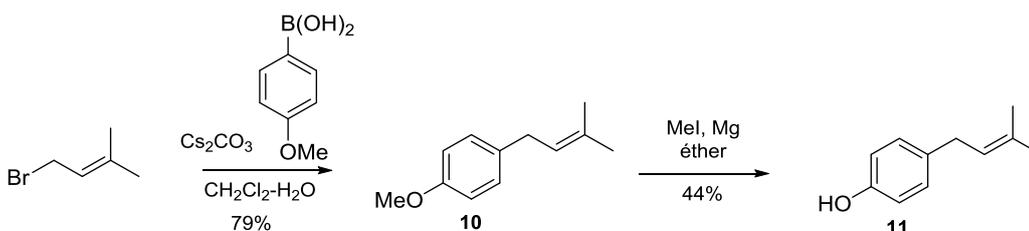
Dans les conditions basiques,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en présence de thiophénol et de NMP (*N*-méthylpyrrolidin-2-one),<sup>60</sup> le 4-allylanisole est déprotégé par chauffage ( $195^\circ\text{C}$ ) et conduit au composé **9** avec un rendement de 88%. Cependant, si nous nous débarrassons facilement de l'excès de NMP par distillation et chromatographie sur colonne, des traces de thiophénol sont toujours restées présentes après diverses purifications.

Enfin, la déprotection du 4-allylanisole dans les conditions de Grignard, nous a permis d'accéder au composé **9** avec un rendement de 69% après hydrolyse.<sup>61</sup> Malgré que cette condition ne soit pas la plus douce, elle conduit au produit désiré pur avec un bon rendement et sera par la suite adoptée dans la synthèse d'autres précurseurs.

Schéma I.1. Synthèse du composé **9**

### Synthèse du composé **11**

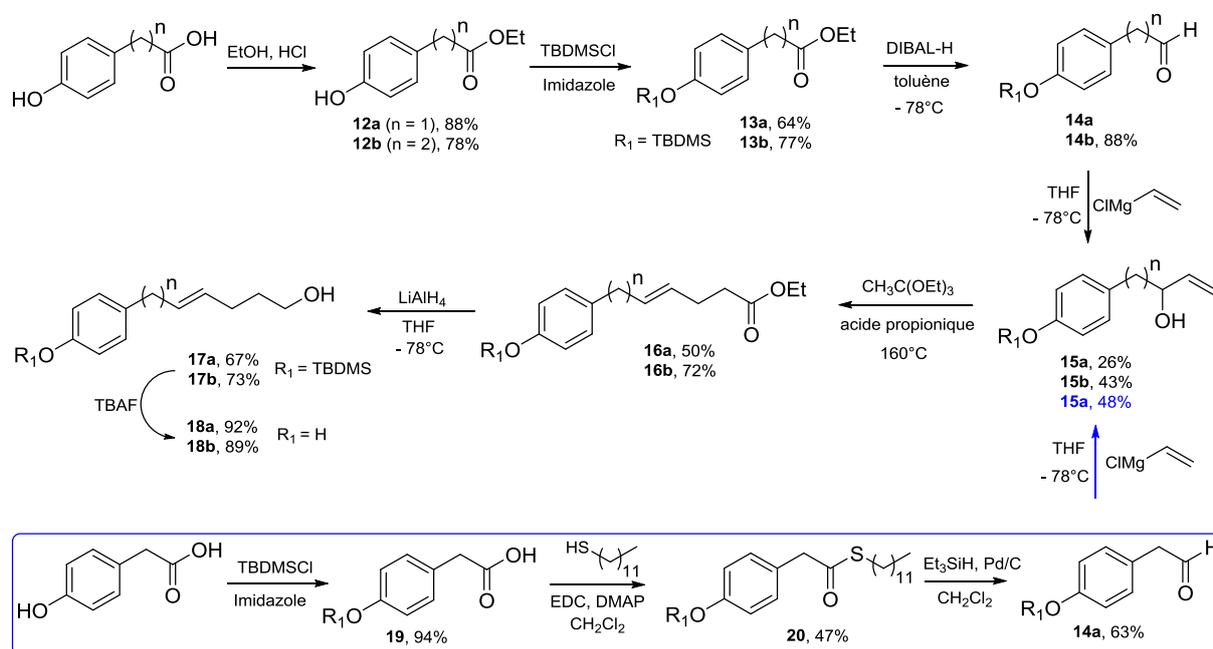
Le composé **11** a été obtenu à travers une réaction de couplage de Suzuki sans Palladium, entre un bromure d'allyle et un acide boronique (Schéma I.2). Plusieurs conditions sont décrites dans la littérature pour réaliser cette réaction. En utilisant les meilleures conditions décrites par Ryu et son équipe,<sup>62</sup> le couplage du bromure d'allyle avec l'acide boronique, en présence du bicarbonate de césium dans un mélange de solvant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$  (10/1) conduit à l'intermédiaire **10**. Dans les conditions précédemment utilisées pour la synthèse du composé **9**, l'intermédiaire **10** est déprotégé en présence d'un organomagnésien pour conduire au composé **11** après hydrolyse.

Schéma I.2. Synthèse du composé **11** par couplage de Suzuki sans Pd

### Synthèse des composés **18a** et **18b**

Comme les composés **18a** et **18b** ne diffèrent que par la longueur de leur chaîne alkyle, nous avons utilisé dans un premier temps la même approche multi étape pour la synthèse de ces deux composés (Schéma I.3). En partant d'un dérivé phénolique substitué en position *para* par une chaîne carboxylique, une première réaction d'estérification en présence d'éthanol et HCl conduit au composé **12**. La protection du groupement hydroxyle de **12** sous forme d'éther silylé conduit au composé **13** dont la fonction ester a été réduite en aldéhyde avec du DIBAL-H pour obtenir le **14**. Ce dernier a ensuite été alkylé avec un vinylmagnésien pour conduire au composé **15**, qui a ensuite permis d'accéder au **16** après un réarrangement de Johnson-Claisen.<sup>63</sup> Le composé **17** a été obtenu par la réduction de **16** avec du  $\text{LiAlH}_4$ , et une dernière étape de déprotection de l'hydroxyle de **17** par du TBAF a permis d'accéder au produit final **18**. Contrairement au composé **18b** qui a été obtenu avec un bon rendement, nous observons une chute de rendement dans la synthèse du composé **18a** (au niveau de la formation de **15a**). En effet, le composé intermédiaire **14a** s'est montré très instable sur colonne de silice et l'addition nucléophile sur l'aldéhyde de **14a** non purifié, conduit au **15a** avec un faible

rendement. Pour pallier à ce problème, une autre voie de synthèse a été explorée pour obtenir l'intermédiaire **14a**, en partant toujours du même réactif de départ et en passant par la formation et la réduction de Fukuyama<sup>64</sup> d'un thioester (composé **20**).

Schéma I.3. Synthèse des composés **18a** et **18b**

## II. Réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » en conditions catalytiques

Le composé **9**, le plus simple, a servi de modèle pour mettre au point la réaction cascade d'époxydation et d'oxydation phénolique en « un pot ». Pour les deux composés **9**, et **11**, cette réaction est également faite en deux étapes (époxydation + oxydation phénolique avec du PIDA) pour faire une comparaison avec la séquence en « un pot ».

### II.1 Oxydation du composé **9**

#### ❖ Oxydation en « un pot »

*Conditions opératoires 1:* En présence de 3 équivalents de DMDO dans l'acétone (voir partie expérimentale pour la synthèse et le dosage), le composé **9** subit une époxydation et une oxydation phénolique cascade par ajout de MeOH en excès et de l'iodotoluène en quantité catalytique (Schéma II.1). En effet, un premier équivalent de DMDO permet d'époxyder l'alcène du modèle et deux autres équivalents de générer l'iode hypervalent (III) en quantité catalytique à partir de l'iodotoluène.<sup>65</sup>

L'iode hypervalent (III) induit ensuite l'oxydation phénolique en générant un *ion phénoxonium* qui est piégé par l'époxyde pour former un *ion spiro-époxonium*. Le piégeage de l'*ion spiro-époxonium* par le méthanol conduit ensuite à un nouveau dérivé d'aculéatine **21**, présentant deux fonctions éthers au lieu d'une seule fonction acétal moins stable. Cependant, l'analyse des données spectrales a montré la présence d'un autre produit **22** dans un rapport 2/3, avec **22** majoritaire (Tableau II.1, entrée n°1). Ce résultat montre un réel problème de compétitivité entre le MeOH et l'eau présente dans le DMDO conservé sur l'acétone. Ainsi, pour pallier à ce problème, nous avons joué sur certains paramètres (séchage du DMDO et solvant de réaction) afin de réaliser la réaction dans les conditions les plus anhydres possibles. Le principe a été d'extraire le DMDO avec un solvant aprotique puis de le sécher sur du tamis moléculaire. La réaction est ensuite faite dans le solvant d'extraction du DMDO. Deux solvants aprotiques, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et CCl<sub>4</sub>, ont permis d'améliorer la proportion de **21** (majoritaire) par rapport à **22**.

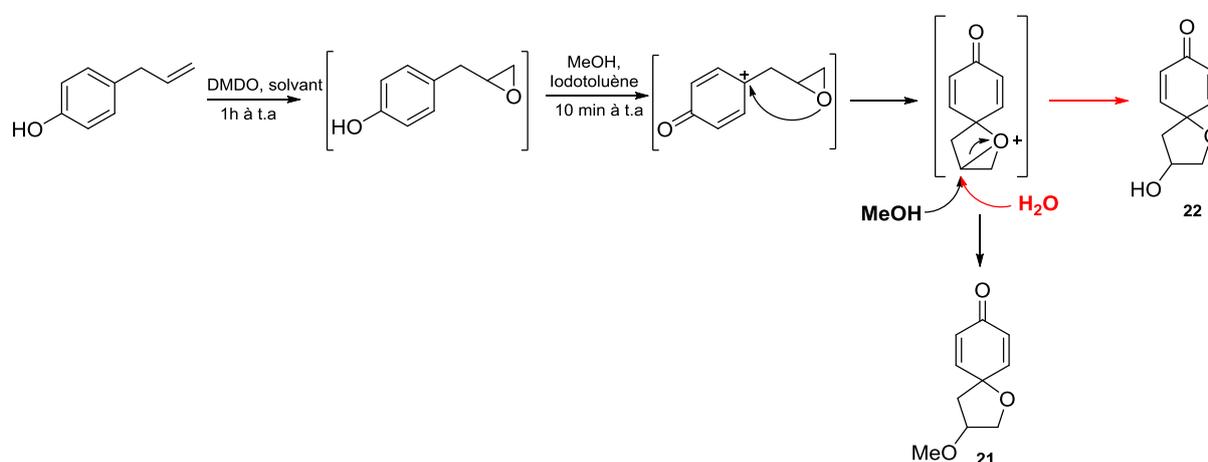


Schéma II.1. Oxydation du composé **9** en « un pot »

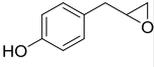
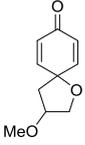
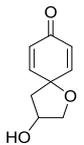
Entrée	Solvant	Ratio <b>21/22</b>
1	Acétone	4/6
2	CCl <sub>4</sub>	8/2
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7/3

Tableau II.1. Oxydation du composé **9** dans différents solvants

Conditions opératoires 2 : Le problème de compétitivité étant toujours présent, nous avons réalisé la réaction en présence de tamis moléculaire (Tableau II.2, entrée 3). Dans ces conditions, seul le produit d'époxydation a été formé et aucune réaction d'oxydation phénolique n'a été observée. Pour vérifier que ce résultat n'est pas dû à une inactivation de l'iodotoluène par le tamis moléculaire, seule la réaction d'époxydation a été faite en présence de tamis moléculaire. Le principe a été de faire réagir le composé **9** avec du DMDO pour former l'époxyde en présence de tamis moléculaire, puis d'enlever ce dernier par filtration avant l'ajout de l'iodotoluène et du MeOH. Cette expérience a conduit au même résultat que la précédente, à savoir la formation de l'époxyde et l'absence d'oxydation phénolique (Tableau II.2, entrées 4 et 10). Nous en déduisons que la présence d'eau est nécessaire à la réaction d'oxydation phénolique.

Conditions opératoires 3 : Pour déterminer la quantité minimale d'eau nécessaire à l'oxydation phénolique et limitant la formation du produit secondaire **22**, nous avons réalisé plusieurs réactions dans les *conditions opératoires 2* (époxydation en présence de tamis moléculaire, puis filtration et oxydation phénolique sans tamis moléculaire) en ajoutant de l'eau après la filtration du tamis moléculaire. Ces expériences ont montré que, l'ajout d'eau (à partir de 0,15 équivalent) débloque la réaction d'oxydation phénolique avec formation du produit **21** (Tableau II.2, entrées 5 et 12). En plus, nous observons des traces du sous-produit provenant de la réaction compétitive entre le MeOH et l'eau. Cette méthode conduit à un mélange de trois produits, dans lequel l'époxyde et le composé **21** sont majoritaires.

Il est à noter que les expériences réalisées en faisant varier la quantité de MeOH et d'iodotoluène n'ont montré aucune influence sur la réaction d'oxydation phénolique.

Entrée	Conditions opératoires				
	Acétone	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			
1	DMDO		v		
2	DMDO + MeOH (20 equiv) + iodotoluène (10 mol%)			v	v
3	DMDO + MeOH + iodotoluène + tamis		v		
4	DMDO + tamis Filtration MeOH + iodotoluène		v		
5	DMDO + tamis Filtration MeOH + iodotoluène + H <sub>2</sub> O		v	v	v
6	DMDO + MeOH + iodotoluène (10%, 20%, 50%, 100%)			v	v

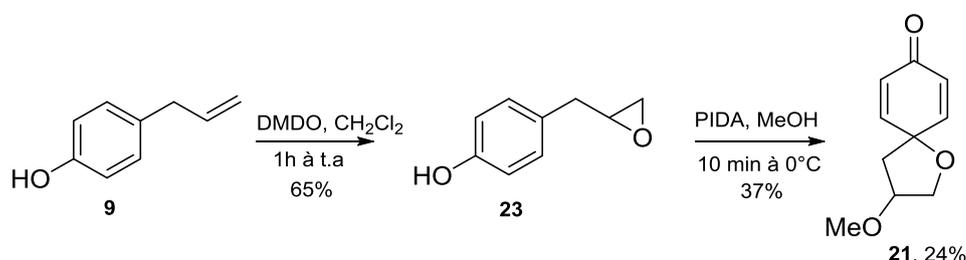
7	DMDO + MeOH (20éq) +iodotoluène			v	v
8	DMDO + H <sub>2</sub> O + iodotoluène				v
9		DMDO	v		
10		DMDO + MeOH + iodotoluène		v	v
11		DMDO + tamis Filtration MeOH + iodotoluène	v		
12		DMDO + tamis Filtration MeOH + iodotoluène + H <sub>2</sub> O	v	v	v
13		DMDO + H <sub>2</sub> O + iodotoluène			v

**Tableau II.2.** Oxydation en « un pot » du composé **9** réalisée dans différentes conditions

Ainsi, malgré le problème de compétitivité entre le MeOH et l'eau, les solvants CCl<sub>4</sub> et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> représentent la meilleure condition pour réaliser la réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot ». Cependant, le CCl<sub>4</sub> étant un solvant toxique, la réaction réalisée dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre, avec extraction du DMDO dans le même solvant a été défini comme condition opératoire générale pour la nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot ». Dans ces conditions opératoires, l'oxydation du composé **9** conduit au produit désiré **21** avec un rendement de 33%. L'addition nucléophile (MeOH ou H<sub>2</sub>O) sur l'ion *spiro-époxonium* se fait uniquement en *endo*, favorisant la formation du cycle à cinq.

### ❖ Oxydation en deux étapes

Le composé **9** en présence du DMDO dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, conduit au composé **23** avec un rendement de 65% (Schéma II.2). L'oxydation phénolique de ce dernier, en présence du PIDA et du MeOH a permis d'obtenir le composé **21** avec un rendement de 37%. Cependant, même si cette réaction d'oxydation en « deux étapes » conduit à un seul et unique produit, son rendement global de 24% reste inférieur à celui de la réaction réalisée dans les conditions en « un pot ».



**Schéma II.2.** Oxydation du composé **9** en deux étapes avec utilisation du PIDA pour l'oxydation phénolique

## II.2 Oxydation du composé **11**

Contrairement au composé **9**, l'alcène terminal du composé **11** est trisubstitué. L'oxydation phénolique de ce dernier, nous permettra de savoir si l'ouverture de l'ion *spiro-époxonium* se fait toujours dans le sens de la formation du cycle à cinq.

### ❖ Oxydation « un pot »

Dans les conditions opératoires précédemment décrites, l'oxydation phénolique cascade en « un pot » du composé **11** conduit au produit désiré **24**, avec un rendement de 32% (Schéma II.3). Cependant, nous avons observés la présence de plusieurs sous produits non isolés.

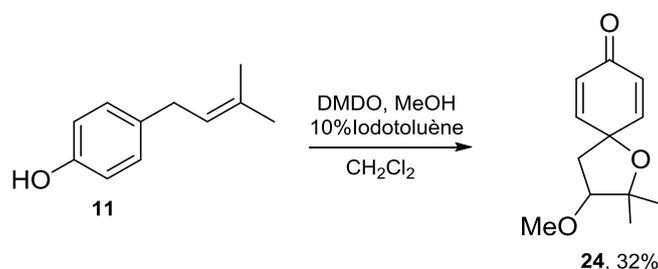


Schéma II.3. Oxydation du composé **11** en « un pot »

Ce résultat confirme, l'ouverture de l'ion *spiro-époxonium* dans le sens de la formation du cycle à cinq. La formation d'un cycle à 4, très contraint, est moins favorisée.

### ❖ Oxydation en deux étapes

L'époxydation de **11** en présence du DMDO dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  conduit au composé **25** avec un rendement de 75%. Le composé **24** a ensuite été obtenu par oxydation phénolique de **25** avec du PIDA en présence du MeOH (Schéma II.4). Contrairement au modèle simplifié **9**, le rendement global de cette réaction qui est de 36%, est légèrement supérieur à celui en « un pot » de 32% (voir Schéma II.3).

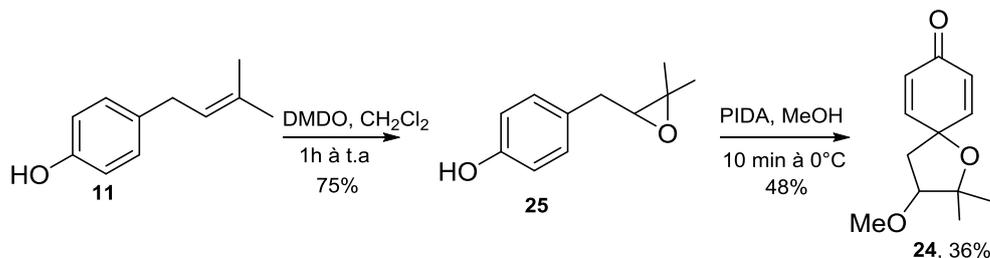


Schéma II.4. Oxydation du composé **11** en deux étapes avec utilisation du PIDA pour l'oxydation phénolique

### II.3 Oxydation des composés 18a et 18b en « un pot »

Pour étudier le piégeage de l'ion *spiro-époxonium* par un alcool intramoléculaire, les composés **18a** et **18b** ont été oxydés en présence de DMDO et de l'iodotoluène dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Schéma II.5).

L'oxydation du composé **18a** a conduit à sa dégradation. En revanche, le composé **18b** a bien conduit au produit d'oxydation phénolique désiré avec un rendement de 16%. On observe une régiosélectivité lors de l'ouverture de l'ion *spiro-époxonium* par l'addition de l'hydroxyle intramoléculaire. Comme pour les modèles simplifiés **9** et **11**, cette régiosélectivité va toujours vers la formation du cycle à cinq.

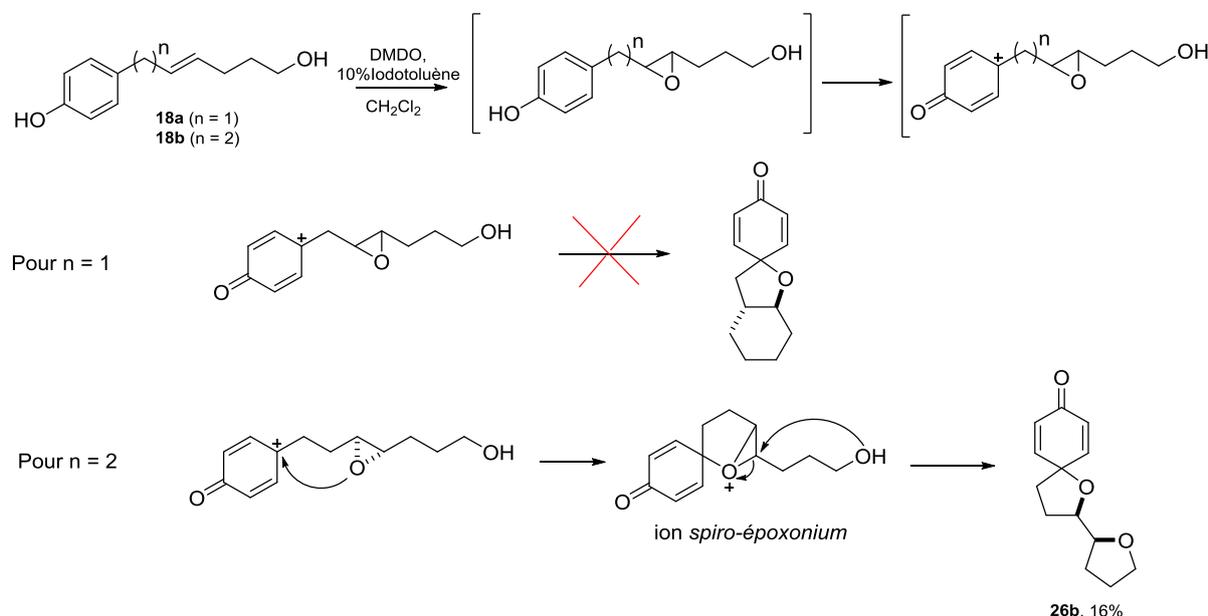
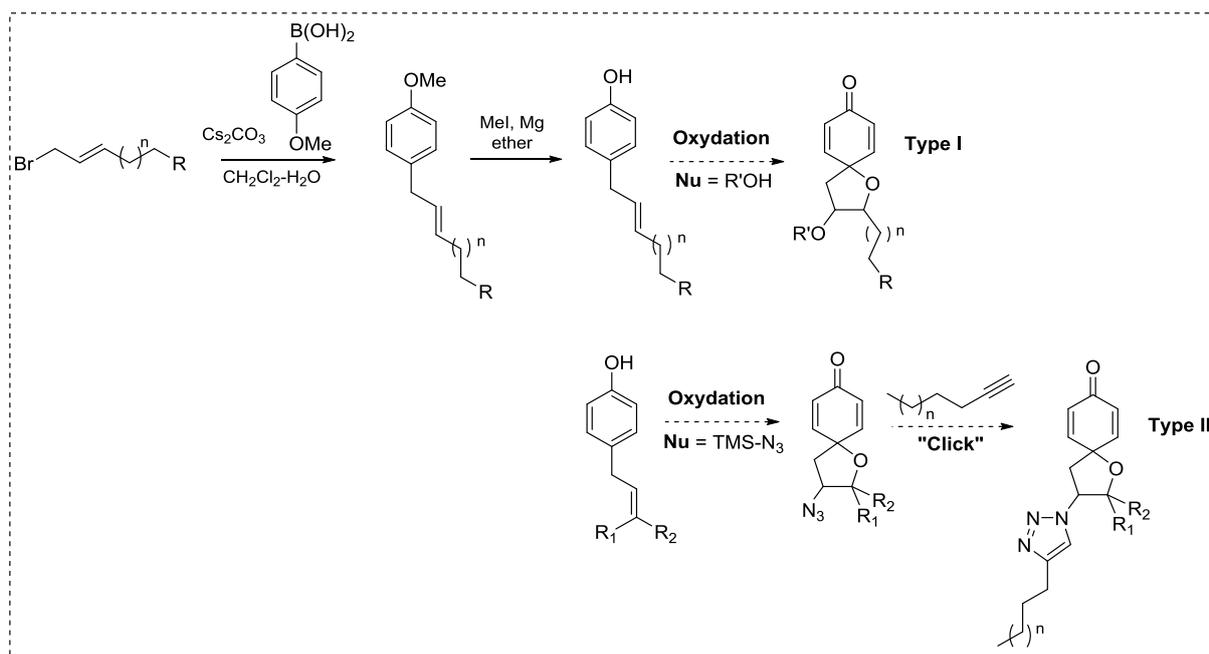


Schéma II.7. Oxydation des composés **18a** et **18b** en « un pot »

### III. Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche montrent qu'il est possible d'accéder à de nouveaux analogues d'aculéatines par des méthodes d'oxydation en « un pot » utilisant le réactif à base d'iode hypervalent en quantité catalytique. Ce dernier est généré *in situ* à partir du DMDO utilisé en quantité stœchiométrique. Avec cette approche en « un pot », nous obtenons également un meilleur rendement par rapport à l'approche en deux étapes, utilisant le PIDA en quantité stœchiométrique pour la réaction d'oxydation phénolique.

La suite de ce projet sera d'optimiser la réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » en jouant par exemple sur la température. A travers les stratégies déjà mises au point pour la synthèse des précurseurs (**9**, **11**, **18**), nous pourrions facilement accéder à de nouveaux analogues d'aculéatines de type I (Schéma III.1). Ces nouveaux analogues auront une chaîne grasse, essentielle pour l'activité antipaludique et deux fonctions éther, plus stables qu'une seule fonction acétal comme observée sur les produits naturels. Par ailleurs, l'exploration de nucléophiles, autres que le MeOH, pour le piégeage de l'ion *spiro-époxonium* pourra éventuellement résoudre le problème de compétitivité rencontré avec l'eau et permettre d'accéder à de nouveaux analogues aculéatines de type II.



**Schéma III.1.** Perspectives pour la synthèse de nouveaux analogues aculéatines

## Chapitre III

# Optimisation de la sélectivité d'un agent antiparasitaire visant les mécanismes épigénétiques

Dans ce chapitre, nous cherchons à optimiser la sélectivité du produit naturel FR235222 sur les parasites apicomplexes. FR235222 est un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC). Ces protéines qui sont impliquées dans le contrôle des mécanismes épigénétiques, constituent de nouvelles cibles dans le traitement du cancer et des maladies parasitaires comme le paludisme et la toxoplasmose. Chez l'homme et un peu moins chez les parasites, il existe plusieurs isoformes HDAC regroupées en différentes classes selon leur homologie structurale.

Ce chapitre est divisé en quatre parties :

**Partie A :** Une étude bibliographique est faite sur les HDAC et les inhibiteurs d'HDAC (HDACi).

**Partie B :** Nous cherchons à localiser la cible (les isoformes HDACs de la classe I) du produit naturel FR235222 dans la cellule humaine.

**Partie C :** La synthèse de nouveaux analogues de FR235222 et des études de modélisation moléculaire sont faites pour comprendre la sélectivité du produit naturel sur les isoformes HDAC de la classe I humaine.

**Partie D :** Nous nous intéressons à la sélectivité entre espèces (parasites et homme). Grâce à des études de prédiction *in silico* sur *TgHDAC3* et *HsHDAC3*, nous cherchons à dégager les caractéristiques essentielles pour l'obtention d'un HDACi analogue de FR235222, sélectif sur les parasites apicomplexes.

## **Partie A**

### Etude Bibliographique sur les HDAC et les inhibiteurs d'HDAC (HDACi)

# I. Epigénétique

## I.1. Généralités

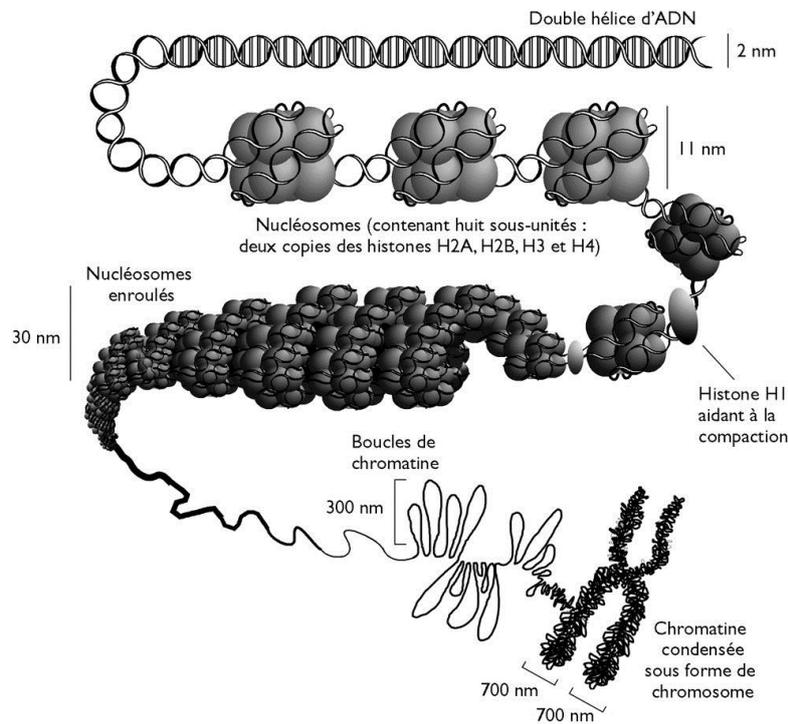
L'épigénétique, qui signifie littéralement « au-dessus des gènes » est l'ensemble des modifications autres que des délétions ou des substitutions qui interviennent au niveau de l'ADN et des protéines l'entourant (chromatine) pour contrôler l'expression d'un gène.<sup>66</sup> Ces modifications ont la particularité d'être réversibles et ne changent pas la séquence d'un gène. Elles impliquent la méthylation de l'ADN, le remodelage des nucléosomes, ainsi que les modifications covalentes des histones. Ces dernières font intervenir différentes enzymes classées en trois groupes selon leur rôle : Writer (ajoute des groupements), Eraser (enlève des groupements) et Reader (reconnait et lit les fragments modifiés).

- Chez l'homme, le dysfonctionnement de certaines enzymes impliquées dans les mécanismes épigénétiques est associé à plusieurs pathologies tels que le cancer, les inflammations, les maladies neurodégénératives et bien d'autres.<sup>67</sup> Ainsi, l'épigénétique constitue une cible prometteuse dans le traitement de diverses maladies humaines.<sup>68</sup> Actuellement, des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et des histones désacétylases sont utilisés dans le traitement du cancer.<sup>69</sup>
- Les parasites *apicomplexes* tels que *Plasmodium* et *Toxoplasma* ont un cycle de développement très complexe. Ils changent régulièrement de forme pour s'adapter à leur environnement. Ces phénomènes de différenciation grâce auxquels ils doivent leur survie reposent essentiellement sur le contrôle précis de l'expression des gènes en réponse à son environnement.<sup>70</sup> Les thérapies épigénétiques représentent ainsi une piste très prometteuse dans la lutte contre les maladies parasitaires. Aujourd'hui, les inhibiteurs d'histones désacétylases constituent une piste émergente dans la recherche de nouveaux traitements antitoxoplasmoses mais aussi antipaludiques.<sup>71</sup>

## I.2. La structure de la chromatine

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN s'associe à d'autres protéines (Figure I.1) pour former une structure en collier de perle appelée « chromatine ».<sup>72</sup> Les nucléosomes, l'unité de base de la chromatine sont composés d'une petite séquence d'ADN (environ 150 paires de base) enroulée 1,6 fois autour d'un octamère de petites protéines appelées histones. Cet octamère protéique est constitué d'un dimère de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Les nucléosomes sont reliés entre eux grâce à de courtes séquences d'ADN dont la longueur varie selon les espèces et le type cellulaire (10 à 80 paires de base). C'est donc dans cette région internucléosomale que viennent s'insérer les histones H1 pour stabiliser la structure de la chromatine. Le contact rapproché des nucléosomes

conduit ensuite aux fibres qui elles-mêmes sont compressées et repliées pour former des structures extrêmement compactes que sont les chromosomes.



**Figure I.1.** Organisation de l'ADN et structure de la chromatine<sup>73</sup>

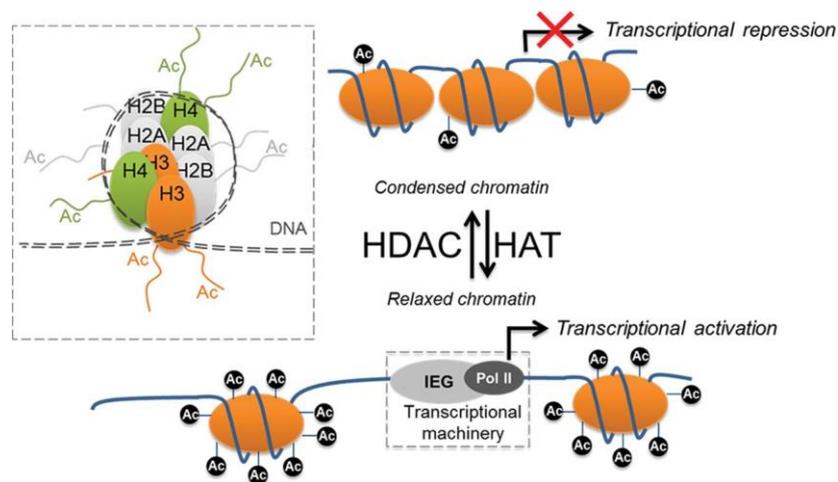
Pour contrôler l'expression des gènes, la chromatine peut exister sous forme condensée ou hétérochromatine (transcriptionnellement inactive) ou sous forme relaxée ou euchromatine (transcriptionnellement active). En effet lorsqu'elle se trouve sous forme relaxée, la région promotrice est accessible et les facteurs de transcriptions sont recrutés pour permettre la transcription des gènes. Pour réprimer temporairement l'expression de certains gènes, la chromatine se trouve sous forme condensée. Plusieurs modifications chimiques réversibles peuvent intervenir au niveau du brin d'ADN et des histones pour contrôler l'état de condensation de la chromatine afin de permettre ou non la transcription des gènes.<sup>74</sup> Il s'agit de la méthylation pour l'ADN, et pour les histones des réactions d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation, d'ubiquitinylation, de biotinylation et d'ADP-ribosylation. Pour contrôler l'expression d'un gène, ces modifications chimiques doivent se faire sur des acides aminés spécifiques, à des positions bien précises sur la queue des histones. Sur un même nucléosome ou sur des nucléosomes voisins, une combinaison de différentes modifications chimiques peut conduire à une réponse bien spécifique.<sup>75</sup> Dans cette combinaison, une modification peut en influencer une autre de manière synergique ou antagoniste pour définir l'état transcriptionnel de la chromatine et le recrutement d'un effecteur spécifique en réponse aux besoins de la cellule. C'est le « code des histones ». Par exemple, des expériences ont montré que la phosphorylation de la sérine 10 inhibe la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et inversement.<sup>76</sup> Cette phosphorylation de la

sérine 10 est couplée de façon synergique à l'acétylation des lysines 9 et/ou 14 durant la stimulation hormonale chez les mammifères. Cette double modification phosphorylation/acétylation de la queue de l'histone H3 correspond à une activation de la transcription. D'autre part, la désacétylation de la lysine 14 est requise pour faciliter le méthylation de la lysine 9, qui correspond à la répression de la transcription.

Dans le cadre des travaux effectués dans cette thèse, nous nous intéressons principalement à l'acétylation des histones qui est la modification post-traductionnelle la mieux caractérisée jusqu'à aujourd'hui.

### **I.3. Acétylation/Désacétylation des histones**

L'acétylation a lieu sur les résidus lysines des histones mais également sur d'autres protéines cellulaires. Cette modification épigénétique met en jeu deux enzymes agissant de manière antagoniste (Figure I.2), les Histones acétyltransférases (HAT) et les Histones désacétylases (HDAC). Les HAT ajoutent un groupement acétyle aux lysines des histones et conduit à la relaxation de la chromatine. En effet, l'acétylation neutralise la charge positive des lysines et diminue le contact entre les nucléosomes voisins. Les HDAC enlèvent le groupement acétyle des lysines ce qui conduit la condensation de la chromatine.



**Figure I.2.** Acétylation/désacétylation des histones par les enzymes HAT/HDAC.<sup>77</sup>

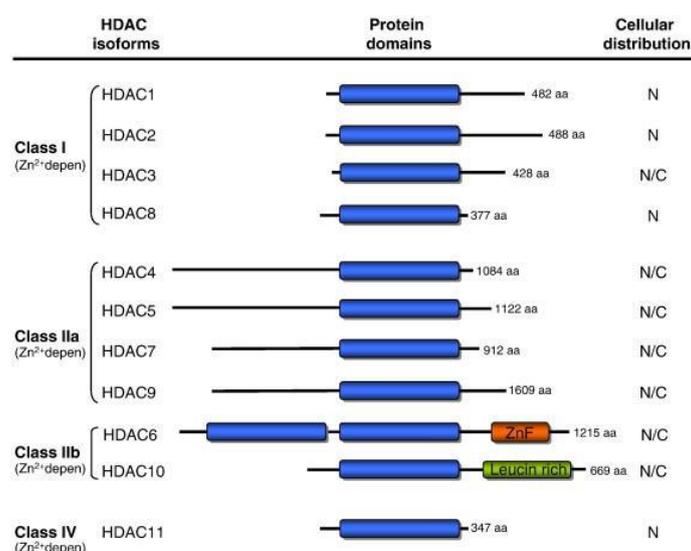
Le dysfonctionnement des HDAC est associé à plusieurs pathologies humaines et pourrait être utilisé pour le traitement de certaines maladies parasitaires<sup>71</sup> telles que le paludisme et la toxoplasmose. Il existe aujourd'hui plusieurs inhibiteurs d'HDAC (HDACi) dont certains sont commercialisés dans la thérapie anticancéreuse.<sup>69b</sup> Mais les HDAC étant une grande famille d'enzyme composé de plusieurs membres (appelés isoformes) repartis en différentes classes, la difficulté réside dans la conception d'inhibiteurs sélectifs d'un isoforme ou d'une classe afin de cibler spécifiquement une HDAC ou une classe d'HDAC impliquée dans une pathologie donnée tout en limitant les effets secondaires. Dans le

cadre du développement d'HDACi antiparasitaires, qui est l'un des objectifs des travaux effectués dans cette thèse, le défi consiste à concevoir des inhibiteurs sélectifs, d'une part, entre classe afin de diminuer les risque d'effets secondaires, et d'autre part, entre espèces (parasite/homme) qui vont cibler spécifiquement les HDACs parasitaires.

## II. Les histones désacétylases (HDACs) : structures et fonctions

### II.1. Les HDACs humaines

Chez l'homme, la famille des HDACs compte 18 membres regroupés en 4 classes selon leur homologie structurale et leur localisation cellulaire.<sup>78</sup> Les HDACs de la classe I, II, IV (HDAC1-11) sont des métalloprotéines zinc ( $Zn^{2+}$ ) dépendant tandis que les sirtuines (SIRT1-7) qui composent la classe III sont  $NAD^+$  dépendant. Les travaux effectués dans cette thèse ne portant pas sur les sirtuines, ces dernières ne seront pas décrites par la suite. D'un point de vue structural, toutes les HDAC partagent en commun une poche catalytique de 11 Å qui contient le  $Zn^{2+}$  responsable de l'activité désacétylase. A quelques exceptions près, les acides aminés composant cette poche sont largement conservés à travers les isoformes, rendant la conception d'inhibiteurs sélectifs difficile.<sup>79</sup>

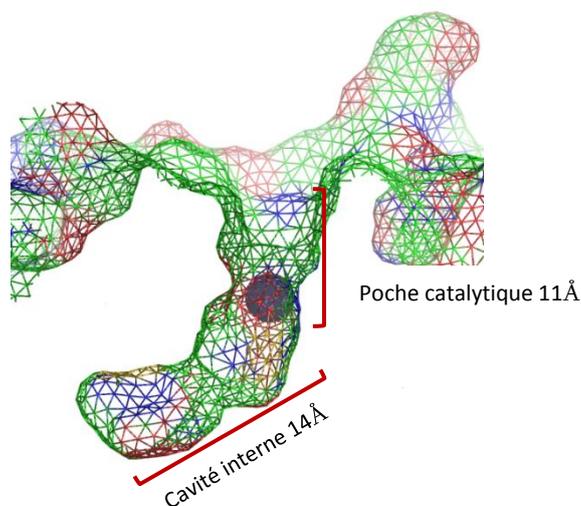


**Figure II.1.** Les différentes classes d'HDACs et leur localisation cellulaire. N (nucleaire), C (cytoplasmique), en bleu le domaine catalytique Zn dépendant

#### ➤ Classe I

Les HDAC de la classe I (HDAC1, 2, 3, 8) sont les plus petites avec approximativement 350 à 500 acides aminés. Dans cette classe, HDAC1 et 2 sont les plus proches avec une identité de séquence avoisinant les 82%.<sup>80</sup> Ensuite arrive HDAC3 qui est légèrement différente de HDAC1 et 2, et enfin HDAC8, la plus similaire à HDAC3 avec 34% d'identité de séquence. Elles présentent toutes un

domaine NLS (*Nuclear Localization Sequence*) et par conséquent désacétylent principalement les histones dans le noyau. HDAC1 et 2 sont exclusivement nucléaires. Quant à HDAC3, elle possède en plus un domaine NES (*Nuclear Export Sequence*) qui laisse penser à une translocation possible vers le cytoplasme bien qu'elle soit principalement nucléaire. L'étude de la localisation d'HDAC8 est rendue difficile à cause de son faible taux d'expression, cependant sa surexpression démontre une localisation nucléaire. Du fait de leur localisation cellulaire et de leur substrat, ces HDAC sont les plus impliquées dans les cancers et constituent, de ce fait, la classe qui attire le plus d'intérêts.<sup>78,81</sup> Contrairement aux autres classes, les HDAC de la classe I possèdent une cavité interne supplémentaire (14 Å) adjacente au site catalytique principal qui contient le zinc (Figure II.2). Cette cavité interne semble avoir pour rôle de faciliter la circulation d'eau dans le site catalytique et d'exporter hors de ce site le groupement acétate issu de la désacétylation des résidus lysines.<sup>82</sup> A l'exception de l'HDAC8, les HDAC de la classe I exercent leur activité enzymatique à travers des complexes multiprotéiques impliqués dans la répression de la transcription.<sup>83</sup> L'activité enzymatique de HDAC1 et 2 est maximale lorsqu'elles font partie de complexes tels que NuRD, CoREST et Sin3A. Seul le complexe SMRT-NCoR a été identifié comme nécessaire à l'activité de l'HDAC3. Les HDAC de la classe I sont ubiquitaires et semblent être important pour la régulation de la prolifération cellulaire.



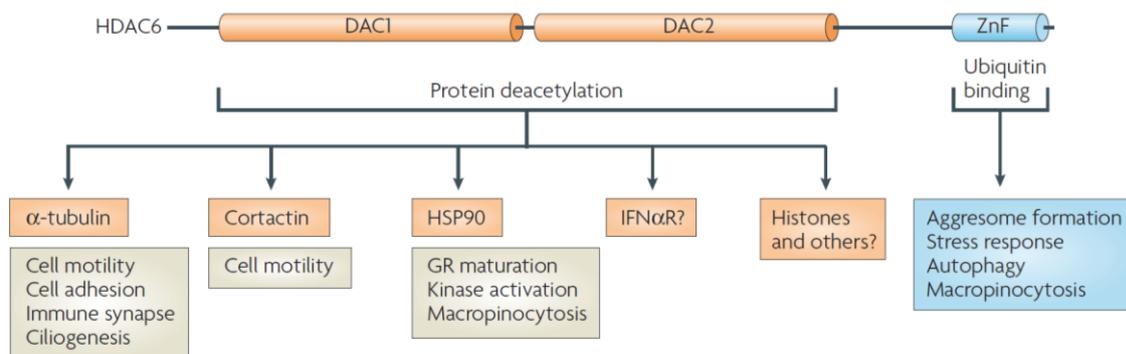
**Figure II.2.** Site actif de HDAC1 (PDB 4BKK) (classe I)

## ➤ Classe II

Les HDAC de la classe II sont présentes dans le noyau ou le cytoplasme et peuvent faire la navette entre les deux compartiments. Leur taille varie entre 669 et 1215 acides aminés. Cette classe est subdivisée en deux groupes : la classe IIa qui est composée de HDAC4, 5, 7 et 9 et la classe IIb qui, elle, contient HDAC6 et 10.<sup>78</sup>

Les HDAC de la classe IIa ne sont pas ubiquitaires et présentent généralement une fonction tissulaire.<sup>84</sup> En effet, elles interviennent à différents stades au cours de la différenciation des cellules musculaires. Contrairement à la classe I, le domaine catalytique se situe dans la région C-terminale pour HDAC4, 5 et 7. HDAC9 est légèrement différente des autres car son domaine catalytique se trouve dans la région N-terminale. Tous les membres de cette classe possèdent une région N-terminale bien conservée qui régule la navette entre le noyau et le cytoplasme mais aussi la liaison avec l'ADN. On retrouve également dans cette région N-terminale, un site de fixation pour la protéine MEF2 et trois sites de fixation pour la protéine 14-3-3. En effet, MEF2 est un facteur de transcription impliqué dans l'expression des gènes musculaires et les HDAC de la classe IIa sont capables de se lier à cette protéine pour réprimer son activité afin de bloquer la différenciation cellulaire.<sup>80</sup> La phosphorylation des HDAC au niveau du site de fixation de 14-3-3 permet de débloquent la différenciation cellulaire. La protéine 14-3-3, associée avec la présence du domaine NES, favorise la localisation cytoplasmique où leurs rôles ne sont pas bien définis jusqu'à présent.

Dans la classe IIb, l'HDAC6 possède une répétition en tandem du domaine catalytique désacétylase dans la région côté N-terminale et un domaine ubiquitine-binding zinc finger (ZnF) du côté C-terminal (Figure II.3). Elle est presque exclusivement localisée dans le cytoplasme où elle exerce diverses fonctions.<sup>83</sup> La tubuline est l'un des substrats les plus connus pour HDAC6 et sa désacétylation permet de réguler la mobilité cellulaire. L'autre isoforme de la classe IIb, HDAC10, quant à elle, possède un premier domaine catalytique désacétylase et un deuxième qui est inactif. Egalement localisée dans le noyau et le cytoplasme, son rôle est moins connu dans la cellule.



**Figure II.3.** Organisation du domaine catalytique de HDAC6 et quelques rôles.<sup>83</sup>

### ➤ Classe IV

HDAC11 est le seul isoforme de cette classe. C'est la plus petite des HDAC avec 347 acides aminés et elle est localisée exclusivement dans le noyau. Elle présente des similarités relatives avec la classe I mais ne semble être impliquée dans aucun complexe protéique. Même si très peu de choses sont

connues à son sujet, il semblerait qu'elle soit impliquée dans la régulation du système immunitaire *via* son rôle dans l'expression de l'interleukine 10.<sup>85</sup>

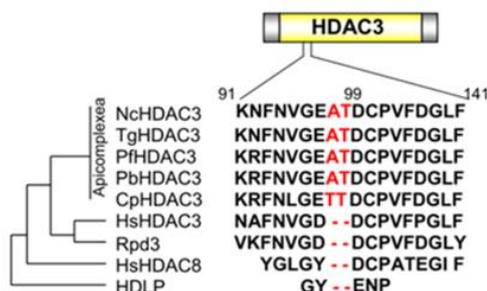
## II.2. Les HDACs apicomplexes : *P. falciparum* et *T. gondii*

Contrairement à l'homme, peu d'isoformes HDAC ont été identifiés et étudiés chez les parasites apicomplexes.

Chez *P. falciparum*, parmi les 5 isoformes d'HDAC (*PfHDAC*) connus, trois (*PfHDAC1-3*) présentent des homologies avec les HDAC de la classe I ou II humaines et les deux autres (*PfSir2* et *PfSir2-like*) avec les sirtuines de la classe III.<sup>86</sup> Seulement deux *PfHDAC* semblent être exprimées dans la phase érythrocytaire du cycle de développement du parasite, l'endroit où la plupart des molécules antipaludiques agissent.<sup>71c</sup> Bien que *PfHDAC1* soit localisée dans le noyau, aucune fonction biologique des *PfHDAC* n'est connue à ce jour. A cause de sa forte homologie avec *HsHDAC8* (40% d'identité de séquence et l'isoforme HDAC la plus proche possédant une structure cristallographique à l'époque) et de sa localisation cellulaire, l'inhibition de *PfHDAC1* semble être à l'origine des activités antipaludiques observées pour certains inhibiteurs d'HDAC. Des études de simulation effectuées avec des inhibiteurs d'HDAC sur un modèle de *PfHDAC1* construit par homologie de séquence avec *HsHDAC8*, tendent à montrer une corrélation avec les activités biologiques.<sup>87</sup>

A ce jour, le génome de *Toxoplasma* posséderait 6 HDAC (*TgHDAC1-5* et *TgSir2*) regroupées en trois classes selon leur homologie avec les HDAC humaines.<sup>88</sup> Alors que la plus part des *TgHDAC* sont principalement cytoplasmiques, *TgHDAC3* est exclusivement localisée dans le noyau. Comme les *HsHDAC* de la classe I, *TgHDAC3* est également recrutée par des complexes multiprotéiques à travers lesquels elle exerce son activité désacétylase. En 2009, Hakimi et son équipe ont identifié *TgHDAC3* comme étant la cible de FR235222, un inhibiteur d'HDAC ayant des activités antitoxoplasmoses.<sup>71a</sup>

L'alignement de séquence de l'HDAC3 des parasites apicomplexes avec celle des autres organismes (Figure II.4) montre que les apicomplexes possèdent deux acides aminés supplémentaires (Alanine 98 et Thréonine 99, absents chez l'homme) situés dans la région du site catalytique.<sup>71a</sup>

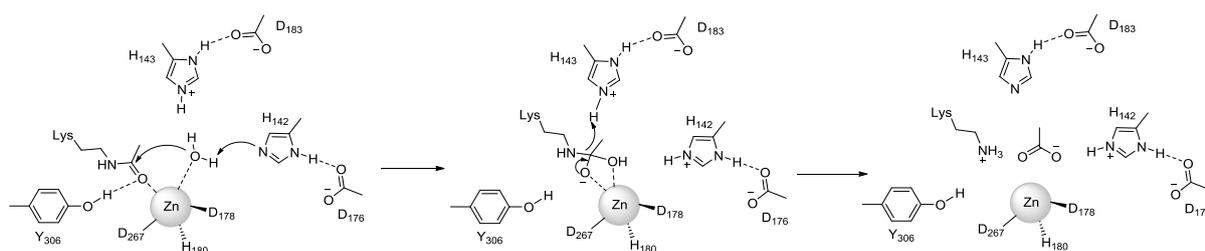


**Figure II.4.** Alignement de séquence des homologues HDAC3 des parasites *Apicomplexes* avec d'autres organismes.<sup>71a</sup>

### II.3. Mécanismes de désacétylation des histones par les HDAC

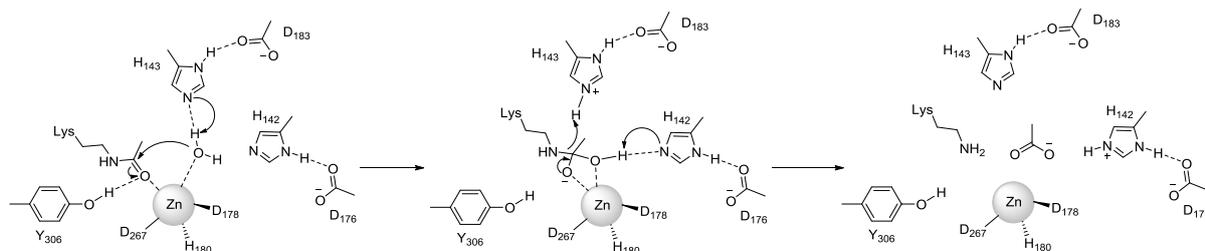
Tous les mécanismes proposés pour la désacétylation des résidus lysines des histones impliquent la participation de certains acides aminés du site actif presque conservés à travers toutes les classes d'HDAC.<sup>79a,89</sup> Le zinc est coordonné à deux acides aspartiques et une histidine (D178, H180 et D267 pour *HsHDAC8*). D'autres résidus importants sont deux histidines (H142 et H143 pour *HsHDAC8*), qui, à leur tour, forment un couple avec deux acides aspartiques (D176 et D183 pour *HsHDAC8*). Ces quatre résidus sont identiques pour toutes les HDAC de la classe I, alors que le D183 est remplacé par la glutamine ou l'asparagine dans les classes II et IV. Enfin, une tyrosine (Y306 pour *HsHDAC8*) est remplacée par une histidine dans la classe IIa. Ce résidu Y306, dont le groupement hydroxyle est orienté vers le site actif semble avoir pour rôle de stabiliser l'intermédiaire tétraédrique oxyanion observé dans les mécanismes de désacétylation proposés dans la littérature. L'orientation différente de la chaîne latérale de l'histidine, opposée au site actif et qui ne stabilise pas l'intermédiaire oxyanion semble être la cause de la faible activité désacétylase des HDAC de la classe IIa.<sup>90</sup> Des expériences de mutation ont montré que remplacer la tyrosine par une phénylalanine (Y297 chez HDLP ou Y306 chez HDAC8)<sup>91,92</sup> ou par une histidine (Y298 chez HDAC3)<sup>93</sup> provoque une baisse, voire une perte de l'activité enzymatique de ces HDAC de la classe I. De même, lorsque l'histidine de la classe IIa (H843 chez HDAC7) est remplacée par une tyrosine, une augmentation de l'activité enzymatique de cette dernière est observée.<sup>93</sup> Ces études montrent le rôle important du résidu Y306 dans l'activité catalytique et dans la stabilisation de l'état de transition.

En 1999, Finin et son équipe ont proposé un premier mécanisme en faisant des expériences de mutation sur HDLP (Histone Deacetylase Like Protein, homologue HDAC chez la bactérie *Aquifex Aeolicus*).<sup>91</sup> Dans ce mécanisme (Schéma II.1), le couple H142-D176 joue le rôle de base et déprotone la molécule d'eau afin de faciliter l'attaque nucléophile sur le carbonyle du groupement acétyle de la lysine. Le rôle de l'autre couple H143-D183 serait alors de protoner l'amine sur l'intermédiaire tétraédrique pour libérer le groupement acétyle.



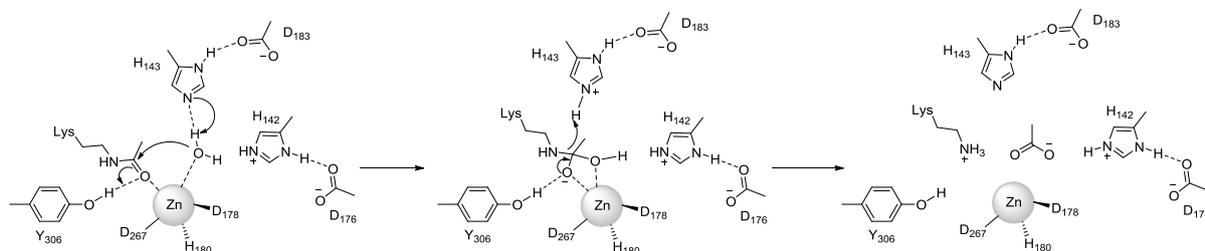
**Schéma II.1.** Mécanisme de désacétylation proposé par Finin.<sup>91</sup>

En 2010, Zhang et son équipe ont rapporté un autre mécanisme basé sur des études de simulation sur HDAC8 (Schéma II.2).<sup>94</sup> Dans celui-ci, les histidines sont protonées sur l'atome d'azote delta. Le couple H143-D183 joue le rôle de base dans la formation de l'intermédiaire tétraédrique et d'acide pour protoner l'amine. Le rôle du couple H142-D176 semble être limité à la déprotonation de l'intermédiaire tétraédrique dans ce mécanisme concerté.



**Schéma II.2.** Mécanisme de désacétylation proposé par Zhang.<sup>94</sup>

Récemment en 2016, un nouveau mécanisme a été proposé par Gantt et son équipe à travers des expériences de mutation sur HDAC8 (Schéma II.3).<sup>95</sup> Dans ce mécanisme le couple H143-D183 joue le rôle de base et d'acide comme dans le mécanisme de Zhang. Cependant, H142 reste protonée tout au long du cycle catalytique et sert de catalyseur électrostatique. Le résidu Y306 stabilise l'oxyanion de l'intermédiaire tétraédrique par une liaison hydrogène.

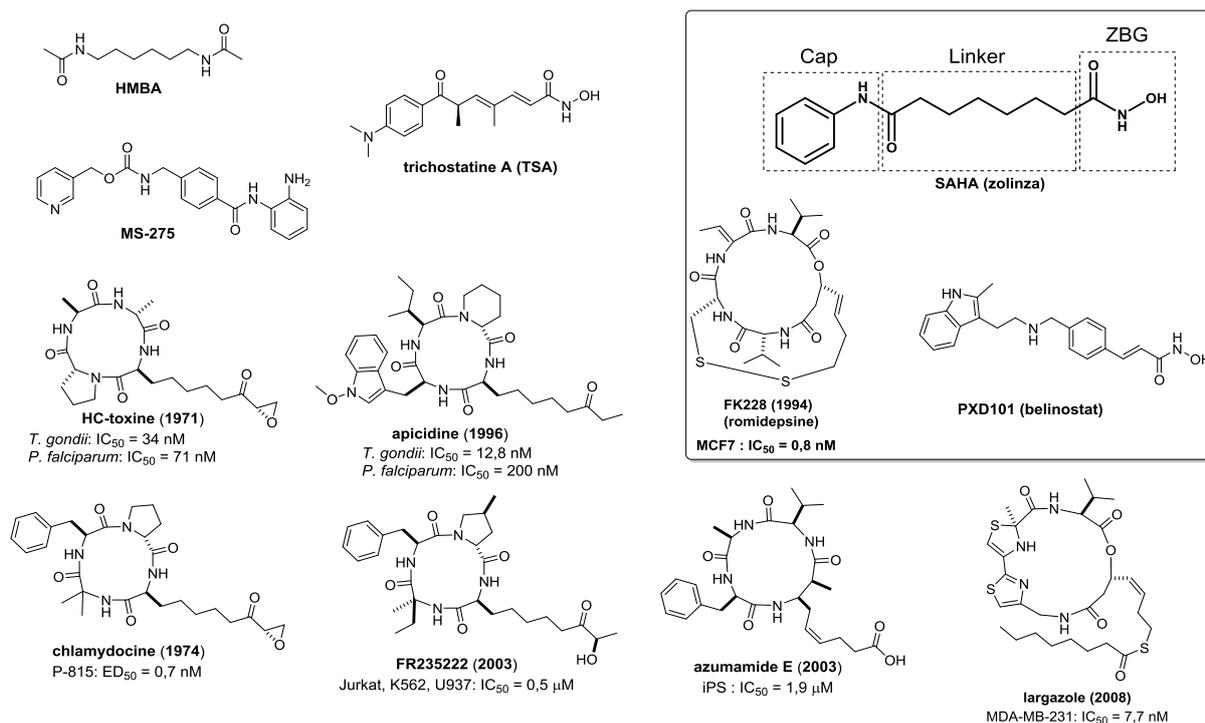


**Schéma II.3.** Mécanisme de désacétylation proposé par Gantt.<sup>95</sup>

### III. Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi)

Plusieurs composés naturels ou synthétiques sont connus pour inhiber les histones désacétylases (ce sont les HDACi) (Figure III.1).<sup>79a</sup> Parmi ces composés, deux acides hydroxamiques SAHA (aussi appelé zolinza ou vorinostat)<sup>96</sup> et PXD101 (belinostat)<sup>97</sup> et un depsipeptide cyclique FK228 (istodax ou romidepsine)<sup>98</sup> ont reçu l'autorisation de mise sur le marché comme médicaments anticancéreux en application cutanée. Le plus connu des HDACi, SAHA, est une petite molécule synthétique inspirée du produit naturel trichostatine A (TSA), lui aussi un HDACi. Le FK228 est quant à lui un produit naturel isolé de *Chromobacterium violaceum* et contient un pont disulfure qui est réduit en thiol, forme

active dans la cellule. De nombreux HDACi d'origine naturelle ou synthétique sont décrits à travers la littérature, mais dans leur diversité structurale, ils sont tous caractérisés par la présence de trois régions principales qui miment le substrat naturel des HDAC (histone-lys-Ac). Il s'agit d'une tête chélatante (ZBG, Zinc Binding Group), qui coordine le  $Zn^{2+}$  au fond du site catalytique, une chaîne aliphatique (Linker) qui mime celle de la lysine et fait des interactions hydrophobes avec les résidus qui composent le long tunnel du site catalytique, et enfin une partie hydrophobe ou cyclopeptidique (cap) qui interagit avec la surface de la protéine à l'entrée du site catalytique.



**Figure III.1.** Quelques inhibiteurs d'HDACs

Bien qu'efficaces, ces HDACi ne montrent aucune sélectivité entre les isoformes HDAC. Cette sélectivité est pourtant importante pour clarifier la fonction biologique de chaque isoforme mais aussi pour développer des agents thérapeutiques avec très peu d'effets secondaires. Cependant, la conception d'HDACi sélectifs représente un grand défi du fait de la forte similarité structurale et de la conservation de séquence entre les isoformes HDAC de la même classe. Ainsi, très peu d'HDACi isoformes sélectifs sont rapportés dans la littérature alors que les HDACi non sélectifs représentent la majorité.<sup>89,99</sup> D'autre part, la cristallisation de plusieurs isoformes d'HDAC (tableau II.1) apporte des éléments structuraux pour relever ce défi.<sup>100</sup> En effet, aussi minimes soient elles, l'identification de différences structurales entre les isoformes au niveau du site catalytique pourra permettre de moduler sur une région bien précise de l'inhibiteur afin de concevoir des HDACi sélectifs.

Classe I				Classe II						Classe IV
				Classe IIa				Classe IIb		
HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11
4KBX	3MAX 4LXZ 4LY1	4A69	1W22 1T64 1T67 1T69 etc	2VQJ 2VQM		3COY 3COZ 3C10				

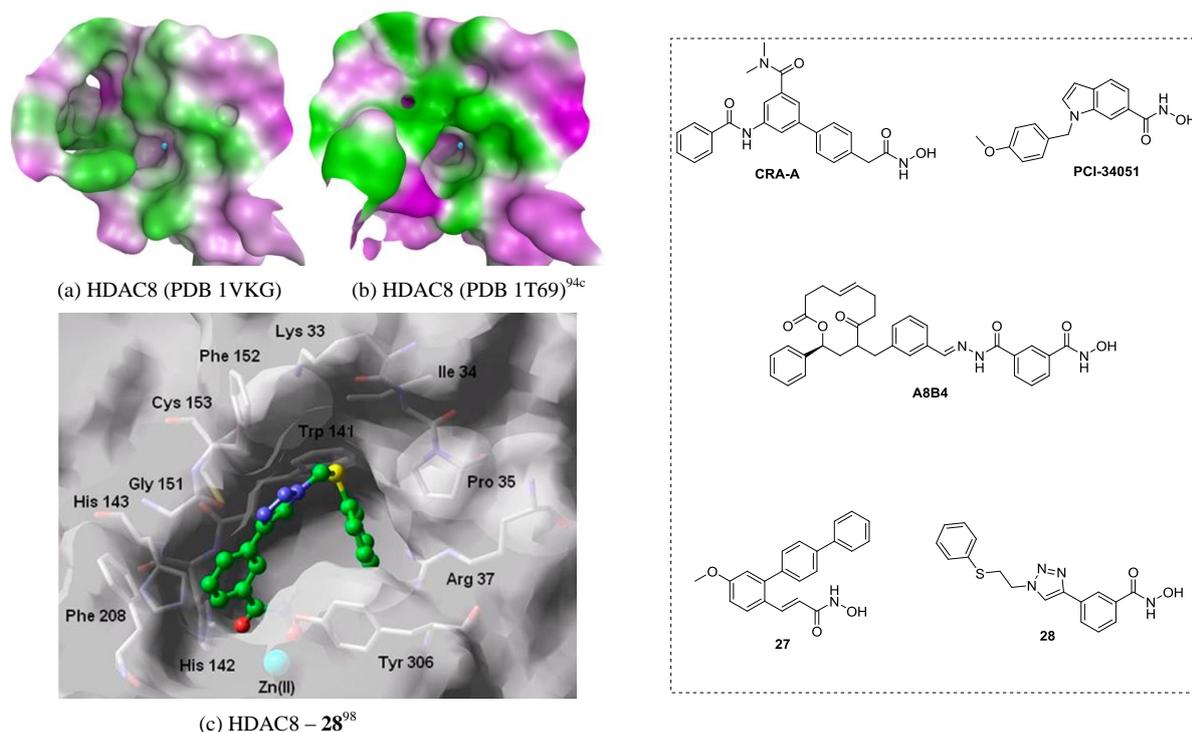
**Tableau II.1.** Les structures cristallines HDAC disponibles dans la PDB

### **III.1. Les HDACi isoformes/classes sélectifs chez l'homme**

#### **III.1.1. Dans la classe I**

##### **Les dérivés d'acide hydroxamiques : Inhibiteurs sélectifs de HDAC8**

SAHA étant l'HDACi le plus commun, il a fait l'objet de plusieurs modifications principalement sur la région « cap » afin de concevoir des inhibiteurs sélectifs entre isoformes. Mais l'acide hydroxamique (ZBG) possède un pouvoir de chélation très fort et ces inhibiteurs ne représentent pas forcément les meilleurs candidats pour la conception d'HDACi sélectifs. Cependant, des dérivés de types acides arylhydroxamiques (un cycle aromatique est directement lié à l'acide hydroxamique) et acides cinnamyle hydroxamiques (un groupement cinnamyle directement lié à l'acide hydroxamique) ont montré une sélectivité principalement sur HDAC6 et 8 en jouant sur la différence de taille de la cavité catalytique. Contrairement aux autres isoformes de la classe I, HDAC8 est connue pour être une structure très dynamique (à l'entrée du site catalytique) et peut exister sous plusieurs conformations pour mieux s'adapter à son ligand.<sup>101</sup> La superposition de plusieurs structures cristallographiques de HDAC8 cristallisée avec différents ligands montre que cette dernière peut adopter deux conformations particulières. Une conformation, HDAC8 cristallisée avec le ligand CRA-A, montre une cavité adjacente à l'entrée du site catalytique dans laquelle vient se loger le « cap » encombrant de CRA-A (Figure III.2 (a)). L'autre conformation correspond à HDAC8 cristallisée avec SAHA, où cette cavité est absente (Figure III.2 (b)).



**Figure III.2.** Inhibiteurs sélectifs sur HDAC8. (a) structure cristallographique de HDAC8 cristallisée avec CRA-A, présence d'une cavité adjacente au site catalytique (b) HDAC8 cristallisée avec SAHA, une seule cavité correspondant au site catalytique (c) position de docking du composé **28** dans HDAC8, le thiophényle se loge dans la cavité adjacente au site catalytique.

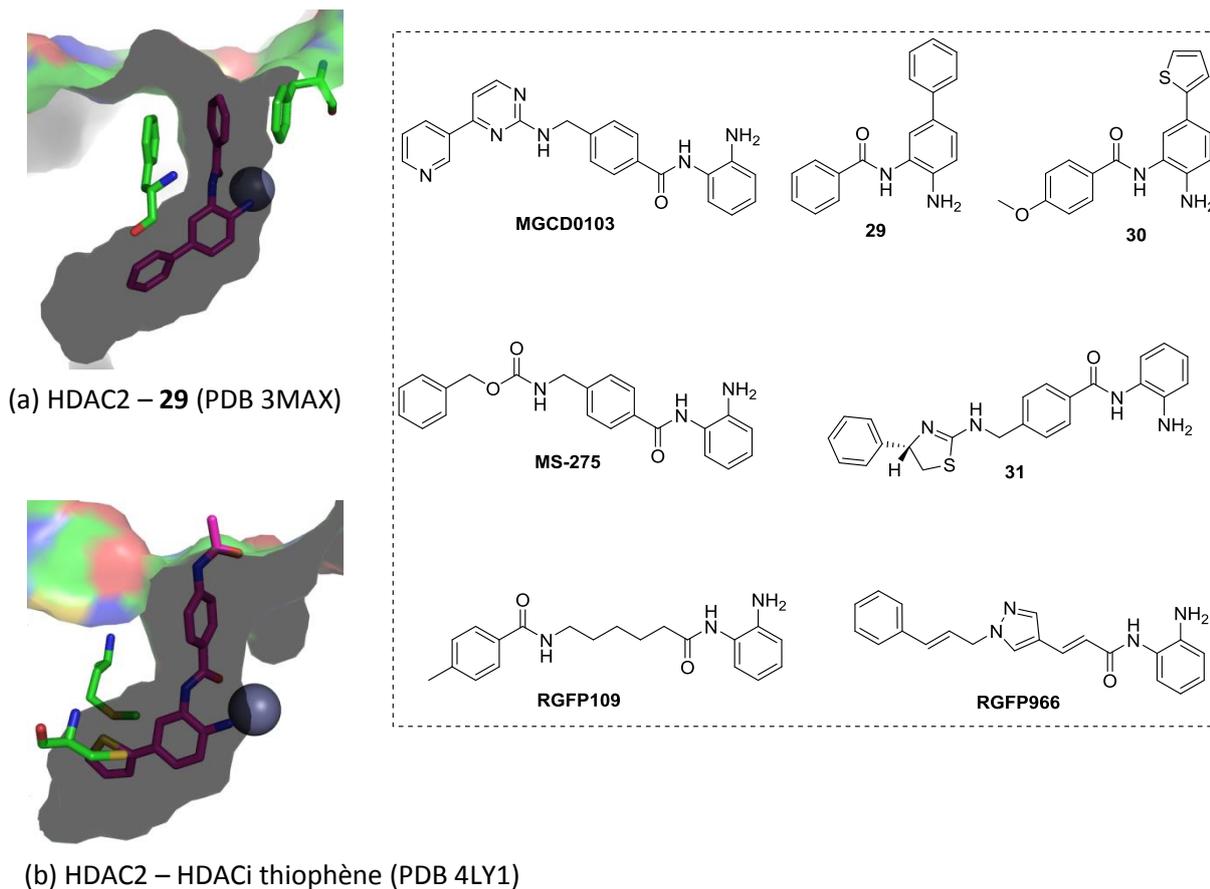
Compte tenu de cette grande flexibilité du site catalytique de HDAC8, plusieurs dérivés d'acide hydroxamique sans « linker » sont conçus pour obtenir une sélectivité sur cette dernière. PCI-34051 présente des activités antiprolifératives uniquement sur des lignées de cellules T et inhibe sélectivement HDAC8 avec une  $IC_{50}$  de 0,01  $\mu$ M contre respectivement 4 ; >50 ; >50 ; 2,9 et 13 pour HDAC1, 2, 3, 6 et 10.<sup>102</sup> Suite à ce résultat intéressant, Huang et son équipe ont remplacé la partie acide arylhydroxamique de PCI-34051 par de l'acide cinnamyle hydroxamique et modulé le groupement méthoxybenzyle dans l'optique de faire des inhibiteurs sélectifs d'HDAC8 ciblant plus de lignées cellulaires.<sup>103</sup> Le composé **27**, le plus actif qui sort de cette optimisation, montre une  $IC_{50}$  de 27 nM sur HDAC8 et est deux fois plus actif que PCI-34051. Il a également montré une activité antiproliférative sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses du poumon. Cependant, une baisse de la sélectivité est observée car le composé est légèrement actif sur HDAC1 et 3 avec un  $IC_{50}$  d'environ 3  $\mu$ M.

D'autres inhibiteurs sélectifs de HDAC8 ont été synthétisés en explorant la cavité adjacente à l'entrée du site catalytique. Le composé **A8B4** (Figure III.2), obtenu par condensation d'un hydrazide avec un aldéhyde montre une activité de 0,023  $\mu$ M sur HDAC8 contre 3,6 et 15  $\mu$ M sur HDAC2 et HDAC3-nCoR2 respectivement.<sup>104</sup> Une autre molécule intéressante, le composé **28**, un acide triazolyl-

benzohydroxamique obtenu par une réaction de chimie « click » montre une activité de 0,070  $\mu\text{M}$  sur HDAC8 contre 2,4  $\mu\text{M}$ , 38  $\mu\text{M}$ , 44  $\mu\text{M}$ , et > 100  $\mu\text{M}$  sur HDAC6, 1, 4 et 2 respectivement.<sup>105</sup> Les études de simulations ont révélé que le groupement thiophényle se loge dans la cavité à l'entrée du site catalytique et fait des interactions hydrophobes avec les résidus Trp141, Ile34 et Pro35 qui composent cette cavité (Figure III.2 (c)).

### **Les dérivés 2-aminoanilines : inhibiteurs sélectifs de HDAC1, 2 et 3**

Pour concevoir des inhibiteurs sélectifs de la classe I, la cavité interne 14 Å spécifique de cette classe a été explorée en modulant la région tête chélatante. Ainsi, plusieurs dérivés de type 2-aminoaniline tels que, MS-275<sup>106</sup> ou MGCD0103<sup>107</sup> se sont montrés sélectifs des isoformes HDAC1, 2 et 3 (Figure III.3). Une petite préférence sur HDAC1 et 2 est observée par rapport à HDAC3.<sup>108</sup> MGCD0103 qui montre une activité de 0,15  $\mu\text{M}$  et 0,29  $\mu\text{M}$  sur HDAC1 et 2 respectivement, est 10 fois moins actif sur HDAC3 avec une  $\text{IC}_{50}$  de 1,66  $\mu\text{M}$ . L'absence d'activité de MS-275 sur HDAC8 est attribuée à des différences observées au fond du site catalytique. En effet, même si les résidus qui composent le site catalytique sont bien conservés dans la classe I, des différences dans la forme et dans la taille de la cavité sont observées du côté de HDAC8. La présence du Trp141 dans HDAC8 à la place d'une leucine dans HDAC1-3 empêcherait ainsi la coordination de la tête chélatante 2-aminoaniline au  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>109</sup> Les structures cristallines de HDAC2 avec des acide hydroxamiques et des dérivés 2-aminoanilines montrent que les anilines et non les hydroxamates vont se loger dans la cavité interne de 14 Å.<sup>110</sup> En absence de cette cavité interne dans les autres classes d'HDAC, la tête chélatante 2-aminoaniline n'a pas la place pour se loger et cela explique la sélectivité des dérivés 2-aminoanilines sur la classe I (plus précisément HDAC1-3). Ces observations ont amené à la conception de nouveaux dérivés 2-aminoanilines substitués sur la position 5 pour obtenir plus d'interactions dans la cavité interne. La structure cristallographique du composé **29** sur HDAC2 montre que le groupement phényle sur la position 5 remplit bien la cavité interne (Figure III.3 (a)). Une particularité de ces composés est que leur  $\text{IC}_{50}$  sur HDAC2 dépend fortement du temps d'incubation contrairement aux dérivés hydroxamiques tel que SAHA. En effet, au bout d'une heure d'incubation, le composé **29** montre une  $\text{IC}_{50}$  de 0,90  $\mu\text{M}$  sur HDAC2 contre 0,027  $\mu\text{M}$  après 24 heures.<sup>110</sup>



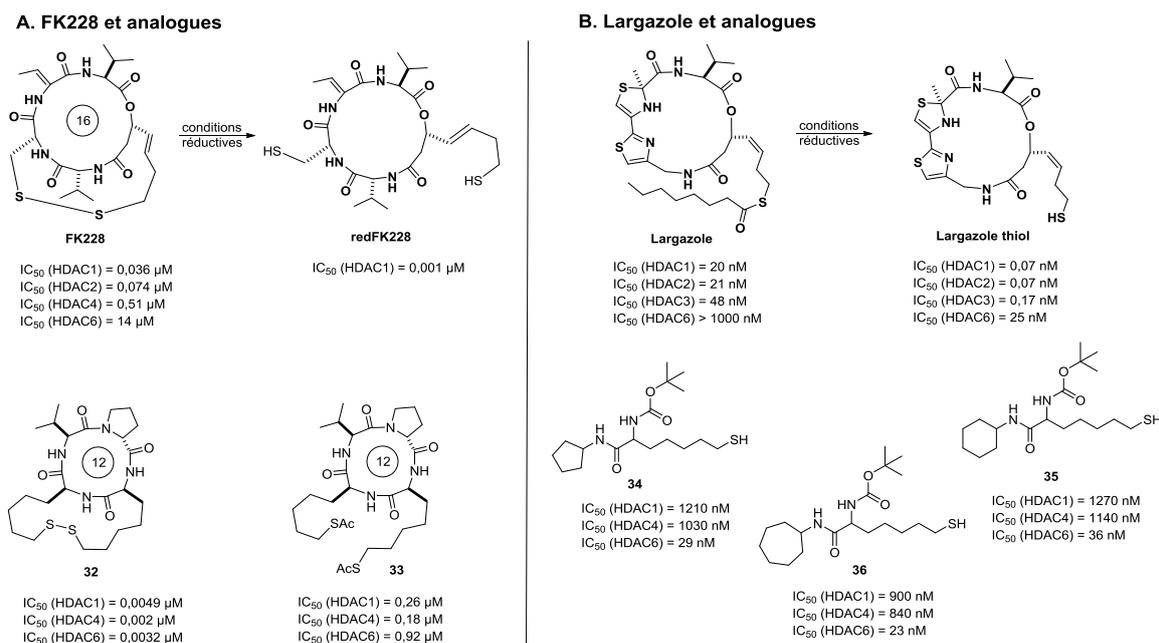
**Figure III.3.** Dérivés 2-aminoaniline, HDACi sélectifs des isoformes HDAC1-3. (a) Exploitation de la cavité interne par un groupement phényle, (b) par un groupement thiophène

Malgré la très grande similarité structurale qui existe entre HDAC1, 2 et 3, plusieurs dérivés 2-aminoanilines sont connus pour inhiber spécifiquement un ou deux de ces isoformes. Par exemple, le composé **30** avec un thiophène sur la position 5 du groupement aniline montre une meilleure activité sur HDAC1 et 2 par rapport à HDAC3 avec respectivement une  $IC_{50}$  de 0,05 et 0,2  $\mu\text{M}$  pour HDAC1 et 2 contre 20  $\mu\text{M}$  pour HDAC3.<sup>111</sup> Le choix du thiophène se justifie par le fait qu'il est susceptible de faire une interaction avec les résidus Met30 et Cys151 localisés dans la cavité interne (figure III.3 (b)). L'exploration des analogues de MGCD0103 possédant un hétérocycle chiral comme « cap » a permis d'identifier des inhibiteurs plus actifs sur HDAC3-NCoR2.<sup>112</sup> On retrouve entre autre le composé **31** avec une  $IC_{50}$  de 0,93  $\mu\text{M}$ , 0,085  $\mu\text{M}$  et 0,012  $\mu\text{M}$  contre HDAC1, 2 et 3. Pendant que l'aniline et le groupement carbonyle coordinent le  $\text{Zn}^{2+}$  au fond du site catalytique, la région cap, qui comprend un phényle et un thiazoline interagit avec la surface de la protéine à l'entrée du site catalytique. Ceci montre que les différences structurales à l'entrée du site catalytique (par exemple, HDAC3, contrairement aux autres isoformes de la classe I, présente une tyrosine) peuvent aussi être exploitées dans la conception d'HDACi sélectifs. Le composé RGFP109 a montré également une sélectivité sur HDAC3 avec une  $IC_{50}$  de 63 nM contre 300 nM, 1,28  $\mu\text{M}$  et 10,7  $\mu\text{M}$  sur HDAC1, 2 et 8 respectivement.<sup>113</sup> Le composé RGFP966 s'est lui aussi montré très sélectif sur HDAC3 avec une  $IC_{50}$

de 0,08  $\mu\text{M}$  et aucune activité inhibitrice n'a été observée sur les autres isoformes HDACs lorsqu'ils sont incubés dans 15  $\mu\text{M}$  de RGFP966.<sup>114</sup>

### Les dérivés cyclopeptides : inhibiteurs sélectifs des isoformes de la classe I

**FK228** est actuellement le seul HDACi dérivé cyclotérapeptidique commercialisé comme traitement anticancéreux par application cutanée.<sup>98</sup> Ce produit d'origine naturelle est connu pour être un inhibiteur sélectif de HDAC1 et 2 qu'il inhibe avec respectivement une  $\text{IC}_{50}$  de 0,038  $\mu\text{M}$  et 0,074  $\mu\text{M}$  contre 0,51  $\mu\text{M}$  et 14  $\mu\text{M}$  pour HDAC4 et 6.<sup>115</sup> Cependant, FK228 a montré une meilleure activité sur HDAC1 dans des conditions réductrices ( $\text{IC}_{50} = 1 \text{ nM}$ ) suggérant que ce dernier est réduit en thiol (redFK228) dans le milieu biologique par des glutathiones (Figure III.4). A ce jour, aucune donnée structurale ne permet d'expliquer explicitement cette sélectivité de FK228. Plusieurs analogues synthétiques (par exemple **32** et **33**)<sup>116</sup> ont été élaborés pour des études de relations structure - activité et même si certains se sont montrés très intéressants, la plupart montre une activité similaire sur les classes I et II (HDAC4 et 6) dans des conditions réductrices en présence de DTT (dithiothreitol) (Figure III.4).



**Figure III.4.** Analogues FK228 et largazole, HDACi sélectifs des isoformes de la classe I

Le **largazole**, un autre HDACi d'origine naturelle, est connu pour être sélectif des isoformes de la classe I avec une préférence sur HDAC1, 2 et 3 par rapport à HDAC8.<sup>117</sup> Tout comme FK228, la fonction thioester du largazole est une fonction prodrogue qui est hydrolysée en thiol libre dans le milieu biologique. Sous forme thiol libre, le largazole devient plus actif sur la classe I mais présente cependant une légère activité sur HDAC6. Ce produit naturel a fait l'objet de plusieurs modifications afin de comprendre les relations structure – activité et concevoir des HDACi plus sélectifs entre

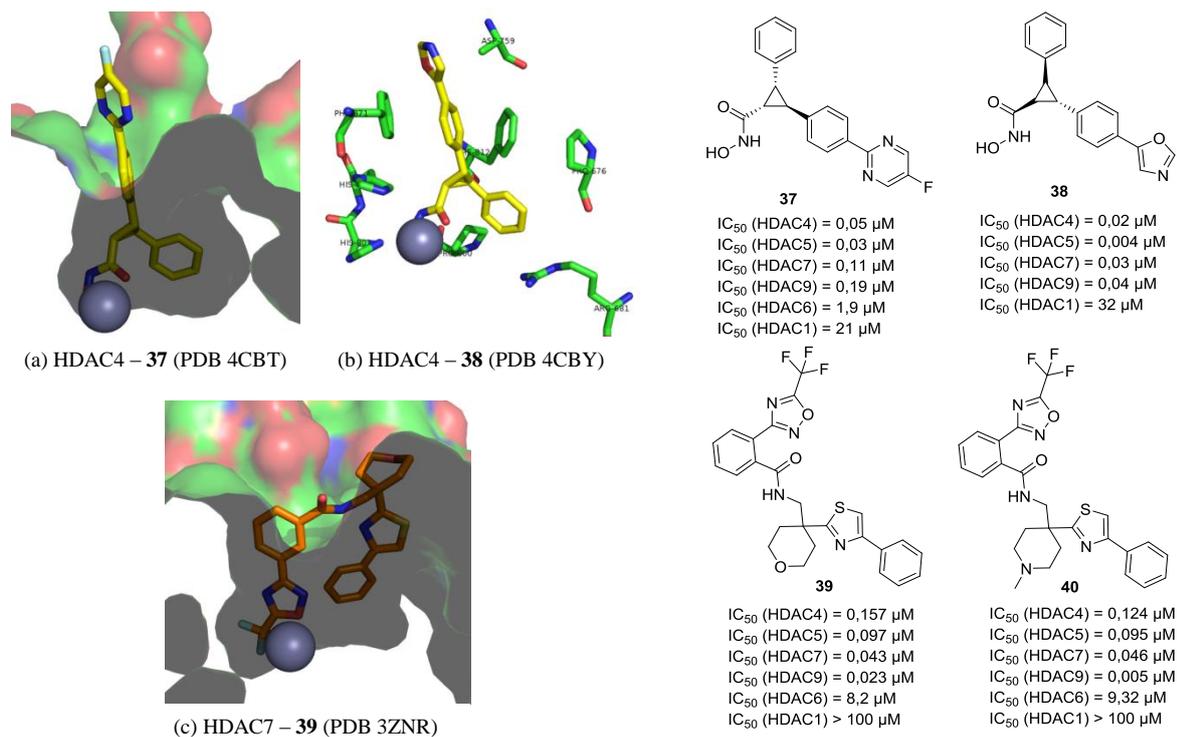
isoformes. En 2006, Miyata et son équipe ont montrés que les analogues synthétiques du largazole sans la partie cyclique (composés **34**, **35** et **36**) sont sélectifs sur HDAC6 (Figure III.4).<sup>118</sup> Ces résultats laissent penser que la sélectivité du largazole, mais aussi de FK228, pourrait venir de la partie cyclique depsipeptide.

### III.1.2. Dans la classe II

#### Les inhibiteurs sélectifs des isoformes de la classe IIa

Les dérivés de type cyclopropane trisubstitués possédant une tête chélatante acide hydroxamique constituent une classe de molécule qui inhibe de façon sélective les HDACs de la classe IIa (Figure III.5). La structure cristallographique de HDAC4 avec les composés **37** et **38** (Figure III.5 (a) et (b)) montre que la tête chélatante hydroxamate est coordonnée de manière bidentate avec le  $Zn^{2+}$  et fait en plus, des liaisons hydrogènes avec les histidines His802 et 803 (correspond aux His142 et 143 dans HDAC8).<sup>119</sup> Dans la classe IIa, l'absence de la cavité interne de 14 Å, associée à la substitution de la Tyr306 (classe I) par une His dont la chaîne imidazole est orientée en dehors du site catalytique, fait que les isoformes de cette classe ont une poche catalytique différente en forme et en taille (plus large) à ceux de la classe I. Ainsi, la sélectivité des composés **37** et **38** pour les isoformes de la classe IIa s'explique par le fait que le groupement phényle des ligands vient se loger au fond de la poche catalytique (plus large) et fait des interactions  $\pi$ -stacking avec Arg681 et Phe812 et des interactions hydrophobes avec Pro676, Pro800 et Leu943 (Figure III.5 (b)).

Un HTS (High-throughput screening) effectué par GSK a permis d'identifier les dérivés trifluorométhylloxadiazoles (TMFO) comme inhibiteurs sélectifs des isoformes de la classe IIa.<sup>120</sup> La structure cristallographique de HDAC7 avec les composés **39** (Figure III.5 (c)) et **40** montre qu'un atome de fluor, et l'atome d'oxygène du cycle oxadiazole chélatent faiblement le  $Zn^{2+}$  tandis que le reste du ligand fait des interactions hydrophobes avec la protéine en formant un U à l'intérieur de la poche catalytique et en plaçant le phényle au fond de celle-ci (comme pour **37** et **38**).



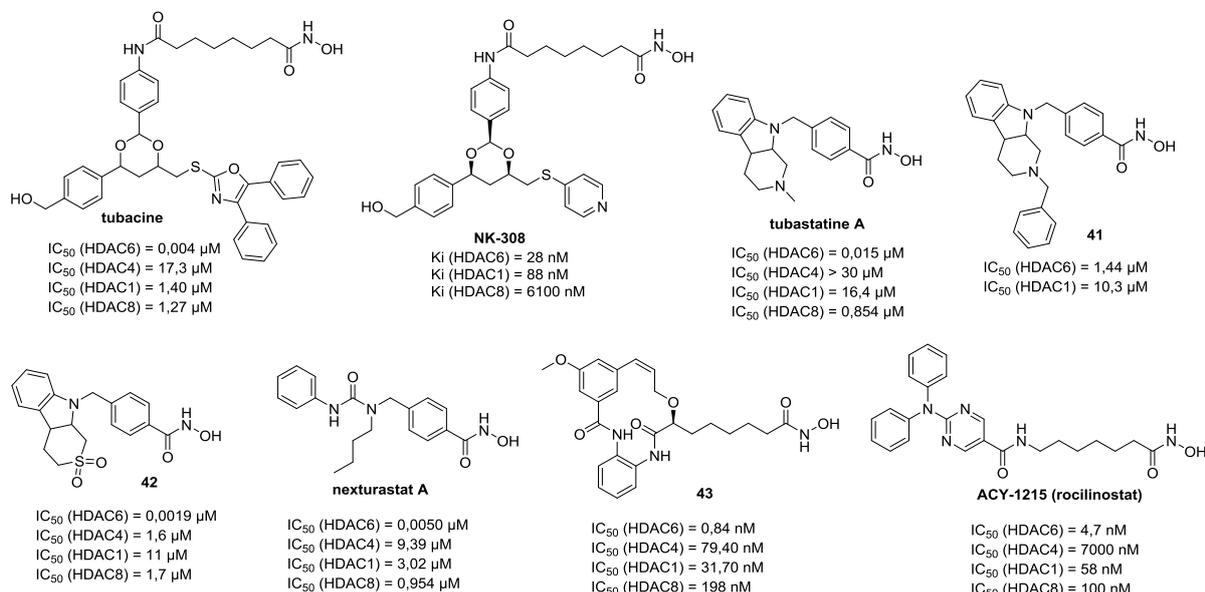
**Figure III.5.** HDACi sélectifs des isoformes de la classe IIa. (a) HDAC4 cristallisée avec **37**, fond du site catalytique très large, (b) HDAC4 cristallisée avec **38**, interactions  $\pi$ -stacking et hydrophobes avec certains résidus du site catalytique, (c) HDAC7 cristallisée avec **39**, optimisation des interactions hydrophobes.

### Les inhibiteurs sélectifs de HDAC6

La comparaison d'une structure cristallographique de HDAC1 avec un modèle HDAC6 construit par homologie de séquence montre que cette dernière possède une poche catalytique beaucoup plus large, mais aussi moins profonde par rapport aux autres isoformes HDAC.<sup>121</sup> HDAC6 semble donc pouvoir accueillir des substrats ou inhibiteurs ayant un « cap » large et rigide, qui ne rentrent pas dans la poche catalytique (plus étroite) des autres isoformes. La tubacine<sup>122</sup> et son analogue NK-308,<sup>123</sup> tous les deux sélectifs sur HDAC6, semblent remplir ces critères (Figure III.6). Le NK-308 présente cependant, une meilleure activité sur HDAC6 par rapport à la tubacine. Des études de simulations ont confirmé la pertinence de la région « cap » de ces inhibiteurs pour établir des interactions hydrophobes avec HDAC6 à l'entrée de son site catalytique.<sup>123,124</sup>

Compte tenu de cette caractéristique particulière à HDAC6, l'exploration de molécules polycycliques a permis d'identifier des carbazoles ou carbolines tricycliques possédant une tête chélatante hydroxamate comme inhibiteurs sélectifs de HDAC6 (Figure III.6).<sup>121</sup> La tubastatine A a montré une sélectivité sur HDAC6 par rapport aux autres isoformes, mais elle présente cependant une légère activité sur HDAC8. Lorsque le substituant 2-méthyl de la tubastatine A est remplacé par un

groupement benzyle (composé **41**), on observe une meilleure activité sur HDAC6 et aussi une meilleure sélectivité par rapport à HDAC1.<sup>125</sup> De même, le remplacement du *N*-méthyle par un groupement sulfone conduit à un inhibiteur (composé **42**) plus actif sur HDAC6.<sup>126</sup>



**Figure III.6.** HDACi sélectifs de HDAC6 (classe IIb)

D'autres composés tels que le nexturastat A,<sup>127</sup> le composé **43**<sup>128</sup> ou le ACY-1215<sup>129</sup> sont connus pour être des inhibiteurs sélectifs d'HDAC6. Le rocilinoestat (encore appelé ACY-1215) est le premier inhibiteur sélectif d'HDAC6 à entrer en phase d'essais cliniques pour le traitement du myélome multiple (une maladie de la moelle osseuse).<sup>129</sup>

### III.2. Les HDACi antiparasitaires et la sélectivité entre espèces

- Les dérivés d'acides hydroxamiques

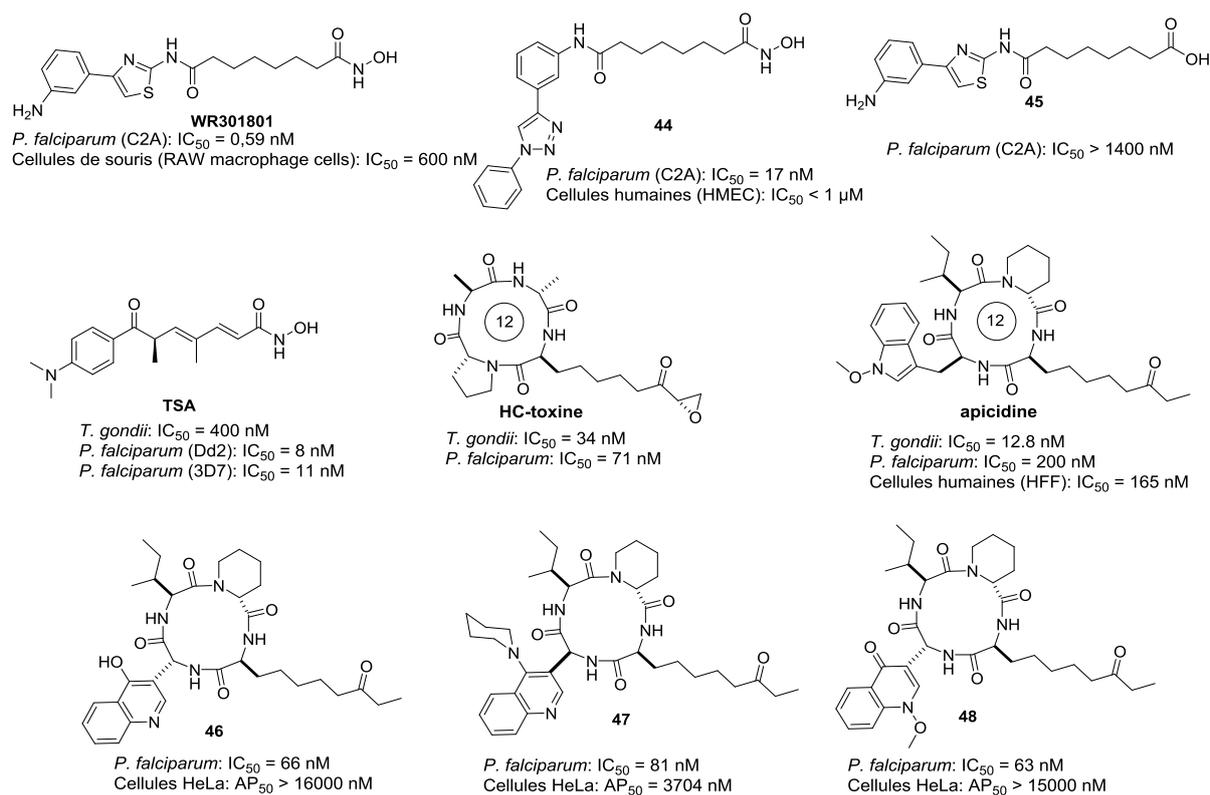
La plupart des HDACi présentés ci-dessous comme inhibiteurs des isoformes *Hs*HDAC sont également actifs sur les parasites *Plasmodium* (*Pf*HDAC) et *Toxoplasma* (*Tg*HDAC). La trichostatine A (TSA) (Figure III.7), l'un des premiers produits naturels à avoir montré une activité HDACi sur des cellules humaines (IC<sub>50</sub> de l'ordre de 1 à 10 nM), présente également des activités antipaludiques, aussi bien sur la souche résistante Dd2 de *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> = 8 nM) que sur la souche sensible 3D7 (IC<sub>50</sub> = 11 nM).<sup>71d</sup> Parmi les cinq isoformes HDAC caractérisés chez *P. falciparum*, *Pf*HDAC1 a été identifiée comme la cible des HDACi antipaludiques.<sup>130</sup> L'évaluation de l'activité antipaludique de plusieurs molécules connues comme inhibiteurs d'HDAC montre qu'il est possible d'obtenir une sélectivité entre espèces en modulant sur la région « cap » des ligands.<sup>71c,131</sup> Parmi les meilleures molécules, **WR301801**<sup>132</sup> et le composé **44**,<sup>133</sup> en plus d'être sélectifs sur le parasite par rapport à des cellules saines humaines (HMEC, human microvascular endothelial cells), présentent de fortes activités sur des souches multirésistantes C2A de *P. falciparum* (Figure III.7). Cependant, ces

composés ne sont pas efficaces *in vivo* et cela s'explique par leur instabilité dans le milieu biologique. En effet, **WR301801** forme un produit métabolite qui pourrait venir de l'hydrolyse de la tête chélatante acide hydroxamique (composé **45**).

Par ailleurs, les acides hydroxamiques et leurs dérivés sont connus pour être mutagènes.<sup>134</sup> Selon certaines hypothèses, les isocyanates, qui sont responsables de cet effet mutagène, proviennent d'un réarrangement de Lossen des hydroxamates activés.<sup>134,135</sup> Les isocyanates étant très instables, ils peuvent facilement réagir avec un groupement nucléophile présent sur l'ADN pour provoquer des lésions à l'ADN, des mutations et aussi le développement d'un cancer. L'évaluation des propriétés génotoxiques des HDACi dérivés d'acide hydroxamique disponibles sur le marché a montré que tous ces composés sont mutagènes et provoquent des aberrations chromosomiques dans les cellules de rongeurs.<sup>134</sup> Ainsi, pour des maladies qui nécessiteraient une utilisation chronique d'un HDACi, il serait préférable de concevoir des inhibiteurs non mutagènes.

- Les tétrapeptides cycliques

L'apicidine et l'HC-toxine, deux cyclotétrapeptides naturels, sont les premiers HDACi à avoir montré une activité cytotoxique sur les parasites *P. falciparum* et *T. gondii* (Figure III.7).<sup>136</sup> Ces composés sont considérés comme des inhibiteurs d'HDAC à cause de leur capacité à hyperacétyler les histones de *P. falciparum*. L'activité inhibitrice de l'apicidine s'explique par la forte similarité de son linker avec la lysine acétylée des histones qui est le substrat naturel des HDAC.<sup>137</sup> Cependant, PfHDAC et TgHDAC ne constituent pas les seules cibles de ces cyclotétrapeptides. Ces derniers présentent également des activités inhibitrices sur les HDAC de la classe I et II humaine qui sont communes aux parasites et à l'hôte.<sup>138</sup> Ainsi, le potentiel thérapeutique de ces HDACi est limité par leur faible sélectivité sur les parasites. Dans l'optique d'améliorer la sélectivité de l'apicidine sur *P. falciparum*, Merck a réalisé une étude de relation structure – activité en modifiant le résidu tryptophane du cyclopeptide et aussi la tête chélatante cétone (Figure III.7).<sup>137,139</sup> Lorsque le tryptophane est remplacé par un dérivé quinoline tels que sur les composés **46** et **47**, on observe une légère sélectivité sur *P. falciparum* aussi bien en test enzymatique qu'en test cellulaire. Cependant, la présence d'un groupement encombrant sur l'atome d'azote de la quinoline provoque non seulement une diminution de l'activité inhibitrice mais aussi une perte de la sélectivité sur le parasite. En comparaison avec l'apicidine, les analogues 4-hydroxyquinoline **46** et méthoxyquinoline **48** sont les plus intéressants de cette série avec une meilleure activité inhibitrice et aussi une meilleure sélectivité sur *P. falciparum*. De manière générale, les analogues obtenus en modifiant la tête chélatante ont montré des activités similaires à celle de l'apicidine et ne présentent aucune sélectivité sur le parasite.



**Figure III.7.** HDACi ayant des activités antiparasitaires

- FR235222, un HDACi antitoxoplasmose et antipaludique : contexte du projet de thèse et travaux antérieurs

FR235222 est un cyclotérapeptide naturel isolé du bouillon de fermentation d'*Acremonium sp.*<sup>140</sup> Découvert en 2003, ce produit a d'abord été étudié pour ses activités anticancéreuses<sup>141</sup> et s'est montré sélectif sur les isoformes HDACs de la classe I.<sup>142</sup> En 2009, Hakimi et son équipe ont découvert une activité antiparasitaire pour ce produit naturel.<sup>71a</sup> En effet, FR235222 est actif sur plusieurs parasites de la famille des *Apicomplexes*. Il bloque la croissance et la différenciation de *P. falciparum* dans les globules rouges et provoque aussi la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et la perte des capacités d'infection des kystes<sup>71b</sup> chez *T. gondii*. Au cours de ces travaux,<sup>71b</sup> Hakimi et son équipe se sont particulièrement intéressés aux propriétés antitoxoplasmoses de ce produit naturel. Comme les cyclopeptides cités plus haut (apicidine et HC-toxine), FR235222 inhibe la croissance intracellulaire de *T. gondii* avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire (environ 10 nM) et est plus efficace que la pyriméthamine (IC<sub>50</sub> = 300 nM) qui est actuellement utilisé comme médicament antitoxoplasmose. Contrairement aux analogues cyclopeptidiques, les dérivés d'acides hydroxamiques (TSA et Scriptaid) sont beaucoup moins actifs sur la prolifération de *T. gondii* (environ 400 nM). L'activité HDACi de FR235222 est confirmée par une hyperacétylation de l'histone H4 de *T. gondii*. La corrélation entre l'inhibition de la croissance intracellulaire de *T. gondii* et cette hyperacétylation de l'histone H4 montre que FR235222 exerce ses activités dans le noyau de la cellule. Ainsi, des études de mutagenèse

dirigée ont permis d'identifier *TgHDAC3* comme étant la cible du produit naturel. La meilleure activité des analogues cyclopeptidiques par rapport aux non cycliques pourrait donc s'expliquer par la grande capacité du cyclopeptide à traverser les barrières membranaires et à atteindre plus facilement la cible *TgHDAC3* localisée dans le noyau. D'autre part, ces mutations ont mis en évidence le rôle important des acides aminés A98 et T99 dans l'activité désacétylase de *TgHDAC3*. En effet, lorsque T99 est remplacé par une alanine (A), la souche (*T. gondii*) mutante correspondante devient résistante à FR235222.

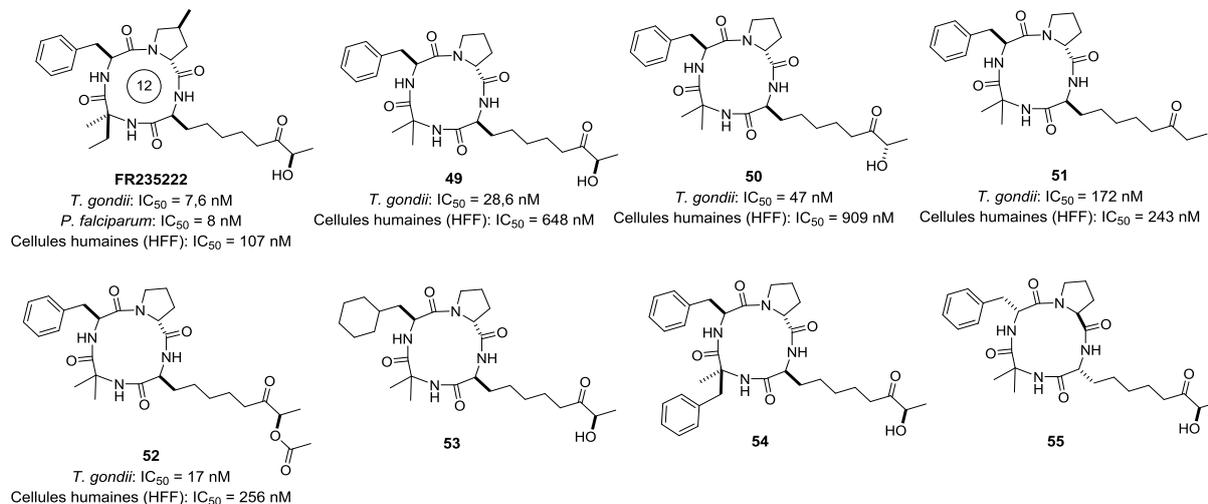
Même si FR235222 présente d'excellentes propriétés antitoxoplasme, son potentiel thérapeutique reste limité à cause de l'absence de sélectivité par rapport aux HDAC humaines. Cependant, sa cible ayant été identifiée chez *T. gondii*, les travaux effectués dans cette thèse ont pour objectif d'optimiser sa sélectivité sur le parasite. Comme les parasites apicomplexes possèdent deux acides aminés supplémentaires (A98 et T99) localisés à l'entrée de leur site catalytique, le principe est de moduler le produit naturel FR235222 afin d'obtenir des interactions favorables sur *TgHDAC3* (notamment avec la T99 donneur de liaison hydrogène) mais défavorables sur les *HsHDAC*.

Les travaux antérieurs à cette thèse ont eu pour objectifs de faire une librairie de nouveaux composés cyclotétrapeptidiques analogues de FR235222 et ont permis de dégager des caractéristiques essentielles à l'activité antitoxoplasme (Figure III.8).<sup>143</sup> L'analogue simplifié du produit naturel **49**, a montré de fortes activités biologiques proches de celles de FR235222. La plupart des modifications apportées au niveau de la tête chélatante (*R*)-céto-hydroxyle du produit naturel n'ont montré aucune amélioration significative sur la croissance du parasite *T. gondii*. Il est à noter que même les têtes chélatantes thioester ou thiol (analogues du largazole), connues comme inhibiteurs sélectifs des HDAC de la classe I humaine n'ont montré aucune activité sur *T. gondii*. Cependant, lorsque le groupement hydroxyle est absent (tête chélatante de l'apicidine, composé **50**) ou change de configuration absolue (composé **51**), une inhibition de la croissance du parasite avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire est observée et reste toutefois inférieure à celle de FR235222. L'acétylation du groupement hydroxyle (composé **52**) conduit à un analogue un peu plus actif mais moins sélectif.

D'autre part, en gardant la meilleure tête chélatante (celle du produit naturel), les modifications effectuées sur la partie cyclopeptidique montrent que l'absence du groupement phényle (réduit en cyclohexyle, composé **53**) provoque une perte de l'activité, aussi bien sur le parasite que sur les cellules humaines. De même, la présence d'un groupement phényle supplémentaire (composé **54**) est défavorable à l'activité antitoxoplasme.

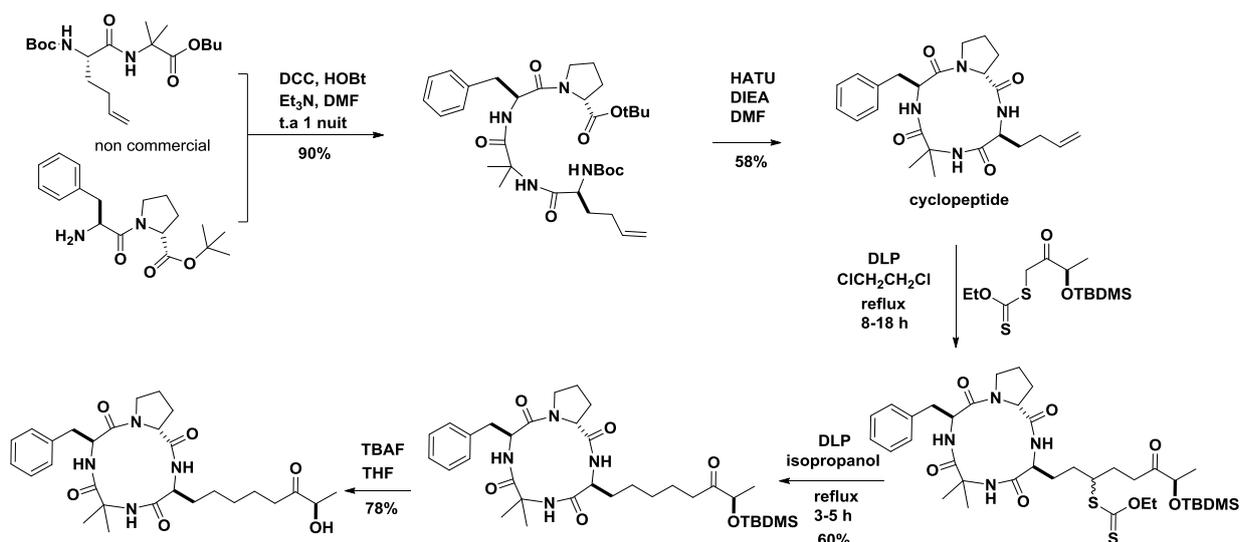
L'énantiomère du cyclopeptide (composé **55**) s'est révélé moins efficace que son analogue normal. Mais en induisant une inhibition de la croissance des souches *T. gondii*, cet énantiomère montre qu'il est capable de traverser les membranes cellulaires et d'atteindre sa cible. Les deux énantiomères du cyclopeptide étant ainsi capable de traverser les membranes cellulaires, on peut en déduire que ce

dernier à un mode de passage passif. Cependant, la faible activité du composé **55** est probablement due à une moins bonne reconnaissance par la cible.



**Figure III.8.** Analogues du produit naturel FR235222

Tous ces composés ont été obtenus à travers une stratégie de synthèse convergente par couplage de deux dipeptides afin d'obtenir un térapeptide linéaire, qui est ensuite cyclisé pour obtenir le cyclotérapeptide avec une fonction alcène libre (Schéma III.9).<sup>143</sup> Les deux dipeptides de départ sont eux-mêmes obtenus par un couplage peptidique entre deux acides aminés ou dérivés d'acides aminés. La réaction radicalaire de Zard,<sup>144</sup> entre l'alcène du cyclotérapeptide et différents xanthates, permet ensuite d'obtenir des analogues de FR235222.



**Schéma III.9.** Synthèse d'un analogue du produit naturel FR235222

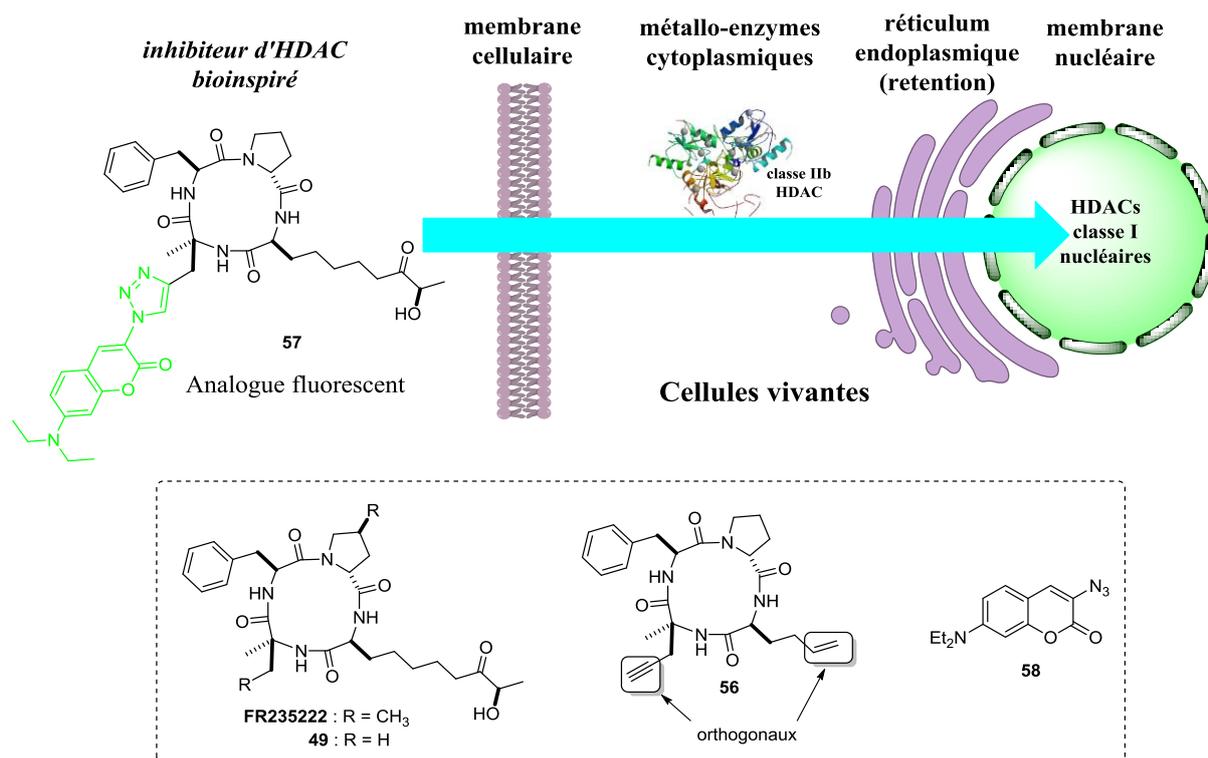
## **Partie B**

Etudes de pénétration et de localisation  
cellulaire de FR235222 à partir d'un analogue  
fluorescent : confirmation de la cible chez  
l'homme (HDAC classe I)

## I. Introduction

Les récents travaux du laboratoire sur le produit naturel FR235222 et son analogue simplifié **49** ont montré, pour ces HDACi, une forte activité de l'ordre du nanomolaire sur des parasites apicomplexes et sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses.<sup>143</sup> L'hypothèse selon laquelle, les cyclotérapeptides possédant une fonction cétone comme tête chélatante sont sélectifs des HDAC de la classe I humaine est soutenue par de plus en plus de travaux.<sup>145,146</sup> Les HDAC de la classe I étant principalement localisées dans le noyau, cela montre une forte capacité des cyclotérapeptides à traverser les barrières membranaires. Ainsi, pour mettre en évidence cette grande capacité de pénétration cellulaire des cyclotérapeptides<sup>147,148</sup> et confirmer visuellement, pour la première fois, la cible de ces HDACi dans une cellule humaine, nous avons développé un analogue fluorescent de FR235222 (Figure I.1). Des HDACi non sélectifs, incorporant un chromophore tels que, le dansyl,<sup>149</sup> l'aminocoumarine,<sup>150</sup> le ruthénium (II)<sup>151</sup> ou le rhénium (I)<sup>152</sup> polypyridyle, le rouge cyanin Cy5.5<sup>153</sup> et le 4-amino-1,8-naphthalimide<sup>154</sup> ont été précédemment développés pour des études de localisation cellulaire. Même si ces HDACi fluorescent ou phosphorescent ont montré une bonne capacité de pénétration cellulaire, le noyau semble être difficilement accessible dans les cellules vivantes par ces HDACi localisés dans le cytosol. Au regard de ces résultats, le choix du marqueur fluorescent devient crucial pour notre étude. Dans plusieurs cas, le chromophore lui-même, affecte les propriétés d'absorption et influence la distribution subcellulaire.<sup>155,156</sup> Pour notre étude, le squelette peptidique **56** portant deux groupements orthogonaux, un alcyne et un alcène terminal, a été conçu pour pouvoir accéder à l'HDACi cyclotérapeptidique fluorescent **57**. Dans ces travaux, le marqueur aminocoumarine fluorescent de Wang a été choisi pour plusieurs raisons.<sup>157</sup> L'azidoaminocoumarine **58** est une petite sonde fluorogène, facilement « clickable » avec une longueur d'onde d'excitation et d'émission maximale de 420 nm et 505 nm respectivement. Cette sonde peut sélectivement réagir avec l'alcyne terminal du squelette peptidique **56** à travers la réaction click d'Huisgen. Elle a déjà été utilisée comme marqueur fluorescent dans la conception de capteurs d'ions alcalins<sup>158</sup> et nitroxyle.<sup>159</sup> Cependant, cette sonde est aussi connue pour s'accumuler à l'espace périnucléaire où sont également localisés les mitochondries et le réticulum endoplasmique dans la cellule.<sup>158,159</sup> Cette distribution cellulaire peut être retrouvée avec d'autres sondes de type aminocoumarine.<sup>150,160,161</sup> Ainsi, la rétention de ces sondes dans des régions subcellulaires autour du noyau pourrait représenter un défi pour notre HDACi cyclotérapeptidique fluorescent **57** pour atteindre le noyau.

Dans cette partie, nous rapportons la synthèse et l'activité biologique de **57**, ce qui nous permettra de mettre en évidence les propriétés de pénétration cellulaire des cyclotérapeptides et de confirmer visuellement la sélectivité des analoges FR235222 sur les HDAC de la classe I humaine.

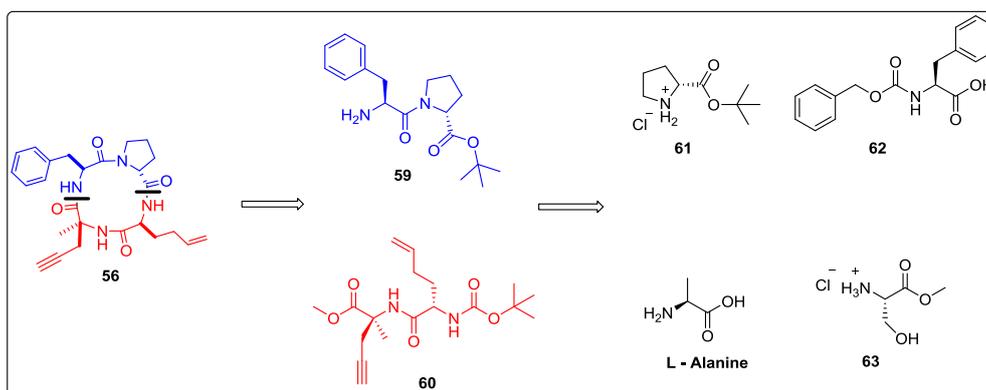


**Figure I.1.** Analogue fluorescent de FR235222 et passage membranaire

## II. Résultats et discussion

### II.1. Synthèse d'un analogue FR235222 fluorescent

Le squelette peptidique **56** a été obtenu selon une stratégie de synthèse convergente de deux dipeptides **59** et **60** (Schéma II.1).



**Schéma II.1.** Stratégie de synthèse du squelette peptidique **56**

➤ Synthèse du dipeptide 59

Le dipeptide **64** a été obtenu par le couplage de la D-proline **61** dont la fonction acide est préalablement protégée par un groupement *ter*-butanol, avec la L-phénylalanine **62** ayant la fonction amine protégée par un carbobenzoxy (Schéma II.2). On obtient le composé **59** après déprotection du *N*-carbobenzoxy par hydrogénation catalytique.

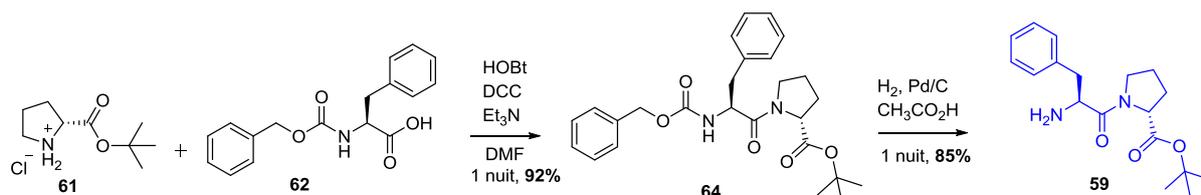


Schéma II.2. Synthèse du dipeptide **59**

➤ Synthèse du dipeptide 60

Le dipeptide **60** a été obtenu indirectement à partir de la L-alanine et de la tyrosine **63** en passant par les composés **65** et **66** (Schéma II.3).

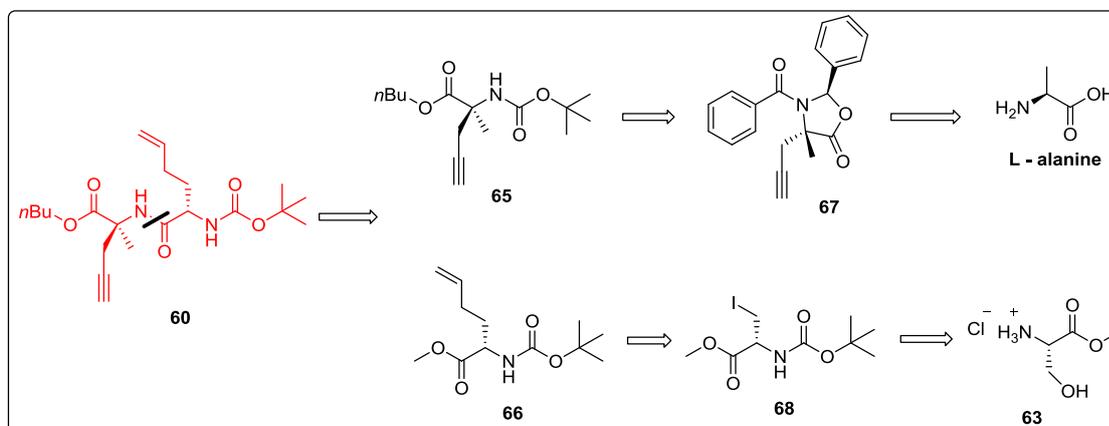


Schéma II.3. Stratégie de synthèse du dipeptide **60**

- Composé **65** : Sur la L-alanine, nous avons introduit un deuxième centre stéréogène en formant le composé **69** (Schéma II.4).<sup>162</sup> Ce centre stéréogène étant plus encombré, il oriente la stéréochimie de la réaction d'alkylation qui conduit au composé **67** avec un rendement 62%. En présence de HCl concentré, nous avons libéré les fonctions amine et acide carboxylique du composé **67**. La fonction acide a ensuite subi une estérification avec du *n*BuOH en présence

du TMSCl et la fonction amine a été protégée avec un Boc (*N*-Boc) pour conduire au composé **65**. La synthèse de **65** à partir de **67** se fait en une seule étape avec un rendement de 49%.<sup>163,164</sup>

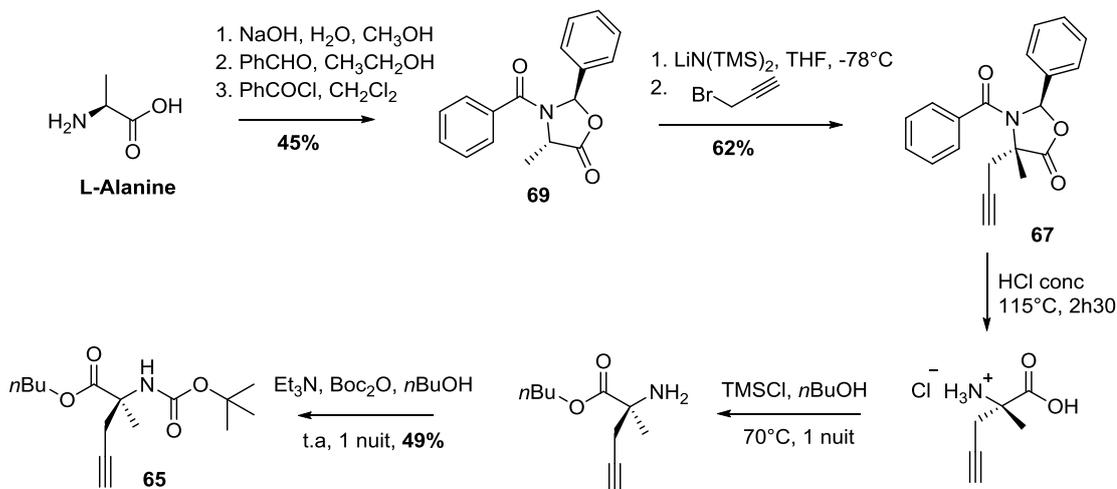


Schéma II.4. Synthèse du composé **65**

- Composé **66** : Celui-ci a été obtenu en suivant la stratégie précédemment décrite par le laboratoire (Schéma II.5).<sup>143</sup> En partant du produit commercial **63** dont la fonction amine a été protégée par un Boc (composé **70**), nous avons transformé le groupement hydroxyle de **70** en un bon nucléofuge (tosylate) pour conduire au composé **71** avec un rendement de 77%. Nous accédons ensuite au composé **72**, avec un rendement de 58%, par la substitution nucléophile du tosylate de **71** par un iodure en présence de NaI. Par l'introduction d'un cupro-zincique dans la liaison carbone-iodure, la polarité du carbone portant l'iode est inversée et devient un bon nucléophile. Ce dernier permet d'accéder au composé **66** avec un rendement de 75% grâce à une réaction de substitution nucléophile sur un bromure d'allyle.

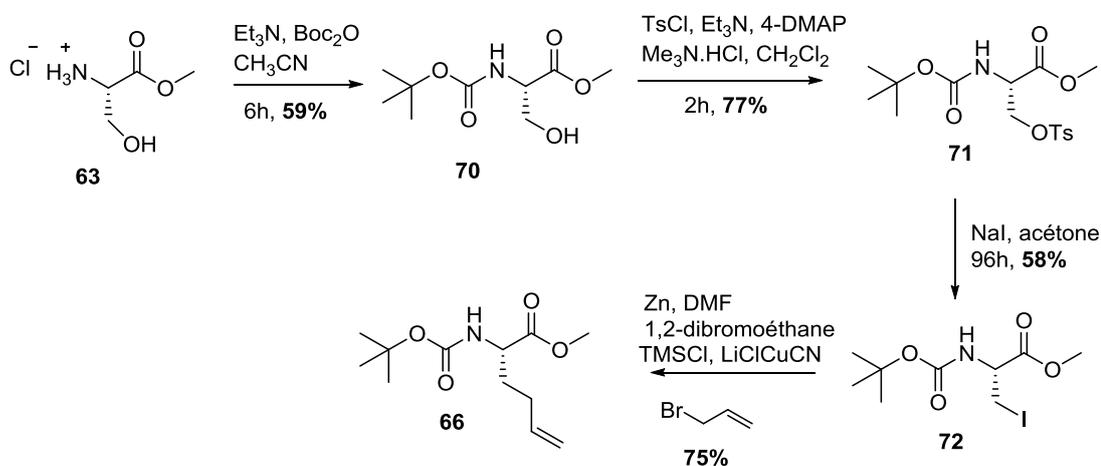


Schéma II.5. Synthèse du composé **66**

Une fois **65** et **66** obtenus, la condensation de ces deux composés a permis d'accéder au dipeptide **60** avec un rendement de 54%, en hydrolysant préalablement la fonction ester de **65** et en déprotégeant la fonction amine de **66** (Schéma II.6).

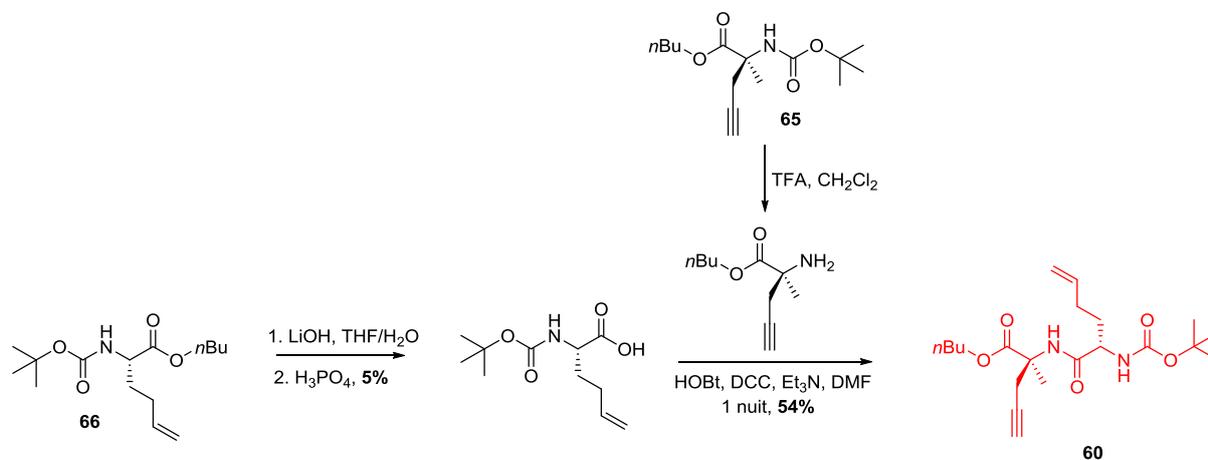


Schéma II.6. Synthèse du dipeptide **60**

➤ Synthèse du cyclotérapeptide **56**

Le couplage des deux dipeptides **59** et **60** conduit au térapeptide linéaire **73** avec un rendement de 77%, en hydrolysant préalablement la fonction ester de **60**. Après déprotection des résidus clés, la cyclisation de **73** a permis d'accéder au cyclotérapeptide **56** avec un rendement de 72%.

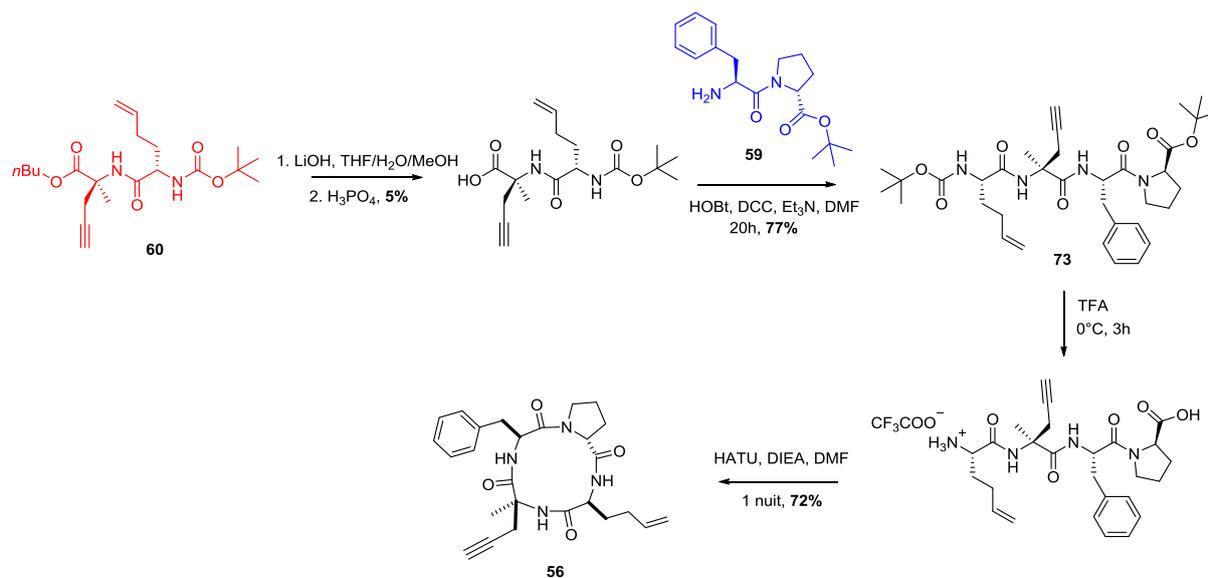


Schéma II.7. Synthèse du squelette peptidique **56**

➤ Synthèse de la sonde fluorogénique **58**

La sonde fluorogénique a été obtenue selon la stratégie décrite par Wang (Schéma II.8).<sup>157</sup> La condensation de l'aldehyde avec le nitro conduit à la coumarine possédant un groupement nitro avec un rendement de 62%. Ce dernier est réduit en amine avec un rendement de 43%, en présence de SnCl<sub>2</sub> dans l'HCl concentré. L'amine est ensuite transformée en sel de diazonium qui est lui-même substitué par un azoture (Sandmeyer) pour conduire à la sonde fluorogénique **58** avec un rendement de 82%.

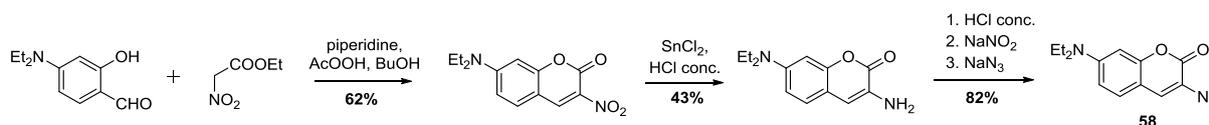
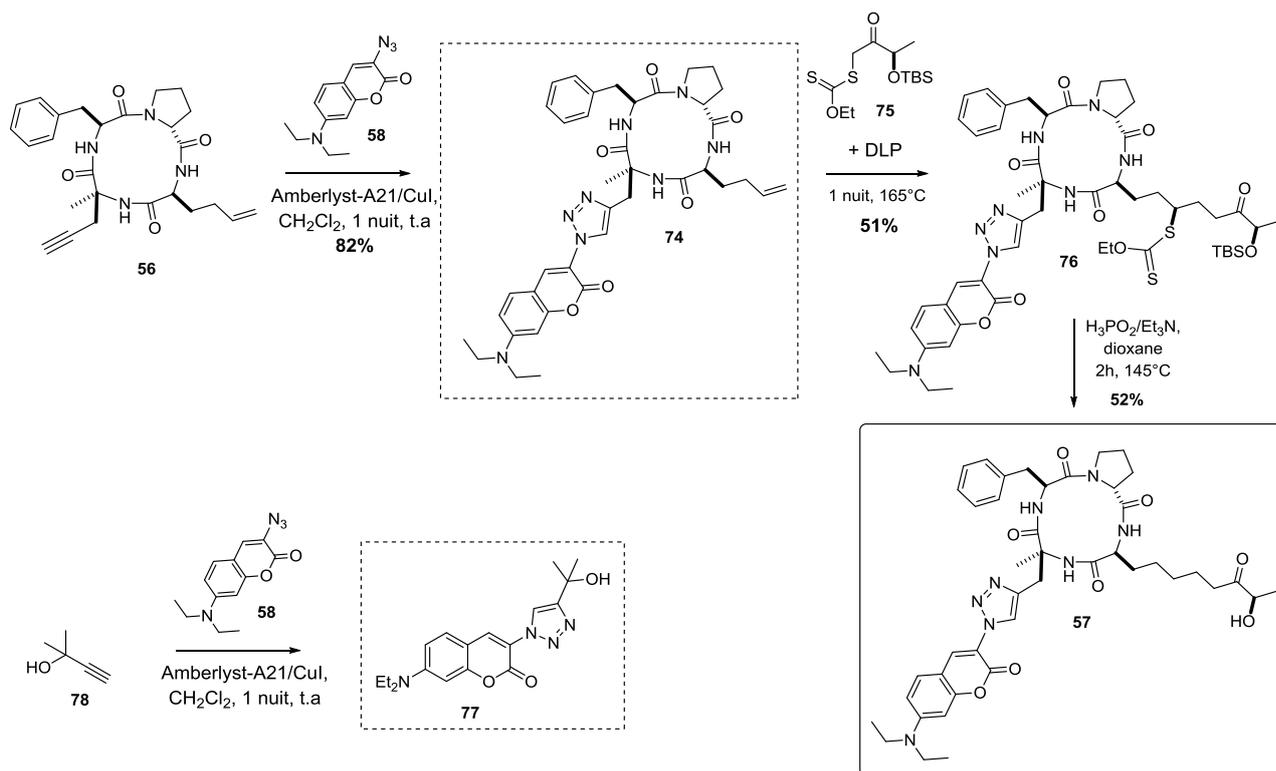


Schéma II.8. Synthèse de la sonde fluorogénique **58**

➤ Synthèse du cyclotétrapeptide fluorescent **57**

La réaction d'Huisgen catalysée au cuivre, entre **56** et **58** permet d'accéder au composé **74** avec un rendement de 82% (Schéma II.9). Pour cette réaction « click », nous avons trouvé que l'utilisation d'un polymère-supporté (Amberlyst-A21/CuI)<sup>165</sup> en quantité catalytique permet d'obtenir **74** avec un bon rendement reproductible. La fonction alcène libre de **74** est ensuite engagée dans un couplage radicalaire de Zard<sup>144</sup> avec le xanthate **75** pour conduire au composé **76** avec un rendement de 51%. Pour obtenir le composé **57** à partir de **76**, nous avons utilisé une nouvelle méthode qui permet de réduire le xanthate et de déprotéger le silyle de manière concomitante par utilisation d'un sel d'acide phosphonique H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N.<sup>166</sup> Contrairement à l'ancienne méthode du laboratoire, qui souffrait d'un mauvais rendement et qui consistait à réduire le xanthate dans un premier temps avec de la DLP dans l'isopropanol, avant de déprotéger le silyle avec du TBAF, cette nouvelle méthode permet d'accéder directement au composé **57** à partir de **76** avec un rendement reproductible de 52%.

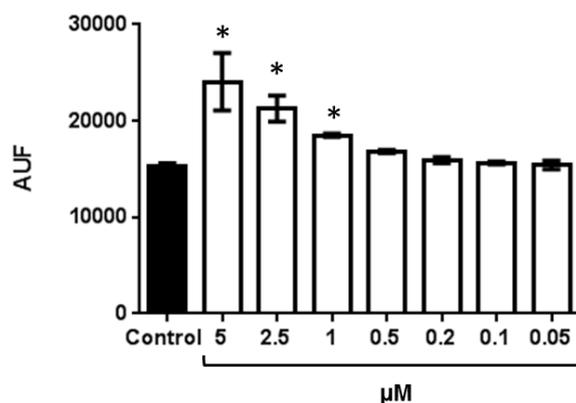
La molécule fluorescente **77** a été obtenue par la réaction d'Huisgen entre les composés **58** et **78** et a servi de référence pour l'évaluation des propriétés biologiques de **57**.<sup>157</sup>



**Schéma II.9.** Synthèse du cyclotétrapeptide **57** et du composé **77**

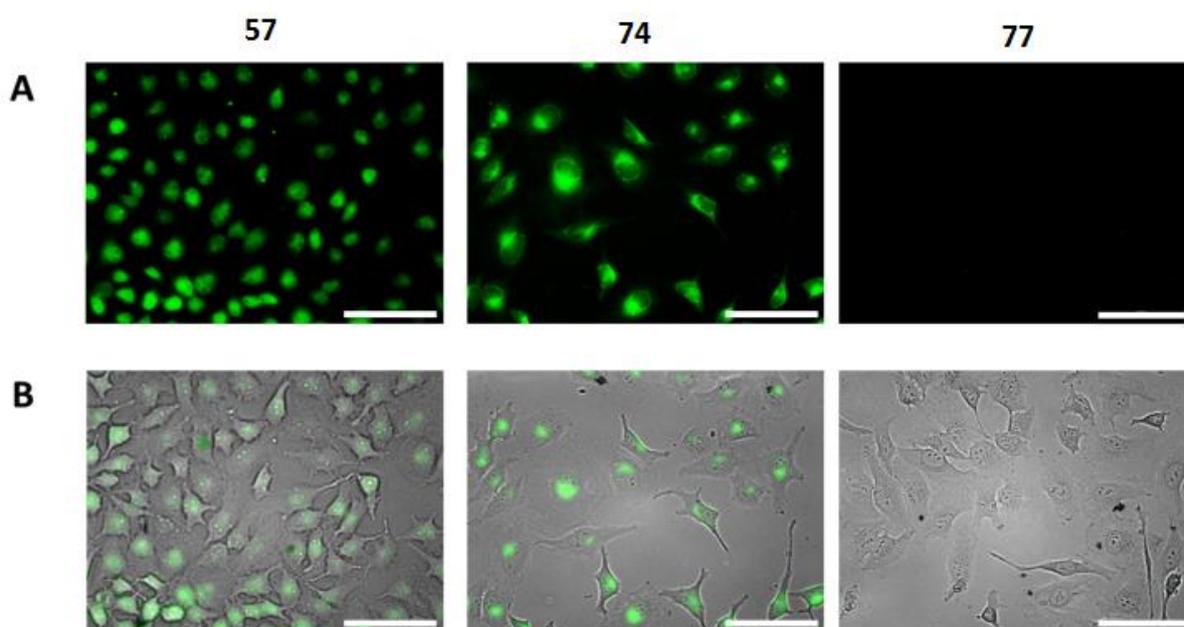
## II.2. Pénétration cellulaire

Dans la deuxième partie de ces travaux nous avons comparé les marqueurs fluorescents **57**, **74** et **77**, par rapport à leurs propriétés de pénétration cellulaire en utilisant des cellules HeLa. Cette expérience a été suivie par un imageur cellulaire de microplaque permettant une imagerie rapide de plusieurs échantillons sous filtre GFP. Le seuil de détection a d'abord été établi (Figure II.1) avant de choisir une concentration optimale de 2,5  $\mu$ M pour chacun de nos marqueurs fluorescents.



**Figure II.1.** L'intensité de fluorescence mesurée *in situ* avec un imageur cellulaire de microplaque sous filtre GFP après 1h de traitement des cellules HeLa avec le composé **57**. Ce dernier est détecté dans les cellules traitées entre 1-5 μM.

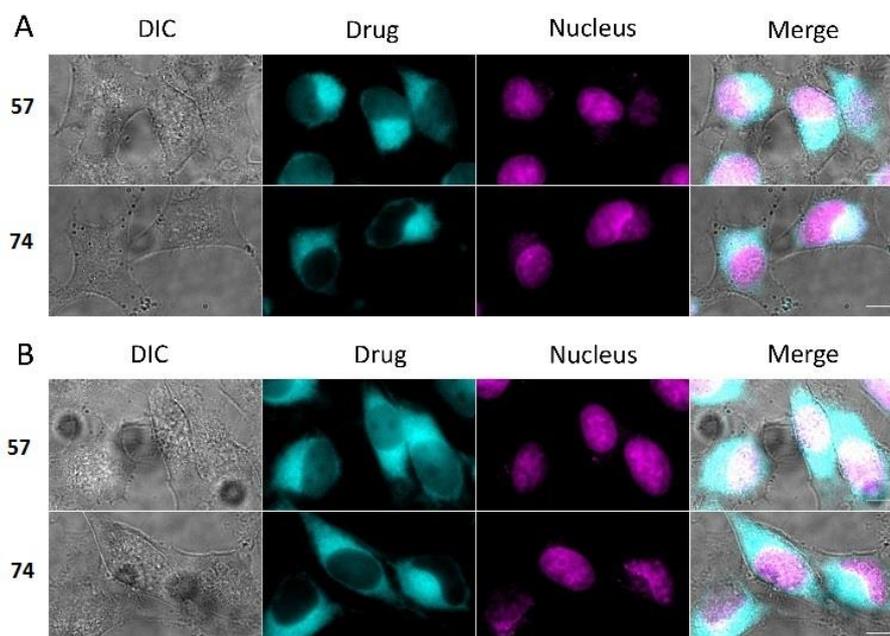
Après 15 minutes de traitement avec les marqueurs fluorescents, les cellules ont été lavées avant d'être directement analysées avec l'imageur cellulaire. Les cellules traitées avec les cyclotérapeptides **57** et **74** ont montré une forte fluorescence avec des intensités similaires, alors que, le fluorochrome simple **77** s'est montré incapable de pénétrer dans les cellules (Figure II.2). Ces expériences confirment ainsi, les propriétés de pénétration cellulaire des cyclotérapeptides. Nous avons également remarqué que les composés **57** et **74** ne montrent pas exactement la même distribution subcellulaire.



**Figure II.2.** Imagerie à débit moyen. A) Images représentatives recueillies avec un imageur de cellules de microplaques en utilisant un filtre GFP. B) Images résultantes de la fusion filtre GFP / champ lumineux. Conditions : chaque sonde fluorescente à 2,5 μM pendant 15 min à 37 ° C. Echelle : 100 μm.

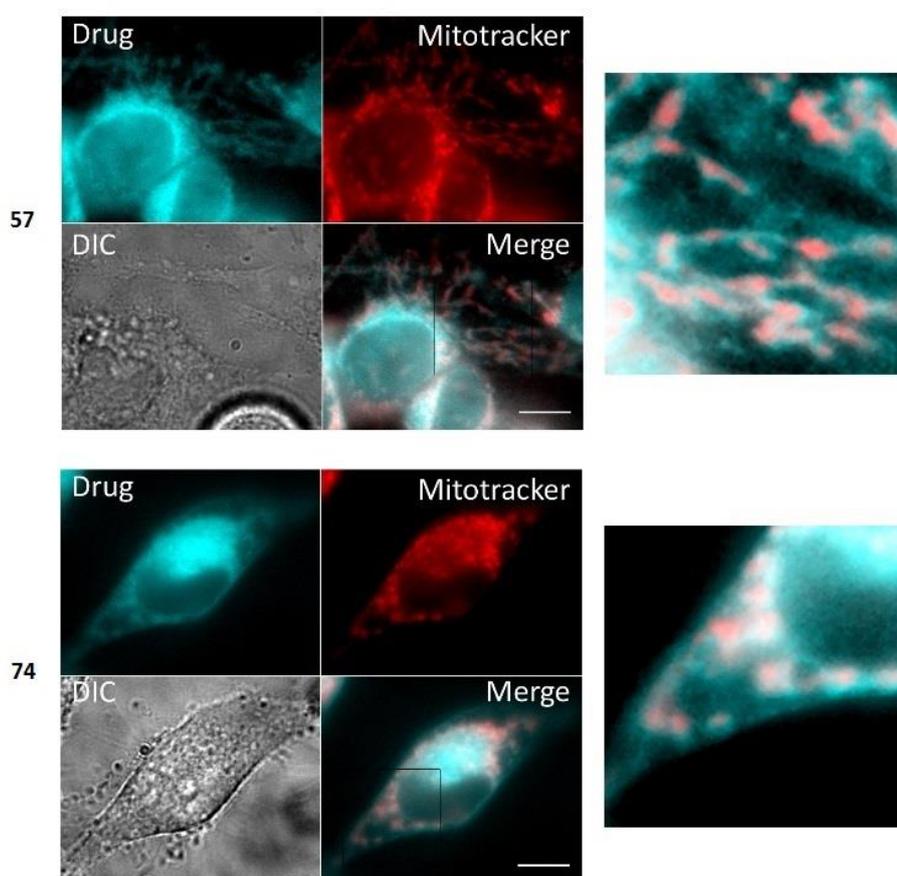
### II.3. Localisation cellulaire

Pour étudier la distribution des composés **57** et **74** dans les cellules, il est nécessaire de travailler avec un instrument ayant une bonne sensibilité et une forte résolution. Ainsi, nous avons utilisé un microscope à fluorescence avec un filtre CFP, pour obtenir une localisation plus précise, mais aussi pour pouvoir travailler avec une faible concentration de nos composés. Des lignées de cellules HeLa et de cellules lymphoblastiques K562 ont été incubées pendant 1 h, dans deux milieux de culture contenant 160 nM de l'un ou l'autre des composés **57** et **74**. Les deux composés ont montré une accumulation dans des organites cellulaires à la périphérie du noyau (Figure II.3). Aucune accumulation importante n'a été détectée ailleurs dans le cytosol. Le contour de l'enveloppe nucléaire est marqué contrairement à la membrane plasmique. En accord avec les travaux précédemment décrit dans la littérature, notre groupement triazole aminocoumarine est sujet à une localisation dans ce compartiment cellulaire (membrane périnucléaire). Cependant, contrairement au **74**, qui reste à la périphérie de la membrane nucléaire, le composé **57** est clairement détecté à l'intérieur du noyau. Ces résultats montrent que, la présence de la tête chélatante contribue fortement à la localisation et à la rétention nucléaire de **57**, et que ce dernier pourrait, par conséquent, interagir avec les HDAC présentes dans le noyau.



**Figure II.3.** La microscopie en direct. Des cellules HeLa ont été incubées avec chaque sonde fluorescente à 160 nM pendant 1 h à 37 ° C. Les cellules ont été colorées avec Draq 5 pour visualiser l'ADN. A) Les cellules sélectionnées ont porté sur des pseudopodes montrant une forte accumulation dans la région nucléaire et périnucléaire. B) Les clichés de cellules sélectionnées avec leur noyau dans le plan focal. Les nucléoles peuvent être détectés comme anneaux brillants dans le noyau marqué avec Draq 5 (noyau, magenta) et ne sont pas marqués également par le composé **57**. Echelle : 10 µm.

Nous avons ensuite mis en présence les cellules traitées (précédemment avec les composés **57** ou **74**) avec un marqueur mitochondriale (Mitotracker red), ce qui a permis de montrer une co-localisation partielle de nos composés. Les deux composés ont montré une accumulation dans des organites cellulaires à la périphérie du noyau et à nouveau, aucune accumulation importante n'a été détectée ailleurs dans le cytosol. Cependant, sur les zooms effectués sur la figure II.4 (à droite), nous observons clairement que nos composés **57** et **74** se trouvent aux mêmes endroits que le marqueur mitochondriale, ce qui suggère qu'ils sont co-localisés dans les mitochondries et pourraient interagir aussi avec le réticulum endoplasmique à travers les Membranes Associées aux Mitochondries (MAM). Cette observation est cohérente avec la détection de nos composés dans cette enveloppe nucléaire, qui est connu pour être associée avec la membrane des réticulums endoplasmiques. Comme précédemment, contrairement au **74**, le composé **57** est présent dans le noyau.



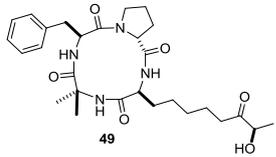
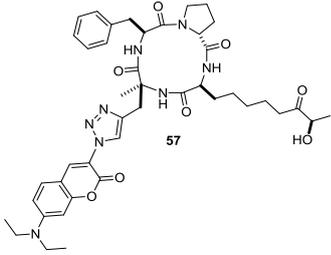
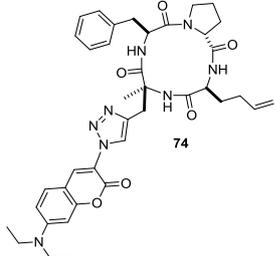
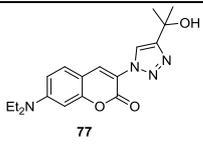
**Figure II.4.** Les cellules HeLa pré-colorées avec le Mitotracker pour visualiser les mitochondries et traitées avec 160 nM de **57** (en haut) ou **74** (en bas) pendant 1 h à 37 ° C. A droite, un agrandissement d'une partie de l'image fusionnée (Merge). Echelle : 10 µm.

## II.4. Activités biologiques

Malgré la présence de notre analogue fluorescent **57** dans la membrane périnucléaire due à son motif triazole aminocoumarine, une accumulation dans le noyau est également observée, suggérant son affinité pour les HDAC de la classe I. Cette dernière observation nous a incité à évaluer son activité (tests enzymatiques et cellulaires) et sa sélectivité (tests enzymatiques) en tant que HDACi pour corrélérer cette localisation cellulaire spécifique avec une sélectivité pour les HDAC de la classe I nucléaires.

La plupart des tests (enzymatiques) HDAC est basée sur l'utilisation d'un substrat fluorescent (portant la coumarine comme fluorochrome).<sup>167</sup> Etant donné que notre molécule **57** porte également un fluorochrome coumarine, il était nécessaire de trouver un test alternatif pour éviter toute interférence optique avec le substrat. Récemment, nos collaborateurs biologistes ont développé un nouveau test d'inhibition d'HDAC couplé à une détection UHPLC-ESI-MS/MS,<sup>168</sup> pour une identification direct des inhibiteurs. Ainsi, en utilisant ce nouveau test, l'activité inhibitrice de nos molécules fluorescentes **57**, **74** et **77** a pu être évaluée. L'analogue simplifié **49** non fluorescent a été utilisé comme référence pour ces tests.

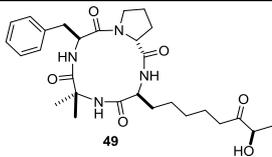
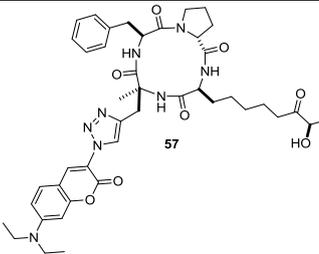
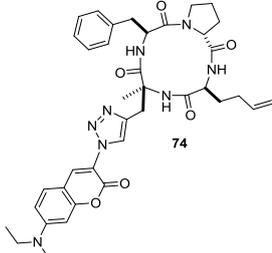
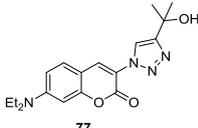
Les résultats comparables obtenus pour le composé **49** par le test de fluorescence traditionnel et le nouveau test UHPLC-ESI-MS/MS reflètent une concordance entre ces deux méthodes (Table II.1, entrée 1). La sélectivité observée pour les HDAC de la classe I (nucléaires) par rapport à l'HDAC6 de la classe IIb (cytoplasmique) est confirmée *in vitro* pour le cyclotérapeptide **49**. Notre analogue fluorescent **57** (entrée 2) a également montré une forte activité inhibitrice sur les HDAC de la classe I tout en ayant une forte sélectivité par rapport à HDAC6 de la classe IIb. Comme attendu, le cyclotérapeptide fluorescent sans la tête chélatante **74** (entrée 3) et le fluorochrome simple **77** (entrée 4) n'ont montré aucune activité enzymatique ni sur les HDAC de la classe I, ni sur HDAC6 de la classe IIb.

Entrée	Composés	HDAC Classe I, HeLa extraits nucléaires IC <sub>50</sub> (μM)	HDAC6 Classe IIb IC <sub>50</sub> (μM)
1		0,0084 ± 0,0006 (0,0081 ± 0,0019) <sup>a</sup>	> 300
2		0,0358 ± 0,0061	> 300
3		> 300	> 300
4		> 300	> 300

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> déterminée par le test de fluorescence standard effectués en triplicata

**Tableau II.1.** Activités enzymatiques des composés sur les HDACs de la classe I et sur HDAC6

Ces composés ont ensuite été sujets à des tests cellulaires. Le composé **49** (Tableau II.2, entrée 1) a montré une forte activité sur le parasite *P. falciparum* et sur des lignées de cellules cancéreuses. En comparaison à ce dernier et comme pour les activités enzymatiques, le composé **57** (entrée 2) a montré des activités inhibitrices plus faibles sur cellules. Une explication possible serait que la présence du motif triazole coumarine provoque une localisation partielle de **57** dans l'enveloppe périnucléaire, diminuant ainsi sa concentration dans le noyau des cellules (Figure II.4). Le cyclotérapeptide fluorescent sans la tête chélatante **74** (entrée 3) s'est avéré être actif sur la souche 3D7 de *P. falciparum* et légèrement sur des cellules lymphoblastiques. Aucune activité n'a été observée pour **74** sur les autres lignées cellulaires. Le fluorochrome simple **77** (entrée 4) a montré des activités inhibitrices similaires, mais avec des concentrations plus élevées. Cela pourrait s'expliquer par la faible capacité de pénétration cellulaire de **77**. Des études menées par certains de nos collaborateurs avaient montré que ce type de composé a des activités biologiques sur *Cryptococcosis* et pourrait être impliqué dans l'augmentation des espèces réactives oxygénées (ROS).<sup>169</sup>

Entrée	Composés	IC <sub>50</sub> <i>P. f.</i> 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> Lymphoblast (μM)	IC <sub>50</sub> Erythroblast K562 (μM)	IC <sub>50</sub> HeLa (μM)	IC <sub>50</sub> HEK293 (μM)
1	 49	0.017 ± 0.002	0.048 ± 0.001	0.018 ± 0.002	0.170 ± 0.010	0.04 ± 0.02
2	 57	0.919 ± 0.070	1.67 ± 0.28	1.23 ± 0.06	0.56 ± 0.04	0.27 ± 0.06
3	 74	1.24 ± 0.18	15.6 ± 4.1	>100	>100	>100
4	 77	43.4 ± 6.4	41.8 ± 5.5	47.6 ± 2.2	> 50	> 50

**Tableau II.2.** Activités cellulaires des composés sur *P. falciparum* et sur des lignées de cellules cancéreuses (tests réalisés en triplicata)

### III. Conclusion et perspectives

A l'issue de ces travaux, grâce aux analogues fluorescents **57** et **74** du produit naturel FR235222, nous avons montré que le cyclotérapeptide possède d'excellentes propriétés de pénétration cellulaire. Cependant, la présence d'un groupement fluochromique sur une molécule bioactive n'est pas sans conséquences et peut altérer non seulement les propriétés de pénétration cellulaire de la molécule, mais aussi sa distribution subcellulaire. En effet, les études de localisation cellulaire ont montré une accumulation de nos composés **57** et **74** dans la membrane périnucléaire et une présence partielle dans les mitochondries et éventuellement dans les réticulums endoplasmiques. Bien que les analogues fluorescents **57** et **74** traversent les barrières membranaires, seul le composé **57** (absent dans le cytosol) est capable d'atteindre le noyau de la cellule, montrant son affinité et surtout sa sélectivité pour les HDACs de la classe I. L'évaluation des activités biologiques confirme l'affinité et la sélectivité de **57** sur les HDAC de la classe I (nucléaires) par rapport à HDAC6 de la classe IIb (cytoplasmique). Le composé **74** (sans la tête chélatante) n'a montré aucune activité ni sur les HDAC de la classe I, ni sur HDAC6 de la classe IIb. D'autre part, ces résultats laissent penser que la tête chélatante « céto-hydroxyle » de FR235222 ou de ses analogues pourrait être responsable de leurs activités HDACi et de leur sélectivité sur les HDAC de la classe I.

Dans la troisième partie de ce chapitre (Partie C), nous vérifierons que cette sélectivité du produit naturel et de ses analogues, vient de sa tête chélatante « céto-hydroxyle ». Par des moyens de modélisation moléculaire, nous essayerons également d'expliquer cette sélectivité.

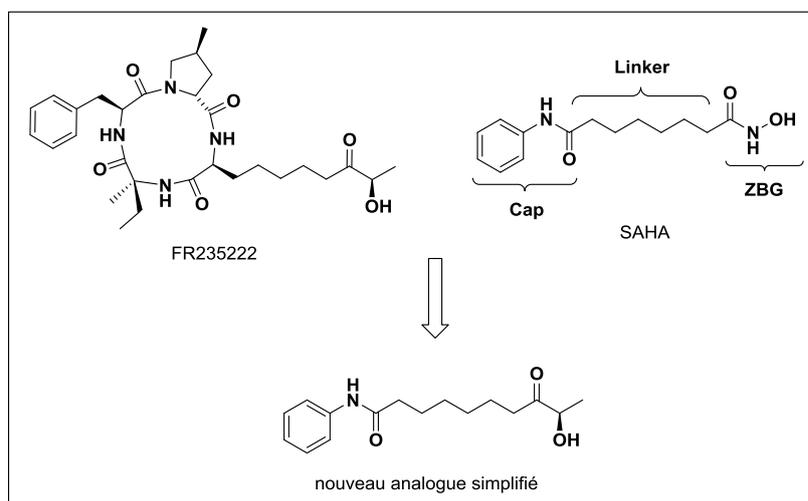
## **Partie C**

Sélectivité de la tête chélatante « céto-hydroxyle » sur les HDACs de la classe I par rapport à l'HDAC6 de la classe IIb humaine

## I. Introduction

La littérature montre que les HDACi cyclotérapeptidiques possédant une tête chélatante de type cétone sont généralement sélectifs des isoformes HDAC de la classe I humaine.<sup>145,146</sup> Cependant, peu de choses sont connues, en ce qui concerne les caractéristiques structurales et biologiques qui gouvernent cette sélectivité. Dans cette partie de la thèse, nous nous intéressons à l'identification et à la compréhension des caractéristiques structurales qui pourraient être responsables de la sélectivité du produit naturel FR235222 sur les HDAC de la classe I par rapport à HDAC6 de la classe IIb. Nos précédents travaux (Partie B), effectués sur un analogue fluorescent du produit naturel FR235222 (composé **57**), confirment que les HDACi analogues de FR235222 sont sélectifs des HDAC de la classe I par rapport à l'HDAC6 de la classe IIb. L'absence de la tête chélatante (composé **74**) a conduit à une perte de l'activité biologique de la molécule, suggérant que l'activité et peut être la sélectivité du produit naturel pourraient venir de sa tête chélatante « céto-hydroxyle ».

Pour confirmer cette hypothèse, des analogues simplifiés de FR235222 ont été synthétisés en remplaçant le cyclotérapeptide par une simple aniline (Figure I.1). Nos nouveaux analogues ne diffèrent de SAHA que par leur tête chélatante, et comme nous savons que SAHA est actif sur quasiment toutes les HDAC de toutes les classes, nous pouvons donc considérer que l'aniline n'apportera aucune sélectivité aux nouveaux analogues. Ainsi, l'évaluation de l'activité biologique de ces analogues simplifiés ne mettra en évidence que l'apport de la tête chélatante.



**Figure I.1.** Exemple d'un nouvel analogue simplifié de FR235222

Des études de modélisation moléculaire ont été effectuées sur HDAC1 (classe I) et HDAC6 (classe IIb) afin de comprendre cette sélectivité de la tête chélatante « céto-hydroxyle ». Pour ce faire, nous avons construit un modèle HDAC6 par homologie de séquence et nous avons utilisé

une structure cristallographique pour HDAC1 (PDB 4BKX), afin de procéder à des études de docking et de dynamique moléculaire.

## II. Résultats et discussion

### II.1. Synthèse d'analogues simplifiés de FR235222

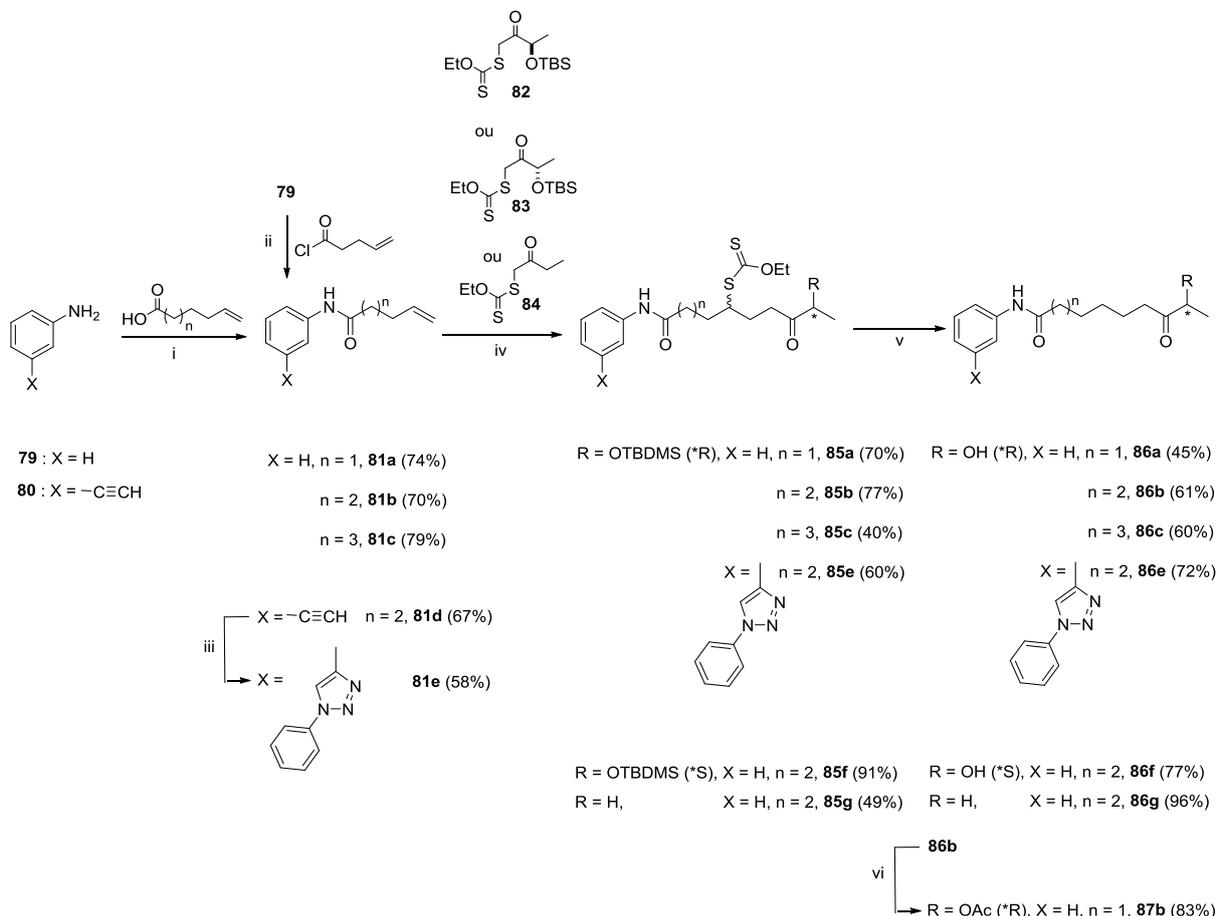
A travers la stratégie de synthèse précédemment développée au laboratoire,<sup>143</sup> nous pouvons greffer différentes têtes chélatantes sur tout type de molécule ayant un « linker » finissant par un alcène terminal. La partie cyclotérapeptide a ainsi été remplacée par le « cap » le plus simple, un groupement phényl amide, que nous retrouvons chez SAHA.

Dans un premier temps, pour déterminer la taille optimale du linker, nous avons synthétisé trois composés phényl amide **81a-c**, ayant chacun un linker de taille différente. Pour le composé **81a**, il s'agit d'une réaction d'amidification entre l'aniline **79** et le chlorure de penténoyle commercial qui a conduit au produit escompté avec un rendement de 74%. Les composés **81b** et **81c** ont été obtenus avec un rendement respectif de 70% et 79%, par une réaction entre l'aniline et l'acide hexénoïque et hepténoïque respectivement. A travers la réaction radicalaire de Zard,<sup>144</sup> ces trois composés ont été condensés avec le (*R*)-hydroxyl-cétone xanthate **82**<sup>143</sup> pour fournir les composés **85a-c** avec respectivement un rendement de 70%, 77% et 40%. En présence d'un sel d'acide phosphonique et de triéthylamine, le groupement xanthate de ces derniers est réduit et avec une déprotection concomitante du groupement silyle, nous accédons directement aux composés **86a-c** avec un rendement respectif de 45%, 61% et 60%. L'évaluation de l'activité HDACi (qui sera discutée plus bas) de ces trois composés a montré que le **86b** porte le meilleur linker.

Ainsi, dans la deuxième partie, en partant du **81b** ayant le meilleur linker, le couplage des xanthates, (*S*)-hydroxyl-cétone **83** et éthyle cétone **84**, a conduit aux composés **86f** et **86g**. Ces derniers permettront d'évaluer l'apport du groupement hydroxyle et de sa stéréochimie sur les activités biologiques de la tête chélatante « céto-hydroxyle ». Dans les études antérieures à cette thèse,<sup>143</sup> l'acétylation du groupement hydroxyle de l'HDACi cyclotérapeptidique **49** avait montré une amélioration de son activité inhibitrice. De ce fait, nous avons également synthétisé l'analogue simplifié **87b** par acétylation du composé **86b**.

Enfin, la 3-acétylène aniline **80** a servi de départ pour la synthèse du composé **86e**. Une première réaction d'amidification entre **80** et l'acide hexénoïque (meilleur linker) a permis d'accéder au composé **81d** avec un rendement de 67%. Ce dernier conduit au composé **81e** avec un rendement de 58%, par une réaction « click » d'Huisgen avec un phényl azide généré *in situ*. Le composé **81e** réagit ensuite avec le xanthate **82** dans les conditions de Zard pour conduire au composé **85e** avec un rendement de 60%. Enfin, la réduction du xanthate avec la déprotection concomitante du groupement

silyle a permis d'obtenir le composé **86e** avec un rendement de 72%. Le choix du composé **86e** dans cette étude se justifie par les travaux de Kozikowski,<sup>170</sup> qui a montré que ce type de motif pourrait augmenter significativement l'inhibition sélective de HDAC3.



**Schéma II.1.** Synthèse des analogues simplifiés, (i) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a, 1 nuit; (ii) Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a, 1 nuit; (iii) aniline, tBuONO, TMSN<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 2 h puis **81d**, CuI/Et<sub>3</sub>N supporté sur tamis moléculaire, t.a, 1 nuit; (iv) xanthate, DLP, ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, 175°C, 1 nuit; (v) sel d'acide phosphonique/Et<sub>3</sub>N, AIBN, dioxane, 145°C, 2 h; (vi) Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DMAP, 1 h à 0°C, 2 h à t.a.

## II.2. Résultats biologiques

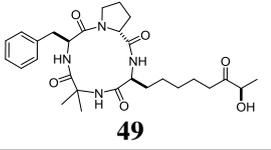
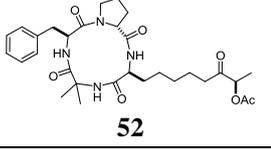
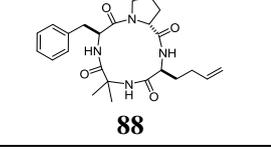
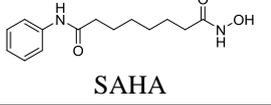
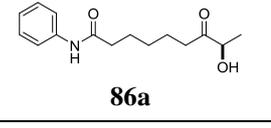
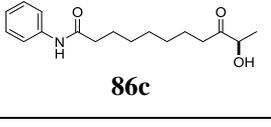
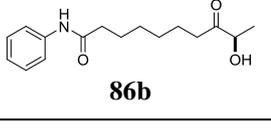
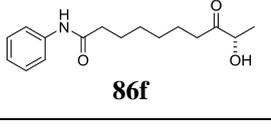
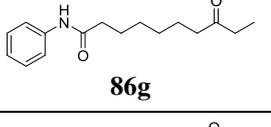
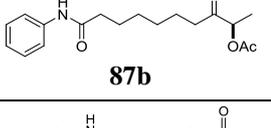
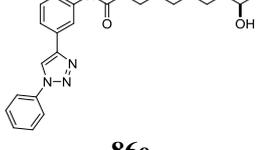
Des précédents travaux du laboratoire,<sup>143</sup> basés sur des tests cellulaires, les composés **49** et **52** se sont montrés très efficaces pour inhiber la prolifération du parasite *P. falciparum* et de plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Ces deux composés, plus le cyclotérapeptide sans tête chélatante **88** et SAHA, ont donc servi de référence pour l'évaluation des activités biologiques de nos analogues simplifiés. Le choix du composé **88** comme référence se justifie par les travaux de Ghaderi et Olsen,<sup>171</sup> qui ont montré qu'un cyclodepsipeptide sans tête chélatante pouvait efficacement inhiber l'activité des

HDAC. Ainsi, l'activité inhibitrice des composés **49**, **52**, **86a-c**, **86e-g**, **87b**, **88** et SAHA a été évaluée sur des extraits nucléaires de cellules HeLa, qui contiennent un mélange des isoformes HDAC nucléaires (principalement HDAC1-3) (Tableau II.1). Ces composés ont aussi été testés sur divers isoformes HDAC recombinants (HDAC1, HDAC3/NCOR2 et HDAC6).

Les composés **49** et **52** (entrées 1 et 2) ont montré de très bonnes activités inhibitrices sur les extraits nucléaires de cellules HeLa (correspondant aux HDAC de la classe I), alors qu'aucune activité n'a été observée sur l'HDAC6 de la classe IIb ( $IC_{50} > 300$ ). La grande sélectivité de ces molécules est comparable à celle de l'apicidine (un produit naturel sélectif des HDAC de la classe I).<sup>146</sup> Pour vérifier que la partie tétracyclopeptide ne joue pas un rôle crucial dans l'activité inhibitrice et dans la sélectivité de ces composés, le composé **88** sans tête chélatante a été évalué en tests enzymatiques. Ce dernier n'a montré aucune activité inhibitrice ni sur les HDAC de la classe I, ni sur HDAC6 de la classe IIb (entrée 3), suggérant que l'activité biologique viendrait principalement de la tête chélatante. Ainsi, le cyclotérapeptide a été remplacé par un groupement phényl amide. L'évaluation de l'activité inhibitrice des composés **86a-c** sur les extraits nucléaires de cellules HeLa (entrées 5-7) a permis de définir la meilleure longueur pour le linker. En effet, le composé **86b** (entrée 7), dont le linker a la même longueur que celui de SAHA (entrée 4), s'est montré le plus actif. En plus, ce dernier a montré une très bonne sélectivité sur les HDAC de la classe I ( $IC_{50} = 8,9 \mu M$ ) par rapport à HDAC6 de la classe IIb ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ).

Une fois, la bonne longueur pour le linker connue, nous avons étudié l'impact du changement de la tête chélatante (*R*)-hydroxyl-cétone de FR235222, par la (*S*)-hydroxyl-cétone (**86f**) et éthyle cétone (**86g**) que nous retrouvons chez l'apicidine. L'évaluation de leurs activités biologiques a montré que les têtes chélatantes « céto-hydroxyle » (entrées 7 et 8) sont plus actives que la tête cétone simple **86g** (entrée 9). Nous observons également que la stéréochimie du groupement hydroxyle est importante, avec **86b** plus actif que **86f**.

La présence d'un groupement *ortho*-phényl triazole, sur le « cap » phényl amide **86e** (entrée 11), a permis d'augmenter l'activité inhibitrice sur les HDAC de la classe I tout en gardant la sélectivité par rapport à HDAC6.

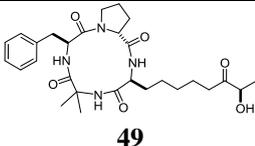
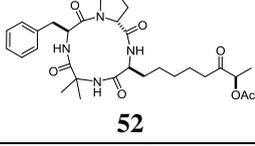
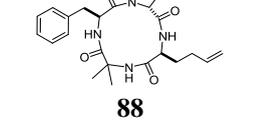
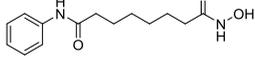
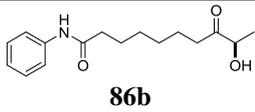
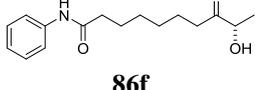
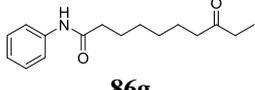
entrée	Composés	IC <sub>50</sub> HsHDAC classe I HeLa extraits Nucléaires (μM)	IC <sub>50</sub> HsHDAC1 (μM)	IC <sub>50</sub> HsHDAC3/Ncor1 (μM)	IC <sub>50</sub> HsHDAC6 (μM)
1	 <b>49</b>	0,008 ± 0,002	0,96 ± 0,60	0,33 ± 0,01	> 300
2	 <b>52</b>	0,11	0,39 ± 0,02	0,35	> 300
3	 <b>88</b>	> 300	> 300	> 300	> 300
4	 SAHA	0,099 ± 0,006	0,123 ± 0,003	0,96 ± 0,07	0,033 ± 0,004
5	 <b>86a</b>	30% inhib. at 50 μM	-	-	-
6	 <b>86c</b>	27,3 ± 5,9	-	-	-
7	 <b>86b</b>	8,9 ± 0,5	7,9 ± 0,8	50,2 ± 4,7	> 300
8	 <b>86f</b>	77,1 ± 6,4	-	-	> 300
9	 <b>86g</b>	>300	-	-	> 300
10	 <b>87b</b>	63,7 ± 5,3	-	-	> 300
11	 <b>86e</b>	0,88 ± 0,05	5,04 ± 0,07	1,97 ± 0,03	> 300

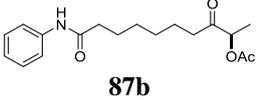
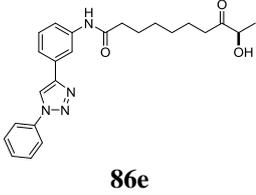
**Tableau II.I.** Tests d'inhibition d'HDAC sur extraits nucléaires et enzymes purifiées (tests réalisés en triplicata)

Par la suite, nous avons évalué l'activité antiproliférative de nos meilleures molécules sur le parasite *P. falciparum* et sur des lignées de cellules cancéreuses humaines (Tableau II.2). Les cyclotérapeptides **49** et **52** (entrées 1 et 2) ont montré de meilleures activités inhibitrices sur cellules par rapport à nos analogues simplifiés, avec respectivement des  $IC_{50}$  de 17,4 nM et 22,2 nM pour **49** et **52** sur *P. falciparum* et de l'ordre de 6 nM à 170 nM sur les lignées de cellules cancéreuses (Jurkat, K562, HeLa ou encore HEK293). Parmi les analogues simplifiés, le composé **86e** (entrée 9) est celui qui a montré la meilleure activité, aussi bien sur *P. falciparum* que sur les cellules cancéreuses humaines, ce qui est en accord avec le résultat des tests enzymatiques.

Des tests supplémentaires effectués sur des cellules saines (lymphocyte B) ont montré que le composé **86e** a une  $IC_{50} > 50 \mu M$  alors que le cyclotérapeptide **49** et SAHA restent cytotoxiques ( $IC_{50} = 0,7 \mu M$  et  $1,48 \mu M$  respectivement).

Dans les travaux effectués dans cette thèse, aucune molécule possédant une tête chélatante « céto-hydroxyle » ne s'est montrée active sur l'HDAC6 de la classe IIb.

entrée	Composés	$IC_{50}$ <i>P.</i> <i>falciparum</i> 3D7 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ Lymphoblast (Jurkat) ( $\mu M$ )	$CC_{50}$ Erythroblast K562 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ HeLa ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ HEK293 ( $\mu M$ )
1	 <b>49</b>	0,017 $\pm 0,002$	0,048 $\pm 0,001$	0,018 $\pm 0,002$	0,170 $\pm 0,010$	0,04 $\pm 0,02$
2	 <b>52</b>	0,022 $\pm 0,001$	0,127 $\pm 0,011$	0,061 $\pm 0,002$	0,119 $\pm 0,008$	0,006 $\pm 0,001$
3	 <b>88</b>	-	-	-	> 100	> 100
4	 SAHA	-	-	-	2,8 $\pm 0,5$	0,080 $\pm 0,006$
5	 <b>86b</b>	37,9 $\pm$ 3,8	92 $\pm$ 1	62,3 $\pm$ 5,8	> 50	35,6 $\pm 1,6$
6	 <b>86f</b>	$\geq 100$	-	-	-	-
7	 <b>86g</b>	83,3 $\pm$ 16,8	-	-	-	-

8	 <b>87b</b>	40,1 ± 4,3	≥ 100	≥ 100	> 50	36,3 ± 1,7
9	 <b>86e</b>	4,8 ± 1,3	2,8 ± 0,7	7,1 ± 0,9	115,1 ± 25,3	15,9 ± 1,1

**Tableau II.2.** Activités antiprolifératives sur *P. falciparum* et sur des lignées de cellules cancéreuses (tests réalisés en triplicata)

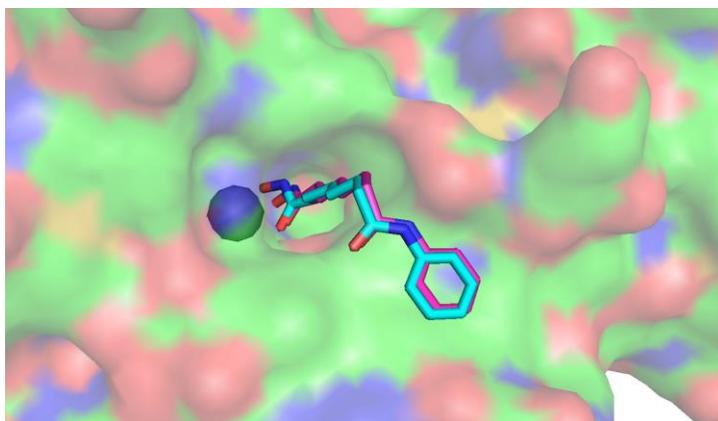
### II.3. Modélisation moléculaire

Les composés **86b** et **86e** sont nos deux meilleurs analogues HDACi qui inhibent sélectivement les HDACs de la classe I par rapport à HDAC6 de la classe IIb. Cependant, pour les études de modélisation moléculaire, nous avons choisi **86b** car il possède le « cap » le plus simple et est structuralement plus proche de SAHA. Contrairement à **86b**, SAHA inhibe aussi bien les HDAC de la classe I que HDAC6 de la classe IIb. Pour comprendre cette différence et trouver une explication à la sélectivité de la tête chélatante « céto-hydroxyle », des études de docking, suivies de dynamiques moléculaires ont été effectuées avec les ligands **86b** et SAHA sur les protéines HDAC1 (classe I) et HDAC6 (classe IIb). Nous avons utilisé une structure cristallographique de HDAC1 (PDB 4BKX), alors qu'un modèle HDAC6 a été généré par homologie de séquence en utilisant HDAC8 comme empreinte. Le modèle HDAC6 a été construit par le logiciel MOE (voir la partie expérimentale pour plus de détails) et le choix de HDAC8 comme empreinte est validé par les travaux de Jung.<sup>172</sup> En effet, même si HDAC6 présente plus de similarité avec les HDAC de la classe IIa, le site catalytique de HDAC8 (classe I) contient le résidu Tyr306 qui est très important pour l'activité désacétylase. Cette tyrosine est absente chez les HDAC de la classe IIa et est remplacée par une histidine. Par ailleurs, HDAC6 et 8 partagent souvent les mêmes inhibiteurs.

#### ➤ Docking moléculaire

Dans un premier temps, nous avons procédé à des études de docking avec le logiciel GOLD 5.2. Pour valider notre protocole de docking, nous avons réalisé un docking de SAHA dans HDAC2 afin de pouvoir le comparer avec la structure cristallographique de HDAC2 complexée avec SAHA. Le choix de HDAC2 pour cette étude de validation se justifie d'une part, par la disponibilité d'une structure cristallographique HDAC2-SAHA et d'autre part, grâce à sa très grande similarité avec HDAC1 (85% d'identité et 93% de similarité sur toute la région de la protéine). Le docking a reproduit exactement

les modes d'interactions observés expérimentalement comme le montre la superposition entre le complexe HDAC2-SAHA obtenu par docking et le complexe expérimental illustré sur la figure II.2.

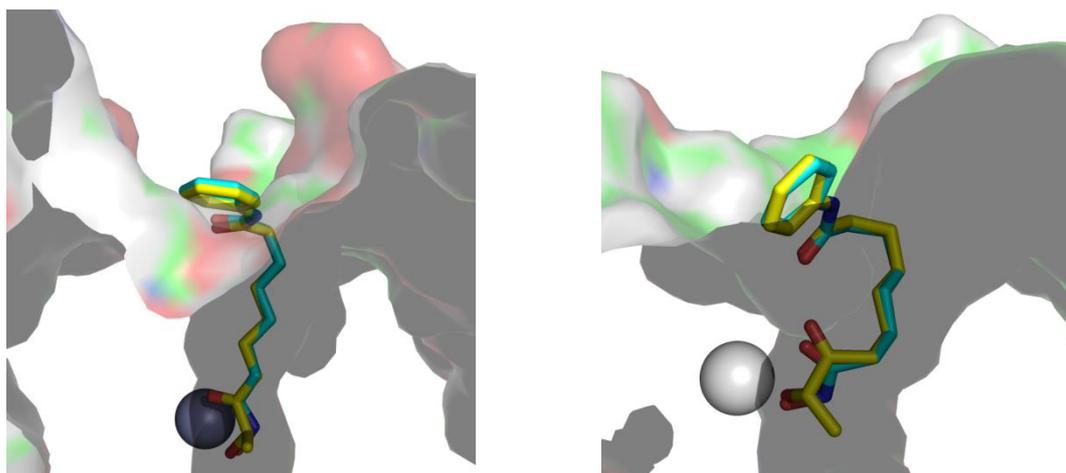


**Figure II.2.** Superposition de la position de docking (cyan) avec la position expérimentale (violet) de SAHA dans HDAC2

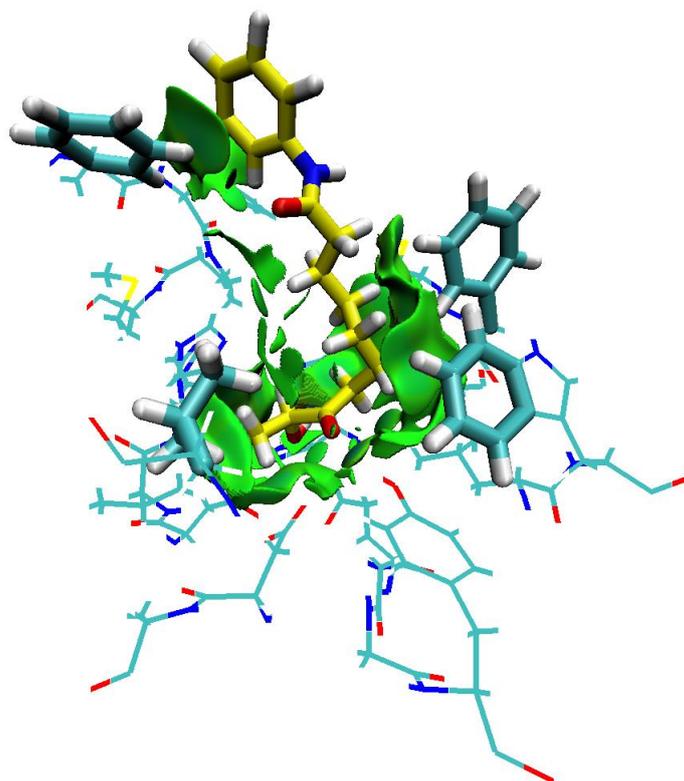
Une fois notre protocole de docking validé, et en suivant la même approche, nous avons obtenu par docking les complexes, HDAC1-**86b**, HDAC1-SAHA et HDAC6-**86b**, HDAC6-SAHA (Figure II.3). Nous retrouvons la même position pour les deux ligands dans les deux protéines. Cependant, alors qu'ils se logent parfaitement dans HDAC1 (comme HDAC2-SAHA) pour faire une **double coordination** au  $Zn^{2+}$  avec leur tête chélatante, ils pénètrent moins profondément dans HDAC6 et font une **simple coordination** au  $Zn^{2+}$  avec le groupement hydroxyle de leur tête chélatante. Ce résultat s'explique par la topologie des deux protéines. En effet, contrairement à HDAC1 qui possède une cavité étroite, HDAC6 présente une cavité catalytique très large. Ainsi, les deux ligands se logent parfaitement dans HDAC1 qui impose une position étroite au « linker aliphatique ». Au contraire dans HDAC6, la cavité étant large, le linker flexible est recourbé et semble être très mobile. Dans cette position de docking de **86b** dans HDAC6, le ligand avec son linker flexible se courbe pour interagir avec les résidus hydrophobes qui composent la poche catalytique. Afin de visualiser ces interactions, une analyse NCI (non covalent interactions) est réalisée sur le complexe HDAC6-**86b**. Cette analyse est basée sur le calcul de la densité électronique et de son gradient. Lorsqu'une interaction faible est présente, des points critiques apparaissent entre les atomes qui interagissent provoquant un changement critique du gradient de densité. Ce dernier présente alors des singularités aux zones de faible densité. La recherche de ces points dans l'espace permet de tracer des surfaces représentant les interactions non covalentes. Les bassins attractifs et répulsifs peuvent être distingués. Graphiquement, les surfaces représentées en bleu correspondent à des liaisons hydrogènes, les surfaces vertes à des interactions faibles de type Van der Waals, et les surfaces rouges à des répulsions stériques. La surface

NCI est tracée pour le complexe HDAC6-**86b** (Figure II.4). Les interactions hydrophobes entre les résidus Phe62, Phe679, Phe680, Leu749 et le linker de **86b** sont clairement illustrées.

Les différences de comportement et notamment la grande flexibilité de **86b** et SAHA dans HDAC6 par rapport à HDAC1 sont confirmées par les données recueillies suite à nos docking. En effet, nous avons analysé les clusters (qui contiennent les positions qui se ressemblent) obtenus à l'issue de chaque docking (100 positions générées pour le ligand dans une protéine fixe). Pour SAHA, nous avons observé que 45% des positions ressemblaient à la meilleure position de docking dans HDAC1 contre 30% dans HDAC6. Pour **86b**, 27% des positions appartenaient au même cluster que la meilleure position de docking dans HDAC1 contre 16% dans HDAC6. Ces données montrent d'une part, que les ligands sont plus mobiles dans HDAC6 et d'autre part, que SAHA est plus stable (dans les deux protéines) que **86b**.



**Figure II.3.** Docking de **86b** (en jaune) et SAHA (en cyan) sur HDAC1 (à gauche) et HDAC6 (à droite)

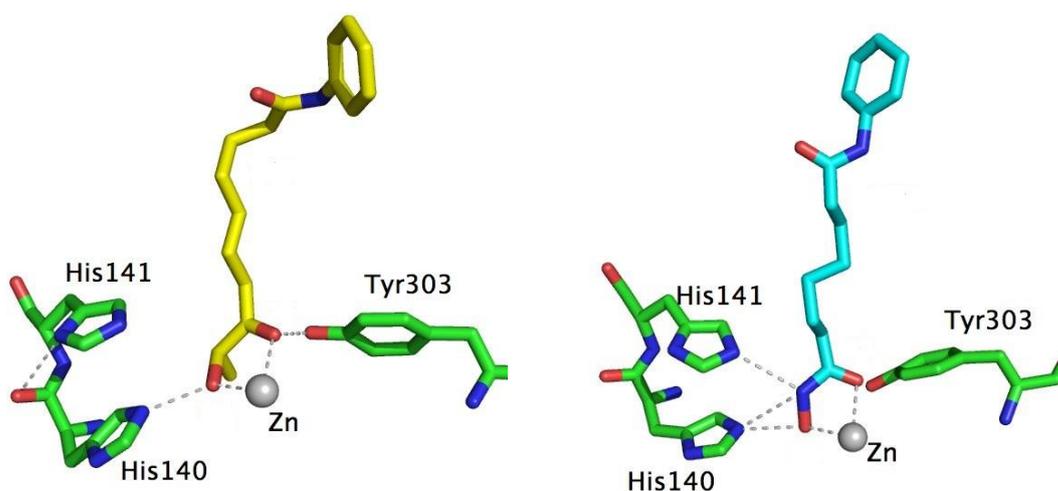


**Figure II.4.** Analyse NCI du docking de **86b** sur HDAC6. Les isosurfaces sont générées pour un gradient de densité égale à 0,4 au, et l'échelle de couleur est  $-0,07 < \rho < 0,07$  au.

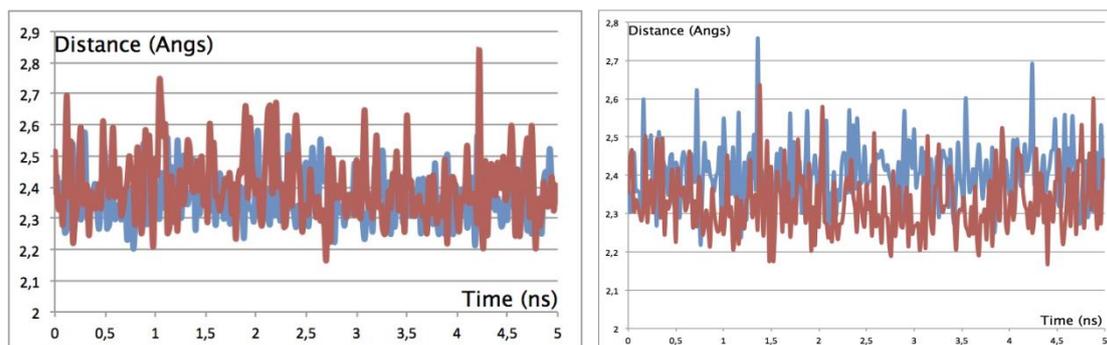
## ➤ Dynamique moléculaire

Afin de vérifier la stabilité de nos meilleures positions de docking, nous avons procédé à des simulations de dynamique moléculaire. Pendant le docking, la flexibilité de la protéine n'est pas prise en compte et seul le ligand est mobile. La dynamique moléculaire permet d'accéder à la conformation la plus stable (plus basse en énergie) à partir d'une position de docking (complexe ligand protéine obtenu par docking) en attribuant une certaine flexibilité au ligand et à la protéine. Ainsi, pour chacun de nos quatre meilleurs complexes ligand-protéine obtenu par docking, nous avons procédé à une minimisation suivie d'une dynamique de 5 ns.

**HDAC1** : Les positions obtenues pour les deux ligands après les 5 ns de simulations étaient très semblables à celles du docking. La double coordination est restée stable pour les deux ligands pendant tout le long de la simulation et seulement, des fluctuations ont été observées au niveau du groupement phényl amide « cap » à la surface à l'entrée du site catalytique (Figure II.5). Pour le ligand **86b**, le métal  $Zn^{2+}$  est distant des groupements hydroxyle et carbonyle de 2,36 Å et 2,40 Å respectivement. Nous observons des liaisons hydrogènes entre certains résidus du site catalytique et la tête chélatante « céto-hydroxyle ». His140 partage une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle et la Tyr303 avec le carbonyle de la tête chélatante. Pour le ligand SAHA (Figure II.5), nous avons en moyenne des distances de 2,40 Å et 2,32 Å respectivement entre le  $Zn^{2+}$  et les groupements hydroxyle et carbonyle de la tête chélatante « acide hydroxamique ». Par ailleurs, comme pour le ligand **86b**, nous observons les mêmes liaisons hydrogènes entre la protéine et le ligand, avec en plus pour SAHA, une liaison hydrogène entre His141 et l'atome d'azote de la tête chélatante « acide hydroxamique ». La stabilité de ces interactions (têtes chélatante et  $Zn^{2+}$ ) est représentée en fonction du temps dans la figure II.6.



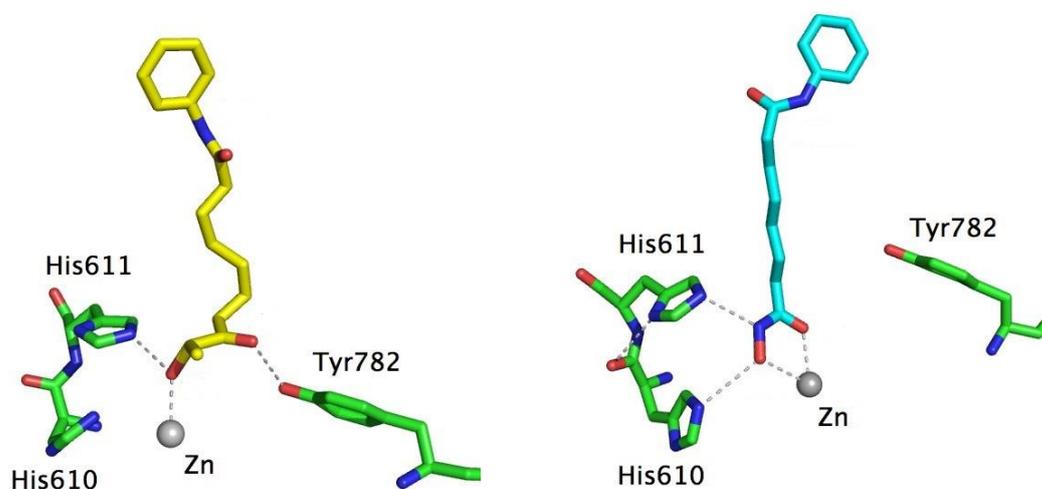
**Figure II.5.** Dynamique moléculaire de **86b** (en jaune à gauche) et SAHA (en cyan à droite) sur HDAC1. Structures après 5 ns de dynamique



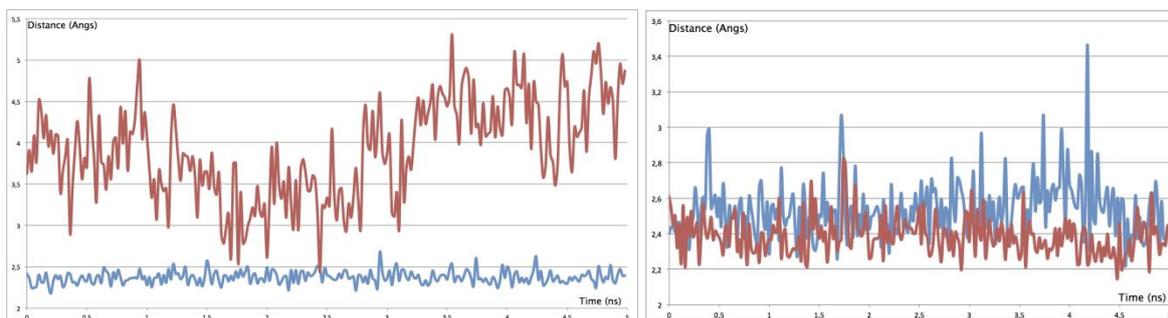
**Figure II.6.** Distance entre le  $Zn^{2+}$  (HDAC1) et les atomes d'oxygène de l'hydroxyle (en bleue) et du carbonyle (en rouge) en fonction du temps. **86b** à gauche et SAHA à droite

**HDAC6 :** Les simulations effectuées sur HDAC6 ont montré des modes de coordination différents entre les ligands **86b** et SAHA (Figure II.7). Avec le ligand **86b**, comme pour le docking, la simple coordination reste stable après les 5 ns de simulation. Dans ce mode de liaison, pendant que le groupement hydroxyle de **86b** interagit avec le métal  $Zn^{2+}$  (distance 2,37 Å) et partage une liaison hydrogène avec His611, le groupement carbonyle est très éloigné du métal (distance 3,91 Å) et fait une liaison hydrogène avec le résidu Tyr782. La stabilité de ces interactions (tête chélatante et  $Zn^{2+}$ ) est représentée en fonction du temps dans la figure II.8 (à gauche).

Pour SAHA, nous avons observé un passage de la simple coordination (position de docking) de la tête chélatante, à la double coordination qui est restée stable pendant toute la simulation de dynamique. Dans ce nouveau mode de coordination, les groupements hydroxyle et carbonyle sont tous les deux liés au  $Zn^{2+}$  avec une distance de 2,51 Å et 2,44 Å respectivement. Nous observons également des liaisons hydrogène entre la tête chélatante « acide hydroxamique » et les résidus His610 et His611 du site catalytique.



**Figure II.7.** Dynamique moléculaire de **86b** (en jaune à gauche) et SAHA (en cyan à droite) sur HDAC6. Structures après 5 ns de dynamique



**Figure II.8.** Distance entre le  $Zn^{2+}$  (HDAC6) et les atomes d'oxygène de l'hydroxyle (en bleue) et du carbonyle (en rouge) en fonction du temps. **86b** à gauche et SAHA à droite

Cette différence dans le mode de coordination, entre **86b** (simple) et SAHA (double) reflète la force de chélation de leur tête chélatante et explique pourquoi le composé **86b** n'est pas biologiquement actif sur HDAC6 contrairement à SAHA. Dans les études de simulation, cette force est représentée par la charge qui se trouve sur chaque atome. Dans notre cas, ces charges ont été assignées par l'approche RESP (voir partie expérimentale pour plus de détails). La charge sur l'atome d'oxygène du groupement carbonyle est de -0,53 électrons pour **86b** et -0,63 électrons pour SAHA. Ainsi, la forte interaction électrostatique entre le carbonyle de SAHA et le  $Zn^{2+}$  de HDAC6 semble être la force motrice de cette double coordination. Au contraire, pour le ligand **86b** la charge sur le carbonyle semble insuffisante pour générer cette double coordination.

Ainsi, les différents modes de coordination du ligand **86b** sur HDAC1 (double coordination) et HDAC6 (simple coordination) expliqueraient pourquoi la tête chélatante « céto-hydroxyle » est sélective sur HDAC1 par rapport à HDAC6.

### III. Conclusion

La raison de la sélectivité d'un HDACi entre les différents isoformes HDAC est très souvent difficile à rationaliser. En partant d'un HDACi cyclotérapeptidique possédant une tête chélatante « céto-hydroxyle », nous avons synthétisé des analogues simplifiés sans la partie cyclotérapeptidique, puis évalué leurs activités biologiques. De ces études, deux de nos nouveaux analogues simplifiés **86b** et **86e** ont montré des activités de l'ordre du micromolaire et une sélectivité sur les HDAC de la classe I en tests enzymatiques. Ces résultats ont confirmé notre hypothèse selon laquelle, la sélectivité du produit naturel FR235222 viendrait de sa tête chélatante « céto-hydroxyle ». Pour expliquer cette sélectivité de la tête chélatante, des études de modélisation moléculaire ont été effectuées avec **86b** et

SAHA sur HDAC1 de la classe I et HDAC6 de classe IIb. Pour les deux ligands, nous avons retrouvé une **double coordination** de la tête chélatante avec l'atome de zinc situé au fond de la cavité étroite de HDAC1. Par contre, HDAC6 ayant une cavité plus large, le ligand suit la courbure de la cavité en faisant des interactions hydrophobes avec son linker flexible, qui n'est plus suffisamment long pour aller chercher la double coordination et il en résulte une **simple coordination**. Dans le cas de SAHA, la tête chélatante « acide hydroxamique » est assez forte pour rompre ces interactions hydrophobes et aller chercher la double coordination. Cette force de chélation de la tête « acide hydroxamique » explique pourquoi SAHA est actif sur toutes les classes d'HDAC. Dans le cas du composé **86b**, la tête chélatante « céto-hydroxyle » n'est pas assez forte pour rompre ces interactions hydrophobes et la simple coordination reste stable sur HDAC6. Cette simple coordination, qui découle de la faiblesse de la tête chélatante et de la flexibilité du linker, explique la sélectivité de **86b** et donc de la tête « céto-hydroxyle » sur les HDAC de la classe I par rapport à HDAC6 de la classe IIb.

A travers le composé **86e**, ces travaux montrent aussi qu'il est possible d'apporter des modifications sur la partie « cap » pour aller chercher des interactions supplémentaires (spécifiques) à la surface de la protéine, sans que le ligand ne perde sa sélectivité sur les HDAC de la classe I. C'est sur cet aspect que nous avons par la suite cherché à travailler pour optimiser la sélectivité du produit naturel FR235222 entre l'homme et les parasites apicomplexes.

## **Partie D**

Optimisation de la sélectivité du produit  
naturel FR235222 sur les parasites  
apicomplexes

## I. Introduction

Après avoir confirmé par des études de marquage fluorescent la cible du produit naturel FR235222 chez l'homme, et mis en évidence le rôle de chacune des trois régions (cap, linker et ZBG) dans ses activités biologiques (activités inhibitrices et sélectivité), nous nous intéressons dans cette dernière partie, à la sélectivité entre espèces. Les travaux effectués sur FR235222 montrent que ce dernier inhibe l'activité des HDAC de la classe I chez l'homme (*HsHDAC*), mais aussi des HDAC *apicomplexes*. Il s'agit donc ici, d'optimiser la sélectivité de ce produit naturel sur le parasite *T. gondii* chez dont la cible a été identifiée comme étant HDAC3 (*TgHDAC3*). Les parasites *apicomplexes* possédant deux acides aminés supplémentaires (Alanine92 et Thréonine93) à la surface de l'entrée du site catalytique, notre principe est de moduler le cyclotérapeptide du produit naturel afin d'obtenir des interactions favorables avec cette région de la protéine (notamment avec la T93 donneur de liaison hydrogène). Ces nouvelles interactions devront être défavorables chez l'homme pour obtenir une sélectivité sur le parasite. Dans cette quête de sélectivité entre espèces, il est nécessaire de garder la tête chélatante « céto-hydroxyle » du produit naturel, car au lieu de chercher une sélectivité entre les 11 HDAC humaines et le parasite, elle nous place directement dans la classe I humaine et réduit ainsi le problème de sélectivité entre les HDAC de la classe I humaine et le parasite. En plus de cette remarque qui résulte de nos travaux effectués dans les parties précédentes (B et C), nous savons qu'il est possible d'apporter des modifications sur la région « cap » du ligand sans que ce dernier ne devienne actif sur les autres *HsHDAC*.

Dans cette optique, nous avons construit dans un premier temps un modèle *TgHDAC3* par homologie de séquence. Des études de simulation ont été faites pour valider ce modèle *TgHDAC3*, mais aussi pour comprendre comment interagit le cyclotérapeptide avec la surface de la protéine à l'entrée du site catalytique. Une fois le modèle validé, nous avons fait des études de prédiction (principalement du docking) pour dégager un type de molécule potentiellement sélectif sur le parasite.

## II. Construction et validation du modèle *TgHDAC3*

### II.1. Construction du modèle *TgHDAC3*

*TgHDAC3* n'ayant pas été cristallisé, nous avons construit un modèle par homologie de séquence avec le logiciel MOE. Dans la première étape qui concerne le choix de l'empreinte, l'algorithme BLAST nous a fourni deux protéines, *HsHDAC1* et *HsHDAC3*, qui peuvent potentiellement servir d'empreinte pour la construction de notre modèle. En effet, le pourcentage d'identité avec la séquence cible (*TgHDAC3*) étant supérieur à 30% pour chacune de ces deux protéines, avec respectivement 65% et 59% d'identité pour *HsHDAC1* et *HsHDAC3*, il est possible d'obtenir un modèle fiable en utilisant l'une ou l'autre comme empreinte. Nous avons construit deux modèles *TgHDAC3* à partir de chacune des deux empreintes (un modèle par empreinte). La superposition des deux modèles (*TgHDAC3*) n'ayant montré aucune différence réelle, ni au niveau du site catalytique, ni sur le reste de la protéine, nous avons choisi le modèle obtenu à partir de *HsHDAC1* pour les études de simulation car ce dernier présente théoriquement plus de similarité avec *TgHDAC3*. Afin d'affiner la structure de notre modèle final et d'accéder à une conformation stable en solution, nous avons fait une minimisation suivie d'une dynamique de 5 ns avec AMBER.

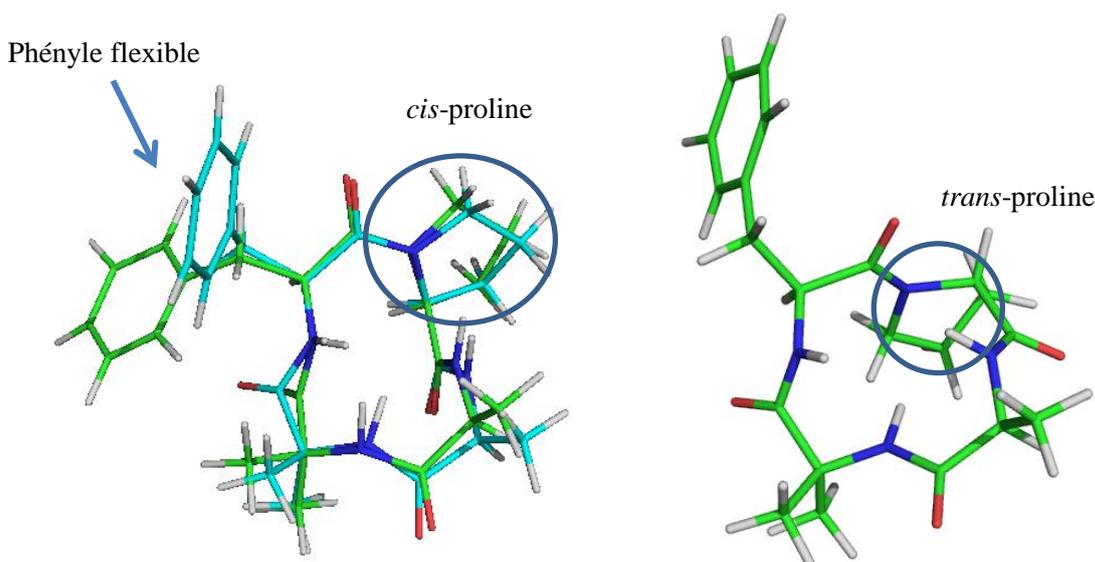
### II.2. Validation du modèle *TgHDAC3*

Pour valider notre modèle (*TgHDAC3*) et mieux comprendre la relation structure-activité, des études de docking et de dynamique moléculaire ont été réalisées avec les composés (ligands) **49**, **50** et **51**, des analogues de FR235222 tirés des études antérieures du laboratoire et qui ont montré une activité inhibitrice de l'ordre du nanomolaire sur *T. gondii*.<sup>143</sup> La convergence entre les données expérimentales et théoriques nous donnera une idée sur la fiabilité de notre modèle. En effet, à défaut de disposer de l'enzyme *TgHDAC3* purifiée, nous nous appuyons sur des données cellulaires pour obtenir une tendance sur l'activité de *TgHDAC3*. Une première étape associant des études de docking à des dynamiques moléculaires nous a permis de générer des structures réalistes pour différents complexes ligand/protéine (*TgHDAC3*). Les docking ont été réalisés avec le logiciel Autodock, les dynamiques avec Amber, et l'interaction avec le zinc a été décrite *via* un champs de force non lié.

#### ➤ **Construction des ligands**

Les ligands ont été construits et leur géométrie a été optimisée en mécanique quantique avec le logiciel GAUSSIAN09 au niveau B3LYP/6-31+G. En solution, les ligands cyclopeptides peuvent adopter plusieurs conformations en l'absence de leur récepteur. Malgré le nombre important d'analogues HDACi cyclotérapeptidiques rapportés dans la littérature, la conformation bioactive du

cyclotétrapeptide n'est toujours pas connue. Des travaux ont montré que l'apicidine peut adopter plusieurs conformations dans le DMSO, parmi lesquelles on retrouve 80% de *t-t-t-t* et 15% de *c-t-t-t* (la conformation *cis* pour la pipéridine).<sup>173</sup> Récemment Ghadiri et son équipe ont montré que la conformation bioactive de l'apicidine serait la *c-t-t-t*.<sup>174</sup> En remplaçant la pipéridine de l'apicidine par le triazole 1,5-disubstitué (*c-t-t-t*) ou 1,4-disubstitué (*t-t-t-t*), la conformation *c-t-t-t* a montré la meilleure activité inhibitrice sur *HsHDAC1* et *HsHDAC3* et le plus proche de celle du produit naturel apicidine. Ainsi, en référence à ces travaux, nous avons choisi la conformation *c-t-t-t* (la conformation *cis* pour la proline) pour notre cyclotétrapeptide (Figure II.1).

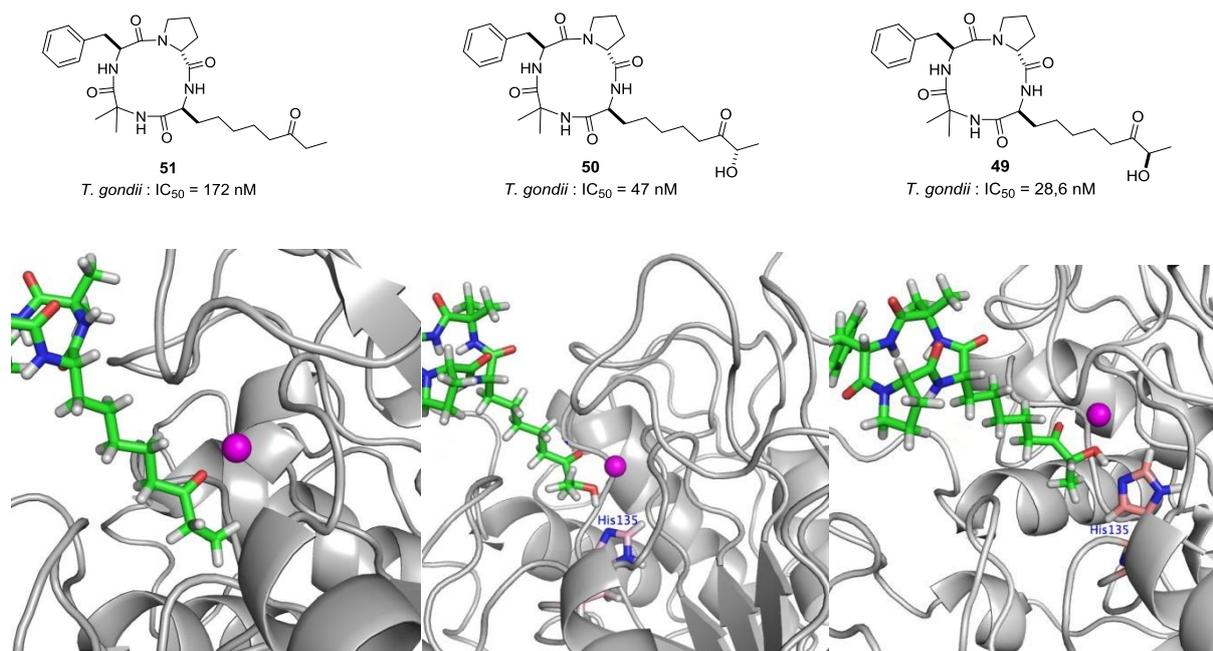


**Figure II.1.** Conformations *c-t-t-t* (à gauche) et *t-t-t-t* (à droite) du cyclotétrapeptide dérivé de FR235222.

### ➤ Docking et dynamiques moléculaires

Lors des études de docking, nous avons observé, que le cyclotétrapeptide n'adopte pas une position fixe à l'entrée du site catalytique. Ainsi, afin de pouvoir faire une étude comparative entre les différents ligands, nous sommes partis de la même position du cyclotétrapeptide pour chaque ligand. Pour cela, le docking du ligand **49** sur *TgHDAC3*, suivi d'une dynamique moléculaire de 2 ns a permis d'obtenir un complexe ligand**49**-*TgHDAC3* (Figure II.2). En partant de ce dernier, nous avons modifié à chaque fois la tête chélatante du ligand **49** pour obtenir les ligands **50** et **51** et, après une nouvelle dynamique moléculaire, nous avons obtenu les complexes ligand**50**-*TgHDAC3* et ligand**51**-*TgHDAC3*. L'analyse de ces structures montre que le ligand **51**, qui ne possède qu'une fonction cétone comme tête chélatante, fait une simple coordination avec le zinc du site catalytique. Cette simple coordination, expliquerait la faible activité de **51** ( $IC_{50} = 172$  nM) par rapport aux deux autres ligands **49** et **50** ( $IC_{50} = 28$  nM et 47 nM respectivement) qui font une double coordination avec leur tête chélatante « céto-hydroxyle ». En plus des interactions avec le zinc, on retrouve une liaison

hydrogène entre le résidu His135 et le groupement hydroxyle de **49** et **50**. Cependant, la meilleure activité de **49** par rapport à **50** pourrait être liée à la présence d'une interaction de van der Waals supplémentaire en faveur du **49**. Cette interaction se situe au niveau de la tête chélatante de **49** dont le méthyle pointe vers un résidu du site catalytique. A cause de la différence de stéréochimie, cette interaction n'est pas observée avec **50**.



**Figure II.2.** Complexes ligand/*TgHDAC3* obtenu par docking et dynamiques moléculaires

### ➤ Evaluation des énergies libres d'interactions par calcul MM-PBSA

Pour quantifier ces interactions, nous avons évalué l'énergie libre d'interaction pour chaque complexe ligand-*TgHDAC3* par des calculs MM-PBSA dont le principe est décrit dans le chapitre I (Tableau II.1). Nos systèmes étant de même taille, le terme entropie a été négligé dans ces calculs. En classant les trois ligands en fonction de leur énergie libre d'interaction, nous retrouvons l'ordre expérimental. La décomposition des termes énergétiques montre que la différence entre les ligands se situe principalement au niveau des interactions électrostatiques et de van der Waals. Les autres termes sont relativement équivalents étant donné que nos ligands sont de même taille, ce qui justifie aussi l'absence du terme entropie. Comme le laissait suggérer le résultat des simulations de dynamiques moléculaires, la différence entre **49** et **50** se situe au niveau des énergies d'interactions de van der Waals, qui penchent légèrement en faveur du **49**.

La convergence de nos données théoriques avec les données expérimentales nous donne ainsi une idée sur la fiabilité de notre modèle *TgHDAC3* pour les études de simulations.

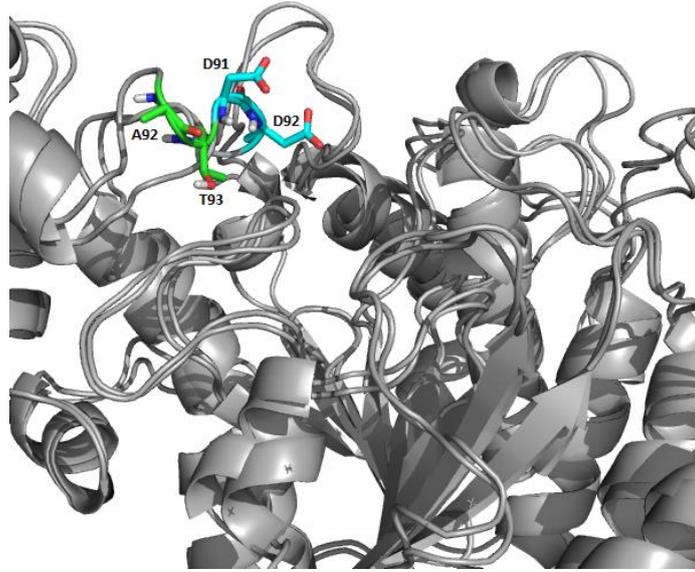
	<b>51</b>	<b>50</b>	<b>49</b>
$\Delta E_{\text{ele}}$	$-39,9 \pm 4,1$	$-76,35 \pm 7,48$	$-75,71 \pm 5,16$
$\Delta E_{\text{vdw}}$	$-39,48 \pm 4,00$	$-28,92 \pm 3,93$	$-31,34 \pm 3,47$
$\Delta E_{\text{MM}}$	$-79,38 \pm 5,61$	$-105,27 \pm 5,46$	$-107,06 \pm 5,64$
$\Delta E_{\text{PB}}$	$79,79 \pm 6,31$	$97,42 \pm 6,77$	$97,30 \pm 7,10$
$\Delta E_{\text{SA}}$	$-4,44 \pm 0,21$	$-3,48 \pm 0,24$	$-3,73 \pm 0,19$
$\Delta E_{\text{sol}}$	$75,35 \pm 6,22$	$93,94 \pm 6,79$	$93,57 \pm 7,01$
$\Delta G_{\text{calc}}$ en kcal/mol	<b><math>-4,03 \pm 4,54</math></b>	<b><math>-11,33 \pm 3,58</math></b>	<b><math>-13,49 \pm 3,86</math></b>
<i>T. gondii</i> (IC <sub>50</sub> )	<b>172 nM</b>	<b>47 nM</b>	<b>28 nM</b>

Tableau II.1. Energie interne d'interaction des ligands sur TgHDAC3

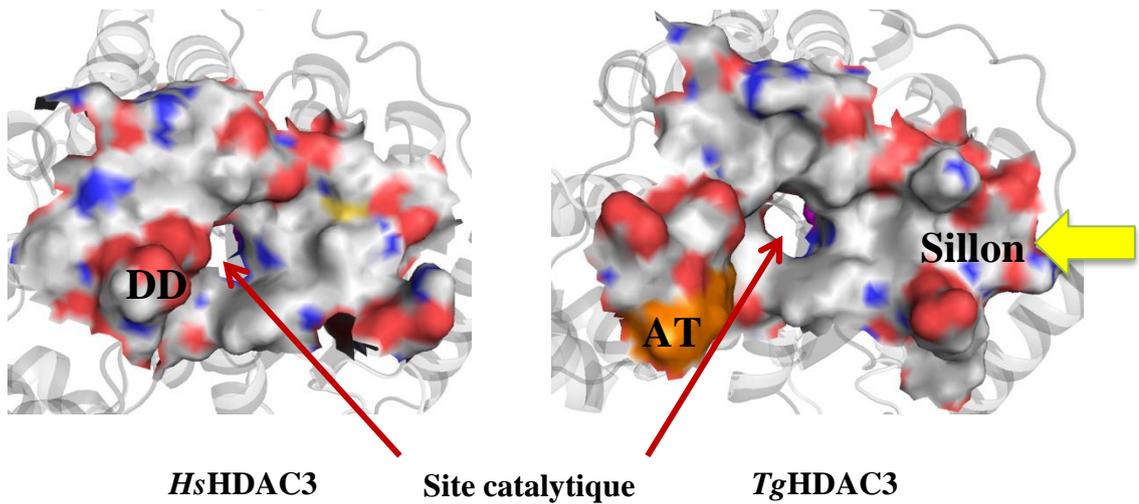
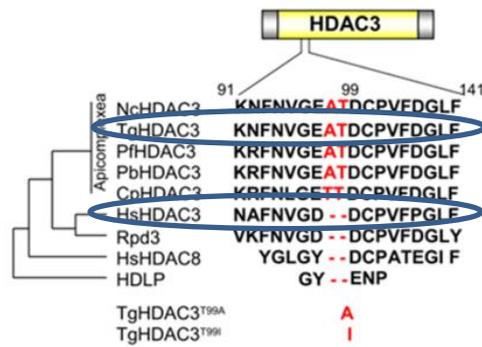
### III. Etudes de prédictions *in silico* : optimisation de la sélectivité de FR235222 sur TgHDAC3

#### III.1. Analyse comparative de TgHDAC3 avec HsHDAC3

Pour aller à la recherche d'une sélectivité entre deux espèces, il est nécessaire de faire une étude comparative afin d'identifier les zones de similitudes et de différences sur lesquelles il est possible de jouer pour obtenir une sélectivité. Compte tenu du pourcentage de similarité et d'identité entre ces deux protéines, aucune différence majeure n'a été observée à l'intérieur du site catalytique. Hakimi et son équipe ont montré que les apicomplexes (*TgHDAC3*) possèdent deux acides aminés supplémentaires à l'entrée de leur site catalytique par rapport aux HDAC humaines (*HsHDAC3*). L'analyse de notre modèle *TgHDAC3* et la superposition avec *HsHDAC3* montre que la présence de ces acides aminés génère une zone de protubérance (boucle) et perturbe la distribution des atomes à la surface de l'entrée du site catalytique (Figure III.1). Dans la région correspondante aux deux acides aminés **A92** et **T93** du parasite, nous retrouvons chez l'homme deux acides aspartiques **D90** et **D91**. Ces deux régions ayant des propriétés différentes, avec notamment la **T93** donneur d'hydrogène chez le parasite et les **D** accepteurs d'hydrogène chez l'homme, nous pouvons envisager de moduler le cyclotérapeptide du ligand afin d'obtenir une sélectivité entre ces deux espèces. Parmi les différences majeures, on observe également la présence d'un sillon sur les deux protéines qui est plus prononcé sur le parasite.



Superposition de *TgHDAC3* (AT en vert) avec *HsHDAC3* (DD en cyan)



**Figure III.1.** Analyse structurale et comparaison de *TgHDAC3* avec *HsHDAC3*

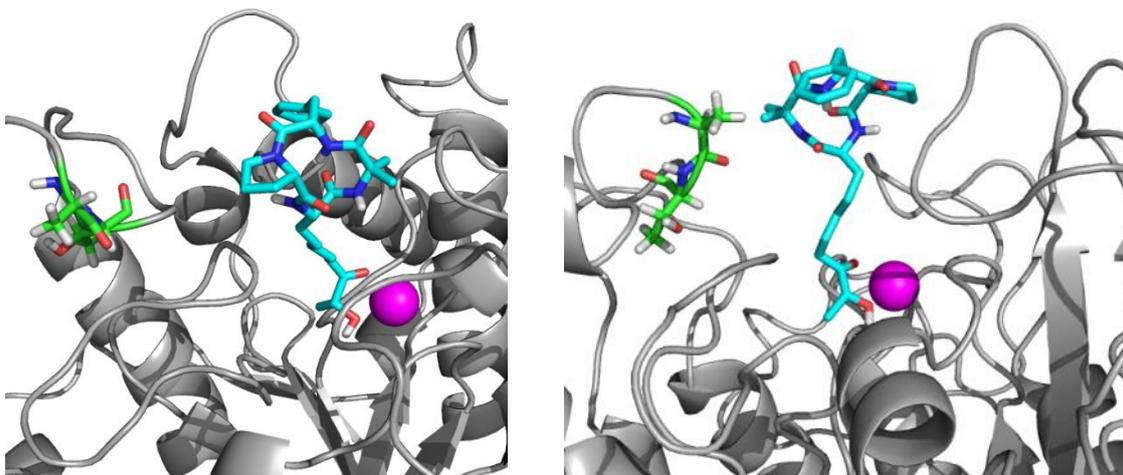
## III.2. Etudes de prédiction

Bien que, l'analyse comparative des deux protéines et les travaux effectués dans les parties précédentes (B et C) montrent que le cyclotérapeptide est la région idéale à moduler pour obtenir une sélectivité sur le parasite, des études de docking sont nécessaires pour obtenir une idée précise des modifications à apporter sur le cyclotérapeptide, mais aussi de la position de ces modifications pour obtenir des interactions favorables sur le parasite (*TgHDAC3*) et défavorables sur l'humain (*HsHDAC3*).

Le but étant de dégager rapidement des caractéristiques essentielles pour obtenir cette sélectivité, toutes les études de docking ont été faites avec GOLD. Chaque docking a été refait trois fois pour vérifier la stabilité de la meilleure solution proposée par le logiciel.

### ➤ Docking du composé 49 sur *TgHDAC3*

Un premier docking a été effectué avec le composé **49** pour essayer de comprendre le comportement du cyclotérapeptide à la surface de l'entrée du site catalytique. Comme pour le docking effectué avec AUTODOCK dans la validation du modèle *TgHDAC3*, nous avons observé que les interactions du cyclotérapeptide avec les résidus à l'entrée du site catalytique ne sont pas spécifiques (Figure III.2). Cependant, deux positions préférentielles ont été observées pour le cyclotérapeptide. Dans l'une (à gauche), c'est la proline qui est proche de la zone **AT** alors que dans l'autre (à droite), le cyclotérapeptide tourne de 180° et présente plutôt sa valine du côté de la zone **AT**. Après plusieurs docking effectués avec le même ligand sur *TgHDAC3*, ces deux positions reviennent fréquemment comme meilleures solutions de docking et aucune ne semble être préférentielle par rapport à l'autre. La stabilité de ces positions a été vérifiée par des simulations de dynamique moléculaire.



**Figure III.2.** Complexes ligand **49** - *TgHDAC3* issues de docking suivie de dynamique moléculaire

Pour cibler une région précise de la protéine, il est donc nécessaire de figer la position du cyclotétrapeptide et d'identifier l'acide aminé le plus proche de la zone **AT**, qui pourra être modifié pour obtenir des interactions favorables avec *TgHDAC3*. Pour ce faire, nous avons envisagé d'exploiter le sillon présent à l'entrée du site catalytique et qui se trouve à l'opposé de la zone **AT**. Lorsque la proline du cyclotétrapeptide se trouve du côté du sillon, la valine est du côté de la zone **AT** et inversement. Ainsi, le principe consiste à mettre un groupement volumineux sur l'un de ces acides aminés pour figer le cyclotétrapeptide et modifier l'autre pour obtenir les interactions favorables avec la protéine. Lors de nos travaux effectués dans la partie B de ce chapitre sur l'analogue fluorescent de FR235222, nous avons développé une stratégie de synthèse permettant de greffer facilement une sonde fluorescente sur la position valine par une réaction d'Huisgen. En référence à cette stratégie de synthèse déjà mise au point, nous avons choisi de mettre le groupement volumineux sur la position valine du cyclotétrapeptide.

➤ **Docking du composé 57 sur *TgHDAC3* :** Exploitation du sillon présent à la surface de la protéine

Le composé **57** répondant aux critères dégagés précédemment, nous avons fait des docking sur *TgHDAC3* pour vérifier notre hypothèse (Figure III.3). Ces simulations ont montré que lorsque le ligand rentre bien dans le site catalytique et chélate le zinc avec sa tête « céto-hydroxyle », le groupement encombrant coumarine se place dans le sillon et une seule position est observée pour le cyclotétrapeptide (à gauche). Dans cette position, c'est la proline qui se trouve du côté de la zone **AT**. Mais cette dernière étant très éloignée (environ 10 Å) des acides aminés **AT** de *TgHDAC3*, nous avons envisagé d'échanger sa position dans le cyclotétrapeptide avec la phénylalanine. D'autre part, une des solutions qui revenait la plus souvent lors des docking est

celle où la coumarine se loge dans le site catalytique et interagit avec le zinc grâce à son groupement carbonyle (à droite). Pour pallier à ce problème, la coumarine pourrait être remplacée par un autre groupement encombrant apolaire.

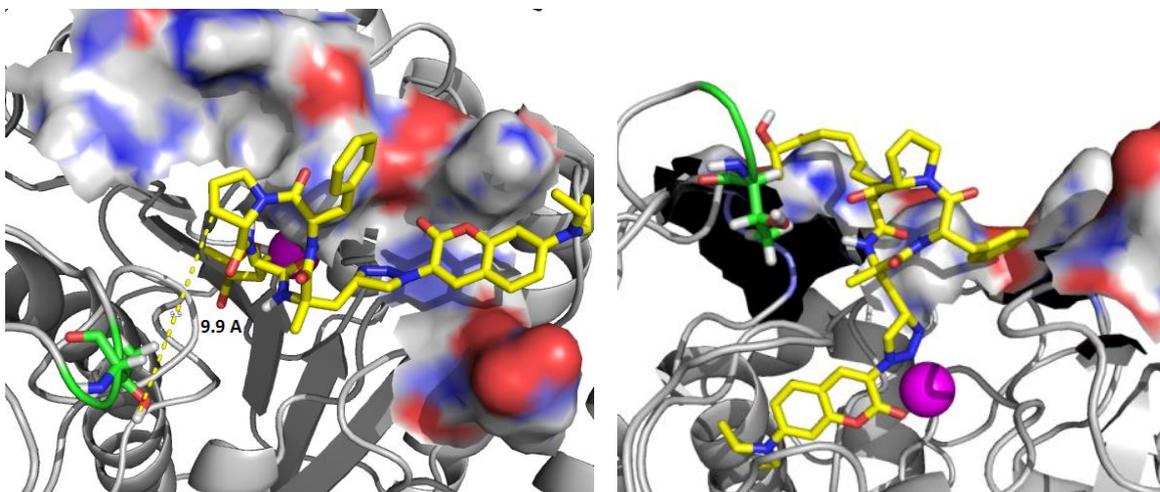
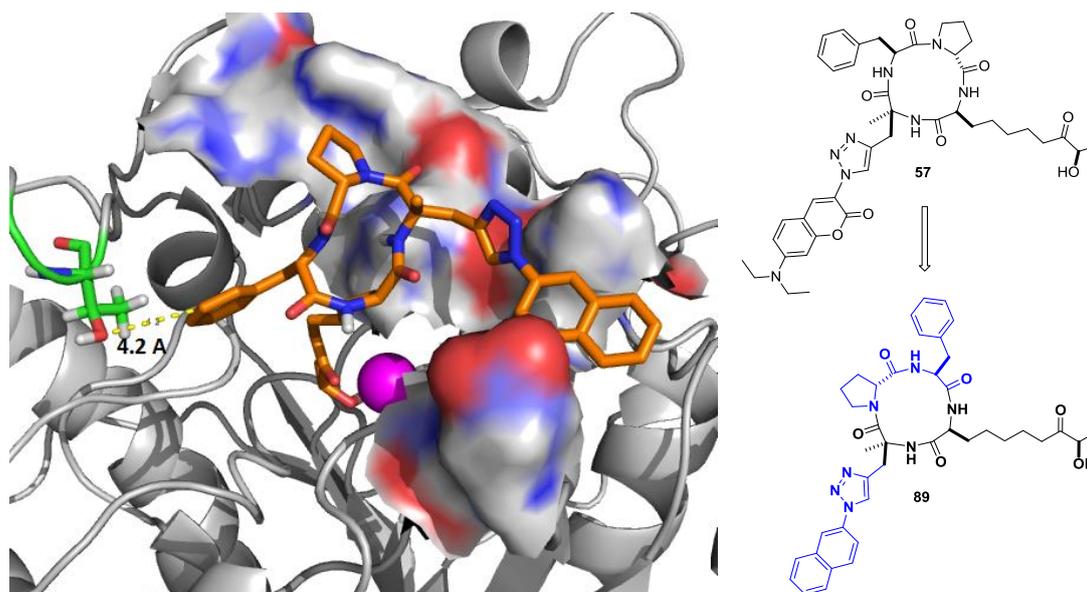


Figure III.3. Docking du composé fluorescent **57** sur *TgHDAC3*

➤ **Docking du composé **89** sur *TgHDAC3* :**

Suite aux observations précédentes, un nouveau ligand (composé **89**) a été construit en échangeant la position de la proline avec la phénylalanine et en remplaçant la coumarine par un naphthalène (Figure III.4). Le docking de ce ligand sur *TgHDAC3* a conduit aux résultats escomptés. En effet, le naphthalène se loge dans le sillon et bloque le cyclotérapeptide. Cette fois, nous retrouvons la phénylalanine du côté de la zone **AT** et proche de l'acide aminé **T93** (en vert) de *TgHDAC3*. Cette position de docking est très stable et revient comme meilleure solution à la suite de plusieurs docking.

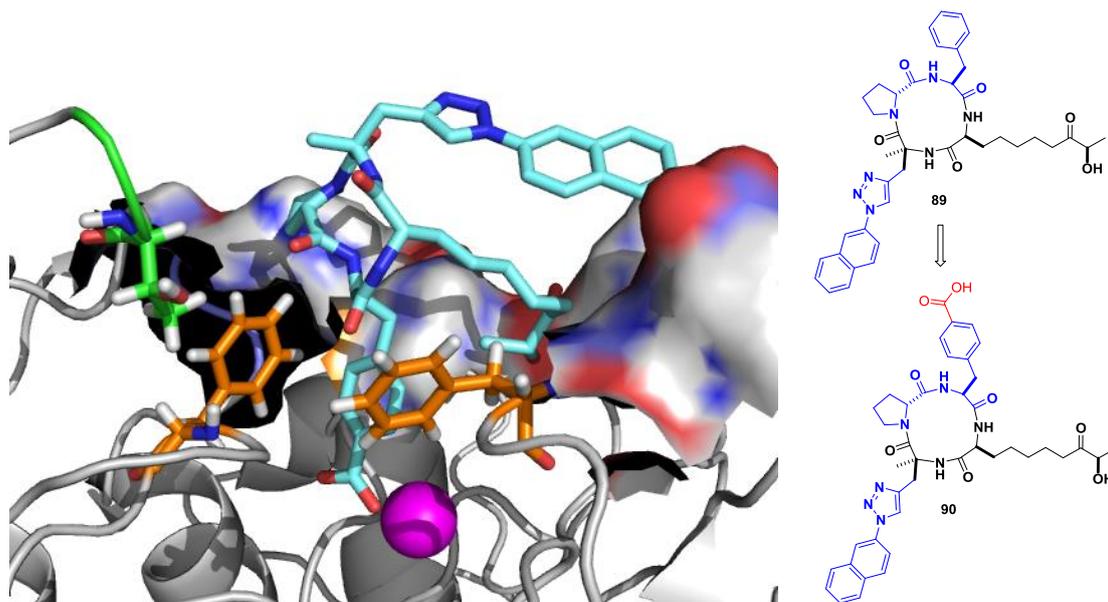


**Figure III.4.** Docking du composé **89** sur *TgHDAC3*

Maintenant que nous avons figé le cyclotérapeptide avec la phénylalanine proche de la zone **AT**, le principe est de mettre un accepteur d'hydrogène sur cette dernière afin d'obtenir une interaction favorable avec la **T93** donneur d'hydrogène de *TgHDAC3*, mais défavorable avec le **D91/D92** accepteur d'hydrogène de *HsHDAC3*. Cette stratégie est basée sur le fait que les interactions accepteur – donneur sont favorables alors que les interactions accepteur – accepteur sont répulsives, donc défavorables. Pour choisir le groupement accepteur à mettre sur la phénylalanine, nous avons utilisé le module SEESAR de Hermès. Ce module met en évidence les interactions entre un ligand et une protéine et permet de modifier manuellement le ligand pour aller chercher une interaction bien précise avec la protéine. Ainsi, en partant du composé **89**, nous avons rajouté un groupement carboxylate sur la phénylalanine afin d'obtenir une liaison hydrogène avec la **T93** de *TgHDAC3*. Ce nouveau ligand **90** (Figure III.5) généré avec SEESAR a ensuite fait l'objet d'un docking sur *TgHDAC3* pour vérifier la stabilité de la liaison hydrogène.

#### ➤ Docking du composé **90** sur *TgHDAC3*

Contrairement au résultat attendu, la meilleure solution (le plus haut score) proposée par ce docking, présente le groupement carboxylate dans le site catalytique (Figure III.5). Bien que, la tête « céto-hydroxyle » ait une force de chélation plus grande et peut conduire à une double coordination, c'est le groupement carboxylate qui se positionne dans le site catalytique pour faire une simple coordination avec le zinc. Ce résultat s'expliquerait par le fait que, le phényle qui porte le carboxylate est stabilisé par des interactions  $\pi$ -stacking avec deux résidus phénylalanines (F145 et F200 en orange) qui composent la poche catalytique. Contrairement au linker flexible qui porte la tête « céto-hydroxyle », le phényle apporte une certaine rigidité au ligand et pénètre plus facilement dans le site catalytique.

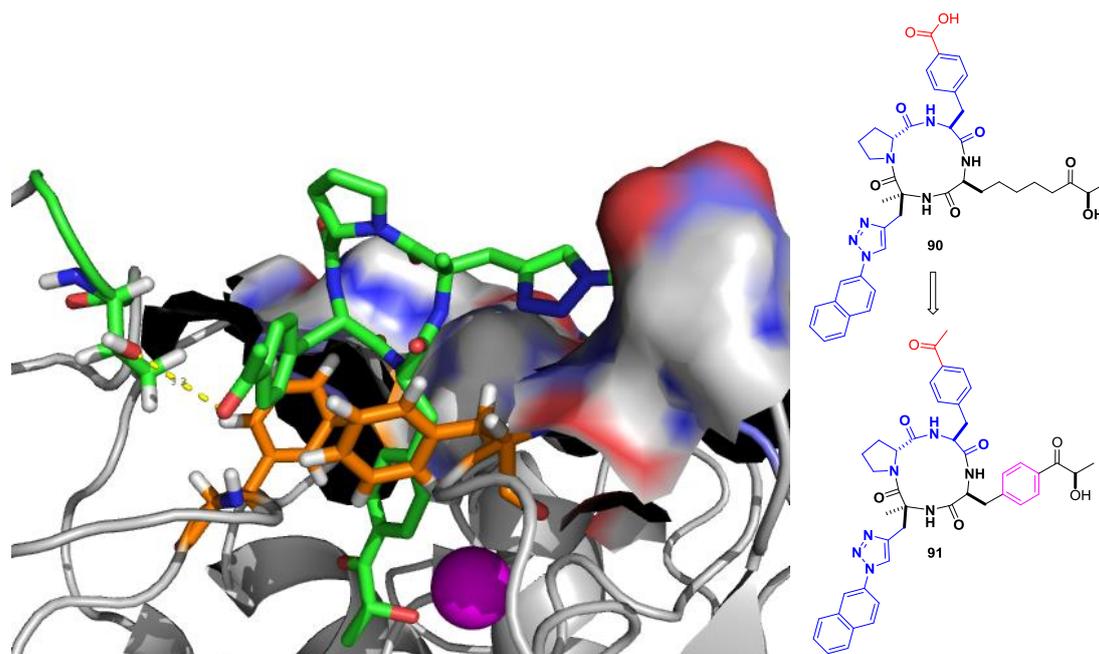


**Figure III.5.** Docking du composé **90** sur *TgHDAC3*

Ces observations montrent qu'à chaque fois que nous mettrons un accepteur d'hydrogène sur ce phényle du cyclotétrapeptide, au lieu de faire une liaison hydrogène avec la **T93** de *TgHDAC3*, celui-ci va plutôt chercher la coordination avec le zinc. Pour résoudre ce problème, nous avons envisagé d'apporter plus de rigidité à notre linker flexible qui porte la tête « céto-hydroxyle », en le remplaçant par un cycle aromatique. Ainsi, nous pourront mettre n'importe quel accepteur sur la phénylalanine du cyclotétrapeptide, du moment que la tête « céto-hydroxyle » possède un pouvoir de chélation plus fort, c'est elle qui ira chercher la coordination avec le zinc.

#### ➤ Docking du composé **91** sur *TgHDAC3*

En tenant compte de ces observations, de nouveaux ligands présentant différents accepteurs ont été construits avant de faire l'objet d'un docking sur *TgHDAC3*. Le composé **91**, qui présente un acétyle comme accepteur d'hydrogène sur la phénylalanine est celui qui a montré le meilleur docking (Figure III.6). En effet, la position qui correspond à la tête « céto-hydroxyle » doublement coordonnée au zinc dans la poche catalytique, au naphthalène positionné dans le sillon et enfin à la cétone faisant une liaison hydrogène avec la **T93** de *TgHDAC3* est toujours sortie comme meilleure solution à l'issue de plusieurs docking.

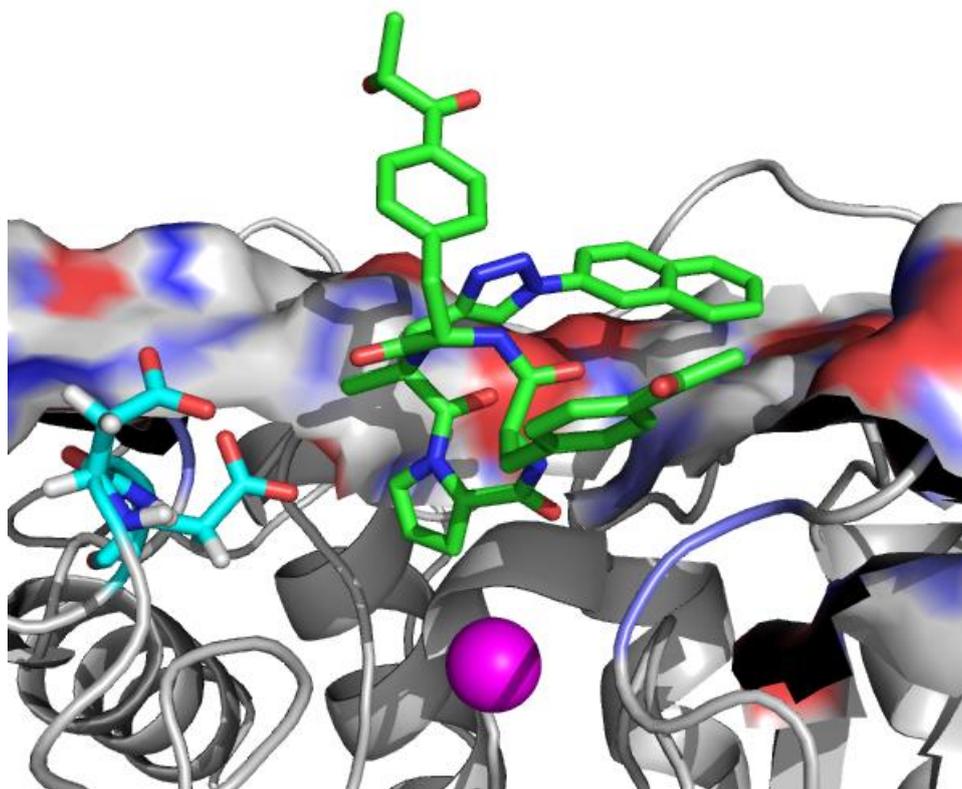


**Figure III.6.** Docking du composé **91** sur *TgHDAC3*

Une fois, l'interaction favorable obtenue entre le ligand et le parasite, l'étape suivante consiste à vérifier si elle est défavorable sur l'humain. Pour cela, le composé **91** a fait l'objet d'un docking sur *HsHDAC3*.

#### ➤ Docking du composé **91** sur *HsHDAC3*

Aucune des solutions proposées par le docking ne correspond à une position correcte du ligand dans le site catalytique. En effet, le docking montre une absence totale de coordination du zinc par la tête chélatante « céto-hydroxyle » ou même par le groupement acétyle (Figure III.7). Le ligand qui reste à l'entrée du site catalytique, ne semble pas faire d'interactions spécifiques avec *HsHDAC3*.



**Figure III.7.** Docking du composé **91** sur *HsHDAC3*

Les travaux effectués dans cette partie montrent que le composé **91** serait potentiellement sélectif sur *TgHDAC3* par rapport à *HsHDAC3* et permettent ainsi de dégager des caractéristiques essentielles pour l'obtention d'une sélectivité sur le parasite. Le naphthalène et le groupement acétyle sur la phénylalanine peuvent éventuellement être remplacés par d'autres composés ayant les mêmes propriétés.

#### **IV. Synthèse d'un HDACi potentiellement sélectif sur les parasites apicomplexes**

A travers les études de modélisation moléculaire, nous sommes arrivés à définir un type de HDACi potentiellement sélectif sur *T. gondii*. Pour valider notre démarche théorique et vérifier la sélectivité du type de molécule fournie par les études de prédiction comme sélectif sur le parasite, il est nécessaire de synthétiser chaque intermédiaire et d'évaluer leur activité biologique. Cela permettra également de vérifier expérimentalement l'effet de chacune des modifications apportées sur le produit naturel FR235222.

Ces nouvelles molécules impliquant le changement de position de deux acides aminés du cyclotérapeptide (proline et phénylalanine), il a fallu revoir complètement notre stratégie de synthèse développée pour l'obtention des analogues FR235222. Compte tenu du nombre de modifications et de la difficulté à les introduire, la nouvelle stratégie pourrait être longue à mettre

en place. Ainsi, nous avons choisi de synthétiser le composé **92** en faisant abstraction de la modification du linker.

En suivant une stratégie de synthèse linéaire et en partant des composés **65** et **93**, dont les fonctions acide (pour **65**) et amine (pour **93**) ont été préalablement déprotégées, nous avons obtenu le composé **94** avec un rendement de 47%. Le composé **65** vient de la synthèse de notre analogue fluorescent de FR235222 dans la partie B. Le composé **93** est obtenu à partir de la D-proline dont la fonction amine a été protégée par un Boc, et la fonction acide, par du triméthylsilyléthyle (TMSE). La cyclisation du térapeptide linéaire devant se faire entre la proline et le dérivé de phénylalanine qui est le dernier acide aminé introduit dans la synthèse, il est intéressant de garder l'acide de la proline protégé tout au long de la synthèse et de pouvoir ensuite le déprotéger dans les mêmes conditions que le *N*-Boc du dérivé de phénylalanine. Ainsi, le choix du TMSE comme groupement protecteur de l'acide de la proline, se justifie par son orthogonalité dans un seul sens. En effet, on peut déprotéger un Boc avec de l'HCl 4 M dioxane sans toucher au TMSE, mais on peut aussi déprotéger les deux avec du TFA. Dans ces travaux, nous nous sommes arrêtés à la synthèse du dipeptide **94**. L'étape suivante consistera à coupler ce dernier avec le composé **66** qui vient aussi de la synthèse de l'analogue fluorescent de FR235222 dans la partie B et dont la fonction acide sera préalablement libérée. La condensation du tripeptide avec le dérivé de phénylalanine potentiellement responsable de la sélectivité sur le parasite, conduira au térapeptide linéaire. Ce dernier sera ensuite cyclisé pour fournir le squelette cyclotérapeptidique présentant une fonction alcyne et une fonction alcène orthogonales. Sur la fonction alcyne, sera greffé, grâce à la réaction d'Huisgen, un groupement volumineux comme le naphthalène. Enfin, le couplage de la tête chélatante sur l'alcène, par la réaction radicalaire de Zard permettra d'obtenir le composé **92**. L'avantage de cette stratégie de synthèse est qu'elle est facilement modulable, du fait que les groupements clés (dérivé phénylalanine et groupement volumineux) seront introduits tardivement dans la synthèse. Ces deux régions pourront être modulées pour accéder à une diversité de molécules potentiellement sélectives sur les parasites apicomplexes.

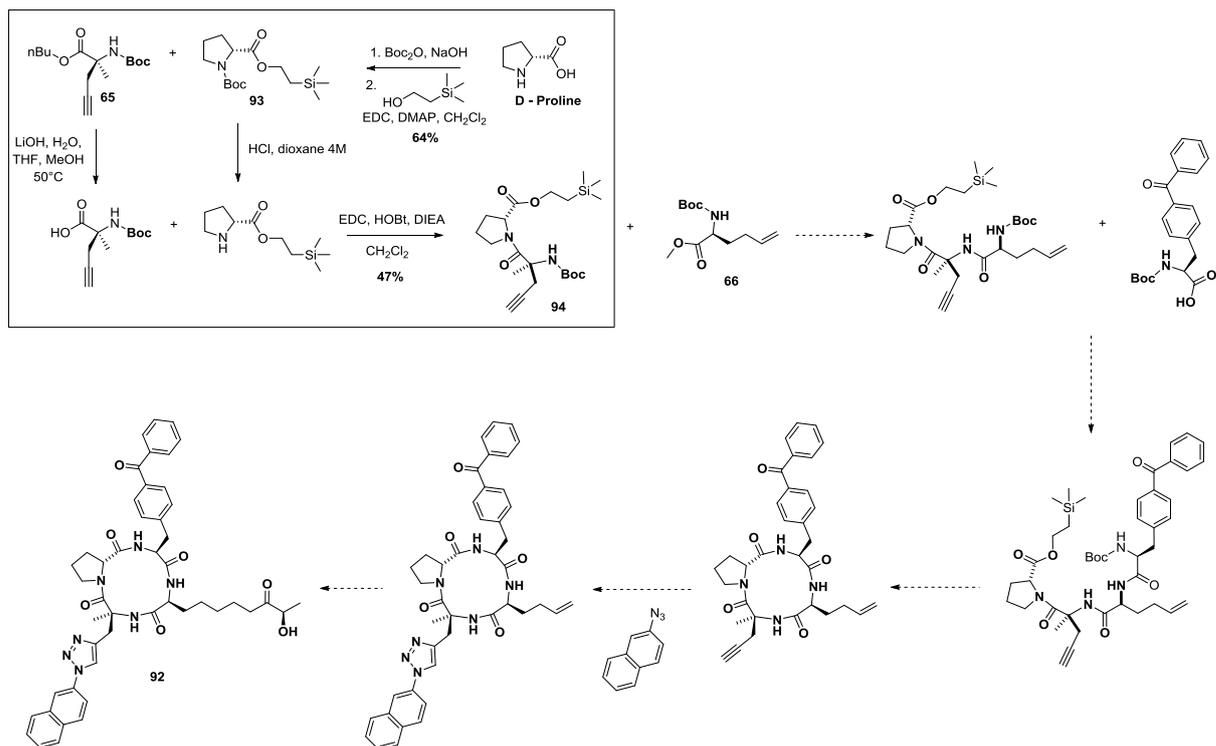


Schéma IV.1. Synthèse d'un HDACi potentiellement sélectif sur les parasites apicomplexes

## V. Conclusion

Au cours des travaux effectués dans cette partie, nous avons construit un modèle *Tg*HDAC3 par homologie de séquence à partir de *Hs*HDAC1. Ce modèle a ensuite été confronté aux données de tests cellulaires qui ont montré une bonne convergence avec des données théoriques ( $\Delta G$ ) obtenues suite à des études de docking et de dynamiques moléculaires, par calculs MM-PBSA. L'identification de différences structurales fondamentales entre le modèle *Tg*HDAC3 et *Hs*HDAC3, notamment à l'entrée du site catalytique, et les études de prédiction (docking), nous a permis de dégager quelques modifications importantes à envisager sur le produit naturel FR235222 afin d'obtenir une sélectivité sur le parasite (*Tg*HDAC3). Enfin, une nouvelle stratégie de synthèse a été définie pour obtenir un analogue de FR235222 potentiellement sélectif sur les parasites apicomplexes. Cette stratégie est en cours d'étude et pourra permettre d'accéder facilement et en peu d'étapes à une diversité de HDACi sélectifs entre espèces.

# **Conclusion Générale**

## **&**

# **Perspectives**

## Conclusions

Dans le cadre du développement de nouveaux traitements contre le paludisme et la toxoplasmose, les travaux effectués dans cette thèse ont porté sur deux thématiques principales.

Les aculéatines sont des produits naturels ayant une spirocyclohexadiénone responsable de leurs propriétés antipaludiques et antitoxoplasmoses. Dans le but de concevoir de nouveaux analogues de ces produits naturels, nous avons développé une nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot ». Dans cette réaction, nous partons d'un précurseur possédant à la fois une fonction phénol et une fonction alcène. L'alcène est époxydé par du DMDO et l'oxydation phénolique est induite par de l'iode hypervalent (III). Ce dernier est généré en quantité catalytique et *in situ* à partir de l'iodotoluène et du DMDO (co-oxydant). L'oxydation phénolique génère l'ion *phénoxonium* qui est piégé par l'époxyde intramoléculaire pour former un ion *spiro-époxonium*. Cet intermédiaire est par la suite piégé par un hydroxyle inter ou intramoléculaire pour former une spirocyclohexadiénone. Plusieurs précurseurs ont été étudiés pour la mise au point de cette nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot ». Dans les cas où elle a conduit au produit escompté, nous avons obtenu un meilleur rendement que lorsque la réaction est effectuée de façon séquentielle. Cependant, un problème de compétitivité entre le MeOH et H<sub>2</sub>O est observé lors du piégeage de l'intermédiaire *spiro-époxonium*.

La deuxième thématique abordée dans cette thèse a porté sur le produit naturel FR235222, un composé cyclotétrapeptidique qui les HDAC aussi bien humaines que parasitaires.

- Dans un premier temps, grâce à une sonde fluorescente, nous avons montré que notre analogue **57** pénètre dans le noyau des cellules HeLa vivantes et cible donc les HsHDAC de la classe I humaine. Ces résultats mettent aussi en évidence les propriétés de pénétration cellulaire du cyclotétrapeptide. Par ailleurs, la conception d'un analogue fluorescent **74** sans tête chélatante a montré que ce dernier n'atteint pas le noyau et suggère que la sélectivité du produit naturel sur les HsHDAC de la classe I humaine pourrait venir de sa tête chélatante. Ces résultats ont été confirmés par l'évaluation de l'activité biologique des composés **57** et **74** sur les HsHDAC de la classe I (nucléaires) et sur HsHDAC6 de la classe IIb (cytoplasmique). Le composé **57** s'est montré sélectif sur la classe I alors que **74** n'a montré aucune activité ni sur la classe I ni sur la classe IIb.
- La synthèse de nouveaux analogues simplifiés de FR235222 et l'évaluation de leurs activités biologiques sur les HsHDACs de la classe I et HsHDAC6 de la classe IIb humaine, ont montré que, même sans la partie cyclotétrapeptide, la molécule garde sa sélectivité sur la classe I

humaine. Des études de modélisation moléculaire ont montré que la tête chélatante « céto-hydroxyle » fait une double coordination sur *HsHDAC1* (classe I) dont la cavité catalytique est étroite et une simple coordination sur *HsHDAC6* (classe IIb) ayant une cavité catalytique large. Cette différence de mode de coordination qui explique la sélectivité sur la classe I serait liée au faible pouvoir de chélation de la tête chélatante « céto-hydroxyle » et à la flexibilité du linker aliphatique.

→ Enfin, dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à la sélectivité entre espèces (homme et parasite). *TgHDAC3* constitue la cible de FR235222 chez le parasite *T. gondii* et n'ayant pas été cristallisée, nous avons construit un modèle par homologie de séquence. Ce modèle *TgHDAC3* a ensuite été confronté aux données de tests cellulaires qui ont convergé avec les données théoriques obtenues par des études de modélisation moléculaire. Grâce aux différences structurales observées entre *TgHDAC3* et *HsHDAC3*, notamment à l'entrée du site catalytique, des études de prédiction (docking) nous ont permis de dégager des modifications essentielles à apporter au produit naturel FR235222 afin d'obtenir une sélectivité sur *TgHDAC3* parasite. Une stratégie de synthèse a été définie pour accéder facilement et en peu d'étapes à une diversité d'analogues FR235222 potentiellement sélectifs sur les parasites apicomplexes.

## Perspectives

Pour la première thématique, la suite de ce projet sera d'optimiser la réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » en jouant par exemple sur la température et afin d'accéder facilement à de nouveaux analogues d'aculéatines. L'exploration de nucléophiles, autres que le MeOH, pour le piégeage de l'intermédiaire *spiro-époxonium* pourra éventuellement résoudre le problème de compétitivité rencontré avec l'eau.

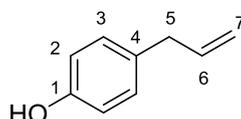
Pour la deuxième thématique, il faudrait finir la synthèse du composé **94** potentiellement sélectif sur le parasite et évaluer son activité biologique sur les HDACs humaines et parasitaires (*T. gondii* et *P. falciparum*). Enfin, pour évaluer l'effet de chaque modification apportée au produit naturel FR235222, il serait également intéressant de synthétiser les intermédiaires obtenus lors des études de prédictions.

# **Partie expérimentale**

## Chapitre II

### 4-Vinylphenol [9]<sup>59</sup>

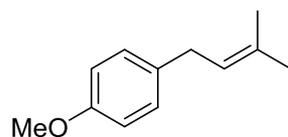
Iodomethane (6.6 mL, 103.62 mmol, 6 equiv) was added in portions to magnesium turnings (5.04 g, 207.25 mmol, 12 equiv) activated by 1,2-dibromoethane (0.3 mL) in ether (80 mL). After completion of reaction, the solids in the solution were allowed to settle, and the liquid was canulated to a flask containing 4-allylanisole (2.5 g, 17.1 mmol). The outlet of the flask was attached through a trap to control vacuum, and ether was gradually evaporated with vigorous stirring. When evaporation slowed down, the flask was placed in a warm (45°C) oil bath. When no more ether was visibly evaporating, the flask was filled with argon and the bath temperature was gradually increased to 190°C, maintaining stirring while possible. After 10 min at 190°C, the reaction flask was allowed to cool down to room temperature. Ether (60 mL) was added, followed by slow dropwise addition of 1 N HCl (100 mL). After all solids reacted, the mixture was diluted with EtOAc (100 mL) and water (60 mL) and stirred vigorously for 10 min. The layers were separated, and the aqueous layer was washed with ethyl acetate. The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 5:95) to give **9** as yellow oil in 69% yield (1.4 g, 11.86 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0,15 (EtOAc/cyclohexane, 5:95); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3311, 2900, 1612, 1510, 1436, 1222, 1171; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 3.31 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, 2×H5), 5.04 (m, 2H, 2×H7), 5.94 (m, 1H, H6), 6.77 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, 2×H3), 7.05 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, 2×H2); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 39.5 (CH<sub>2</sub>, C5), 115.4 (2×CH, 2×C2), 115.6 (CH<sub>2</sub>, C7), 129.9 (2×CH, 2×C3), 132.5 (C, C4), 138.0 (CH, C6), 153.9 (C, C1).

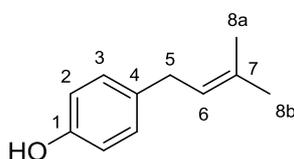
### 1-Methoxy-4-(2-methylprop-1-en-1-yl)benzene [10]<sup>175</sup>

A mixture of 4-methoxyphenyl boronic acid (2 g, 13.16 mmol, 1.3 equiv), 1-bromo-3-methylbut-2-ene (1.5 g, 10.12 mmol) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.9 g, 15.18 mmol, 1.5 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (33 mL, 10:1) was stirred at 70°C overnight. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with aq. 1N HCl, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:98) to give **10** in 79% yield (1.39 g, 7.98 mmol).



#### 4-(2-Methylprop-1-en-1-yl)phenol [11]<sup>176</sup>

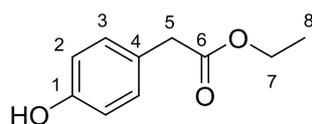
According to the synthesis of **9** and starting from **10** (1.28 g, 7.35 mmol), iodomethane (2.84 mL, 44.58 mmol, 6 equiv) and magnesium (2.16 g, 89.16 mmol, 12 equiv), the compound **11** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) as yellow oil in 44% yield (0.52 g, 3.21 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0,15 (EtOAc/cyclohexane, 5:95); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3052, 2914, 1708, 1513, 1265, 738; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.77 (s, 3H, 3×H8a), 1.80 (s, 3H, 3×H8b), 3.33 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, 2×H5), 5.36 (m, 1H, H6), 6.81 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2×H2), 7.10 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 17.8 (CH<sub>3</sub>, C8a), 25.8 (CH<sub>3</sub>, C8b), 33.5 (CH<sub>2</sub>, C5), 115.2 (2×CH, 2×C2), 123.6 (CH, C6), 129.4 (2×CH, 2×C3), 132.3 (C, C7), 134.1 (C, C4), 153.6 (C, C1); **LRMS (ESI+)**  $m/z$  (%) 163 (85) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>, 149 (100) [ $M-CH_3$ ]<sup>+</sup>.

#### Ethyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate [12a]<sup>177</sup>

A mixture of 2-(4-hydroxyphenyl) acetic acid (16.08 g, 0.10 mol) and HCl (0.2 mL) in anhydrous EtOH (75 mL) was stirred at 160°C overnight. After the reaction was completed, ethanol was evaporated and the mixture was diluted with ethyl acetate. The reaction mixture was treated with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, extracted with ethyl acetate and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated and the resulting residue was distilled over Kugelrohr to give **12a** as colorless oil in 88% yield (16.73 g, 93 mmol).

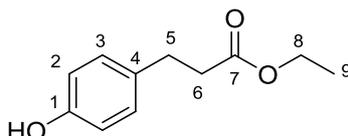


**R<sub>f</sub>** = 0.26 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3386, 1713, 1615, 1516, 1445, 1370, 1299, 1225, 1170  $\text{cm}^{-1}$ ; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3×H8), 3.53 (s, 2×H5), 4.15 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2×H7), 6.72 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2×H2), 7.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz,**

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 14.3 ( $\text{CH}_3$ , C8), 40.7 ( $\text{CH}_2$ , C5), 61.3 ( $\text{CH}_2$ , C7), 115.8 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C}_2$ ), 126.0 (C, C4), 130.6 ( $2\times\text{CH}_2$ ,  $2\times\text{C}_3$ ), 155.2 (C, C1), 173.0 (C, C6).

### Ethyl 3-(4-hydroxyphenyl)propanoate [12b]<sup>177</sup>

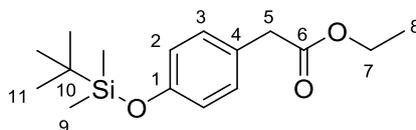
According to the synthesis of **12a** and starting from 3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid (15 g, 90.26 mmol), HCl 37% (0.2 mL) and EtOH (75 mL), the compound **12b** was obtained after distillation over Kugelrohr as colorless oil in 78% yield (14.77 g, 76.13 mmol).



**Rf** = 0.28 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3386, 1713, 1615, 1516, 1445, 1370, 1299, 1170  $\text{cm}^{-1}$ ; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $3\times\text{H}_9$ ), 2.58 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_6$ ), 2.88 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_5$ ), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_8$ ), 6.74 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_2$ ), 7.06 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_3$ ); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 14.4 ( $\text{CH}_3$ , C9), 30.3 ( $\text{CH}_2$ , C6), 36.5 ( $\text{CH}_2$ , C5), 60.7 ( $\text{CH}_2$ , C8), 115.5 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_2$ ), 129.6 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_3$ ), 132.8 (C, C4), 154.3 (C, C1), 173.5 (C, C7).

### Ethyl 2-[4-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy]phenyl)acetate [13a]

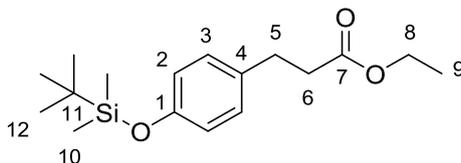
A mixture of **12a** (17.28 g, 96 mmol), TBDMSCl (21.7 g, 144 mmol, 1.5 equiv) and imidazole (19.81 g, 288 mmol, 3 equiv) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL) was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 1 h then at rt for 3 h under argon. After the reaction was completed, the reaction mixture was filtered, concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /cyclohexane, 2:3) to give **13a** in 75% yield (21.26 g, 72.31 mmol).



**Rf** = 0.40 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /cyclohexane, 2:3); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 2956, 2931, 2896, 2857, 1738, 1610, 1510, 1471, 1256, 1152  $\text{cm}^{-1}$ ; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0.18 (s, 6H,  $6\times\text{H}_9$ ), 0.97 (s, 9H,  $9\times\text{H}_{11}$ ), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $3\times\text{H}_8$ ), 3.53 (s, 2H,  $2\times\text{H}_5$ ), 4.15 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_7$ ), 6.72 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_2$ ), 7.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $2\times\text{H}_3$ ); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm -4.3 ( $2\times\text{CH}_3$ ,  $2\times\text{C}_9$ ), 14.3 ( $\text{CH}_3$ , C8), 40.7 ( $\text{CH}_2$ , C5), 61.3 ( $\text{CH}_2$ , C7), 115.8 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_2$ ), 126.0 (C, C4), 130.6 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C}_3$ ), 155.2 (C, C1), 173.0 (C, C6); **LRMS** (ESI+)  $m/z$  (%) 295 (100) [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>; **HRMS** (ESI+)  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{Si}$  295.1724, found 295.1728.

**Ethyl 3-{4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}propanoate [13b]<sup>178</sup>**

According to the synthesis of **13a** and starting from **12b** (14.75 g, 70.03 mmol), TBDMSCl (17.18 g, 114.04 mmol), and imidazole (15.51 g, 228.09 mmol), the compound **13b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 2:3) in 77% yield (16.65 g, 54.05 mmol).

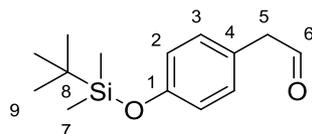


**R<sub>f</sub>** = 0.5 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 2:3); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 0.18 (s, 6H, 6×H10), 0.97 (s, 9H, 9×H12), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3×H9), 2.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2×H5), 2.87 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2×H6), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2×H8), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm – 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C10), 14.4 (CH<sub>3</sub>, C9), 18.4 (C, C11), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C12), 30.4 (CH<sub>2</sub>, C5), 36.4 (CH<sub>2</sub>, C6), 60.5 (CH<sub>2</sub>, C8), 120.2 (2×CH, 2×C2), 129.4 (2×CH, 2×C3), 133.4 (C, C4), 154.2 (C, C1), 173.2 (C, C7).

**2-{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}ethanal [14a]<sup>179</sup>**

**Process A :** The compound **13a** (16.45 g, 55.86 mmol) in anhydrous toluene (100 mL) was cooled at –80°C and the DIBAL-H (41 mL, 61.44 mmol, 1.1 equiv, 1.5 M) was slowly added under argon. The reaction mixture was stirred at –80°C for 1 h. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with MeOH and 1N NaOH, filtered over celite, extracted with ethyl acetate and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated, diluted in ethyl acetate and filtered over silica to give **14a** propanal as yellow oil (not purified).

**Process B :** A mixture of compound **20** (300 mg, 0.684 mmol), Et<sub>3</sub>SiH (0.33 mL, 2.05 mmol) and Pd/C (10 mol%) (35.7 mg, 0.0342 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) was stirred at rt for 90 min. After the reaction was completed, the reaction mixture was filtered over celite and the resulting solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and concentrated. The resulting residue was purified by filtration on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 5:95) to give **14a** as colorless oil in 67% yield (108 mg, 0.43 mmol).

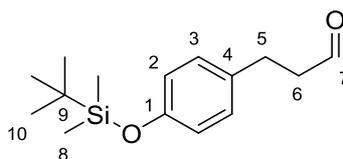


**R<sub>f</sub>** = 0.3 (EtOAc/cyclohexane, 5:95); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) 0.20 (s, 6H, 6×H7), 0.98 (s, 9H, 9×H9), 3.60 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 2×H5), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3), 9.70 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm) – 4.4 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C7),

18.4 (C, C8), 25.8 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C9), 49.7 (CH<sub>2</sub>, C5), 120.7 (2×CH, 2×C3), 124.5 (C, C4), 130.8 (2×CH, 2×C2), 155.2 (C, C1), 199.8 (C, C6).

### 3-{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyloxy]phenyl}propanal [14b]<sup>178</sup>

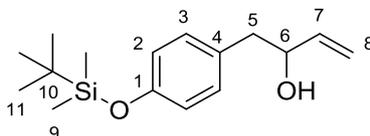
According to the synthesis of **14a** (process A) and starting from **13b** (16.65 g, 54.05 mmol) and DIBAL-H (35 mL, 59.46 mmol), the compound **14b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 5:95) as yellow oil in 88% yield (12.49 g, 47.31 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 2 :98); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 0.18 (s, 6H, 6×H8), 0.97 (s, 9H, 9×H10), 2.73 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H5), 2.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2×H2), 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2×H3), 9.81 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, H7); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm – 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C8), 18.4 (C, C9), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C10), 27.6 (CH<sub>2</sub>, C5), 45.7 (CH<sub>2</sub>, C6), 120.3 (2×CH, 2×C3), 129.4 (2×CH, 2×C2), 133.1 (C, C4), 154.3 (C, C1), 202.0 (C, C7).

### 1-{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyloxy]phenyl}but-3-en-2-ol [15a]

The compound **14a** (146 mg, 0.583 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cooled at –78°C, vinylmagnesium chloride (0.77 mL, 1M, 1.16 mmol, 2 equiv) was slowly added under argon and the reaction mixture was stirred at –78°C for 1 h. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with aqueous NH<sub>4</sub>Cl, extracted with ethyl acetate and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) to give **15a** as colorless oil in 48% yield (78 mg, 0.28 mmol).

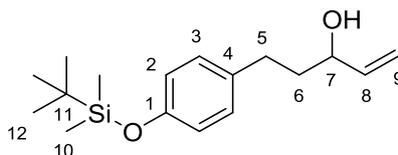


**R<sub>f</sub>** = 0.33 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR ν<sub>max</sub> (film, cm<sup>-1</sup>)** 3376, 2956, 2929, 2857, 1609, 1509, 1258, 917; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 0.18 (s, 6H, 6×H9), 0.98 (s, 9H, 9×H11), 2.81 (m, 2H, 2×H5), 4.32 (dd, *J* = 12.8, 5.9 Hz, 1H, H6), 5.15 (dd, *J* = 10.5, 1.3 Hz, 1H, H8a), 5.26 (dd, *J* = 17.2, 1.3 Hz, 1H, H8b), 5.95 (m, 1H, H7), 6.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm – 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C9), 18.2 (C, C10), 25.8 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C11), 27.0

(C, C6), 43.1 (CH<sub>2</sub>, C5), 73.7 (CH, C6), 114.7 (CH<sub>2</sub>, C8), 120.0 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C2), 130.6 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C3), 140.4 (CH, C7), 154.3 (C, C1); **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 279 (22) [*M*+H]<sup>+</sup>, 261 (100); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. For C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Si 279.1775, found 279.1770.

### 1-{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}but-3-en-2-ol [15b]

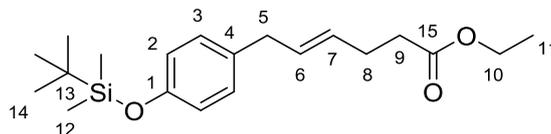
According to the synthesis of **18a** and starting from **14b** (4 g, 15.15 mmol) and vinylmagnesium chloride (20.2 mL, 1M, 30.3 mmol), the compound **15b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) in 61% yield (2.71 g, 9.28 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3355, 2955, 2929, 2857, 1609, 1509, 1255, 916; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.18 (s, 6H, 6×H10), 0.98 (s, 9H, 9×H12), 1.81 (m, 2H, 2×H5), 2.62 (m, 2H, 2×H6), 4.08 (dt, *J* = 7.0, 6.1 Hz, 1H, H7), 5.10 (dt, *J* = 10.4, 1.3 Hz, 1H, H9a), 5.21 (dt, *J* = 17.2, 1.3 Hz, 1H, H9b), 5.87 (ddd, *J* = 17.2, 10.4, 6.1 Hz, 1H, H8), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm - 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C10), 18.3 (C, C11), 25.7 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C12), 30.9 (CH<sub>2</sub>, C6), 38.8 (CH<sub>2</sub>, C5), 72.6 (CH, C7), 114.9 (CH<sub>2</sub>, C9), 120.1 (2×CH, 2×C2), 129.4 (2×CH, 2×C3), 134.6 (C, C4), 141.2 (CH, C8), 153.8 (C, C1); **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 293 (5) [*M*+H]<sup>+</sup>, 275 (100); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. For C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>Si 293.1931, found 293.1933.

### (*E*)-Ethyl 6-{4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}hex-4-enoate [16a]

A mixture of compound **15a** (3.65 g, 13.11 mmol) and propionic acid (0.3 mL) in triethyl orthoacetate (20 mL) was stirred and warmed to 160°C for 2h. After the reaction was completed, the triethyl orthoacetate was evaporated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:98) to give **16a** in 50% yield (2.28 g, 6.55 mmol).

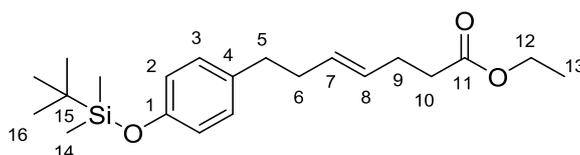


**R<sub>f</sub>** = 0.57 (EtOAc/cyclohexane 4:96); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>), 2955, 2929, 2857, 1736, 1508, 1255, 1168, 916; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.18 (s, 6H, 6×H12), 0.98 (9H, 9×H14), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3×H11), 2.31-2.42 (m, 4H, 2×H8, 2×H), 3.25 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2×H5), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2×H10), 5.48 (m, 1H, H7), 5.61 (m, 1H, H6), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm - 4.2 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C12), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C11), 18.4

(C, C13), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C14), 28.0 (CH<sub>2</sub>, C9), 34.5 (CH<sub>2</sub>, C8), 38.3 (CH<sub>2</sub>, C5), 60.5 (CH<sub>2</sub>, C10), 120.1 (2×CH, 2×C2), 129.5 (2×CH, 2×C3), 130.8 (2×CH, C6, C7), 133.4 (C, C4), 154.0 (C, C1), 173.4 (C, C15); **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 349 (100) [*M*+H]<sup>+</sup>; **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>Si 349.2193, found 349.2195.

**(E)-Ethyl 7-{4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}hept-4-enoate [16b]**

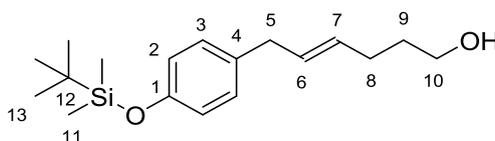
According to the synthesis of **16a** and starting from **15b** (5.93 g, 20.30 mmol) and triethyl orthoacetate (40 mL), the compound **16b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:98) in 72% yield (5.25 g, 14.50 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.31 (EtOAc/cyclohexane, 5:95); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 2955, 2929, 2856, 1736, 1509, 1254, 1169, 915; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.18 (s, 6H, 6×H14), 0.99 (s, 9H, 9×H16), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3×H13), 2.22–2.36 (m, 6H, 2×H6, 2×H9, 2×H10), 2.58 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, 2×H5), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2×H12), 5.35–5.53 (m, 2H, H7, H8), 6.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm –4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C14), 14.4 (CH<sub>3</sub>, C13), 18.4 (C, C15), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C16), 28.1 (CH<sub>2</sub>, C10), 34.5 (2×CH<sub>2</sub>, C6, C9), 35.3 (CH<sub>2</sub>, C5), 60.4 (CH<sub>2</sub>, C12), 119.9 (2×CH, 2×C2), 129.4 (2×CH, 2×C3), 131.0 (2×CH, C7, C8), 134.8 (C, C4), 153.8 (C, C1), 173.3 (C, C11); **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 363 (40) [*M*+H]<sup>+</sup>, 317 (100); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub>Si 363.2349, found 363.2350.

**E-6-{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]phenyl}hex-4-en-1-ol [17a]:**

The compound **16a** (2.28 g, 6.55 mmol) in anhydrous THF (100 mL) was cooled at –78°C, LiAlH<sub>4</sub> (7.86 mL, 2 M, 15.72 mmol, 2.4 equiv) was slowly added and the reaction mixture was stirred –78°C for 1 h under argon. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with aqueous NH<sub>4</sub>Cl, extracted with EtOAc and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) to give **17a** as yellow oil in 67% yield (1.33 g, 4.38 mmol).

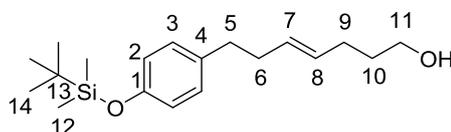


**R<sub>f</sub>** = 0.14 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3374, 2929, 2857, 1606, 1508, 1471, 1255; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.17 (s, 6H, 6×H11), 0.97 (9H, 9×H13), 1.64 (m, 2H, 2×H9),

2.10 (m, 2H, 2×H8), 3.24 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2×H5), 3.64 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2×H10), 5.48 (m, 1H, H7), 5.67 (m, 1H, H6), 6.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2×H2), 7.00 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2×H3);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm – 4.2 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C11), 18.4 (C, C12), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C13), 28.0 (CH<sub>2</sub>, C9), 34.5 (CH<sub>2</sub>, C8), 38.3 (CH<sub>2</sub>, C5), 60.5 (CH<sub>2</sub>, C10), 120.1 (2×CH, 2×C2), 129.5 (2×CH, 2×C3), 130.8 (2×CH, C6, C7), 133.4 (C, C4), 154.0 (C, C1); LRMS (ESI+)  $m/z$  (%) 307 (100) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>; HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>Si 307.2088, found 307.2088.

#### ***E*-Ethyl 7-{4-[(*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy]phenyl}hept-4-enoate [17b]**

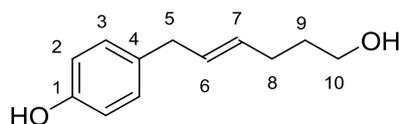
According to the synthesis of **17a** and starting from **16b** (4.42 g, 12.22 mmol) and LiAlH<sub>4</sub> (15 mL, 2 M, 29.33 mmol), the compound **17b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) as yellow oil in 73% yield (2.82 g, 8.88 mmol).



$R_f = 0.29$  (EtOAc/cyclohexane, 1:4); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3348, 2929, 2857, 1608, 1509, 1471, 1255;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0.18 (s, 6H, 6×H12), 0.97 (s, 9H, 9×H14), 1.58 (m, 2H, 2×H10), 2.03 (m, 2H, 2×H9), 2.26 (m, 2H, 2×H6), 2.58 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, 2×H5), 3.57 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2×H11), 5.35-5.50 (m, 2H, H7, H8), 6.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2×H2), 7.00 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2×H3);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm – 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C12), 18.3 (C, C13), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C14), 29.0 (CH<sub>2</sub>, C10), 32.5 (CH<sub>2</sub>, C9), 34.7 (CH<sub>2</sub>, C6), 35.4 (CH<sub>2</sub>, C5), 62.4 (CH<sub>2</sub>, C11), 119.9 (2×CH, 2×C2), 129.4 (2×CH, 2×C3), 130.3 (2×CH, C7, C8), 134.9 (C, C4), 153.7 (C, C1); LRMS (ESI+)  $m/z$  (%) 321 (100) [ $M+H$ ]<sup>+</sup>; HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub>Si 321.2244, found 321.2246.

#### ***E*-4-(6-Hydroxyhex-2-en-1-yl)phenol [18a]**

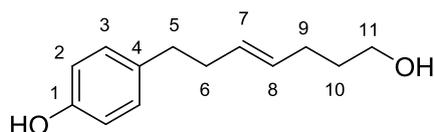
The compound **17a** (1.33g, 4.38mmol) in THF (100 mL) was cooled at 0°C, TBAF (4.38 mL, 1 M, 4.38 mmol, 1 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred 0°C for 1 h under argon. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with aqueous NH<sub>4</sub>Cl, extracted with ethyl EtOAc and dried over MgSO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:3) to give **18a** as yellow solid in 92% yield (0.77 g, 4.02 mmol).



**Rf** = 0.34 (EtOAc/cyclohexane, 2:3); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3361, 1513, 1264, 738;  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1.66 (m, 2H, 2 $\times$ H9), 2.12 (m, 2H, 2 $\times$ H8), 3.26 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H5), 3.66 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H10), 5.49 (m, 1H, H7), 5.58 (m, 1H, H6), 6.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H2), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H3);  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 29.0 ( $\text{CH}_2$ , C9), 32.3 ( $\text{CH}_2$ , C8), 38.3 ( $\text{CH}_2$ , C5), 62.8 ( $\text{CH}_2$ , C10), 115.5 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C2), 129.7 (2 $\times$  $\text{CH}_2$ , 2 $\times$ C3), 130.4 (CH, C7), 130.8 (CH, C6), 132.9 (C, C4), 154.2 (C, C1); **LRMS (ESI+)**  $m/z$  (%) 193 (100) [ $M+\text{H}$ ] $^+$ ; **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_2$  193.1223, found 193.1222.

#### ***E*-4-(7-Hydroxyhept-3-en-1-yl)phenol [18b]**

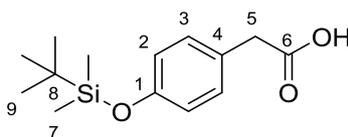
According to the synthesis of **18a** and starting from **17b** (2.82 g, 8.88 mmol) and TBAF (8.88 mL, 1 M, 8.88 mmol), the compound **18b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (AcOEt/cyclohexane, 2:3) as yellow solid in 87% yield (1.58 g, 7.66 mmol).



**Rf** = 0.18 (EtOAc/cyclohexane, 2:3); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3385, 2930, 1514, 1451, 1239;  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1.59 (m, 2H, 2 $\times$ H10), 2.03 (m, 2H, 2 $\times$ H9), 2.24 (m, 2H, 2 $\times$ H6), 2.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 2 $\times$ H5), 3.58 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H11), 5.30-5.47 (m, 2H, H7, H8), 6.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H2), 6.99 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, 2 $\times$ H3);  **$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 28.1 ( $\text{CH}_2$ , C10), 34.5 ( $\text{CH}_2$ , C9), 34.7 ( $\text{CH}_2$ , C6), 35.3 ( $\text{CH}_2$ , C5), 60.4 ( $\text{CH}_2$ , C11), 119.9 (CH, C2), 129.4 (CH, C3), 131.0 (2 $\times$ CH, C7, C8), 134.8 (C, C4), 153.8 (C, C1). **LRMS (ESI+)**  $m/z$  (%) 207 (3) [ $M+\text{H}$ ] $^+$ , 189 (100); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_2$  207.1380, found 207.1382.

#### **2-(4-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)phenyl)acetic acid [19]**

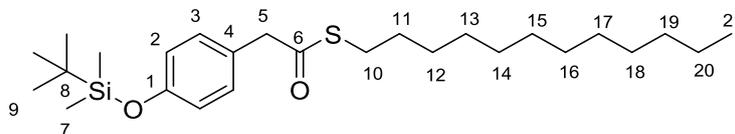
A mixture of 4-hydroxyphenylacetic acid (500 mg, 3.285 mmol), TBDMSCl (1.11 g, 7.35 mmol) and DIEA (1.43 mL, 8.2 mmol) in DMF (15 mL) was stirred at room temperature for 3 h. After the reaction was completed,  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) and acetic acid (100 mL) were added and the reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and aqueous NaCl, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5:95) to give **19** as yellow oil in 94% yield (823 mg, 3,1 mmol).



**Rf** = 0.3 (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5:95); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (**film**) 3122, 2957, 2931, 2897, 2888, 2859, 1712, 1611, 1512, 1472, 1464, 1409, 1263, 1171, 917, 840, 826, 803 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 0.19 (s, 6H, 6×H7), 0.98 (s, 9H, 9×H9), 3.57 (s, 2H, 2×H5), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) - 4.4 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C7), 18.2 (C, C8), 25.6 (3×CH<sub>3</sub>, 2×C9), 40.3 (CH<sub>2</sub>, C5), 120.1 (2×CH, 2×C3), 125.8 (C, C4), 130.3 (2×CH, 2×C2), 154.9 (C, C1), 178.3 (C, C6).

### S-Dodecyl 2-(4-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)ethanethioate [20]

A mixture of compound **19** (600 mg, 2.36 mmol), EDC (543 mg, 2.83 mmol) and DMAP (14.4 mg, 0.118 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL) was stirred at room temperature for 40 min. After the reaction was completed, the reaction mixture was treated with water and HCl 1N and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 1:3) to give **20** as colorless oil in 47% yield (482 mg, 1.07 mmol).



**Rf** = 0.27 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Cyclohexane, 1:4) ; **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (**film**) 2923, 2853, 1692, 1511, 1260, 916; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) 0.19 (s, 6H, 6×H7), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, 3×H21), 0.97 (s, 9H, 9×H9), 1.17-1.38 (m, 18H, 2×H12-20), 1.53 (m, 2H, 2×H11), 2.83 (t, 2H, 2×H10), 3.72 (s, 2H, 2×H5), 6.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H3), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2×H2); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  (ppm) - 4.3 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C7), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C21), 18.4 (C, C8), 22.9 (CH<sub>2</sub>, C20), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C9), 29.0-29.8 (9×CH<sub>2</sub>, C11-C19), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C10), 49.9 (CH<sub>2</sub>, C5), 120.3 (2×CH, 2×C3), 126.7 (C, C4), 130.7 (2×CH, 2×C2), 155.2 (C, C1), 198.2 (C, C6).

### DMDO synthesis<sup>180</sup>

H<sub>2</sub>O (40 mL), acetone (60 mL), and NaHCO<sub>3</sub> (48 g, 0.570 mol) were combined in a 1 L round-bottomed flask and chilled in an ice/water bath with magnetic stirring for 20 min. After 20 min, stirring was halted and Oxone (50 g, 0.0812 mol) was added in a single portion. The flask was loosely covered and the slurry was stirred vigorously for 15 min while still submerged in the ice bath. After 15 min, the stir bar was removed from the reaction flask and rinsed with a small portion of distilled water.

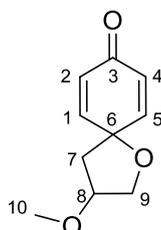
The flask containing the reaction slurry was then attached to a rotary evaporator with the bath at rt. The bump bulb (250 mL) was chilled in a dry ice/acetone bath and a vacuum was carefully applied via a benchtop diaphragm pump. During this process, the flask was rotated vigorously and the vacuum was regulated to prevent bumping of the slurry into the bump trap. After 15 min, the bath temperature was raised to 40 °C over the course of 10 min. When the bath reached 40 °C, the distillation was halted immediately via releasing the vacuum and raising the flask from the heated water bath. The pale yellow acetone solution of DMDO was decanted from the bump bulb directly into a graduated cylinder to measure the total volume of the solution (an average of 50 mL) and then the solution was dried over MgSO<sub>4</sub>. The MgSO<sub>4</sub> was removed by filtration and rinsed with 10 mL of acetone. A final concentration was typically in the range of 60–80 mM.

### Determination of DMDO concentration<sup>180</sup>

The DMDO concentration was assayed using oxidation of an excess of thioanisole to the corresponding sulfoxide and determined by subsequent <sup>1</sup>H NMR measurement. A solution of DMDO (0.50 mL) was reacted with thioanisole (0.10 mL, 0.7 M in acetone-*d*<sub>6</sub>) at 10°C for 10 min. Reduced reaction temperature was applied to avoid overoxidation of the sulfoxide forming the corresponding sulfone. The reaction mixture was directly transferred into an NMR tube, and after <sup>1</sup>H NMR measurement, the concentration of the DMDO solution was determined by signal integration of the sulfoxide phenyl protons ( $\delta$  7.9 - 7.6 ppm) vs those of the excess sulfide ( $\delta$  7.3 - 7.1 ppm).

### 3-Methoxy-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-8-one [21]

A mixture of compound **9** (20 mg, 0.17 mmol) and DMDO (7.5 mL, 0.51 mmol, 3 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was stirred for 1 h at rt. Then, anhydrous MeOH (0.9 mL, 1.7 mmol, 10 equiv) and iodotoluene (3.7 mg, 0.017 mmol, 10%) were added and the reaction mixture was stirred again for 10 min at rt. After the reaction was completed, the reaction mixture was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 1:4) to give **21** as colorless oil in 33% yield (10.1 mg, 0.056 mmol).

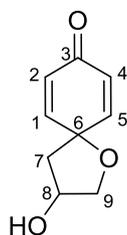


**R<sub>f</sub>** = 0,17 (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 1:4); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3054, 1672, 1421, 1265, 896, 739; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.70 (dd, *J* = 14.2, 7.6 Hz, 1H, H7a), 2.12 (dd, *J* = 14.2, 3.8 Hz, 1H, H7b), 2.45 (dd, *J* = 10.2, 2.7 Hz, 1H, H9a), 2.77 (dd, *J* = 5.9, 2.7 Hz, 1H, H9b), 3.08 (m, 1H, H8), 3.24 (s,

3H, 3×H10), 6.40 (dd,  $J = 10.3, 1.9$  Hz, 1H, H4), 6.42 (dd,  $J = 10.3, 1.9$  Hz, 1H, H2), 6.79 (dd,  $J = 10.3, 3.1$  Hz, 1H, H5), 6.92 (dd,  $J = 10.3, 3.1$  Hz, 1H, H1);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 43.4 ( $\text{CH}_2$ , C7), 46.6 ( $\text{CH}_2$ , C9), 47.6 (CH, C8), 53.1 ( $\text{CH}_3$ , C10), 74.5 (C, C6), 131.6 (2×CH, C2, C4), 150.1 (CH, C1), 150.4 (CH, C5), 185.0 (C, C3); LRMS (ESI+)  $m/z$  (%) 203 (50)  $[M+\text{Na}]^+$ , 181 (30)  $[M+\text{H}]^+$ , 163 (100)  $[M-\text{OH}]^+$ .

### 3-Hydroxy-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-8-one [22]

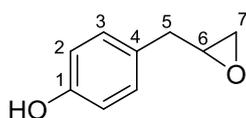
A mixture of compound **9** (40 mg, 0.33 mmol) and DMDO (15 mL, 0.99 mmol, 3 equiv) in acetone was stirred for 1 h at rt. Then, iodotoluene (7.18 mg, 0.033 mmol, 10%) were added and the reaction mixture was stirred again for 10 min at rt. After the reaction was completed, the reaction mixture was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{Et}_2\text{O}$ /cyclohexane, 2:3) to give **22** as colorless oil in 24% yield (13 mg, 0.078 mmol).



Rf = 0.11 ( $\text{Et}_2\text{O}$ /cyclohexane, 2:3); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film) 3373, 3051, 3002, 2921, 1663, 1621, 1396, 1259, 1173  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1.73 (dd,  $J = 14.2, 7.9$  Hz, 1H, H7a), 2.15 (dd,  $J = 14.2, 3.7$  Hz, 1H, H7b), 2.50 (dd,  $J = 4.9, 2.7$  Hz, 1H, H9a), 2.81 (dd,  $J = 4.9, 4.1$  Hz, 1H, H9b), 3.11 (m, 1H, H8), 6.21 (dd,  $J = 10.2, 1.9$  Hz, 2H, H2, H4), 6.93-7.01 (m, 2H, H1, H5);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 43.4 ( $\text{CH}_2$ , C7), 46.9 ( $\text{CH}_2$ , C9), 48.1 (CH, C8), 69.2 (C, C6), 128.4 (2×CH, C2, C4), 150.6 (CH, C1), 150.8 (CH, C5), 185.4 (C, C3).

### 4-(Oxiran-2-ylmethyl)phenol [23]

A mixture of **9** (100 mg, 0.85 mmol) and DMDO (12.5 mL, 0.85 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was stirred at rt for 1 h. After the reaction was completed, the acetone was evaporated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel ( $\text{EtOAc}$ /cyclohexane, 15:85) to give **23** as colorless oil in 68% yield (68.7 mg, 0.45 mmol).

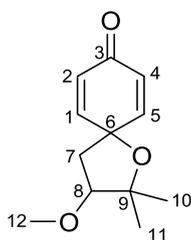


Rf = 0.12 ( $\text{EtOAc}$ /cyclohexane, 1:9); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3382, 1514, 1265, 831, 738;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2.58 (dd,  $J = 4.8, 2.8$  Hz, 1H, H7a), 2.80 (dd,  $J = 8.6, 4.9$  Hz, 2H, 2×H5), 2.82 (dd,  $J = 9.5, 2.8$  Hz, 1H, H7b), 3.17 (m, 1H, H6), 6.76 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, 2×H3), 7.09 (d,  $J = 8.4$  Hz,

2H, 2×H<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 37.8 (CH<sub>2</sub>, C5), 47.0 (CH, C6), 52.9 (CH<sub>2</sub>, C7), 115.5 (2×CH, C3), 129.0 (C, C4), 130.2 (2×CH, C2), 154.6 (C, C1); LRMS (ESI+) *m/z* (%) 151 (85) [M+H]<sup>+</sup>, 107 (100) [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>.

**(R)-3-Methoxy-2,2-dimethyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-8-one [24]**

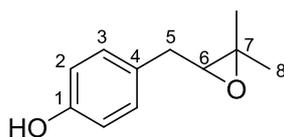
According to the synthesis of **21** and starting from **11** (30 mg, 0.18 mmol), DMDO (13.6 mL, 0.92 mmol), anhydrous MeOH (4.85 mL, 9.2 mmol) and iodotoluene (3.92 mg, 0.018 mmol), the compound **24** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 1:3) as colorless oil in 32% yield (12.2 mg, 0.06 mmol).



R<sub>f</sub> = 0,19 (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 1:3); IR ν<sub>max</sub> (film, cm<sup>-1</sup>) 3054, 2985, 1672, 1265, 738, 705; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1.28 (s, 3H, 3×H<sub>11</sub>), 1.34 (s, 3H, 3×H<sub>10</sub>), 1.82 (dd, *J* = 14.3, 7.6 Hz, 1H, H<sub>7a</sub>), 2.16 (dd, *J* = 14.3, 4.0 Hz, 1H, H<sub>7b</sub>), 2.93 (dd, *J* = 7.6, 4.0 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 3.29 (s, 3H, 3×H<sub>12</sub>), 6.45 (dd, *J* = 10.4, 1.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.47 (dd, *J* = 10.4, 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.83 (dd, *J* = 10.4, 3.1 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 6.95 (dd, *J* = 10.4, 3.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 19.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>11</sub>), 24.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 39.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 53.1 (CH, C<sub>8</sub>), 57.3 (C, C<sub>9</sub>), 59.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>12</sub>), 74.6 (C, C<sub>6</sub>), 131.6 (2×CH, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 150.1 (CH, C<sub>1</sub>), 150.5 (CH, C<sub>5</sub>), 185.1 (C, C<sub>3</sub>); LRMS (ESI+) *m/z* (%) 209 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 191 (100) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**(S)-4-[(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)methyl]phenol [25]**

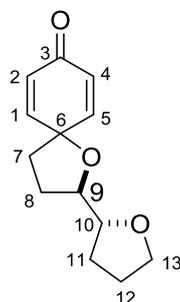
According to the synthesis of **23** and starting from **11** (40 mg, 0.24 mmol), and DMDO (3.42 mL, 0.24 mmol), the compound **25** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 15:85) in 75% yield (32 mg, 0.18 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.22 (EtOAc/cyclohexane, 15:85); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3359, 2964, 2926, 1614, 1595, 1512, 1447; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.39 (s, 3H, 3×H8a), 1.45 (s, 3H, 3×H8b), 2.80 (dd,  $J = 14.7, 6.5\text{ Hz}$ , 1H, H5a), 2.90 (dd,  $J = 14.7, 6.0\text{ Hz}$ , 1H, H5b), 3.00 (t,  $J = 6.2\text{ Hz}$ , 1H, H6), 6.83 (d,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , 2H, 2×H3), 7.15 (d,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , 2H, 2×H2); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 19.0 (CH<sub>3</sub>, C8a), 24.9 (CH<sub>3</sub>, C8b), 34.5 (CH<sub>2</sub>, C5), 64.4 (C, C7), 64.8 (CH, C6), 115.5 (2×CH, 2×C3), 129.9 (2×CH, 2×C2), 130.1 (C, C4), 154.3 (C, C1); **LRMS (ESI<sup>+</sup>)**  $m/z$  (%) 179 (50) [M+H]<sup>+</sup>, 149 (100) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

**(±)-(R\*)-2-[(R\*)-Tetrahydrofuran-2-yl]-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-8-one [26]**

A mixture of compound **18b** (70 mg, 0.34 mmol) and DMDO (15.1 mL, 1.02 mmol, 3 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was stirred for 2 h at rt. Then, iodotoluene (11 mg, 0.050 mmol, 15 mol%) was added and the reaction mixture was stirred again for 3 h at rt. After the reaction was completed, the reaction mixture was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (Et<sub>2</sub>O/cyclohexane, 3:2) to give **26** as colorless oil in 16% yield (12.2 mg, 0.053 mmol).



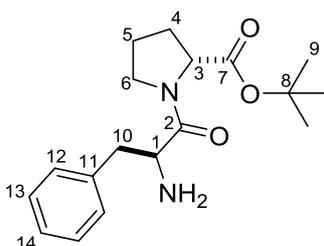
**R<sub>f</sub>** = 0.27 (EtOAc/cyclohexane, 3:7); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.57-1.81 (m, 2H, H8a, H11b), 1.87-1.96 (m, 2H, H8b, H11b), 2.00-2.14 (m, 3H, H7a, H12), 2.24 (m, 1H, H7b), 3.79 (m, 1H, H13a), 3.85-3.94 (m, 2H, H10, H13b), 4.18 (m, 1H, H9), 6.11-6.15 (m, 2H, H2, H4), 6.84 (dd,  $J = 8.7, 4.5\text{ Hz}$ , 1H, H1), 6.86 (dd,  $J = 8.7\text{ Hz}, 4.5\text{ Hz}$ , 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 25.9 (CH<sub>2</sub>, C12), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C8 or C11), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C8 or C11), 37.0 (CH<sub>2</sub>, C7), 68.9 (CH<sub>2</sub>, C13), 78.3 (C, C6), 81.0 (CH, C10), 83.3 (CH, C9), 127.5 (2×CH, C2, C4), 149.9 (CH, C1), 150.5 (CH, C5), 185.8 (C, C3).

## Chapitre III: partie B

The symbol \* in this section means duplicate NMR signals due to diastereoisomeric mixture.

### **(+)-(S)-tert-Butyl 1-((S)-2-amino-3-phenylpropanoyl)pyrrolidine-2-carboxylate [(+)-59]**

To a solution of Z-Phe-OH (2.88 g, 9.60 mmol) and H-D-Pro-OtBu (2.0 g, 9.60 mmol) in DMF (20 mL) was added at 0°C HOBt (1.30 g, 9.60 mmol), DCC (2.4 g, 11.52 mmol), Et<sub>3</sub>N (1.37 g, 10.0 mmol). The mixture was stirred at 0°C for 1 h, then at rt overnight. DMF was evaporated and the residue was diluted with EtOAc and washed with 10% citric acid, 4% NaHCO<sub>3</sub>, and brine. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The corresponding dipeptide (+)-64 (4.0 g, 8.84 mmol, 92%) was obtained after flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2). To a solution of (+)-64 in acetic acid was added Pd/C 10% (252 mg, 2.72 mmol) and the mixture was stirred under H<sub>2</sub> at rt overnight. The mixture was filtrated on celite, washed with EtOAc, and concentrated *in vacuo*. The unprotected dipeptide (+)-59 (2.39 g, 7.52 mmol, 85%) was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5).

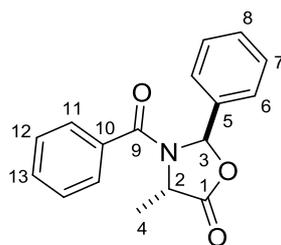


**Rf** = 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 43.0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3358, 2978, 2929, 1724, 1646, 1454, 1364, 1254, 1152, 1090, 910, 849, 756, 694 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.39 (s, 9H, 9×H9), 1.49 (m, 1H, 1×H4a), 1.71-1.90 (m, 3H, 2×H5, 1×H4b), 2.62 (m, 1H, 1×H10a), 2.74 (m, 2H, 2×H6), 3.44 (m, 1H, 1×H10b), 3.72 (dd, *J* = 7.9, 6.8 Hz, 1H, 1×H1), 4.18 (dd, *J* = 8.3, 3.9 Hz, 1H, 1×H3), 7.05-7.30 (m, 7H, 5×Har, NH<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 24.3 (CH<sub>2</sub>, C5), 27.8 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C9), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C4), 42.0 (CH<sub>2</sub>, C10), 46.4 (CH<sub>2</sub>, C6), 54.7 (CH, C1), 59.3 (CH, C3), 81.0 (C, C8), 126.5 (CH, C14), 128.2 (2×CH, 2×C13), 129.2 (2×CH, 2×C12), 137.5 (C, C11), 171.1 (C, C7), 173.1 (C, C2); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. For C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na 369.1790, found 369.1800.

### **(2R,4S)-3-Benzoyl-4-methyl-2-phenyloxazolidin-5-one [69]<sup>162</sup>**

L-Alanine (11 g, 123.47 mmol) was added into a solution of NaOH (5.04 g, 125.94 mmol) in H<sub>2</sub>O (17 mL), and MeOH (84 mL) was added to this solution. The solution was heated (140 °C) until the solid dissolved, and then the solvent was evaporated until precipitation began. The residue was dissolved in anhydrous EtOH (84 mL), and benzaldehyde (18.8 mL, 185.21 mmol) was added. This mixture was stirred at rt for 3 h. The EtOH and most of water was removed under vacuum, and the residue was

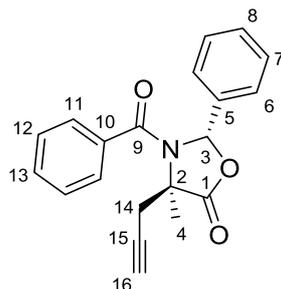
dissolved in EtOH (67 mL) and dried over 4 Å molecular sieves. Filtration and evaporation of the solvent gave a white solid that was dried *in vacuo* overnight. This solid was suspended in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (167 mL), and a solution of benzoyl chloride (19.4 mL, 166.68 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) was added dropwise at 0 °C. After 3 h, the reaction mixture was allowed to stir at rt overnight. This turbid mixture was washed with H<sub>2</sub>O, 5% NaHCO<sub>3</sub>, 5% of NaHSO<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>O again and then dried over NaHSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent gave a white solid. Fractional recrystallizations of this solid from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Et<sub>2</sub>O (1:2) gave **69** as white crystals in 45% yield (16.03 g, 56.98 mmol).



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1.45 (m, 3H, 3×H4), 4.85 (m, 1H, H2), 6.78 (s, 1H, H3), 7.26-7.42 (m, 10H, 2×H6, 2×H7, H8, H10, 2×H11, 2×H12, H13); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 17.6 (CH<sub>3</sub>, C4), 52.8 (CH, C2), 90.4 (CH, C3), 126.5 (C, C5), 126.9 (2×CH, C6), 128.7 (3×CH, 2×C7, C13), 129.9 (CH, C8), 131.3 (C, C10), 135.1 (2×CH, 2×C11), 136.4 (2×CH, 2×C12), 169.5 (C, C9), 172.3 (C, C1)

**(+)-(2S,4S)-3-Benzoyl-4-methyl-2-phenyl-4-(prop-2-ynyl)oxazolidin-5-one [(+)-67]**

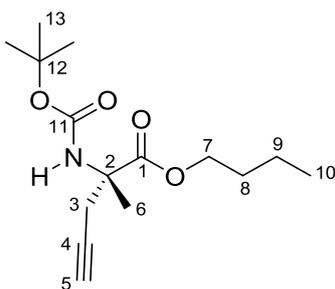
Into a solution of hexamethyldisilazane (3.44 g, 21.3 mmol) in dry THF (23 mL), at -78°C and under argon, was added *n*-butyl lithium 2.5 M (6.30 mL, 15.6 mmol) dropwise. After 5 min at -78°C, the solution was allowed to warm to 0°C for 30 min and then cooled to -78°C again. A solution of (2S,4S)-3-benzoyl-4-methyl-2-phenyl-1,3-oxazolidin-5-one (dried for 10 h under vacuum before using, 4.00 g, 14.2 mmol) in dry THF (50 mL) was added slowly, and the dark red brown solution was stirred at this temperature for 3 h. A solution of propargyl bromide 9.2 M in toluene (3.10 mL, 28.4 mmol) was then added dropwise. The reaction mixture was allowed to slowly warm to 20 °C in 4 h and stirred at this temperature for 20 h. Then the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution (100 mL). Most of the THF was removed *in vacuo*. The product was extracted with EtOAc (3×70 mL). The combined organic layers were washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and ether (1:4) (with two additional recrystallizations from the mother liquid) to give (+)-**67** as white crystal in 62% yield (2.80 g, 8.77 mmol).



$R_f = 0.32$  (EtOAc/cyclohexane, 1:4);  $[\alpha]_D^{20} = +280.6$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $mp = 183.7^\circ\text{C}$ , **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 3287, 1787, 1658, 1392, 1363, 1230  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 1.97 (s, 3H, 3×H4), 2.29 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H16), 2.80 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H, H14a), 3.70 (m, 1H, H14b), 6.61 (s, 1H, H3), 6.93-7.30 (m, 10H, 2×H6, 2×H7, H8, H10, 2×H11, 2×H12, H13);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 23.6 ( $\text{CH}_3$ , C4), 26.2 ( $\text{CH}_2$ , C14), 63.8 (C, C2), 72.1 ( $\text{CH}$ , C16), 79.1 (C, C15), 91.3 ( $\text{CH}$ , C3), 126.3, 127.0, 128.6, 128.8, 130.1, 130.2, 136.3, 136.4 (2×C, 10×CH, C5, 2×C6, 2×C7, C8, C10, 2×C11, 2×C12, C13), 169.6 (C, C9), 173.5 (C, C1); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_3$  320.1281, found 320.1284.

**(-)-(S)-Butyl 2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-methylpent-4-ynoate [(-)-65]**

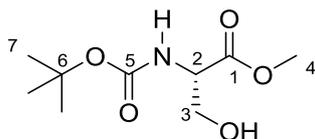
A suspension of (+)-**67** (2.98 g, 9.31 mmol) in concentrated HCl 37% (43 mL) was stirred at reflux ( $115^\circ\text{C}$ ) for 2 h 30 under argon. After, the mixture was cooled and a precipitate was formed. The precipitate was removed by filtration and the aqueous filtrate was evaporated under reduced pressure. The remaining water was removed by azeotropic evaporation with toluene (twice). The solid residue was then suspended in butanol (50 mL), and warmed to  $70^\circ\text{C}$ . TMSCl (8 mL) was added and the reaction was stirred at  $70^\circ\text{C}$  overnight. The reaction mixture was allowed to reach rt and  $\text{Et}_3\text{N}$  (12.8 mL) and di-*tert*-butyl dicarbonate (3.41 g, 15.46 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt overnight. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in water (50 mL) and EtOAc (50 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure to give an oil which was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/cyclohexane, 1:9) to afford the (-)-**65** as a colorless oil (1.31 g, 4.62 mmol, 49%).



**Rf** = 0.3 (EtOAc/cyclohexane 1:9);  $[\alpha]_D^{20} = -15.5$  ( $c = 0.1$ , chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3387, 2959, 1710, 1500, 1369, 1242, 1171, 1119, 1060;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 0.93 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, 3 $\times$ H10), 1.37 (m, 2H, 2 $\times$ H9), 1.44 (s, 9H, 9 $\times$ H13), 1.55 (s, 3H, 3 $\times$ H6), 1.64 (m, 2H, 2 $\times$ H8), 2.03 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H5), 2.92 (s, 2H, 2 $\times$ H3), 4.16 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, 2 $\times$ H7), 5.33 (s, 1H, NH);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 13.7 (CH<sub>3</sub>, C10), 19.2 (CH<sub>2</sub>, C9), 23.3 (CH<sub>3</sub>, C6), 27.1 (CH<sub>2</sub>, C3), 28.4 (3 $\times$ CH<sub>3</sub>, 3 $\times$ C13), 30.7 (CH<sub>2</sub>, C8), 58.3 (C, C2), 65.7 (CH<sub>2</sub>, C7), 71.2 (CH, C5), 79.6 (C, C12), 79.8 (C, C4), 154.4 (C, C11), 173.3 (C, C1); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>Na 306.1681, found 306.1676.

#### Methyl N-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-serinate [70]

To a solution of Boc<sub>2</sub>O (24.8 g, 113.63 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (220 mL) was added **63** (17.7 g, 113.77 mmol) and Et<sub>3</sub>N (48 mL, 344.38 mmol). The reaction mixture was allowed to stir for 6 h at rt. After the reaction was completed, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) was added and the mixture was washed with 1N HCl and aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give **70** as colorless oil in 59% yield (14.8 g, 67.51 mmol).

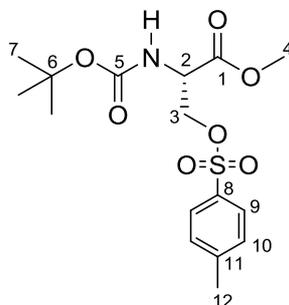


**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 1.45 (s, 9H, 9 $\times$ H7), 2.89 (s, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, 3 $\times$ H4), 3.88 (dd,  $J = 11.1$  Hz, 3.6 Hz, 1H, H3a), 3.97 (dd,  $J = 11.1$  Hz, 3.4 Hz, 1H, H3b), 4.39 (m, 1H, H2), 5.58 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, NH);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 28.2 (3 $\times$ CH<sub>3</sub>, 3 $\times$ C7), 52.6 (CH<sub>3</sub>, C4), 55.7 (CH, C2), 63.3 (CH<sub>2</sub>, C3), 80.2 (C, C6), 155.7 (C, C5), 171.4 (C, C1).

#### Methyl N-(*tert*-butoxycarbonyl)-O-tosyl-L-serinate [71]

Compound **70** (14.8 g, 67.51 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (140 mL) was cooled at 0°C before adding 4-DMAP (0.4 g, 3.25 mmol), Me<sub>3</sub>N.HCl (0.62 g, 6.53 mmol) and *p*-TsCl (12.43 g, 65.20 mmol). A solution of Et<sub>3</sub>N (9.6 mL, 68.94 mmol) dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added dropwise and the reaction was stirred for 2 h at 0°C. After the reaction was completed, small pieces of ice and

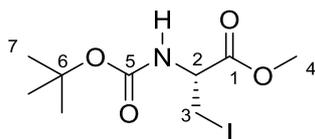
1N HCl (34 mL) were added and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude product obtained was dissolved in Et<sub>2</sub>O, filtered and concentrated. The residue was recrystallized in cyclohexane to give **71** as white solid in 77% yield (19.51 g, 52.25 mmol).



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.37 (s, 9H, 9×H7), 2.39 (s, 3H, 3×H12), 3.63 (s, 3H, 3×H4), 4.24 (dd,  $J = 10.1$  Hz, 3.2 Hz, 1H, H3a), 4.34 (dd,  $J = 10.1$  Hz, 3.0 Hz, 1H, H3b), 4.46 (m, 1H, H2), 5.35 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, NH), 7.30 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 2×H10), 7.71 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 2×H9); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 21.5 (CH<sub>3</sub>, C12), 28.0 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C7), 52.7 (CH<sub>3</sub>, C4), 52.8 (CH, C2), 69.3 (CH<sub>2</sub>, C3), 80.2 (C, C6), 127.8 (2×CH, 2×C10), 129.8 (2×CH, 2×C9), 132.2 (C, C8), 145.0 (C, C11), 154.8 (C, C5), 168.8 (C, C1).

#### Methyl (R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-iodopropanoate [72]

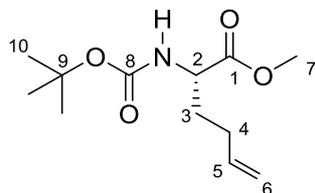
Compound **71** (21.17 g, 56.69 mmol) was dissolved in anhydrous acetone (130 mL) and the reaction flask was wrapped with aluminium paper before the addition of NaI (10.13 g, 67.58 mmol). The reaction mixture was stirred for 48 h at rt before a second portion of NaI (2.53g, 16.87 mmol) was added. After 24 h of stirring, the reaction was completed. The mixture was filtered and the solid obtained was washed with acetone till it turns white. The filtrate was concentrated to give an oil that was dissolved again in Et<sub>2</sub>O. The resulting solution was washed with saturated aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give an oil that crystallized in cyclohexane to give **72** as white solid in 58% yield (10.9 g, 33.12 mmol).



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.46 (s, 9H, 9×H7), 3.54-3.62 (m, 2H, 2×H3), 3.80 (s, 3H, 3×H4), 4.52 (m, 1H, H2), 5.38 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, NH); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 7.7 (CH<sub>2</sub>, C3), 28.2 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C7), 52.9 (CH<sub>3</sub>, C4), 53.6 (CH, C2), 80.4 (C, C6), 154.8 (C, C5), 169.9 (C, C1).

**(+)-(2S)-tert-Butyl 1-(methoxycarbonyl)hex-4-enylcarbamate [(+)-66]**

To a suspension of zinc powder (6.4 g, 97.92 mmol) in dry DMF (75 mL) was injected 1,2-dibromoethane (0.42 mL, 4.90 mmol) under argon. The mixture was stirred for 20 min at rt. TMSCl (0.13 mL, 1.02 mmol) was injected and the solution was stirred at 60°C for 30 min. A solution of **72** (5.37 g, 16.32 mmol) in anhydrous DMF (16 mL) was added dropwise. The solution was stirred for 20 min at 60°C. LiCl (1.52 g, 35.86 mmol) and CuCN (1.61 g, 17.98 mmol) in DMF (17 mL) were injected at -55°C and the mixture was warmed up with stirring for 10 min at 0°C. The solution was cooled again at -55°C and allyl bromide (2.8 mL, 33.10 mmol) was injected. After 5 min, the mixture was warmed up at 0°C and then stirred for 2 h at this temperature. The unreacted zinc was removed by celite filtration and the filtrate was quenched with a saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution. The product was extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue obtained was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:98) to give (+)-**66** as colorless oil in 75% yield (2.98 g, 12.25 mmol).

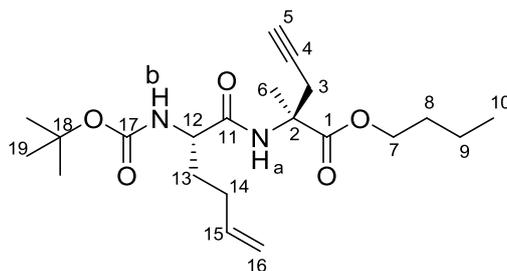


**R<sub>f</sub>** = 0.25 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 20.5 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (**film**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3358, 2978, 1745, 1716, 1518, 1453, 1366, 1249, 1163, 914 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.45 (s, 9H, 3×H10), 1.74 (m, 1H, 1×H3a), 1.90 (m, 1H, 1×H3b), 2.12 (m, 2H, 2×H4), 3.74 (s, 3H, 3×H7), 4.32 (m, 1H, 1×H2), 5.00 (bd, *J* = 10.3 Hz, 1H, 1×H6a), 5.05 (bd, *J* = 17.0 Hz, 1H, 1×H6b), 5.18 (bd, *J* = 7.2 Hz, 1H, NH), 5.79 (m, 1H, 1×H5); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 28.4 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C10), 29.6 (CH<sub>2</sub>, C4), 32.0 (CH<sub>2</sub>, C3), 52.3 (CH<sub>3</sub>, C7), 53.0 (CH, C2), 79.8 (C, C9), 115.7 (CH<sub>2</sub>, C6), 137.0 (CH, C5), 155.4 (C, C8), 173.4 (C, C1); **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 266 (100) [*M*+Na]<sup>+</sup>, 210 (43), 166 (38); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>Na 266.1368, found 266.1374.

**(-)-(S)-Butyl 2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-methylpent-4-ynoate [(-)-60]**

Compound **66** (0.469 g, 1.65 mmol) was dissolved in TFA (1.5 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 30 min at this temperature and then at rt for 3 h. TFA was removed *in vacuo* and the resulting oil was treated with dry ether (3×). The resulting white foam was dried in high vacuum (oil pump) for 6 h. In meantime, to a solution of LiOH (155 mg, 6.45 mmol) dissolved in water (6 mL) was added a solution of **65** (0.443 g, 1.82 mmol) in THF (6 mL), followed by the addition of methanol (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After a 5% aqueous solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> was added until pH 3. The product was extracted with EtOAc (3×20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to give the corresponding crude

carboxylic acid (0.429 g). The two deprotected amino acids were dissolved in dry DMF (15 mL) and cooled with an ice bath. HOBt hydrate (0.375 g, 2.45 mmol), DCC (505 mg, 2.45 mmol) and Et<sub>3</sub>N (1 mL) were successively added. This mixture was stirred at room temperature for 18 h. DMF was evaporated and the residue was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with 10% citric acid (50 mL), 4% sodium bicarbonate (50 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue obtained was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 15:85) to afford the dipeptide (–)-**60** as white solid in 54% yield (0.352 g, 0.89 mmol).

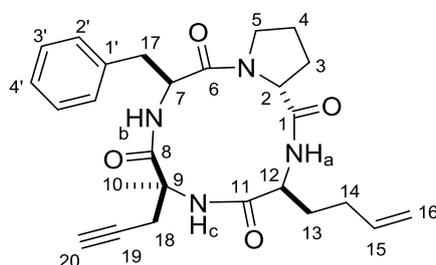


$R_f = 0.37$  (EtOAc/cyclohexane, 1:4);  $[\alpha]_D^{20} = -38.4$  ( $c = 0.1$ , chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3395, 3308, 2959, 1726, 1710, 1662, 1516, 1274, 1250, 1171, 1127; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.93 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, 3×H10), 1.38 (m, 2H, 2×H9), 1.45 (s, 9H, 9×H19), 1.59 (s, 3H, 3×H6), 1.67-1.60 (m, 2H, 2×H8), 1.76-1.67 (m, 1H, H13a), 1.98-1.87 (m, 1H, H13b), 1.99 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H5), 2.15 (dd,  $J = 14.3, 7.2$  Hz, 2H, 2×H14), 3.08-2.85 (m, 2H, 2×H3), 4.27-4.05 (m, 3H, 2×H7, 1×H12), 5.10-4.96 (m, 2H, 2×H16), 5.14 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, NHa), 5.80 (ddt,  $J = 16.9, 10.2, 6.6$  Hz, 1H, H15), 6.93 (s, 1H, NHb); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 13.7 (CH<sub>3</sub>, C10), 19.1 (CH<sub>2</sub>, C9), 22.8 (CH<sub>3</sub>, C6), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C3), 28.4 (3×CH<sub>3</sub>, C19), 29.7 (CH<sub>2</sub>, C13), 30.6 (CH<sub>2</sub>, C8), 31.7 (CH<sub>2</sub>, C14), 54 (CH, C12), 58.7 (C, C2), 65.8 (CH<sub>2</sub>, C7), 71.3 (CH, C5), 79.5 (C, C4), 80 (C, C18), 115.7 (CH<sub>2</sub>, C16), 137.5 (CH, C15), 155.7 (C, C17), 171.4 (C, C1 ou C11), 172.7 (C, C1 ou C11); HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>Na 417.2365, found 417.2359.

**(–)-(3*S*,6*S*,9*S*,14*aR*)-9-Benzyl-3-(but-3-enyl)-6-methyl-6-propargyldecahydropyrrolo [1,2-*a*][1,4,7,10]tetra-azacyclododecine-1,4,7,10-tetraone [(–)-**56**]**

To a solution of LiOH (62 mg, 2.6 mmol) dissolved in water (1.5 mL) was added a solution of (–)-**60** (0.341 g, 0.86 mmol) in THF (2 mL), followed by the addition of methanol (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h at 45°C. After a 5% aqueous solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> was added until pH 3. The product was extracted with EtOAc (3×20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to give the corresponding crude carboxylic acid (290 mg). To a cooled solution of this carboxylic acid and (+)-**59** (0.274 g, 0.86 mmol) in dry DMF (10 mL) were added HOBt (139 mg, 1.03 mmol), DCC (213 mg, 1.03 mmol), and Et<sub>3</sub>N (0.14 mL, 1.03 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. DMF was

evaporated and the residue was diluted with EtOAc (40 mL) and washed with 10% citric acid (40 mL), 4% sodium bicarbonate (40 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (2/3 EtOAc/cyclohexane) to afford the tetrapeptide **73** as a white solid in 77% yield (422 mg, 0.66 mmol); **Rf** = 0.47 (silica gel, EtOAc/cyclohexane, 1:1); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 639.3752, found 639.3753. The tetrapeptide **73** (1.9 g, 2.97 mmol) was dissolved in TFA (9.1 mL) at 0 °C and stirred for 3 h at this temperature. After, TFA was evaporated to give the tetrapeptide trifluoroacetic acid. The product was triturated with dry ether to obtain a precipitate and the ether was removed *in vacuo*. The procedure was repeated twice and the product is carefully dried with oil pump for many hours. To 290 mL of DMF were added the tetrapeptide trifluoroacetic acid (1.77 g, 2.97 mmol), HATU (1.35 g, 3.55 mmol) and DIEA (1.65 mL, 9.47 mmol) in five aliquots with a time interval of 30 min under vigorous stirring. The reaction mixture was stirred for 18 h. After the solvent was then removed. The residue obtained was diluted with EtOAc (40 mL) and washed with 10% citric acid (40 mL), 4% sodium bicarbonate (40 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5/5 EtOAc/cyclohexane) to give the cyclotetrapeptide (–)**56** as white solid in 72% yield (1.00 g, 2.15 mmol, 72%).

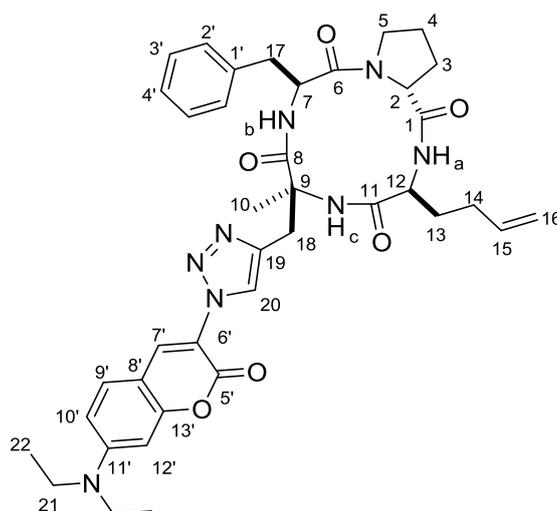


**Rf** = 0.45 (silica gel, 5/5 EtOAc/cyclohexane);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -122.5$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>); **mp** = 88.8°C; **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3302, 3057, 3028, 2978, 2930, 1681, 1658, 1628, 1525, 1428, 1251 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.47 (s, 3H, 3×H10), 1.66-1.81 (m, 3H, H3a, H4a, H13a), 1.95 (m, 1H, H13b), 2.02 (t,  $J = 2,6$  Hz, 1H, H20), 2.11 (m, 2H, 2×H14), 2.22 (m, 1H, H4b), 2.32 (m, 1H, H3b), 2.96 (dd,  $J = 13,6$  Hz,  $J = 6,0$  Hz, 1H, H17a), 3.08 (dd,  $J = 17,0$  Hz,  $J = 2,6$  Hz, 1H H18a), 3.21-3.27 (m, 2H, H5a, H17b), 3.33 (dd,  $J = 16,8$  Hz,  $J = 2,6$  Hz, 1H, H18b), 3.84 (m, 1H, H5b), 4.28 (m, 1H, H12), 5.03 (m, 2H, 2×H16), 5.18 (m, 1H, H7), 5.77 (dtd,  $J = 17,2$  Hz,  $J = 10,4$  Hz,  $J = 6,4$  Hz, 1H, H15), 6.00 (s, 1H, NHc), 7.10 (d,  $J = 10,4$  Hz, 1H, NHa), 7.18-7.29 (m, 5H, 2×H2', 2×H3', H4'), 7.55 (d,  $J = 10,4$  Hz, 1H, NHb); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 23.4 (CH<sub>3</sub>, C10), 24.7 (CH<sub>2</sub>, C3), 25.0 (CH<sub>2</sub>, C4), 26.0 (CH<sub>2</sub>, C13), 28.1 (CH<sub>2</sub>, C18), 29.6 (CH<sub>2</sub>, C14), 35.7 (CH<sub>2</sub>, C17), 46.9 (CH<sub>2</sub>, C5), 53.6 (CH, C7 or C12), 53.7 (CH, C7 or C12), 57.8 (CH, C2), 60.7 (C, C9), 71.5 (C, C19), 78.5 (CH,

C20), 115.9 (CH<sub>2</sub>, C16), 126.7 (2×CH, 2×C2'), 128.6 (2×CH, 2×C3'), 129.0 (CH, C4'), 136.9 (CH, C, C15, C1'), 171.7 (C, C1), 172.7 (C, C6), 173.7 (C, C8), 174.2 (C, C11); **HMRS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na 465.2496; found 465.2498.

**(-)-(3*S*,6*S*,9*S*,14*aR*)-9-Benzyl-3-(but-3-enyl)-6-((1-(7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6-methyldecahydropyrrolo[1,2-*a*][1,4,7,10]tetra-azacyclododecino-1,4,7,10-tetraone [(-)-74]**

To a solution of cyclotetrapeptide (-)-**56** (100 mg, 0.21 mmol) and azidocoumarin **58** (110 mg, 0.42 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.8 mL) was added polymer-supported Amberlyst-A21/CuI catalyst (40 mg). The solution was slowly stirred under argon at rt for 24 h. The polymer was removed by filtration, washed with EtOAc and the combined organic layers were evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (1/1 EtOAc/cyclohexane) to give the cyclotetrapeptide (-)-**74** as a green film in 82% yield (127 mg, 0.17 mmol).

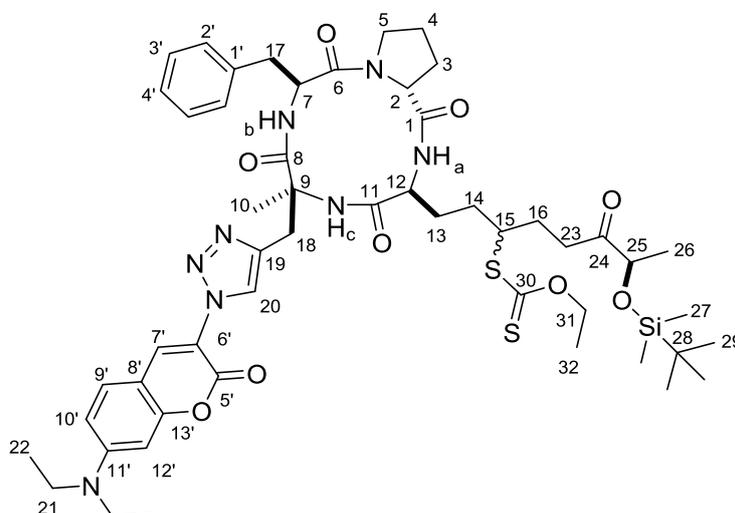


**R<sub>f</sub>** = 0.22 (EtOAc/cyclohexane, 3:7); **[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 58.8 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); **IR** *v*<sub>max</sub> (**film**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3290, 2972, 2928, 1722, 1681, 1622, 1604, 1431, 1354, 1245, 1133 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 1.24 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, 6×H22), 1.41 (s, 3H, 3×H10), 1.72-1.81 (m, 3H, H3a, H4a, H13a), 1.99 (m, 1H, H13b), 2.08 (m, 2H, 2×H14), 2.20 (m, 1H, H4b), 2.33 (m, 1H, H3b), 3.05 (dd, *J* = 13,6 Hz, 6,0 Hz, 1H, H17a), 3.21-3.33 (m, 2H, H5a, H17b), 3.43-3.49 (m, 5H, H18a, 4×H21), 3.85 (m, 1H, H5b), 3.95 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H, H18b), 4.26 (m, 1H, H12), 4.69 (m, 1H, H2), 4.98 (m, 2H, 2×H16), 5.23 (m, 1H, H7), 5.78 (dtd, *J* = 17,0 Hz, *J* = 10,4 Hz, 6,4 Hz, 1H, H15), 6.02 (s, 1H, NHc), 6.56 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H12'), 6.68 (dd, *J* = 8,8 Hz, 2,2 Hz, 1H, H10'), 7.14 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, NHa), 7.26-7.28 (m, 5H, 2×H2', 2×H3',H4'), 7.40 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, H9'), 7.73 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H, NHb), 8.23 (s, 1H, H7'), 8.31 (s, 1H, H20); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 12.4 (2×CH<sub>3</sub>, C22), 23.1 (CH<sub>3</sub>, C10), 24.7 (CH<sub>2</sub>, C3), 24.9 (CH<sub>2</sub>, C4), 27.9 (CH<sub>2</sub>, C13), 29.5 (CH<sub>2</sub>, C14), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C18), 35.9 (CH<sub>2</sub>, C17), 45.0 (2×CH<sub>2</sub>, C21), 46.9 (CH<sub>2</sub>, C5), 53.6 (CH, C7 or C12), 53.8 (CH, C-7 or C12), 57.8 (CH,

C2), 61.9 (C, C9), 97.1 (CH, C12'), 107.08 (C, C8'), 110.0 (CH, C10'), 115.7 (CH<sub>2</sub>, C16), 117.0 (C, C6'), 123.9 (CH, C7'), 126.7 (2×CH, 2×C2'), 128.6 (2×CH, 2×C3'), 129.1 (CH, C4'), 129.9 (CH, C9'), 134.6 (CH, C20), 137.0 (CH, C, C15, C1'), 141.8 (C, C19), 151.4 (C, C11'), 155.8 (C, C13'), 156.7 (C, C5'), 171.8 (C, C1), 172.8 (C, C6), 174.5 (C, C8), 174.7 (C, C11) ; **HMRS (ESI+)** m/z calc. for C<sub>39</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub> 723.3613; found 723.3617.

***S*-((*7R*)-1-((*3S,6S,9S,14aR*)-9-Benzyl-6-((1-(7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6-methyl-1,4,7,10-tetraoxotetradecahydropyrrolo[1,2-*a*][1,4,7,10]tetraazacyclododecin-3-yl)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-oxo-octan-3-yl) *O*-ethyl carbonodithioate [76]**

A solution of cyclotrapeptide (–)-**74** (65 mg, 0.09 mmol) and carbonyl xanthate **75** (69 mg, 0.21 mmol) in 1,2-dichloroethane (0.3 mL) was refluxed for 30 min under argon. Then another solution of the dilauroyl peroxide (5 mg, 0.01 mmol) in 1,2-dichloroethane was added to reaction mixture. After 2 h, a solution of the dilauroyl peroxide (28 mg, 0.07 mmol) in 1,2-dichloroethane (1.5 mL) was added to the reaction mixture, slowly and constantly, for 12 h with a syringe pump. After the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by chromatography column on silica gel (3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3 EtOAc/cyclohexane) to afford the xanthate intermediate **76** as a green film in 51% yield (48 mg, 0.046 mmol).

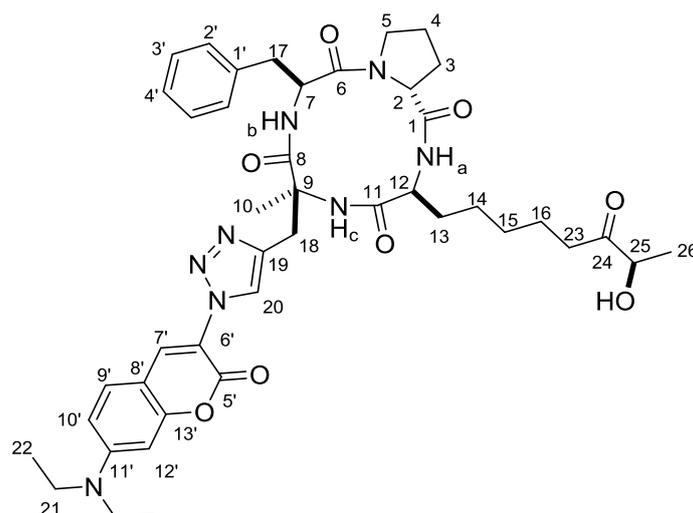


**R<sub>f</sub>** = 0.3 (EtOAc/cyclohexane, 1:4); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3666, 3301, 2931, 1737, 1684, 1603, 1529, 1432, 1379, 1245, 1132, 1047 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.06 (s, 6H, 6×H27), 0.90 (s, 9H, 9×H29), 1.23-1.27 (m, 9H, 6×H22, 3×H26), 1.37-1.43 (m, 6H, 3×H10, 3×H32), 1.71-1.83 (m, 6H, H3a, H4a, H13a, 2×H14, H16a), 2.00-2.21 (m, 3H, H4b, H13b, H16b), 2.32 (m, 1H, H3b), 2.77 (m, 2H, 2×H23), 3.05 (dd, *J* = 13,6 Hz, 6,0 Hz, 1H, H17a), 3.21-3.34 (m, 2H, H5a, H17b), 3.46 (q, *J* = 7,2 Hz, 4H, 4×H21), 3.56 (m, 1H, H18a), 3.75-3.85 (m, 2H, H5b, H15), 3.89 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H, H18b), 4.13 (m, 1H, H25), 4.26 (m, 1H, H12), 4.61 (m, 2H, 2×H31), 4.69 (m, 1H, H2), 5.23 (m,

1H, H7), 6.02 (2s\*, 1H, NHc), 6.61 (s, 1H, H12'), 6.73 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H, H10'), 7.16 (m, 1H, NHa), 7.13-7.27 (m, 5H, 2×H2', 2×H3', H4'), 7.44 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H, H9'), 7.70 (2d\*,  $J = 10,0$  Hz, 1H, NHb), 8.20 (2s\*, 1H, H7'), 8.33 (s, 1H, H20);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm – 5.1, – 4.7\* (2×CH<sub>3</sub>, 2×C27), 12.4 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C22), 13.8 (CH<sub>3</sub>, C32), 18.0 (C, C28), 20.8 (CH<sub>3</sub>, C26), 23.1 (CH<sub>3</sub>, C10), 24.7 (CH<sub>2</sub>, C3), 24.9 (CH<sub>2</sub>, C4), 25.7 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C29), 26.5 (CH<sub>2</sub>, C13), 27.4 (CH<sub>2</sub>, C14), 31.0 (CH<sub>2</sub>, C16), 31.3 (CH<sub>2</sub>, C18), 34.3 (CH<sub>2</sub>, C23), 35.8 (CH<sub>2</sub>, C17), 45.2 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C21), 46.9 (CH<sub>2</sub>, C5), 50.9 (CH, C15), 53.6 (CH, C7 or C12), 54.3 (CH, C7 or C12), 57.8 (CH, C2), 61.9 (C, C9), 69.9 (CH<sub>2</sub>, C31), 74.7 (CH, C25), 97.5 (CH, C12'), 107.5 (C, C8'), 110.3 (CH, C10'), 117.3 (C, C6'), 123.9 (CH, C7'), 126.7 (2×CH, 2×C2'), 128.6 (2×CH, 2×C3'), 129.1 (CH, C4'), 129.9 (CH, C9'), 134.5 (CH, C20), 137.0 (C, C1'), 141.8 (C, C19), 151.2 (C, C11'), 155.7 (C, C13'), 156.7 (C, C5'), 171.7 (C, C1), 172.8 (C, C6), 174.3 (C, C8), 174.6 (C, C11), 213.1 (C, C24), 214.2 (C, C30); HMRS (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>52</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>Si 1045.4706; found 1045.4706.

**(–)-(3*S*,6*S*,9*S*,14*aR*)-9-Benzyl-6-((1-(7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-((*R*)-7-hydroxi-6-oxooctyl)-6-methyldecahydropyrrolo[1,2-*a*] [1,4,7,10]tetraazacyclododecine-1,4,7,10-tetraone [(–)-57]**

A mixture of compound **76** (41.7 mg, 0.039 mmol) and phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1 M) (0.28 mL, 7 equiv) in dioxane (1 mL) was stirred at 145°C. Over 15 min, AIBN (10 mg) was added dropwise and the reaction mixture was stirred over 2 h at 145°C. The dioxane was evaporated and the compound (–)-**57** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (AcOEt) as yellow solid in **52%** yield (16.8 mg, 0.020 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.2 (EtOAc); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 63.1 (c = 0.57, CHCl<sub>3</sub>); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3305, 2926, 2855, 1721, 1682, 1622, 1433, 1354, 1244, 1132 cm<sup>-1</sup>; **<sup>1</sup>H NMR** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.24-1.27 (m, 9H, 6×H22, 3×H26), 1.36 (m, 3H, 3×H10), 1.63-1.68 (m, 4H, 2×H15, 2×H16), 1.73-1.81 (m, 3H, H3a, H4a, H13a), 1.93 (m, 2H, 2×H14), 2.16-2.21 (m, 2H, H4b, H13b), 2.33 (m, 1H, H3b), 2.48 (m, 2H, 2×H23), 3.04 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.0 Hz, 1H, H17a), 3.22-3.33 (m, 2H, H5a, H17b), 3.37 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, H18a), 3.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, 4×H21), 3.86 (m, 1H, H5b), 4.03 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, H18b), 4.18-4.28 (m, 2H, H12, H25), 4.69 (m, 1H, H2), 5.23 (m, 1H, H7), 5.98 (s, 1H, NHc), 6.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H12'), 6.76 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1.8 Hz, 1H, H10'), 7.12 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, NHa), 7.17-7.30 (m, 5H, 2×H2', 2×H3', H4'), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H9'), 7.69 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, NHb), 8.24 (s, 1H, H7'), 8.35 (s, 1H, H20); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 12.4 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C22), 19.8 (CH<sub>3</sub>, C26), 23.0 (CH<sub>3</sub>, C10), 23.2 (CH<sub>2</sub>, C3), 24.7 (CH<sub>2</sub>, C4), 24.9 (CH<sub>2</sub>, C13), 25.1 (CH<sub>2</sub>, C14), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C15), 28.8 (CH<sub>2</sub>, C16), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C18), 35.9 (CH<sub>2</sub>, C23), 37.3 (CH<sub>2</sub>, C17), 45.2 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C21), 46.9 (CH<sub>2</sub>, C5), 53.6 (CH, C7 or C12), 54.4 (CH, C7 or C12), 57.9 (CH, C2), 61.8 (C, C9), 72.6 (CH, C25), 97.4 (CH, C12'), 107.3 (C, C8'), 110.3 (CH, C10'), 117.1 (C, C6'), 123.9 (CH, C7'), 126.7 (2×CH, 2×C2'), 128.6 (2×CH, 2×C3'), 129.1 (CH, C4'), 129.9 (CH, C9'), 134.5 (CH, C20), 137.0 (C, C1'), 141.8 (C, C19), 151.3 (C, C11'), 155.7 (C, C13'), 156.7 (C, C5'), 171.8 (C, C1), 172.8 (C, C6), 174.6 (C, C8), 174.7 (C, C11), 212.6 (C, C24); **HMRS (ESI<sup>+</sup>)** *m/z* calc. for C<sub>43</sub>H<sub>55</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub> 811.4137; found 811.4134.

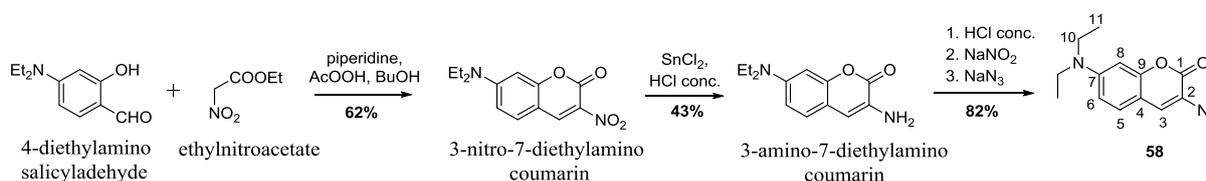
### 3-azido-7-diethylaminocoumarin [58]<sup>157</sup>

A mixture containing n-butanol (20 mL), 4-diethylamino salicylaldehyde (1.43 g, 7.2 mmol), ethyl nitroacetate (0.8 mL, 7.2 mmol), molecular sieves 4 Å (0.100 g), piperidine (0.1 mL, 15 mol%) and acetic acid (0.2 mL, 50 mol%) was heated at 135°C for 24 h. Upon cooling to rt, a bright yellow solid formed, which was collected by filtration and dissolved in DMF (15 mL) at 80 °C. The resulting mixture was filtered again to remove the molecular sieves. The filtrate, upon addition to 100 ml of ice-

cold water, gave the 3-nitro-7-diethylamino coumarin as a bright yellow solid in 62% yield (1.17 g, 4.46 mmol).

To a suspension of 37.4% HCl (23 mL) and stannous chloride dihydrate (6.23 g, 32.88 mmol, 7.5 equiv), 3-nitro-7-diethylamino coumarin (1.15 g, 4.38 mmol) was added at rt in four portions, over a period of thirty minutes. Stirring was continued for 4 h before the solution was poured onto 100 g of ice and made alkaline using NaOH solution (5 M) at 15 °C using an ice-water bath. The resulting suspension was then extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to a pasty residue which upon triturating using hexane gave the 3-amino-7-diethylaminocoumarin as a pale yellow solid in 43% yield (0.432 g, 1.85 mmol).

The 7-Diethylamino-3-amino coumarin (432 mg, 1.85 mmol) was dissolved slowly in HCl aq. (17.2%, 17.2 mL) at rt. Upon cooling to 0 °C and addition of a solution of NaNO<sub>2</sub> (130 mg, 1.85 mmol), the reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. This was followed by the addition of NaOAc (7.2 g, 87.75 mmol) in water (18 mL) to adjust the pH of the resulting solution to 4. NaN<sub>3</sub> (240 mg, 3.7 mmol) was added in four portions at 0 °C, the mixture stirred at 0 °C overnight. The precipitated product was rapidly filtered, washed with ice-cold water and dried under vacuum to give the compound **58** as a yellow solid in 82% (393 mg, 1.52 mmol).



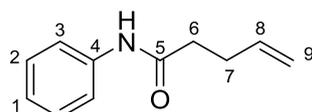
**<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 6×H11), 3.41 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, 4×H10), 6.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H8), 6.60 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, H6), 7.10 (s, 1H, H3), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ ppm 12.4 (2×CH<sub>3</sub>, 2×C11), 44.9 (2×CH<sub>2</sub>, 2×C10), 97.6 (CH, C8), 108.3 (C, C4), 109.7 (CH, C6), 119.8 (C, C2), 127.5 (CH, C5), 128.1 (CH, C3), 149.6 (C, C7), 154.1 (C, C1), 158.3 (C, C9).

## Chapitre III: partie C

The symbol \* in this section means duplicate NMR signals due to diastereoisomeric mixture.

### ***N*-Phenylpent-4-enamide [81a]<sup>181</sup>**

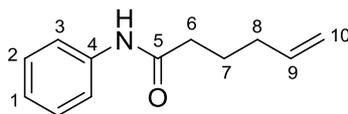
A stirred solution of aniline **79** (0.78 g, 8.43 mmol) and Et<sub>3</sub>N in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was cooled to 0°C followed by the dropwise addition of 4-pentenoyl chloride (1 g, 8.43 mmol, 1 equiv). The reaction mixture was allowed to reach rt and stirred vigorously overnight. After the reaction was completed the precipitate salts were removed by filtration and the filtrate was then washed with 1N HCl followed by extraction of the aqueous layer with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 8:92) to give the compound **81a** as white solid in 74% yield (1.41 g, 7.48 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 4:1); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3316, 2911, 1666, 1602, 1543, 1490, 1442, 1373, 1320, 1245, 1176; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 2.37-2.57 (m, 4H, 2×H6, 2×H7), 5.06 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H9b), 5.13 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, H9a), 5.88 (ddt, *J* = 16.9, 10.1, 6.7 Hz, 1H, H8), 7.10 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.32 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 29.6 (CH<sub>2</sub>, C7), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C6), 116.2 (CH<sub>2</sub>, C9), 120.0 (2×CH, 2×C3), 124.5 (CH, C1), 129.2 (2×CH, 2×C2), 137.1 (C, CH, C4, C8).

### ***N*-Phenylhex-5-enamide [81b]<sup>182</sup>**

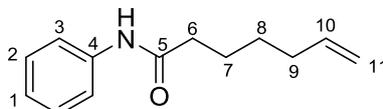
To a solution of DCC (2.71 g, 13.14 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) was added slowly a solution of 5-hexenoic acid (1.5 g, 13.14 mmol, 1.1 equiv) at 0°C followed by aniline **79** (1.11 g, 11.94 mmol, 1 equiv) and DMAP (145.6 mg, 1.19 mmol, 10 mol%). The mixture was allowed to reach rt and stirred vigorously overnight. After the reaction was completed the solid was filtered and the organic layer was washed with HCl 1N, NaHCO<sub>3</sub> 5% and brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 6:4) to give the compound **81b** as white solid in 70% yield (1.57 g, 8.3 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 4:1); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3252, 2938, 1655, 1597, 1549, 1490, 1442, 1384; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.85 (m, 2H, 2×H7), 2.16 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2×H8), 2.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 5.02 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H10a), 5.06 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, H10b) 5.81 (ddt, *J* = 16.9, 10.1, 6.7 Hz, 1H, H9), 7.09 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.32 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 24.7 (CH<sub>2</sub>, C7), 33.3 (CH<sub>2</sub>, C8), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C6), 115.7 (CH<sub>2</sub>, C10), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.4 (CH, C1), 129.2 (2×CH, 2×C2), 138.0 (C, CH, C4, C9), 171.2 (C, C5).

### ***N*-Phenylhept-6-enamide [81c]<sup>182</sup>**

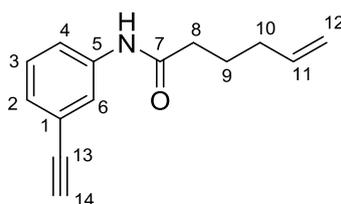
According to the synthesis of *N*-phenylhex-5-enamide **81b**, and starting from aniline **79** (362.7 mg, 3.9 mmol), 6-heptenoic acid (0.5 g, 3.9 mmol), the compound **81c** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 6:4) as brown oil in 79% yield (628 mg, 3.1 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 4:1); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3321, 2938, 1660, 1602, 1538, 1501, 1442, 1384, 1261; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.44 (m, 2H, 2×H8), 1.74 (m, 2H, 2×H7), 2.07 (m, 2H, 2×H9), 2.35 (t, 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 4.96 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H11a), 5.01 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, H11b), 5.79 (ddt, *J* = 16.9, 10.1, 6.7 Hz, 1H, H10), 7.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H1), 7.30 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 25.2 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.6 (CH<sub>2</sub>, C8), 33.6 (CH<sub>2</sub>, C9), 37.7 (CH<sub>2</sub>, C6), 114.9 (CH<sub>2</sub>, C11), 120.0 (2×CH, 2×C3), 124.4 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 138.6 (CH, C10), 171.5 (C, C5).

### ***N*-(3-Ethynylphenyl)hex-5-enamide [81d]**

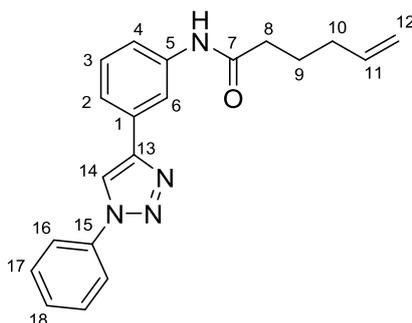
According to the synthesis of *N*-phenylhex-5-enamide **81b**, and starting from 3-aminophenylacetylene **80** (1 g, 8.53 mmol) and 5-hexenoic acid (974.3 mg, 8.53 mmol), the compound **81d** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 4:1) as white solid in 67% yield (1.22 g, 5.72 mmol).



**Rf** = 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane, 4:1); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3289, 2927, 1660, 1607, 1586, 1543, 1485, 1426, 1405, 1288; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.81 (m, 2H, 2×H<sub>9</sub>), 2.13 (dt, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 2H, 2×H<sub>10</sub>), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H<sub>8</sub>), 3.05 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 5.00 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H<sub>12a</sub>), 5.04 (d, *J* = 16.9, 1H, H<sub>12b</sub>), 5.79 (ddt, *J* = 16.9, 10.1, 6.7 Hz, 1H, H<sub>11</sub>), 7.14-7.33 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.63 (s, 1H, H<sub>6</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 24.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>9</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>10</sub>), 36.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>), 83.3 (C, CH, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>), 115.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>12</sub>), 120.6 (CH, C<sub>4</sub>), 123.0 (C, C<sub>1</sub>), 123.5 (CH, C<sub>6</sub>), 128.1 (CH, C<sub>2</sub>), 129.1 (CH, C<sub>3</sub>), 137.9 (C, C<sub>11</sub>), 138.1 (CH, C<sub>5</sub>), 171.6 (C, C<sub>7</sub>); **HRMS** (ESI+) *m/z* calc. for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NONa 236.1051, found 236.1051.

#### ***N*-(3-(1-Phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl)hex-5-enamide [81e]**

To a solution of aniline (86.6 mg, 0.93 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (10 mL) was added tBuONO (148.9 mg, 1.39 mmol, 1.5 equiv) at 0°C. A solution of TMSN<sub>3</sub> (128.57 mg, 1.11 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred over 2 h. Then compound **81d** (200 mg, 0.93 mmol, 1 equiv) and polymer-supported Amberlyst-A21/CuI catalyst (0.5 g) were added to the mixture. The mixture was stirred overnight at rt. After the reaction was completed the polymer was filtered and was washed several times with EtOAc. The combining organic layers were evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:4) to give the compound **81e** as a white solid in 58% yield (180.3 mg, 0.54 mmol).

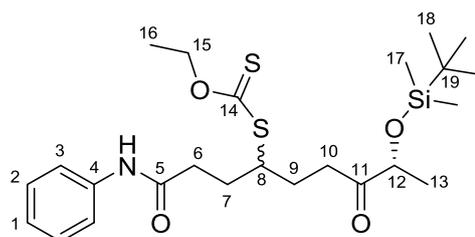


**Rf** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 1:4); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3279, 2935, 1651, 1593, 1530, 1509, 1440, 1408; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.85 (m, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×H<sub>9</sub>), 2.15 (dt, *J* = 7.1, 7.0 Hz, 2H, 2×H<sub>10</sub>), 2.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H<sub>8</sub>), 5.01 (d, *J* = 10.1, 1H, H<sub>12a</sub>), 5.05 (d, *J* = 16.9, 1H, H<sub>12b</sub>), 5.80 (ddt, *J* = 16.9, 10.1, 6.7 Hz, 1H, H<sub>11</sub>), 7.38 (m, 1H, H<sub>18</sub>), 7.45 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.50-7.57 (m, 3H, H<sub>3</sub>, 2×H<sub>17</sub>), 7.67 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.77 (m, 2H, 2×H<sub>16</sub>), 8.12 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 8.21 (s, 1H,

H14);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 24.7 ( $\text{CH}_2$ , C9), 33.2 ( $\text{CH}_2$ , C10), 37.0 ( $\text{CH}_2$ , C8), 115.7 ( $\text{CH}_2$ , C12), 117.2 (CH, C6), 118.2 (CH, C4), 119.8 (CH, C2), 120.7 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C16}$ ), 121.7 (CH, C3), 129.0 (CH, C14), 129.9 ( $3\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C17}$ , C18), 130.0 (C, C1), 137.1 (C, C15), 137.9 (CH, C11), 138.8 (C, C5), 148.1 (C, C13), 171.6 (C, C7); HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{ONa}$  355.1534, found 355.1535.

***S*-((8*R*)-8-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1,7-dioxo-1-(phenylamino)nonan-4-yl) *O*-ethyl carbonodithioate [85a]**

A mixture of compound **81a** (80 mg, 0.45 mmol, 1 equiv) and xanthate **82** (148 mg, 0.45 mmol, 1 equiv) in 1,2-dichloroethane (1 mL) was stirred at 165°C. Over 15 min, DLP (130 mg, 0.326 mmol, 0.7 equiv) was added in two portions every 3 h. The reaction mixture was then stirred overnight at 165°C. The 1,2-dichloroethane was evaporated and the compound **85a** was obtained after purification by column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}/\text{MeOH}$ , 68:30:2) as brown oil in 70% yield (153.7 mg, 0.31 mmol).

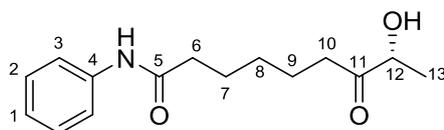


**R<sub>f</sub>** = 0.2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}/\text{MeOH}$ , 68:30:2); IR  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3692, 3317, 2937, 1721, 1662, 1598, 1545, 1443, 1213, 1116, 1047;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0.07 (s, 6H,  $6\times\text{H17}$ ), 0.90 (s, 9H,  $9\times\text{H18}$ ), 1.26 (m, 3H,  $3\times\text{H13}$ ), 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $3\times\text{H16}$ ), 1.68-1.88 (m, 2H,  $2\times\text{H9}$ ), 1.97-2.15 (m, 2H,  $2\times\text{H7}$ ), 2.53, 2.55\* (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H6}$ ), 2.79 (m, 2H,  $2\times\text{H10}$ ), 3.80 (m, 1H, H8), 4.13 (m, 1H, H12), 4.60 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $2\times\text{H15}$ ), 7.09 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.31 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H,  $2\times\text{H2}$ ), 7.51 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H,  $2\times\text{H3}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm - 4.8 ( $\text{CH}_3$ ,  $2\times\text{C17}$ ), 13.9 ( $\text{CH}_3$ , C16), 20.0, 20.1\* ( $\text{CH}_3$ , C13), 25.9 ( $3\times\text{CH}_3$ ,  $3\times\text{C18}$ ), 30.5 ( $2\times\text{CH}_2$ , C7, C9), 34.8, 34.9 ( $2\times\text{CH}_2$ , C6, C10), 50.7, 50.8\* (CH, C8), 70.6 ( $\text{CH}_2$ , C15), 72.9, 73.0\* (CH, C12), 120.0 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C3}$ ), 124.5 (CH, C1), 129.2 ( $2\times\text{CH}$ ,  $2\times\text{C2}$ ), 138.0 (C, C4), 170.4 (C, C5), 212.0 (C, C11), 214.1 (C, C14); HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{NO}_4\text{SiS}_2$  498.2168, found 498.2151.

**(*R*)-8-Hydroxy-7-oxo-*N*-phenylnonanamide [86a]**

A mixture of compound **85a** (24 mg, 0.084 mmol) and phosphonic acid/ $\text{Et}_3\text{N}$  (1 M) (0.42 mL, 5 equiv) in dioxane (1 mL) was stirred at 145°C. Over 15 min, AIBN (7 mg) was added dropwise and the reaction mixture was stirred over 2 h at 145°C. The dioxane was evaporated and the compound **86a**

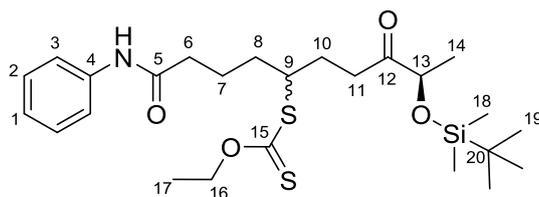
was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:3) as white solid in 45% yield (10 mg, 0.04 mmol).



**Rf** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 2:3);  $[\alpha]_D^{20} = -7.8$  ( $c = 1$ , chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3308, 2939, 1718, 1662, 1599, 1543, 1500, 1444, 1313, 1246, 1103, 1032;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 1.30-1.48 (m, 5H, 2 $\times$ H8, 3 $\times$ H13), 1.60-1.84 (m, 4H, 2 $\times$ H7, 2 $\times$ H9), 2.36 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, 2 $\times$ H6), 2.50 (m, 2H, 2 $\times$ H10), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H12), 7.10 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.32 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2 $\times$ H2), 7.51 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2 $\times$ H3);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 20.0 ( $\text{CH}_3$ , C13), 23.3 ( $\text{CH}_2$ , C9), 25.3 ( $\text{CH}_2$ , C7), 28.8 ( $\text{CH}_2$ , C8), 37.4 ( $\text{CH}_2$ , C6), 37.5 ( $\text{CH}_2$ , C10), 72.8 (CH, C12), 119.9 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C3), 124.5 (CH, C1), 129.2 (2 $\times$ CH, 2 $\times$ C2), 138.1 (C, C4), 171.2 (C, C5), 212.8 (C, C11); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Na}$  286.1419, found 286.1418.

***S*-((*9R*)-9-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1,8-dioxo-1-(phenylamino)decan-5-yl) *O*-ethyl carbonodithioate [85b]**

According to the synthesis of the compound **85a**, and starting from compound **81b** (0.1 g, 0.53 mmol), xanthate **87** (171 mg, 0.53 mmol), DLP (148 mg, 0.37 mmol), the compound **85b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /cyclohexane/MeOH, 68:30:2) as brown oil in 77% yield (209.3 mg, 0.41 mmol).

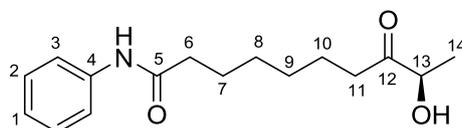


**Rf** = 0.2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /cyclohexane/MeOH, 68:30:2); **IR**  $\nu_{\max}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3676, 3310, 2938, 1714, 1666, 1602, 1549, 1501, 1442, 1373, 1309, 1208;  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm 0.07 (s, 3H, 3 $\times$ H18), 0.91 (s, 9H, 9 $\times$ H19), 1.27, 1.28\* (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 3 $\times$ H14), 1.41 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H, 3 $\times$ H17), 1.70-1.84 (m, 3H, 2 $\times$ H8, H10b), 1.91 (m, 2H, 2 $\times$ H7), 2.09 (m, 1H, H10a), 2.41 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, 2 $\times$ H6), 2.77 (m, 2H, 2 $\times$ H11), 3.81 (m, 1H, H9), 4.14, 4.15\* (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H13), 4.62, 4.63\* (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, 2 $\times$ H16), 7.09 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.31 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2 $\times$ H2), 7.53 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2 $\times$ H3);  **$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  ppm -4.8 ( $\text{CH}_3$ , 2 $\times$ C18), 14.0, 14.3\* ( $\text{CH}_3$ , C17), 18.2 (C, C20), 21.0 21.1\* ( $\text{CH}_3$ , C14), 23.0 ( $\text{CH}_2$ , C7), 25.9 (3 $\times$  $\text{CH}_3$ , 3 $\times$ C19), 27.5 ( $\text{CH}_2$ , C10), 34.4, 34.5\*

(CH<sub>2</sub>, C8), 34.6, 34.7\* (CH<sub>2</sub>, C11), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C6), 50.8 (CH, C9), 70.2 (CH<sub>2</sub>, C16), 75.0 (CH, C13), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.3 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 171.0 (C, C5), 214.0 (C, C12), 214.1 (C, C15); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>SiS<sub>2</sub>Na 534.2144, found 534.2143.

**(R)-9-Hydroxy-8-oxo-N-phenyldecanamide [86b]**

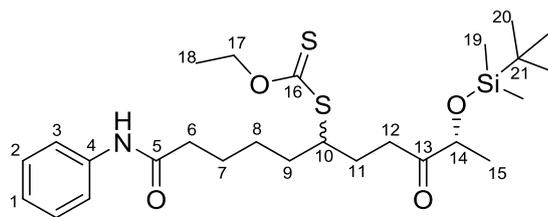
According to the synthesis of the compound **86a**, and starting from compound **85b** (0.1 g, 0.19 mmol) phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1M) (0.98 mL), and AIBN (10 mg), the compound **86b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 1:9) as white solid in 61% yield (32.4 mg, 0.11 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 3:7); **[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 2.8 (c = 1, chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3312, 2927, 1718, 1662, 1603, 1528, 1500, 1444, 1329, 1246, 1103, 1044; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.30-1.46 (m, 7H, 2×H8, 2×H9, 3×H14), 1.65 (m, 2H, 2×H10), 1.74 (m, 2H, 2×H7), 2.35 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 2.48 (m, 2H, 2×H11), 4.24 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, H13), 7.1 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.32 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.51 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 20.0 (CH<sub>3</sub>, C14), 23.5 (CH<sub>2</sub>, C10), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C7), 29.0 (2×CH<sub>2</sub>, C8, C9), 37.5 (CH<sub>2</sub>, C6), 37.7 (CH<sub>2</sub>, C11), 72.8 (CH, C13), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.6 (CH, C1), 129.2 (2×CH, 2×C2), 138.4 (C, C4), 171.4 (C, C5), 212.8 (C, C12); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> 278.1756, found 278.1763.

**S-((10R)-10-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-1,9-dioxo-1-(phenylamino)undecan-6-yl) O-ethyl carbonodithioate [85c]**

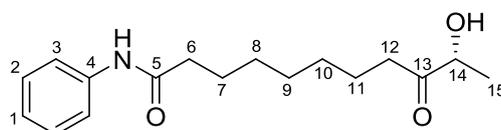
According to the synthesis of the compound **85a**, and starting from compound **81c** (136.6 mg, 0.62 mmol), xanthate **82** (202 mg, 0.62 mmol), DLP (173 mg, 0.43 mmol), compound **85c** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/MeOH, 68:30:2) as brown oil in 40% yield (126.8 mg, 0.241 mmol).



**Rf** = 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/MeOH, 68:30:2); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3686, 3317, 2926, 2862, 1716, 1673, 1603, 1550, 1502, 1443, 1250, 1116, 1052; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.07 (s, 6H, 6×H19), 0.91 (m, 9H, 9×H20), 1.27 (m, 3H, 3×H15), 1.40 (m, 3H, 3×H18), 1.46 – 1.60 (m, 2H, 2×H9), 1.65 – 1.84 (m, 4H, 2×H7, 2×H8), 1.95 – 2.12 (m, 2H, 2×H11), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 2×H6), 2.65 – 2.85 (m, 2H, 2×H12), 3.77 (m, 1H, H10), 4.13 (qd,  $J = 6.8, 2.7$  Hz, 1H, H14), 4.61 (m, 2H, 2×H17), 7.09 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.30 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H2), 7.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm – 4.8, – 4.5\* (2×CH<sub>3</sub>, 2×C19), 13.9 (CH<sub>3</sub>, C18), 18.2 (CH<sub>3</sub>, C15), 21.0 (CH<sub>2</sub>, C7), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C8), 25.9 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C20), 26.4 (CH<sub>2</sub>, C11), 27.6 (CH<sub>2</sub>, C9), 34.4 (CH<sub>2</sub>, C12), 37.6 (CH<sub>2</sub>, C6), 51.1 (CH, C10), 70.1 (CH<sub>2</sub>, C17), 75.0 (CH, C14), 120.0 (2×CH, 2×C3), 124.3 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.1 (C, C4), 171.3 (C, C5), 213.8 (C, C13), 214.7 (C, C16); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub>Si<sub>2</sub> 526.2481, found 526.2462.

### (R)-10-Hydroxy-9-oxo-N-phenylundecanamide [86c]

According to the synthesis of the compound **86a**, and starting from compound **85c** (80 mg, 0.15 mmol) phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1 M) (0.76 mL), and AIBN (13 mg), the compound **86c** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:3) as brown oil in 60% yield (26.2 mg, 0.09 mmol).

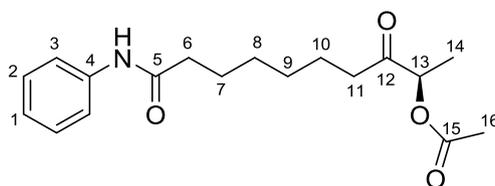


**Rf** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 1:4);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.3$  ( $c = 1$ , chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3294, 2938, 1716, 1666, 1602, 1538, 1501, 1442, 1373, 1314, 1251; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.20 – 1.41 (m, 9H, 2×H8, 2×H9, 2×H10, 3×H15), 1.63 (m, 2H, 2×H11), 1.72 (m, 2H, 2×H7), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 2×H6), 2.39-2.57 (m, 2H, 2×H12), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H14), 7.11 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.31 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H2), 7.51 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 20.0 (CH<sub>3</sub>, C15), 23.6 (2×CH<sub>2</sub>, C7, C11), 25.6 (CH<sub>2</sub>, C10), 29.2 (CH<sub>2</sub>, C8), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C9), 37.6 (CH<sub>2</sub>, C6), 39.9 (CH<sub>2</sub>, C12), 72.8 (CH, C14), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.4 (CH, C1), 129.2

(2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 171.6 (C, C5), 212.9 (C, C13); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $C_{17}H_{25}NO_3Na$  314.1732, found 314.1734.

**(R)-3,10-Dioxo-10-(phenylamino)decan-2-yl acetate [87b]**

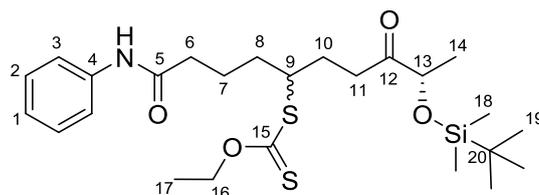
The mixture of compound **86b** (22 mg, 0.079 mmol) in anhydrous  $CH_2Cl_2$  (2 mL) was cooled to 0°C and  $Ac_2O$  (0.011 mL, 0.12 mmol, 1.5 equiv),  $Et_3N$  (0.022 mL, 0.158 mmol, 2 equiv), DMAP (19.3 mg, 0.158 mmol, 2 equiv) were added dropwise. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0°C and for 2 h at rt. After the reaction was completed, EtOAc and saturated aqueous solution of  $NH_4Cl$  were added to the mixture. The organic layer was then dried over  $MgSO_4$ , filtered and the solvent was evaporated. Compound **87b** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 3:7) as white solid in 83% yield (21 mg, 0.066 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.25 (EtOAc/cyclohexane, 3:7);  $[\alpha]_D^{20} = +6.6$  ( $c = 1$ , chloroform); **IR**  $\nu_{max}$  (film,  $cm^{-1}$ ) 3326, 2938, 1730, 1714, 1666, 1602, 1533, 1442, 1378, 1240; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 1.38 (m, 3H, 3×H14), 1.55-1.67 (m, 4H, 2×H8, 2×H9), 1.69-1.79 (m, 4H, 2×H7, 2×H10), 2.14 (s, 3H, 3×H16), 2.35 (m, 2H, 2×H6), 2.47 (m, 2H, 2×H11), 5.08 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H13), 7.10 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.32 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H2), 7.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 16.3 (CH<sub>3</sub>, C16), 21.0 (CH<sub>3</sub>, C14), 23.1 (CH<sub>2</sub>, C10), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C9), 28.8 (CH<sub>2</sub>, C8), 37.6 (CH<sub>2</sub>, C11), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C6), 74.9 (CH, C13), 119.9 (CH, C3), 124.3 (CH, C1), 129.2 (CH, C2), 138.2 (C, C4), 170.7 (C, C15), 179.4 (C, C5), 208.1 (C, C12); **HRMS (ESI+)**  $m/z$  calc. for  $C_{18}H_{26}NO_4$  320.1862, found 320.1858.

**S-((9S)-9-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-1,8-dioxo-1-(phenylamino)decan-5-yl) O-ethyl carbonodithioate [85f]**

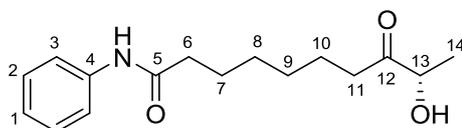
According to the synthesis of the compound **85a**, and starting from compound **81b** (150 mg, 0.79 mmol), xanthate **88** (281.4 mg, 0.87 mmol), DLP (221.28 mg, 0.55 mmol), the compound **85f** was obtained after purification by column chromatography on silica gel ( $CH_2Cl_2$ /cyclohexane/MeOH, 68:30:2) as white solid in 91% yield (368.2 mg, 0.72 mmol).



**Rf** = 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/MeOH, 68:30:2); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3676, 3310, 2938, 1714, 1666, 1602, 1549, 1501, 1442, 1373, 1309, 1208; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.07 (s, 3H, 3×H18), 0.91 (s, 9H, 9×H19), 1.27, 1.28\* (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 3×H14), 1.41 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 3H, 3×H17), 1.70-1.84 (m, 3H, 2×H8, H10b), 1.91 (m, 2H, 2×H7), 2.09 (m, 1H, H10a), 2.41 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, 2×H6), 2.77 (m, 2H, 2×H11), 3.81 (m, 1H, H9), 4.14, 4.15\* (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H13), 4.62, 4.63\* (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, 2×H16), 7.09 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.31 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.53 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm - 4.8, - 4.4\* (2×CH<sub>3</sub>, 2×C18), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C17), 18.2 (C, C20), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C14), 22.8 (CH<sub>2</sub>, C7), 25.7 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C19), 27.4 (CH<sub>2</sub>, C10), 34.5 (2×CH<sub>2</sub>, C8, C11), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C6), 50.8 (CH, C9), 70.2 (CH<sub>2</sub>, C16), 75.0 (CH, C13), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.3 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 171.0 (C, C5), 214.0 (C, C12), 214.1 (C, C15); **HRMS** (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>4</sub>SiS<sub>2</sub> 512.2324, found 512.2311.

#### (S)-9-Hydroxy-8-oxo-N-phenyldecanamide [86f]

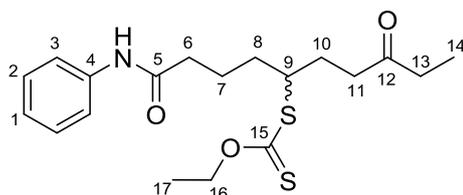
According to the synthesis of the compound **86a**, and starting from compound **85f** (33 mg, 0.064 mmol) phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1 M) (0.32 mL), and AIBN (7 mg), the compound **86f** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:3) as white solid in 77% yield (13.7 mg, 0.05 mmol).



**Rf** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 2:3);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  = + 2.4 (c = 1, chloroform); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3310, 2932, 1719, 1666, 1602, 1538, 1501, 1442, 1373, 1309; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.29-1.43 (m, 7H, 2×H8, 2×H9, 3×H14), 1.64 (m, 2H, 2×H10), 1.73 (m, 2H, 2×H7), 2.35 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 2.47 (m, 2H, 2×H11), 4.23 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, H13), 7.10 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.31 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.51 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 20.0 (CH<sub>3</sub>, C14), 23.5 (CH<sub>2</sub>, C10), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C7), 29.0 (CH<sub>2</sub>, C8, C9), 37.5 (CH<sub>2</sub>, C6, C11), 72.8 (CH, C13), 119.9 (CH, 2×C3), 124.4 (CH, C1), 129.2 (CH, 2×C2), 138.1 (C, C4), 171.4 (C, C5), 212.8 (C, C12); **HRMS** (ESI+)  $m/z$  calc. for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> 278.1756, found 278.1758.

**S-(1,8-Dioxo-1-(phenylamino)decan-5-yl) O-ethyl carbonodithioate [85g]**

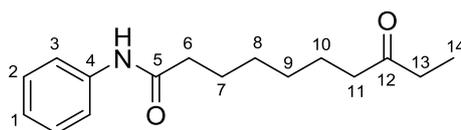
According to the synthesis of the compound **85a**, and starting from compound **81b** (116.4 mg, 0.615 mmol), xanthate **84** (118.1 mg, 0.615 mmol), DLP (171.6 mg, 0.43 mmol), the compound **85g** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/MeOH, 68:30:2) as white solid in 49% yield (113.4 mg, 0.3 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane/MeOH, 68:30:2); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3670, 3306, 2921, 1716, 1668, 1598, 1545, 1502, 1443, 1213, 1116, 1047; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 3×H14), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3×H17), 1.71-1.84 (m, 3H, 2×H8, H10b), 1.84-1.97 (m, 2H, 2×H7), 2.11 (m, 1H, H10a), 2.37-2.48 (m, 4H, 2×H6, 2×H13), 2.50-2.69 (m, 2H, 2×H11), 3.76 (m, 1H, H9), 4.62, 4.63\* (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2×H16), 7.09 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H2), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 2×H3); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 8.0 (CH<sub>3</sub>, C14), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C17), 22.8 (CH<sub>2</sub>, C7), 28.0 (CH<sub>2</sub>, C10), 34.3 (CH<sub>2</sub>, C8), 36.2 (CH<sub>2</sub>, C6), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C13), 39.4 (CH<sub>2</sub>, C11), 50.7 (CH, C9), 70.3 (CH<sub>2</sub>, C16), 119.9 (2×CH, 2×C3), 124.3 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 171.1 (C, C5), 211.2 (C, C12), 215.0 (C, C15); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Na 404.1330, found 404.1332.

**8-oxo-N-Phenyldecanamide [86g]**

According to the synthesis of the compound **86a**, and starting from compound **85g** (55 mg, 0.144 mmol) phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1M) (0.72 mL), and AIBN (15 mg), the compound **86g** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 9:1) as white solid in 96% yield (36.2 mg, 0.14 mmol).

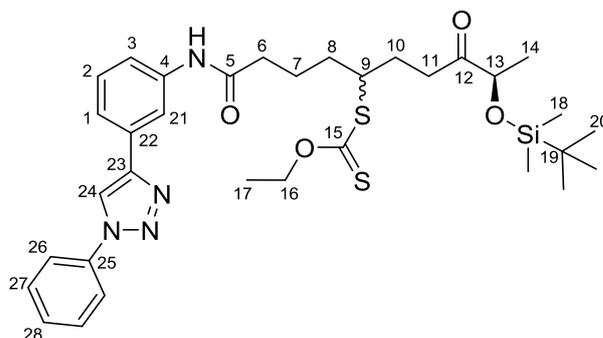


**R<sub>f</sub>** = 0.2 (EtOAc/cyclohexane, 1:9); **IR**  $\nu_{\max}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3364, 2932, 1687, 1602, 1533, 1501, 1437, 1416, 1373; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.05 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 3×H14), 1.20-1.47 (m, 4H, 2×H8, 2×H9), 1.58 (m, 2H, 2×H10), 1.72 (m, 2H, 2×H7), 2.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H6), 2.41 (m, 4H,

2×H11, 2×H13), 7.09 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H1), 7.3 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H2), 7.53 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 2×H3);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.0 ( $\text{CH}_3$ , C14), 23.7 ( $\text{CH}_2$ , C10), 25.5 ( $\text{CH}_2$ , C7), 29.0 ( $\text{CH}_2$ , C8), 29.1 ( $\text{CH}_2$ , C9), 36.1 ( $\text{CH}_2$ , C13), 37.7 (2× $\text{CH}_2$ , C6, C11), 120.0 (2×CH, 2×C3), 124.3 (CH, C1), 129.1 (2×CH, 2×C2), 138.2 (C, C4), 171.6 (C, C5), 212.2 (C, C12); HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_2$  262.1807, found 262.1814.

***S*-((9*S*)-9-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1,8-dioxo-1-((3-(1-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl)amino)decan-5-yl) *O*-ethyl carbonodithioate [85e]**

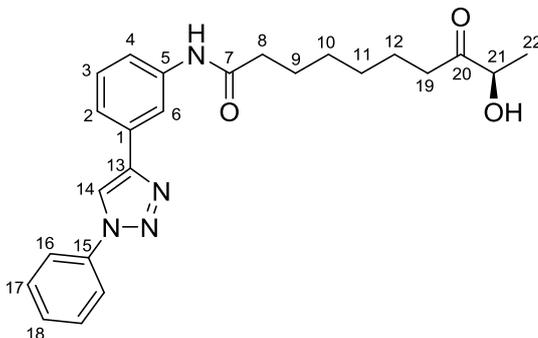
According to the synthesis of the compound **85a**, and starting from compound **81e** (80 mg, 0.24 mmol), xanthate **87** (77.36 mg, 0.85 mmol), DLP (67 mg, 0.168 mmol), the compound **85e** was obtained after purification by column chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}/\text{MeOH}$ , 68:30:2) as white solid in 60% yield (94.4 mg, 0.14 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.15 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}/\text{MeOH}$ , 68:30:2); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3322, 2926, 1721, 1666, 1616, 1600, 1566, 1533, 1508, 1433, 1213, 1116, 1047;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0.07 (s, 3H, 3×H18), 0.91 (s, 9H, 9×H19), 1.28 (m, 3H, 3×H14), 1.41 (m, 3H, 3×H17), 1.67-1.85 (m, 3H, 2×H8, H10b), 1.92 (m, 2H, 2×H7), 2.09 (m, 1H, H10a), 2.44 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, 2×H6), 2.77 (m, 2H, 2×H11), 3.82 (m, 1H, H9), 4.15 (qd,  $J = 6.8, 4.4$  Hz, 1H, H13), 4.62 (m, 2H, 2×H16), 7.39 (m, 1H, H28), 7.45 (m, 1H, H1), 7.50-7.57 (m, 3H, H2, 2×H27), 7.70 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H3), 7.78 (m, 2H, 2×H26), 8.15 (s, 1H, H21), 8.24 (s, 1H, H24);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm - 4.8 (2× $\text{CH}_3$ , 2×C18), 14.0 ( $\text{CH}_3$ , C17), 18.2 ( $\text{CH}_3$ , C14), 21.1 (C, C20), 23.0 ( $\text{CH}_2$ , C7), 25.9 (3× $\text{CH}_3$ , 3×C19), 27.6 ( $\text{CH}_2$ , C10), 34.5 (2× $\text{CH}_2$ , C8, C11), 37.2 ( $\text{CH}_2$ , C6), 50.9 (CH, C9), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , C16), 75.0 (CH, C13), 117.2 (CH, C21), 118.3 (CH, C3), 119.9 (CH, C1), 120.7 (2×CH, 2×C26), 121.7 (CH, C2), 129.0 (CH, C24), 129.9 (3×CH, 2×C27, C28), 130.9 (C, C22), 137.1 (C, C25), 138.9 (C, C4), 148.1 (C, C23), 171.3 (C, C5), 214.0 (C, C12), 214.9 (C, C15); HRMS (ESI+)  $m/z$  calc. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_4\text{SiS}_2$  655.2808, found 655.2807.

**(S)-9-Hydroxy-8-oxo-N-(3-(1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl)decanamide [86e]**

According to the synthesis of compound **86a**, and starting from compound **85e** (74.5 mg, 0.11 mmol) phosphonic acid/Et<sub>3</sub>N (1 M) (0.55 mL), and AIBN (10 mg), the compound **86e** was obtained after purification by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 2:3) as white solid in 72% yield (33.4 mg, 0.08 mmol).

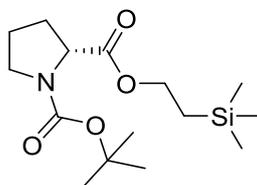


**R<sub>f</sub>** = 0.1 (EtOAc/cyclohexane, 4:6); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 9.9 (c = 1, chloroform); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (film, cm<sup>-1</sup>) 3348, 2927, 1708, 1666, 1613, 1565, 1533, 1490, 1405, 1229; **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 3×H22), 1.40 (m, 4H, 2×H10, 2×H11), 1.67 (m, 2H, 2×H12), 1.77 (m, 2H, 2×H9), 2.40 (m, 2H, 2×H8), 2.50 (m, 2H, 2×H19), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H21), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H18), 7.45 (m, 1H, H2), 7.54 (m, 3H, H3, 2×H17), 7.67 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4), 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×H16), 8.12 (s, 1H, H6), 8.23 (s, 1H, H14); **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 20.0 (CH<sub>3</sub>, C22), 23.5 (CH<sub>2</sub>, C12), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C9), 29.0 (2×CH<sub>2</sub>, C10, C11), 37.7 (2×CH<sub>2</sub>, C8, C19), 72.8 (CH, C21), 117.1 (2×CH, C4, C6), 119.8 (CH, C2), 120.7 (2×CH, 2×C16), 121.7 (CH, C3), 129.1 (CH, C14), 129.9 (3×CH, 2×C17, C18), 131.1 (C, C1), 137.2 (C, C15), 138.9 (C, C5), 148.5 (C, C13), 171.4 (C, C7), 212.9 (C, C20); **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 421.2240, found 421.2241.

**Chapitre III: partie D****(R)-N-Boc-proline-(2-trimethylsilylethyl)ester [93]<sup>183</sup>**

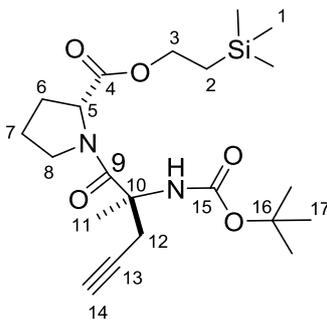
To a solution of D-proline (7.5 g, 65 mmol) and 1N NaOH (130 mL, 130 mmol) in dioxane (33 mL) was added slowly Boc<sub>2</sub>O (16.6 g, 77 mmol, 1.2 equiv) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 30

min at 0°C and overnight at rt. The reaction mixture was concentrated, acidified (pH~2) with 1M KHSO<sub>4</sub> and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give **N-Boc-proline** as white solid in 94% yield (13.15 g, 61.09 mmol). The **N-Boc-proline** (6g, 27.6 mmol) was dissolved in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (140 mL) and cooled to 0°C. To this was added EDC (5.34g, 27.6 mmol), 4-DMAP (0.306 g, 2.52 mmol) and 2-(trimethylsilyl)ethanol (3.66 mL, 2.52 mmol) was added dropwise to the reaction mixture. The reaction was allowed to warm to rt and stir overnight. After the reaction was completed, the solvent was evaporated and the residue was redissolved in EtOAc. This solution was washed with 10% HCl, saturated NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give **93** as colorless oil in 64% yield (5.9 g, 18.70 mmol).



#### **2-(Trimethylsilyl)ethyl ((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-methylpent-4-ynoyl)-D-prolinate [94]**

The compound **93** (1.24 g, 3.95 mmol) was dissolved in 4M HCl in dioxane (9 mL). The mixture was stirred for 2 h at rt. The solvent was evaporated and the material was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and evaporated again to recover the salt. In meantime, to a solution of LiOH (155 mg, 6.45 mmol) dissolved in water (8 mL) was added a solution of **65** (1.12 g, .95 mmol) in THF (8 mL), followed by the addition of methanol (4 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After a 5% aqueous solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> was added until pH 3. The product was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to give the corresponding crude carboxylic acid (0.929 g). The two deprotected amino acids were dissolved in dry anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) and cooled with an ice bath. HOBt hydrate (0.846 g, 5.53 mmol), EDC (1.06 g, 5.53 mmol) and DIEA (1.09 g, 7.9 mmol) were successively added. This mixture was stirred overnight at rt. The solvent was evaporated and the residue was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with 10% citric acid (50 mL), 4% sodium bicarbonate (50 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue obtained was purified by chromatography column on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 15:85) to afford the dipeptide **94** as white solid in 47% yield (0.790 g, 1.86 mmol).



**R<sub>f</sub>** = 0.25 (EtOAc/cyclohexane, 1:4); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (**film**) 3308, 2964, 1721, 1634, 1371, 1254, 1173, 1062; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm 0.16 (s, 9H, 9×H17), 1.12 (m, 2H, 2×H2), 1.55 (s, 9H, 9×H1), 1.66 (s, 3H, 3×H11), 1.95 (s, 1H, H14), 2.10-1.97 (m, 2H, 2×H7), 2.18 (m, 2H, 2×H6), 3.06 (m, 2H, 2×H12), 3.83 (dd, *J* = 13.6, 7.9 Hz, 1H, H8a), 3.89 (dd, *J* = 13.6, 7.9 Hz, 1H, H8b), 4.37-4.24 (m, 3H, 2×H3, H5); **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm - 1.39 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C1), 17.39 (CH<sub>2</sub>, C2), 22.38 (CH<sub>3</sub>, C11), 25.97 (CH<sub>2</sub>, C7), 26.99 (CH<sub>2</sub>, C12), 28.14 (3×CH<sub>3</sub>, 3×C17), 31.00 (CH<sub>2</sub>, C6), 48.00 (CH<sub>2</sub>, C8), 58.38 (C, C10), 61.27 (CH, C5), 63.28 (CH<sub>2</sub>, C3), 71.68 (CH, C14), 79.68 (2×C, C13, C16), 154.00 (C, C15), 170.88 (C, C4), 172.52 (C, C9).

## Biological assay

### HDAC assay using UHPLC-ESI-MS/MS method

Compounds were tested for HDAC inhibition against nuclear extracts from HeLa cells (Enzo Life Sciences, Exeter, UK), and the specific isoform HDAC6 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The HDAC inhibitory activity was determined with a 96-well plate enzymatic assay coupled to UHPLC-ESI-MS/MS detection as previously described.<sup>168</sup> Briefly, test compounds in DMSO (5% DMSO final concentration) were added with 10.5  $\mu$ M MAL substrate into test wells. The reaction was initiated by the addition of enzyme source in assay buffer (50 mM Tris at pH 8.0 adjusted with HCl, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), followed by incubation at 37°C for 4 h. The reaction was stopped by the addition of cold MeCN followed by centrifugation. Supernatants were analyzed by a UHPLC-ESI-MS/MS system equipped with a C18 column. The ratio between areas (deacetylated MAL/acetylated MAL) was obtained to calculate substrate deacetylation rates. HDAC activity was then calculated proportional to the deacetylation rates of non-treated controls (100% HDAC activity). IC<sub>50</sub> values were calculated using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). SAHA was used as positive control.

## Biological materials

Human lymphoblasts (Jurkat) and erythroblasts (K-562) were routinely cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS while HeLa and HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at 37°C and under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The *P. falciparum* 3D7 strain was cultured in human erythrocytes at 5% hematocrit in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM HEPES buffer (pH 7.4) and 10% AB<sup>+</sup> human serum. Petri dishes were incubated at 37°C under a gaseous mixture of 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>.

## *In vitro* toxicity against cancer cell lines and *Plasmodium*

Human cells (Jurkat and K562) growth was measured in microtiter plates (8000 cells/200µl), in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, in presence or not of drug. The drugs were dissolved in DMSO and then further diluted in culture medium so that the final DMSO concentration never exceeded 0.25%. Cell growth was assessed by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine into nucleic acids after 24 h of contact with the drug. Similarly, parasite growth was measured by incubating *P. falciparum* infected erythrocyte suspension (1.5% final hematocrit and 0.6% parasitemia) in culture medium (Hepes-buffered RPMI 1640 + 10% AB<sup>+</sup> human serum) with or without drug during 48h before adding [<sup>3</sup>H]hypoxanthine.<sup>34</sup> Results were expressed as IC<sub>50</sub>, which is the drug concentration leading to 50% inhibition of cell growth. The results are expressed as means +/- SEM. Toxicity against HeLa and HEK293 cells was determined by the XTT assay as previously described.<sup>184</sup> Briefly, HeLa and HEK293 cells were seeded in 96-well plates (10,000 cells/well) and treated immediately at increasing concentrations in triplicates. After 72 h incubation, 50 µL XTT solution (1 mg/mL in culture medium supplemented with electron carrier) were added to the cells and incubated for 4 h. The percentage of cell growth was calculated as the absorbance of each test well divided by that of the vehicle control wells and then multiplied by 100. The concentration that resulted in a 50% reduction in cell growth (IC<sub>50</sub>) was determined from at least five different concentrations using GraphPad Prism 5.0 software.

## Microscopy

For cell permeability studies : HeLa cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were seeded into a 96-well black/µclear plate at 4,500 cells/well. After 24 h incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, the wells were treated with test compounds (0.5% DMSO in Opti-MEM medium) at ranging concentrations in triplicates. Untreated cells (control wells) received vehicle only. After 15 min treatment, cells were washed and left in medium. The plate was then immediately analyzed by a cell imaging multi-mode reader (Cytation 3, Biotek) under bright field and the fluorescence filter for GFP (469/525 nm).

For morphological studies: cells were grown in 8 wells glass bottom  $\mu$ slides (Ibidi®), incubated with each compounds as indicated in figures legends. When indicated, mitochondria were stained before incubation with drugs using Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes) as indicated by the manufacturer. Nuclei were stained with 10 $\mu$ m of Draq 5 (Biostatus) 5 min before observation start. Sample were observed on an Axioobserver (Zeiss) equipped with an incubation chamber set up at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Images were acquired using 63X Apochromat Objective (NA: 1.4) and a CoolSNAP HQ2 camera (Roper scientific), using a CFP filter set for fluorescent compounds, a rhodamine filter set for Mitotracker and a Cy5 filter set for Draq5. Figures were mounted using Fiji software, brightness and contrast was adjusted for optimal rendering.

## Computational part

### Homology model building

A homology model of the HDAC6 catalytic site CD II (from Leu483 to Gly800, Uniprot ID Q9UBN7) was built with MOE 2014.09 ([www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com)). Despite the higher % of identity with class IIa HDACs (HDAC4 and HDAC7), the crystal structure of HDAC8 (PDB code 1T69) was chosen as the template for building the model, as also recently proposed.<sup>172</sup> HDAC8 shares with HDAC6 a catalytic Tyr residue (Tyr306 in HDAC8; Tyr782 in HDAC6), and a similar way of binding inhibitors, making difficult the design of selective inhibitors towards those two isoforms. Alignment of HDAC6 and HDAC8 sequences was carried out with the MOE Align program using default parameters. HDAC6 CD II shares 28% identity, and 46% similarity with HDAC8. Comparative model building was then carried out with the MOE Homology Model module. Fifty intermediate models were built, refined, and scored with GB-IV scoring function, using the AMBER99 force field: a refined and averaged model was finally generated and taken into account. Zinc ion coordinates were transferred from the template to the target. Lateral chains and zinc ion only were then submitted to 1,000 minimization cycles in Sybyl X 1.3 suite (Tripos Inc., St. Louis, MO), using AMBER99 force field, and Powell algorithm. The quality of the minimized model was checked by monitoring Ramachandran plot, MOE Protein Geometry module, Errat, Verify3D, and QMEAN score and results are given in supporting information.

Based on the same protocol, a model was built for *Tg*HDAC3 (Uniprot ID S8K144) with MOE 2014.09. *Hs*HDAC1 (PDB code 4BKX) was chosen as template since it shares 65% identity with *Tg*HDAC3.

Ligands were built and their geometry optimized by using Gaussian09 software at B3LYP/6-31g\* level.

### **Molecular docking**

**GOLD:** The molecular docking calculations were conducted by using the GOLD software, version 5.2 in using the preset options for the genetic GOLD algorithm and the ChemPLP scoring function. Docking was carried out by taking account all residues within 10 Å radius sphere around the Zn ion, thus, comprising the entire catalytic cavities. 100 poses were generated for each ligand. To compare all the solutions, root mean square deviations between different structures are computed and clusters of solutions are formed according value of their rmsd. Best ranked docking poses were then visually inspected in Pymol.

**AUTODOCK:** Docking calculations were carried out on *TgHDAC3* model by using AUTODOCK3.05 software. The grid boxes were set to include all residues of the catalytic pocket and the Zn ion. For the three ligands 54, 55 and 56, the resolution of the grid was 65 × 65 × 65 points with a grid spacing of 0.450 Å. Each ligand was docked into the grid with the Lamarckian algorithm as implemented in AUTODOCK. The cyclotetrapeptide was allowed to freely rotate during docking. The cluster tolerance (rmstol) was set to 2 Å and 256 poses were generated for each ligand. All other parameters were left at the AUTODOCK default settings. Best ranked docking poses were visually inspected with VMD 1.9.2.

### **Molecular dynamics**

The molecular mechanics (MM) dynamics were performed using the AMBER12 software in periodic boundary conditions. Structures of complexes obtained from docking were solvated with a TIP3P water rectangular box. For Zinc atom, non-bonded parameters and a charge of two were added. For ligands, parameters are generated using the program Antechamber of Amber with the GAFF force field and charges were obtained by RESP approach after a Gaussian09 calculation of the electrostatic potential in the MK scheme at the HF/6-31g\* level. The dimensions of the TIP3P water rectangular box were chosen to be at least 10 Å larger than the solute in every direction. Sodium cations were added and long-range electrostatic interactions were computed using the particle-mesh Ewald method with a cutoff value of 10 Å. The time step was set at 1fs. First minimization, heating in NVT ensemble were carried out. Then a MD was run in NPT ensemble at 300K during 5ns. 50 frames were chosen from the dynamic to evaluate the binding energy by the mm-pbsa method.

## NCI analysis

For the NCI analysis, we use the NCI-Plotpackage with promolecular densities.<sup>185</sup> This method calculates an index based on the electron density and the electron density gradient. This index presents singularities at low density when a weak interaction appears between two fragments. The strength of these interactions can also be calculated and isosurfaces can be plotted to visualize the domains of noncovalent interactions.

## **Références bibliographiques**

1. World Health Organization (Geneva, Switzerland). World Malaria Report **2015**. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>
2. World Health Organization (Geneva, Switzerland). Objectifs du Millénaire pour le développement, atteinte de la cible des OMD pour le paludisme, rapport **2015**. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509442/fr/>
3. World Health Organization (Geneva, Switzerland). WHO Global Malaria Programme, Global Technical Strategy meeting reports, **2015**. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/fr/>
4. Eyasu, M., Antimalarial drug resistance: in the past, current status and future perspectives. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *6*, 1-15.
5. Institut de la Francophonie pour la Médecine Tropicale. IFMT MS Paludisme **2011**. [http://www.ifmt.auf.org/IMG/pdf/Plasmodium\\_knowlesi.pdf](http://www.ifmt.auf.org/IMG/pdf/Plasmodium_knowlesi.pdf)
6. <http://www.creapharma.ch/malaria.htm> **2016**
7. Wells, T. N. C.; Alonso, P. L.; Gutteridge, W. E., New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 879-891.
8. World Health Organization (Geneva, Switzerland). World Malaria Report **2014**. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)
9. World Health Organization (Geneva, Switzerland). Weekly epidemiological record. No 4 **2016**, *91*, 33-52.
10. S Clinical Trials Partnership, R. T. S., Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **2015**, *386*, 31-45.
11. Pr Pierre Aubry, Dr Bernard-Alex Gauzère, conseil de santé sur le paludisme, **2014**. <http://www.medecinertropicale.com>
12. Lamar, J, R. Martschinske, G. Tetreault and C. Doud, 2007. Navy Medical Department pocket guide to malaria prevention and control, 1-112.
13. Jones, R. A.; Panda, S. S.; Hall, C. D., Quinine conjugates and quinine analogues as potential antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 335-355.
14. Nzila, A., The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 1043-1054.
15. Batista, R.; De Jesus Silva Júnior, A.; De Oliveira, B. A., Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* **2009**, *14*, 3037-3072.
16. Weiss, L. M.; Dubey, J. P., Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 895-901.
17. Montoya, J. G.; Liesenfeld, O., Toxoplasmosis. *Lancet* **2004**, *363*, 1965-1976.
18. Dard, C.; Fricker-Hidalgo, H.; Brenier-Pinchart, M.-P.; Pelloux, H., Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 492-506.
19. Dubey, J. P.; Miller, N. L.; Frenkel, J. K., The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* **1970**, *132*, 636-662.
20. Frenkel, J. K.; Wallace, G. D., Transmission of toxoplasmosis by tachyzoites: Possibility and probability of a hypothesis. *Med. Hypotheses* **1979**, *5*, 529-532.
21. Dubey, J. P., History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 877-882.
22. Mercier A. Approche écologique, épidémiologique et génétique de la biodiversité de *Toxoplasma gondii* en zone tropicale humide : exemples du Gabon et de la Guyane Française. Thèse de doctorat : Biologie Sciences Santé. Limoges : Université de Limoges, **2010**.

23. Garcia, J. L.; Innes, E. A.; Katzer, F., Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine: Dev. Ther.* **2014**, *4*, 23-37.
24. a) Innes, E. A.; Bartley, P. M.; Maley, S.; Katzer, F.; Buxton, D., Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 246-251.  
b) Buxton, D., Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 335-337.
25. Liu, Q.; Wang, Z.-D.; Huang, S.-Y.; Zhu, X.-Q., Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors.* **2015**, *8*, 1-14.
26. Dardé, M. L.; Peyron, F., Toxoplasme et toxoplasmose. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* **2014**, *27*, 294-308.
27. Tilley, L.; Straimer, J.; Gnädig, N. F.; Ralph, S. A.; Fidock, D. A., Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 682-696.
28. (a) Fernandez-Alvaro, E.; Hong, W. D.; Nixon, G. L.; O'Neill, P. M.; Calderon, F., Antimalarial chemotherapy: natural product inspired development of preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5587-5603. (b) Gamo, F.-J., Antimalarial drug resistance: new treatments options for *Plasmodium*. *Drug Discov. Today* **2014**, *11*, 81-88; (c) Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G., Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2829-2843; (d) Flannery, E. L.; Chatterjee, A. K.; Winzeler, E. A., Antimalarial drug discovery: approaches and progress towards new medicines. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 849-862; (e) Schrader, F. C.; Barho, M.; Steiner, I.; Ortmann, R.; Schlitzer, M., The antimalarial pipeline – An update. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, *302*, 165-171.
29. Wells, T. N. C.; Burrows, J. N.; Baird, J. K., Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 145-151.
30. Shanks, G. D.; Oloo, A. J.; Aleman, G. M.; Ohrt, C.; Klotz, F. W.; Braitman, D.; Horton, J.; Brueckner, R., A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect. Dis.* **2001**, *33*, 1968-1974.
31. O'Neill, P. M.; Barton, V. E.; Ward, S. A., The molecular mechanism of action of artemisinin—The debate continues. *Molecules* **2010**, *15*, 1705-1721.
32. Charman, S. A.; Arbe-Barnes, S.; Bathurst, I. C.; Brun, R.; Campbell, M.; Charman, W. N.; Chiu, F. C. K.; Chollet, J.; Craft, J. C.; Creek, D. J.; Dong, Y.; Matile, H.; Maurer, M.; Morizzi, J.; Nguyen, T.; Papastogiannidis, P.; Scheurer, C.; Shackelford, D. M.; Sriraghavan, K.; Stingelin, L.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wang, X.; White, K. L.; Wittlin, S.; Zhou, L.; Vennerstrom, J. L., Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4400-4405.
33. (a) Capela, R.; Cabal, G. G.; Rosenthal, P. J.; Gut, J.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Lopes, F.; Prudêncio, M., Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4698-4706; (b) Miranda, D.; Capela, R.; Albuquerque, I. S.; Meireles, P.; Paiva, I.; Nogueira, F.; Amewu, R.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Oliveira, R.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Marti, F.; Prudêncio, M.; O'Neill, P. M.; Lopes, F., Novel endoperoxide-based transmission-blocking antimalarials with liver- and blood-schizontocidal activities. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 108-112.
34. Painter HJ, et al. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2007**, *446*, 88-91.

35. Nilsen, A.; LaCrue, A. N.; White, K. L.; Forquer, I. P.; Cross, R. M.; Marfurt, J.; Mather, M. W.; Delves, M. J.; Shackelford, D. M.; Saenz, F. E.; Morrisey, J. M.; Steuten, J.; Mutka, T.; Li, Y.; Wirjanata, G.; Ryan, E.; Duffy, S.; Kelly, J. X.; Sebayang, B. F.; Zeeman, A.-M.; Noviyanti, R.; Sinden, R. E.; Kocken, C. H. M.; Price, R. N.; Avery, V. M.; Angulo-Barturen, I.; Jiménez-Díaz, M. B.; Ferrer, S.; Herreros, E.; Sanz, L. M.; Gamo, F.-J.; Bathurst, I.; Burrows, J. N.; Siegl, P.; Guy, R. K.; Winter, R. W.; Vaidya, A. B.; Charman, S. A.; Kyle, D. E.; Manetsch, R.; Riscoe, M. K., Quinolone-3-diarylethers: a new class of drugs for a new era of malaria eradication. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 177ra37.
36. Yuthavong, Y.; Tarnchompoo, B.; Vilaivan, T.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Charman, S. A.; McLennan, D. N.; White, K. L.; Vivas, L.; Bongard, E.; Thongphanchang, C.; Tawechai, S.; Vanichtanankul, J.; Rattanajak, R.; Arwon, U.; Fantauzzi, P.; Yuvaniyama, J.; Charman, W. N.; Matthews, D., Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16823-16828.
37. Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B. K. S.; Lee, M. C. S.; Zou, B.; Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D. M.; Dharia, N. V.; Tan, J.; Cohen, S. B.; Spencer, K. R.; Gonzalez-Paez, G. E.; Lakshminarayana, S. B.; Goh, A.; Suwanarusk, R.; Jegla, T.; Schmitt, E. K.; Beck, H.-P.; Brun, R.; Nosten, F.; Renia, L.; Dartois, V.; Keller, T. H.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A.; Diagana, T. T., Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science* **2010**, *329*, 1175-1180.
38. Spillman, Natalie J.; Allen, Richard J. W.; McNamara, Case W.; Yeung, Bryan K. S.; Winzeler, Elizabeth A.; Diagana, Thierry T.; Kirk, K., Na(+) regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 227-237.
39. Nagle, A.; Wu, T.; Kuhen, K.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Francek, C.; Chen, Z.; Plouffe, D.; Lin, X.; Caldwell, C.; Ek, J.; Skolnik, S.; Liu, F.; Wang, J.; Chang, J.; Li, C.; Liu, B.; Hollenbeck, T.; Tuntland, T.; Isbell, J.; Chuan, T.; Alper, P. B.; Fischli, C.; Brun, R.; Lakshminarayana, S. B.; Rottmann, M.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A.; Glynne, R.; Tully, D. C.; Chatterjee, A. K., Imidazolopiperazines: lead optimization of the second-generation antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4244-4273.
40. McNamara, C. W.; Lee, M. C. S.; Lim, C. S.; Lim, S. H.; Roland, J.; Nagle, A.; Simon, O.; Yeung, B. K. S.; Chatterjee, A. K.; McCormack, S. L.; Manary, M. J.; Zeeman, A.-M.; Dechering, K. J.; Kumar, T. R. S.; Henrich, P. P.; Gagaring, K.; Ibanez, M.; Kato, N.; Kuhen, K. L.; Fischli, C.; Rottmann, M.; Plouffe, D. M.; Bursulaya, B.; Meister, S.; Rameh, L.; Trappe, J.; Haasen, D.; Timmerman, M.; Sauerwein, R. W.; Suwanarusk, R.; Russell, B.; Renia, L.; Nosten, F.; Tully, D. C.; Kocken, C. H. M.; Glynne, R. J.; Bodenreider, C.; Fidock, D. A.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A., Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature* **2013**, *504*, 248-253.
41. Coteron, J. M.; Marco, M.; Esquivias, J.; Deng, X.; White, K. L.; White, J.; Koltun, M.; El Mazouni, F.; Kokkonda, S.; Katneni, K.; Bhamidipati, R.; Shackelford, D. M.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S. B.; Jiménez-Díaz, M. B.; Gamo, F.-J.; Goldsmith, E. J.; Charman, W. N.; Bathurst, I.; Floyd, D.; Matthews, D.; Burrows, J. N.; Rathod, P. K.; Charman, S. A.; Phillips, M. A., Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5540-5561.

42. Umeda, T.; Tanaka, N.; Kusakabe, Y.; Nakanishi, M.; Kitade, Y.; Nakamura, K. T., Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 8-9.
43. Cobb, R. E.; Bae, B.; Li, Z.; DeSieno, M. A.; Nair, S. K.; Zhao, H., Structure-guided design and biosynthesis of a novel FR-900098 analogue as a potent *Plasmodium falciparum* 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr) inhibitor. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2526-2528.
44. Heilmann, J.; Mayr, S.; Brun, R.; Rali, T.; Sticher, O., Antiprotozoal activity and cytotoxicity of novel 1,7-dioxadispiro[5.1.5.2]pentadeca-9,12-dien-11-one derivatives from *Amomum aculeatum*. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2939-2945.
45. Heilmann, J.; Brun, R.; Mayr, S.; Rali, T.; Sticher, O., Minor cytotoxic and antibacterial compounds from the rhizomes of *Amomum aculeatum*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1281-1285.
46. Salim, A. A.; Su, B.-N.; Chai, H.-B.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Ruskandi, A.; Farnsworth, N. R.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D., Dioxadispiroketal compounds and a potential acyclic precursor from *Amomum aculeatum*. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1849-1853.
47. Chin, Y.-W.; Salim, A. A.; Su, B.-N.; Mi, Q.; Chai, H.-B.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Ruskandi, A.; Farnsworth, N. R.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D., Potential anticancer activity of naturally occurring and semisynthetic derivatives of aculeatins A and B from *Amomum aculeatum*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 390-395.
48. Wong, Y.-S., Synthesis of (+)-aculeatins A and B. *Chem. Commun.* **2002**, 686-687.
49. Baldwin, J. E.; Adlington, R. M.; Sham, V. W. W.; Marquez, R.; Bulger, P. G., Biomimetic synthesis of (+)-aculeatin D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2353-2363.
50. Alvarez-Bercedo, P.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A., Enantioselective synthesis and absolute configurations of aculeatins A, B, D, and 6-epi-aculeatin D. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9641-9649.
51. (a) Peuchmaur, M.; Wong, Y.-S., Diastereodivergent Strategies for the Synthesis of Homochiral Aculeatins. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5374-5379; (b) Chandrasekhar, S.; Rambabu, C.; Shyamsunder, T., Total synthesis of aculeatins A and B via a tethered oxa-Michael approach. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4683-4685; (c) Peuchmaur, M.; Wong, Y.-S., Studies towards the synthesis of aculeatin C. *Synlett* **2007**, 2902-2906; (d) Malathong, V.; Rychnovsky, S. D., Polyol synthesis with beta -oxyanionic alkylolithium reagents: syntheses of aculeatins A, B, and D. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4220-4223; (e) Suresh, V.; Selvam, J. J. P.; Rajesh, K.; Venkateswarlu, Y., Total synthesis of aculeatins A and B from D-glucose. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 1509-1513; (f) Kamal, A.; Reddy, P. V.; Prabhakar, S.; Balakrishna, M., Total synthesis of aculeatins A and B from (S)-malic acid. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 2861-2865; (g) Harbindu, A.; Kumar, P., Synthesis of aculeatins A and B via iterative hydrolytic kinetic resolution. *Synthesis* **2010**, 1479-1484; (h) Yadav, J. S.; Thrimurtulu, N.; Venkatesh, M.; Prasad, A. R., The stereoselective total synthesis of aculeatin A and B via Prins cyclization. *Synthesis* **2010**, 431-436; (i) Yadav, J. S.; Rao, K. V. R.; Ravindar, K.; Subba Reddy, B. V., Total synthesis of (+)-aculeatin D and (+)-6-epi-aculeatin D. *Synlett* **2010**, 51-54; (j) Ramana, C. V.; Pandey, S. K., A modular total synthesis of aculeatins A, B, E, F and 6-epi-aculeatins E, F. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 390-399.
52. Yao, H.; Song, L.; Tong, R., Total synthesis of aculeatin A via double intramolecular oxa-Michael addition of secondary/tertiary alcohols. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1498-1504.

53. Peuchmaur, M.; Saidani, N.; Botte, C.; Marechal, E.; Vial, H.; Wong, Y.-S., Enhanced antimalarial activity of novel synthetic aculeatin derivatives. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4870-4873.
54. Wipf, P.; Lynch, S. M.; Birmingham, A.; Tamayo, G.; Jimenez, A.; Campos, N.; Powis, G., Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1651-1658.
55. (a) McCarty, S. E.; Schellenberger, A.; Goodwin, D. C.; Fuenta, N. R.; Tekwani, B. L.; Calderon, A. I., Plasmodium falciparum thioredoxin reductase (PfTrxR) and its role as a target for new antimalarial discovery. *Molecules* **2015**, *20*, 11459-11473; (b) Krnajska, Z.; Gilberger, T. W.; Walter, R. D.; Muller, S., The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *112*, 219-228.
56. Lion, C. J.; Matthews, C. S.; Wells, G.; Bradshaw, T. D.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D., Antitumour properties of fluorinated benzothiazole-substituted hydroxycyclohexa-2,5-dienones (quinols). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5005-5008.
57. Hall, G.; Bradshaw, T. D.; Laughton, C. A.; Stevens, M. F.; Emsley, J., Structure of Mycobacterium tuberculosis thioredoxin in complex with quinol inhibitor PMX464. *Protein. Sci.* **2011**, *20*, 210-215.
58. Winkler, M.; Maynadier, M.; Wein, S.; Lespinasse, M.-A.; Boumis, G.; Miele, A. E.; Vial, H.; Wong, Y.-S., Uncovering new structural insights for antimalarial activity from cost-effective aculeatin-like derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2064-2077.
59. Lin, J. M.; Prakasha Gowda, A. S.; Sharma, A. K.; Amin, S., In vitro growth inhibition of human cancer cells by novel honokiol analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3202-3211.
60. Chakraborti, A. K.; Sharma, L.; Nayak, M. K., Demand-based thiolate anion generation under virtually neutral conditions: influence of steric and electronic factors on chemo- and regioselective cleavage of aryl alkyl ethers. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6406-6414.
61. Jungong, C. S.; Novikov, A. V., Practical preparation of resveratrol 3-O-D-Glucuronide. *Synth. Commun.* **2012**, *42*, 3589-3597.
62. Ueda, M.; Nishimura, K.; Kashima, R.; Ryu, I., A transition-metal-free cross-coupling reaction of allylic bromides with aryl- and vinylboronic acids. *Synlett* **2012**, *23*, 1085-1089.
63. Johnson, W. S.; Werthemann, L.; Bartlett, W. R.; Brocksom, T. J.; Li, T.-T.; Faulkner, D. J.; Petersen, M. R., Simple stereoselective version of the Claisen rearrangement leading to trans-trisubstituted olefinic bonds. Synthesis of squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 741-743.
64. (a) Fukuyama, T.; Lin, S. C.; Li, L., Facile reduction of ethyl thiol esters to aldehydes: application to a total synthesis of (+)-neothramycin A methyl ether. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7050-7051; (b) Tokuyama, H.; Yokoshima, S.; Lin, S.-C.; Li, L.; Fukuyama, T., Reduction of ethanethiol esters to aldehydes. *Synthesis* **2002**, 1121-1123; (c) Tokuyama, H.; Yokoshima, S.; Yamashita, T.; Lin, S.-C.; Li, L.; Fukuyama, T., Facile palladium-mediated conversion of ethanethiol esters to aldehydes and ketones. *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 381-387.
65. (a) Dohi, T.; Maruyama, A.; Yoshimura, M.; Morimoto, K.; Tohma, H.; Kita, Y., Versatile hypervalent-iodine(III)-catalyzed oxidations with m-chloroperbenzoic acid as a cooxidant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6193-6196; (b) Ochiai, M.; Takeuchi, Y.; Katayama, T.; Sueda, T.; Miyamoto, K., Iodobenzene-catalyzed alpha -acetoxylation of ketones. In situ generation of hypervalent (diacyloxyiodo)benzenes using m-chloroperbenzoic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12244-12245; (c) Ngatimin, M.; Frey, R.; Levens, A.; Nakano, Y.; Kowalczyk, M.; Konstas, K.; Hutt, O. E.; Lupton, D.

- W., Iodobenzene-catalyzed oxabicyclo[3.2.1]octane and [4.2.1]nonane synthesis via cascade C–O/C–C formation. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5858-5861.
66. Deichmann, U., Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Dev. Biol.* **2016**, *416*, 249-254.
67. (a) Arrowsmith, C. H.; Bountra, C.; Fish, P. V.; Lee, K.; Schapira, M., Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 384-400; (b) Johnson, C.; Warmoes, M. O.; Shen, X.; Locasale, J. W., Epigenetics and cancer metabolism. *Cancer Lett.* **2015**, *356* (2, Part A), 309-314; (c) Sharma, S.; Kelly, T. K.; Jones, P. A., Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27-36.
68. Kelly, T. K.; De Carvalho, D. D.; Jones, P. A., Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1069-1078.
69. (a) Copeland, R. A.; Olhava, E. J.; Scott, M. P., Targeting epigenetic enzymes for drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 505-510; (b) Minucci, S.; Pelicci, P. G., Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Rev. Cancer* **2006**, *6*, 38-51.
70. (a) Hakimi, M.-A.; Deitsch, K. W., Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 357-362; (b) Dixon, S. E.; Stilger, K. L.; Elias, E. V.; Naguleswaran, A.; Sullivan, W. J., Jr., A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *173*, 1-9; (c) Duraisingh, Manoj T.; Horn, D., Epigenetic regulation of virulence gene expression in parasitic protozoa. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 629-640.
71. (a) Bougdour, A.; Maubon, D.; Baldacci, P.; Ortet, P.; Bastien, O.; Bouillon, A.; Barale, J.-C.; Pelloux, H.; Menard, R.; Hakimi, M.-A., Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 953-966; (b) Maubon, D.; Bougdour, A.; Wong, Y.-S.; Brenier-Pinchart, M.-P.; Curt, A.; Hakimi, M.-A.; Pelloux, H., Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on *Toxoplasma gondii*: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4843-4850; (c) Andrews, K. T.; Tran, T. N.; Wheatley, N. C.; Fairlie, D. P., Targeting histone deacetylase inhibitors for anti-malarial therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 292-308; (d) Andrews, K. T.; Tran, T. N.; Lucke, A. J.; Kahnberg, P.; Le, G. T.; Boyle, G. M.; Gardiner, D. L.; Skinner-Adams, T. S.; Fairlie, D. P., Potent antimalarial activity of histone deacetylase inhibitor analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1454-1461.
72. Li, G.; Zhu, P., Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 2893-2904.
73. Brodeur, J.; Toussaint, M.; Compactation de la chromatine, Extrait de biologie moléculaire, **2006**, page 9. <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55483>.
74. Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell.* **2007**, *128*, 693-705.
75. (a) Jenuwein, T.; Allis, C. D., Translating the histone code. *Science* **2001**, *293*, 1074-1080; (b) Cui, L.; Miao, J., Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell.* **2010**, *9*, 1138-1149.
76. Rea, S.; Elsenhaber, F.; O'Carroll, D.; Strahl, B. D.; Sun, Z.-W.; Schmid, M.; Opravil, S.; Mechtler, K.; Ponting, C. P.; Allis, C. D.; Jenuwein, T., Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **2000**, *406*, 593-599.
77. Whittle, N.; Singewald, N., HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 569-581.

78. Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I., HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **2009**, *277*, 8-21.
79. (a) Bertrand, P., Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2095-2116; (b) Weerasinghe, S. V. W.; Estiu, G.; Wiest, O.; Pflum, M. K. H., Residues in the 11 Å Channel of histone deacetylase 1 promote catalytic activity: implications for designing isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5542-5551.
80. de Ruijter, A. J. M.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. P., Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 737-749.
81. Carey, N.; La Thangue, N. B., Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 369-375.
82. (a) Wang, D.-F.; Wiest, O.; Helquist, P.; Lan-Hargest, H.-Y.; Wiech, N. L., On the function of the 14 Å long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3409-3417; (b) Wambua, M. K.; Nalawansa, D. A.; Negmeldin, A. T.; Pflum, M. K. H., Mutagenesis studies of the 14 Å internal cavity of histone deacetylase 1: insights toward the acetate-escape hypothesis and selective inhibitor design. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 642-650.
83. Yang, X.-J.; Seto, E., The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 206-218.
84. New, M.; Olzscha, H.; La Thangue, N. B., HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 637-656.
85. Lian, Z.-r.; Xu, Y.-f.; Wang, X.-b.; Gong, J.-p.; Liu, Z.-j., Suppression of histone deacetylase 11 promotes expression of IL-10 in kupffer cells and induces tolerance following orthotopic liver transplantation in rats. *J. Surg. Res.* **2012**, *174*, 359-368.
86. Joshi, M. B.; Lin, D. T.; Chiang, P. H.; Goldman, N. D.; Fujioka, H.; Aikawa, M.; Syin, C., Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *99*, 11-19.
87. Mukherjee, P.; Pradhan, A.; Shah, F.; Tekwani, B. L.; Avery, M. A., Structural insights into the *Plasmodium falciparum* histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5254-5265.
88. Saksouk, N.; Bhatti, M. M.; Kieffer, S.; Smith, A. T.; Musset, K.; Garin, J.; Sullivan, W. J., Jr.; Cesbron-Delauw, M.-F.; Hakimi, M.-A., Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 10301-10314.
89. Roche, J.; Bertrand, P., Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 451-483.
90. Bottomley, M. J.; Lo Surdo, P.; Di Giovine, P.; Cirillo, A.; Scarpelli, R.; Ferrigno, F.; Jones, P.; Neddermann, P.; De Francesco, R.; Steinkuehler, C.; Gallinari, P.; Carfi, A., Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26694-26704.
91. Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P., Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **1999**, *401*, 188-193.
92. Vannini, A.; Volpari, C.; Gallinari, P.; Jones, P.; Mattu, M.; Carfi, A.; De Francesco, R.; Steinkühler, C.; Di Marco, S., Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8–substrate complex. *EMBO rep.* **2007**, *8*, 879-884.

93. Lahm, A.; Paolini, C.; Pallaoro, M.; Nardi, M. C.; Jones, P.; Neddermann, P.; Sambucini, S.; Bottomley, M. J.; Lo Surdo, P.; Carfi, A.; Koch, U.; De Francesco, R.; Steinkühler, C.; Gallinari, P., Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17335-17340.
94. Wu, R.; Wang, S.; Zhou, N.; Cao, Z.; Zhang, Y., A proton-shuttle reaction mechanism for histone deacetylase 8 and the catalytic role of metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9471-9479.
95. Gantt, S. M. L.; Decroos, C.; Lee, M. S.; Gullett, L. E.; Bowman, C. M.; Christianson, D. W.; Fierke, C. A., General base-general acid catalysis in human histone deacetylase 8. *Biochemistry* **2016**, *55*, 820-832.
96. Marks, P. A., Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* **2007**, *26*, 1351-1356.
97. Nelson, K. J.; Parsonage, D.; Hall, A.; Karplus, P. A.; Poole, L. B., Cysteine pKa Values for the Bacterial Peroxiredoxin AhpC. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12860-12868.
98. Lech-Maranda, E.; Robak, E.; Korycka, A.; Robak, T., Depsipeptide (FK228) as a novel histone deacetylase inhibitor: mechanism of action and anticancer activity. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1062-1069.
99. (a) Thaler, F.; Mercurio, C., Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 523-536; (b) Zhang, L.; Han, Y.; Jiang, Q.; Wang, C.; Chen, X.; Li, X.; Xu, F.; Jiang, Y.; Wang, Q.; Xu, W., Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 63-84.
100. Micelli, C.; Rastelli, G., Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 718-735.
101. (a) Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B.-C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W., Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* **2004**, *12*, 1325-1334; (b) Estiu, G.; West, N.; Mazitschek, R.; Greenberg, E.; Bradner, J. E.; Wiest, O., On the inhibition of histone deacetylase 8. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4103-4110; (c) Deschamps, N.; Simoes-Pires, C. A.; Carrupt, P.-A.; Nurisso, A., How the flexibility of human histone deacetylases influences ligand binding: an overview. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 736-742.
102. Balasubramanian, S.; Ramos, J.; Luo, W.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Buggy, J. J., A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* **2008**, *22*, 1026-1034.
103. Huang, W.-J.; Wang, Y.-C.; Chao, S.-W.; Yang, C.-Y.; Chen, L.-C.; Lin, M.-H.; Hou, W.-C.; Chen, M.-Y.; Lee, T.-L.; Yang, P.; Chang, C.-I., Synthesis and biological evaluation of ortho-aryl N-hydroxycinnamides as potent histone deacetylase (HDAC) 8 isoform-selective inhibitors. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1815-1824.
104. Tang, W.; Luo, T.; Greenberg, E. F.; Bradner, J. E.; Schreiber, S. L., Discovery of histone deacetylase 8 selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2601-2605.
105. Suzuki, T.; Ota, Y.; Ri, M.; Bando, M.; Gotoh, A.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Tatum, P. R.; Mizukami, T.; Nakagawa, H.; Iida, S.; Ueda, R.; Shirahige, K.; Miyata, N., Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562-9575.
106. (a) Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Nosaka, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T.; Suzuki, T.; Tsuruo, T.; Nakanishi, O., A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with

- marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4592-4597; (b) Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N.; Saito, A.; Mariko, Y.; Yamashita, T.; Nakanishi, O., Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3001-3003.
107. Zhou, N.; Moradei, O.; Raepfel, S.; Leit, S.; Frechette, S.; Gaudette, F.; Paquin, I.; Bernstein, N.; Bouchain, G.; Vaisburg, A.; Jin, Z.; Gillespie, J.; Wang, J.; Fournel, M.; Yan, P. T.; Trachy-Bourget, M.-C.; Kalita, A.; Lu, A.; Rahil, J.; MacLeod, A. R.; Li, Z.; Besterman, J. M.; Delorme, D., Discovery of N-(2-aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4072-4075.
  108. Fournel, M.; Bonfils, C.; Hou, Y.; Yan, P. T.; Trachy-Bourget, M.-C.; Kalita, A.; Liu, J.; Lu, A.-H.; Zhou, N. Z.; Robert, M.-F.; Gillespie, J.; Wang, J. J.; Ste-Croix, H.; Rahil, J.; Lefebvre, S.; Moradei, O.; Delorme, D.; MacLeod, A. R.; Besterman, J. M.; Li, Z., MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 759-768.
  109. Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E. C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; Chakravarty, P.; Paolini, C.; De Francesco, R.; Gallinari, P.; Steinkühler, C.; Di Marco, S., Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15064-15069.
  110. Bressi, J. C.; Jennings, A. J.; Skene, R.; Wu, Y.; Melkus, R.; Jong, R. D.; O'Connell, S.; Grimshaw, C. E.; Navre, M.; Gangloff, A. R., Exploration of the HDAC2 foot pocket: synthesis and SAR of substituted N-(2-aminophenyl)benzamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3142-3145.
  111. Moradei, O. M.; Mallais, T. C.; Frechette, S.; Paquin, I.; Tessier, P. E.; Leit, S. M.; Fournel, M.; Bonfils, C.; Trachy-Bourget, M.-C.; Liu, J.; Yan, T. P.; Lu, A.-H.; Rahil, J.; Wang, J.; Lefebvre, S.; Li, Z.; Vaisburg, A. F.; Besterman, J. M., Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5543-5546.
  112. Marson, C. M.; Matthews, C. J.; Yiannaki, E.; Atkinson, S. J.; Soden, P. E.; Shukla, L.; Lamadema, N.; Thomas, N. S. B., Discovery of potent, isoform-selective inhibitors of histone deacetylase containing chiral heterocyclic capping groups and a N-(2-aminophenyl)benzamide binding unit. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6156-6174.
  113. Jia, H.; Pallos, J.; Jacques, V.; Lau, A.; Tang, B.; Cooper, A.; Syed, A.; Purcell, J.; Chen, Y.; Sharma, S.; Sangrey, G. R.; Darnell, S. B.; Plasterer, H.; Sadri-Vakili, G.; Gottesfeld, J. M.; Thompson, L. M.; Rusche, J. R.; Marsh, J. L.; Thomas, E. A., Histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting HDAC3 and HDAC1 ameliorate polyglutamine-elicited phenotypes in model systems of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 351-361.
  114. Malvaez, M.; McQuown, S. C.; Rogge, G. A.; Astarabadi, M.; Jacques, V.; Carreiro, S.; Rusche, J. R.; Wood, M. A., HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 2647-2652.
  115. Itoh, Y.; Suzuki, T.; Miyata, N., Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 529-544.
  116. Arai, T.; Ashraful Hoque, M.; Nishino, N.; Kim, H.-J.; Ito, A.; Yoshida, M., Cyclic tetrapeptides with -SS- bridging between amino acid side chains for potent histone deacetylases' inhibition. *Amino Acids* **2013**, *45*, 835-843.

117. Bowers, A.; West, N.; Taunton, J.; Schreiber, S. L.; Bradner, J. E.; Williams, R. M., Total synthesis and biological mode of action of largazole: A potent Class I histone deacetylase inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11219-11222.
118. (a) Suzuki, T.; Kouketsu, A.; Itoh, Y.; Hisakawa, S.; Maeda, S.; Yoshida, M.; Nakagawa, H.; Miyata, N., Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4809-4812; (b) Itoh, Y.; Suzuki, T.; Kouketsu, A.; Suzuki, N.; Maeda, S.; Yoshida, M.; Nakagawa, H.; Miyata, N., Design, synthesis, structure-selectivity relationship, and effect on human cancer cells of a novel series of histone deacetylase 6-selective inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5425-5438.
119. Bürli, R. W.; Luckhurst, C. A.; Aziz, O.; Matthews, K. L.; Yates, D.; Lyons, K. A.; Beconi, M.; McAllister, G.; Breccia, P.; Stott, A. J.; Penrose, S. D.; Wall, M.; Lamers, M.; Leonard, P.; Müller, I.; Richardson, C. M.; Jarvis, R.; Stones, L.; Hughes, S.; Wishart, G.; Haughan, A. F.; O'Connell, C.; Mead, T.; McNeil, H.; Vann, J.; Mangette, J.; Maillard, M.; Beaumont, V.; Munoz-Sanjuan, I.; Dominguez, C., Design, synthesis, and biological evaluation of potent and selective class IIa histone deacetylase (HDAC) inhibitors as a potential therapy for Huntington's disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9934-9954.
120. Lobera, M.; Madauss, K. P.; Pohlhaus, D. T.; Wright, Q. G.; Trocha, M.; Schmidt, D. R.; Baloglu, E.; Trump, R. P.; Head, M. S.; Hofmann, G. A.; Murray-Thompson, M.; Schwartz, B.; Chakravorty, S.; Wu, Z.; Mander, P. K.; Kruidenier, L.; Reid, R. A.; Burkhart, W.; Turunen, B. J.; Rong, J. X.; Wagner, C.; Moyer, M. B.; Wells, C.; Hong, X.; Moore, J. T.; Williams, J. D.; Soler, D.; Ghosh, S.; Nolan, M. A., Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 319-325.
121. Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P., Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10842-10846.
122. Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Grozinger, C. M.; Schreiber, S. L., Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4389-4394.
123. Estiu, G.; Greenberg, E.; Harrison, C. B.; Kwiatkowski, N. P.; Mazitschek, R.; Bradner, J. E.; Wiest, O., Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2898-2906.
124. Weerasinghe, S. V. W.; Estiu, G.; Wiest, O.; Pflum, M. K. H., Residues in the 11 .ANG. channel of histone deacetylase 1 promote catalytic activity: implications for designing isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5542-5551.
125. Kalin, J. H.; Butler, K. V.; Akimova, T.; Hancock, W. W.; Kozikowski, A. P., Second-generation histone deacetylase 6 inhibitors enhance the immunosuppressive effects of Foxp3+ T-regulatory cells. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 639-651.
126. De Vreese, R.; Verhaeghe, T.; Desmet, T.; D'Hooghe, M., Potent and selective HDAC6 inhibitory activity of N-(4-hydroxycarbamoylbenzyl)-1,2,4,9-tetrahydro-3-thia-9-azafluorenes as novel sulfur analogues of Tubastatin A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3775-3777.
127. Bergman, J. A.; Woan, K.; Perez-Villarroel, P.; Villagra, A.; Sotomayor, E. M.; Kozikowski, A. P., Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9891-9899.
128. Auzzas, L.; Larsson, A.; Matera, R.; Baraldi, A.; Deschenes-Simard, B.; Giannini, G.; Cabri, W.; Battistuzzi, G.; Gallo, G.; Ciacci, A.; Vesci, L.; Pisano, C.; Hanessian, S., Non-

- natural macrocyclic inhibitors of histone deacetylases: design, synthesis, and activity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8387-8399.
129. Santo, L.; Hideshima, T.; Kung, A. L.; Tseng, J.-C.; Tamang, D.; Yang, M.; Jarpe, M.; van Duzer, J. H.; Mazitschek, R.; Ogier, W. C.; Cirstea, D.; Rodig, S.; Eda, H.; Scullen, T.; Canavese, M.; Bradner, J.; Anderson, K. C.; Jones, S. S.; Rajee, N., Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* **2012**, *119*, 2579-2589.
  130. Patel, V.; Mazitschek, R.; Coleman, B.; Nguyen, C.; Uргаonkar, S.; Cortese, J.; Barker, R. H., Jr.; Greenberg, E.; Tang, W.; Bradner, J. E.; Schreiber, S. L.; Duraisingh, M. T.; Wirth, D. F.; Clardy, J., Identification and characterization of small molecule inhibitors of a class I histone deacetylase from *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2185-2187.
  131. Andrews, K. T.; Tran, T. N.; Fairlie, D. P., Towards histone deacetylase inhibitors as new antimalarial drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 3467-3479.
  132. Dow, G. S.; Chen, Y.; Andrews, K. T.; Cardia, D.; Gerena, L.; Gettayacamin, M.; Johnson, J.; Li, Q.; Melendez, V.; Obaldia, N., III; Tran, T. N.; Kozikowski, A. P., Antimalarial activity of phenylthiazolyl-bearing hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3467-3477.
  133. Chen, Y.; Lopez-Sanchez, M.; Savoy, D. N.; Billadeau, D. D.; Dow, G. S.; Kozikowski, A. P., A series of potent and selective, triazolylphenyl-based histone deacetylase inhibitors with activity against pancreatic cancer cells and *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3437-3448.
  134. Shen, S.; Kozikowski, A. P., why hydroxamates may not be the best histone deacetylase inhibitors—what some may have forgotten or would rather forget? *ChemMedChem* **2016**, *11*, 15-21.
  135. Lee, M.-S.; Isobe, M., metabolic activation of the potent mutagen, 2-naphthohydroxamic acid, in salmonella *typhimurium* TA98. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4300-4307.
  136. Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Myers, R. W.; Dulski, P. M.; Crumley, T. M.; Allocco, J. J.; Cannova, C.; Meinke, P. T.; Colletti, S. L.; Bednarek, M. A.; Singh, S. B.; Goetz, M. A.; Dombrowski, A. W.; Polishook, J. D.; Schmatz, D. M., Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13143-13147.
  137. Meinke, P. T.; Colletti, S. L.; Doss, G.; Myers, R. W.; Gurnett, A. M.; Dulski, P. M.; Darkin-Rattray, S. J.; Allocco, J. J.; Galuska, S.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H., Synthesis of apicidin-derived quinolone derivatives: parasite-selective histone deacetylase inhibitors and antiproliferative agents. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4919-4922.
  138. (a) Gallo, P.; Latronico, M. V. G.; Gallo, P.; Grimaldi, S.; Borgia, F.; Todaro, M.; Jones, P.; Gallinari, P.; De Francesco, R.; Ciliberto, G.; Steinkuehler, C.; Esposito, G.; Condorelli, G., Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *80*, 416-424; (b) Hildmann, C.; Wegener, D.; Riestler, D.; Hempel, R.; Schober, A.; Merana, J.; Giurato, L.; Guccione, S.; Nielsen, T. K.; Ficner, R.; Schwienhorst, A., Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 258-270.
  139. (a) Colletti, S. L.; Myers, R. W.; Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Dulski, P. M.; Galuska, S.; Allocco, J. J.; Ayer, M. B.; Li, C.; Lim, J.; Crumley, T. M.; Cannova, C.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Meinke, P. T., Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidin. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 107-111; (b) Colletti, S. L.; Myers, R.

- W.; Darkin-Rattray, S. J.; Gurnett, A. M.; Dulski, P. M.; Galuska, S.; Allocco, J. J.; Ayer, M. B.; Li, C.; Lim, J.; Crumley, T. M.; Cannova, C.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Meinke, P. T., Broad spectrum antiprotozoal agents that inhibit histone deacetylase: structure-activity relationships of apicidin. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 113-7.
140. Mori, H.; Abe, F.; Furukawa, S.; Furukawa, S.; Sakai, F.; Hino, M.; Fujii, T., FR235222, a fungal metabolite, is a novel immunosuppressant that inhibits mammalian histone deacetylase (HDAC). II. Biological activities in animal models. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 80-86.
141. Petrella, A.; D'Acunto, C. W.; Rodriguez, M.; Festa, M.; Tosco, A.; Bruno, I.; Terracciano, S.; Taddei, M.; Paloma, L. G.; Parente, L., Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukemia cell lines: Role of Annexin A1. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 740-749.
142. Gomez-Paloma, L.; Bruno, I.; Cini, E.; Khochbin, S.; Rodriguez, M.; Taddei, M.; Terracciano, S.; Sadoul, K., Design and synthesis of cyclopeptide analogs of the potent histone deacetylase inhibitor FR235222. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1511-1519.
143. Traore, M.; Mietton, F.; Maubon, D.; Peuchmaur, M.; Francisco Hilario, F.; Pereira de Freitas, R.; Bougdour, A.; Curt, A.; Maynadier, M.; Vial, H.; Pelloux, H.; Hakimi, M.-A.; Wong, Y.-S., Flexible synthesis and evaluation of diverse anti-apicomplexa cyclic peptides. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3655-3675.
144. Quiclet-Sire, B.; Zard, S. Z., The degenerative radical transfer of xanthates and related derivatives: an unusually powerful tool for the creation of carbon-carbon bonds. *Top. Curr. Chem.* **2006**, *264*, 201-236.
145. Furumai, R.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Yoshida, M.; Horinouchi, S., Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 87-92.
146. Bantscheff, M.; Hopf, C.; Savitski, M. M.; Dittmann, A.; Grandi, P.; Michon, A.-M.; Schlegl, J.; Abraham, Y.; Becher, I.; Bergamini, G.; Boesche, M.; Delling, M.; Duempelfeld, B.; Eberhard, D.; Huthmacher, C.; Mathieson, T.; Poeckel, D.; Reader, V.; Strunk, K.; Sweetman, G.; Kruse, U.; Neubauer, G.; Ramsden, N. G.; Drewes, G., Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 255-265.
147. Schwochert, J.; Lao, Y.; Pye, C. R.; Naylor, M. R.; Desai, P. V.; Gonzalez Valcarcel, I. C.; Barrett, J. A.; Sawada, G.; Blanco, M.-J.; Lokey, R. S., Stereochemistry balances cell permeability and solubility in the naturally derived phepropeptin cyclic peptides. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**.
148. Wang, C. K.; Northfield, S. E.; Swedberg, J. E.; Colless, B.; Chaousis, S.; Price, D. A.; Liras, S.; Craik, D. J., Exploring experimental and computational markers of cyclic peptides: Charting islands of permeability. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 202-213.
149. Kong, Y.; Jung, M.; Wang, K.; Grindrod, S.; Velena, A.; Lee, S. A.; Dakshanamurthy, S.; Yang, Y.; Miessau, M.; Zheng, C.; Dritschilo, A.; Brown, M. L., Histone deacetylase cytoplasmic trapping by a novel fluorescent HDAC inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1591-1599.
150. Hentschel, F.; Sasse, F.; Lindel, T., Fluorescent analogs of the marine natural product psammaphin A: synthesis and biological activity. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7120-7133.

151. Ye, R.-R.; Ke, Z.-F.; Tan, C.-P.; He, L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W., Histone-deacetylase-targeted fluorescent ruthenium(II) polypyridyl complexes as potent anticancer agents. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10160-10169.
152. Ye, R.-R.; Tan, C.-P.; Lin, Y.-N.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W., A phosphorescent rhenium(i) histone deacetylase inhibitor: mitochondrial targeting and paraptosis induction. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8353-8356.
153. Meng, Q.; Liu, Z.; Li, F.; Ma, J.; Wang, H.; Huan, Y.; Li, Z., An HDAC-targeted imaging probe LBH589–Cy5.5 for tumor detection and therapy evaluation. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 2469-2476.
154. Fleming, C. L.; Ashton, T. D.; Nowell, C.; Devlin, M.; Natoli, A.; Schreuders, J.; Pfeffer, F. M., A fluorescent histone deacetylase (HDAC) inhibitor for cellular imaging. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7827-7830.
155. Horobin, R.; Rashid-Doubell, F.; Padiani, J.; Milligan, G., Predicting small molecule fluorescent probe localization in living cells using QSAR modeling. 1. Overview and models for probes of structure, properties and function in single cells. *Biotech. Histochem.* **2013**, *88*, 440-460.
156. Horobin, R. W., Where do dyes go inside living cells? Predicting uptake, intracellular localisation, and accumulation using QSAR models. *Color. Technol.* **2014**, *130*, 155-173.
157. Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q., A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.
158. Ast, S.; Schwarze, T.; Müller, H.; Sukhanov, A.; Michaelis, S.; Wegener, J.; Wolfbeis, O. S.; Körzdörfer, T.; Dürkop, A.; Holdt, H.-J., A highly K<sup>+</sup>-selective phenylaza-[18]crown-6-lariat-ether-based fluoroionophore and its application in the sensing of K<sup>+</sup> ions with an optical sensor film and in cells. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14911-14917.
159. Zhou, Y.; Liu, K.; Li, J.-Y.; Fang, Y.; Zhao, T.-C.; Yao, C., Visualization of nitroxyl in living cells by a chelated copper (II) coumarin complex. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1290-1293.
160. Hirosawa, S.; Arai, S.; Takeoka, S., A TEMPO-conjugated fluorescent probe for monitoring mitochondrial redox reactions. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4845-4847.
161. Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D., Fluorescent peptoids as selective live cell imaging probes. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2646-2651.
162. Hsiao, Y.; Hegedus, L. S., Synthesis of optically active imidazolines, azapenamams, dioxocyclams, and bis-dioxocyclams. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3586-3591.
163. Nebel, K.; Mutter, M., Stereoselective synthesis of isovaline (IVA) and IVA-containing dipeptides for use in peptide synthesis. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4793-6.
164. Seebach, D.; Naef, R., Enantioselective generation and diastereoselective reactions of chiral enolates derived from  $\alpha$ -heterosubstituted carboxylic acids. Preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2704-8.
165. Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J., Reusable polymer-supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition in automation protocols. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1689-1692.
166. Barton, D. H. R.; Ok Jang, D.; Jaszberenyi, J. C., Hypophosphorous acid and its salts: new reagents for radical chain deoxygenation, dehalogenation and deamination. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5709-5712.
167. (a) Heltweg, B.; Dequiedt, F.; Marshall, B. L.; Brauch, C.; Yoshida, M.; Nishino, N.; Verdin, E.; Jung, M., Subtype selective substrates for histone deacetylases. *J. Med. Chem.*

- 2004**, *47*, 5235-5243; (b) Heltweg, B.; Trapp, J.; Jung, M., In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity. *Methods* **2005**, *36*, 332-337.
168. Zwick, V.; Simoes-Pires, C.; Cuendet, M., Cell-based multi-substrate assay coupled to UHPLC-ESI-MS/MS for a quick identification of class-specific HDAC inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, Ahead of Print.
169. Ferreira, S. Z.; Carneiro, H. C.; Lara, H. A.; Alves, R. B.; Resende, J. M.; Oliveira, H. M.; Silva, L. M.; Santos, D. A.; Freitas, R. P., Synthesis of a new peptide-coumarin conjugate: a potential agent against cryptococcosis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 271-275.
170. Chen, Y.; He, R.; Chen, Y.; D'Annibale, M. A.; Langley, B.; Kozikowski, A. P., Studies of benzamide- and thiol-based histone deacetylase inhibitors in models of oxidative-stress-induced neuronal death: identification of some HDAC3-selective inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 842-852.
171. (a) Vickers, C. J.; Olsen, C. A.; Leman, L. J.; Ghadiri, M. R., Discovery of HDAC inhibitors that lack an active site Zn<sup>2+</sup>-binding functional group. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 505-508; (b) Villadsen, J. S.; Kitir, B.; Wich, K.; Friis, T.; Madsen, A. S.; Olsen, C. A., An azumamide C analogue without the zinc-binding functionality. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1849-1855.
172. Senger, J.; Melesina, J.; Marek, M.; Romier, C.; Oehme, I.; Witt, O.; Sippl, W.; Jung, M., Synthesis and biological investigation of oxazole hydroxamates as highly selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1545-1555.
173. Kranz, M.; Murray, P. J.; Taylor, S.; Upton, R. J.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J., Solution, solid phase and computational structures of apicidin and its backbone-reduced analogs. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 383-388.
174. Horne, W. S.; Olsen, C. A.; Beierle, J. M.; Montero, A.; Reza Ghadiri, M., Probing the bioactive conformation of an archetypal natural product HDAC inhibitor using conformationally homogeneous triazole-modified cyclic tetrapeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4718-4724.
175. Ricci, J.; Poulain-Martini, S.; Duñach, E., Catalytic friedel-crafts allylation using Zn(II) triflimidate. *Comptes Rendus Chimie* **2009**, *12*, 916-921.
176. Schmidt, B.; Riemer, M.; Schilde, U., tandem claisen rearrangement/6-endo cyclization approach to allylated and prenylated chromones. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7602-7611.
177. Bozzini, T.; Botta, G.; Delfino, M.; Onofri, S.; Saladino, R.; Amatore, D.; Sgarbanti, R.; Nencioni, L.; Palamara, A. T., tyrosinase and layer-by-layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7699-7708.
178. Schmidt, B.; Hoelter, F.; Kelling, A.; Schilde, U., Pd-Catalyzed arylation reactions with phenol diazonium salts: application in the synthesis of diarylheptanoids. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3357-3365.
179. Huang, M.-Y.; Chen, L.; Li, R.; Jia, X.; Hong, R., Synthesis of (±)-bakuchiol via a pot-economy approach. *Chin. J. Chem.* **2014**, *32*, 715-720.
180. Taber, D. F.; DeMatteo, P. W.; Hassan, R. A., Simplified preparation of dimethyldioxirane (DMDO). *Org. Synth.* **2013**, *90*, 350-357.
181. Nicolai, S.; Sedigh-Zadeh, R.; Waser, J., Pd(0)-catalyzed alkene oxy- and aminoalkynylation with aliphatic bromoacetylenes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3783-3801.
182. Conti, P.; Tamborini, L.; Pinto, A.; Sola, L.; Ettari, R.; Mercurio, C.; De Micheli, C., Design and synthesis of novel isoxazole-based HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4331-4338.

183. Lassen, K. M.; Joullié, M. M., Total synthesis of Lys3 tamandarin M: a potential affinity ligand. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5306-5309.
184. Roehm, N. W.; Rodgers, G. H.; Hatfield, S. M.; Glasebrook, A. L., An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* **1991**, *142*, 257-265.
185. Contreras-Garcia, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J.-P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLLOT: a program for plotting noncovalent interaction regions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 625–632.

## **SYNTHESE ET ETUDES DE MODELISATION MOLECULAIRE DANS L'OPTIMISATION DE LA SELECTIVITE DE NOUVEAUX AGENTS ANTIPARASITAIRES INSPIRES DE PRODUITS NATURELS**

Mots clefs : paludisme, toxoplasmose, apicomplexes, antiparasitaires, aculéatines, oxydation phénolique cascade, FR235222, épigénétique, HDAC, sélectivité

Les aculéatines et FR235222 sont deux familles de molécules d'origine naturelle qui agissent de façons très efficaces sur les parasites intracellulaires de la famille des apicomplexes, responsables notamment du paludisme ou de la toxoplasmose. Dans la première partie de ces travaux, nous avons développé une nouvelle réaction cascade d'oxydation phénolique en « un pot » utilisant un réactif à base d'iode hypervalent en quantité catalytique. Cette stratégie de synthèse flexible et hautement modulable en peu d'étapes, permettra d'accroître l'accessibilité vers de nouveaux analogues aculéatines bioactives. Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à FR235222, un HDACi (inhibiteur des histones désacétylases) qui cible les HDACs de la classe I chez l'homme et l'HDAC3 chez le parasite *T. gondii* responsable de la toxoplasmose. Les HDACs sont des protéines qui jouent un rôle important dans le contrôle des mécanismes épigénétiques. Dans cette étude, un analogue fluorescent du produit naturel a été synthétisé et a permis de confirmer la cible de FR235222 chez l'homme grâce à des études de localisation cellulaire. Par la synthèse et l'évaluation de l'activité HDACi de nouveaux analogues, associées à des études de modélisation moléculaire, nous avons démontré pour la première fois que la tête chélatante céto-hydroxyle et la flexibilité du linker sont responsables de cette sélectivité sur les HDACs de la classe I humaine. Enfin, grâce à ses résultats et à l'identification de différences structurales entre l'HDAC3 humaine et parasitaire, des études de prédiction (docking) ont permis de dégager des caractéristiques essentielles d'un HDACi potentiellement sélectif sur les parasites apicomplexes.

## **SYNTHESIS AND MOLECULAR MODELISATION FOR OPTIMISING THE SELECTIVITY OF NOVEL ANTIPARASITIC AGENTS INSPIRED BY NATURAL PRODUCTS**

Keywords: malaria, toxoplasmosis, apicomplexan, antiparasites, aculeatin, cascade phenolic oxidation, FR235222, epigenetic, HDAC, selectivity

Aculeatins and FR235222 are two families of natural products that are highly effective against apicomplexan parasites, responsible for malaria and toxoplasmosis. In the first part of this work, we developed a new reaction involving a “one pot” phenolic oxidation cascade sequence using a hypervalent iodine reagent in catalytic condition. This flexible synthetic strategy will increase accessibility to new aculeatin derivatives to achieve bioactive compounds. In the second part, we were interested in FR235222, an HDACi (histone deacetylase inhibitor) which targets the class I human HDAC and parasite *T. gondii* HDAC3 responsible for toxoplasmosis. HDACs are proteins that play an important role in the control of epigenetic mechanisms. In this study, a FR235222 fluorescent derivative was synthesized to confirm the FR235222 target in human cells through cellular localization studies. The synthesis and assessment of the activity of new HDACi analogues, combined with molecular modelisation studies, allowed to demonstrate for the first time that the keto-hydroxyl zinc binding group and the flexibility of the linker would be responsible for this selectivity on human class I HDACs. Finally, with these results in hand and the identification of structural differences between human and parasitic HDAC3, prediction studies (docking) have revealed structural determinants to design inhibitors selective for apicomplexan parasites HDACi.