



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Alma Abou Samra

► **To cite this version:**

Alma Abou Samra. Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Chimie thérapeutique. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS390 . tel-01784253

HAL Id: tel-01784253

<https://theses.hal.science/tel-01784253>

Submitted on 3 May 2018

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.

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué
Spécialité de doctorat : Chimie thérapeutique

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le vendredi 24 novembre 2017, par

Alma Abou Samra

Composition du Jury :

Anne-Sophie Voisin Professeur, Université de Caen-Normandie	Présidente
Patricia Melnyk Professeur, Université de Lille	Rapporteuse
Sylvie Michel Professeur, Université Paris-Descartes	Rapporteuse
Laurent Evanno Maître de Conférences, Université Paris-Saclay	Examineur
Fanny Roussi Directrice de recherche CNRS, ICSN-CNRS	Directrice de thèse
Sandy Desrat Chargé de recherche CNRS, ICSN-CNRS	Co-encadrant de thèse

"Whatever a mind of a man can conceive and believe, the hand of a man can achieve"

Sean Covey

Remerciements

First and foremost, I am most grateful to “ARC Foundation for Cancer Research” for the generous three-year PhD grant that I was lucky to benefit from, and for organizing their annual “Young Researchers in Cancerology” Days where I got the chance to attend very rich talks, meet prominent researchers and professors as well as contributors and donors, and make two poster presentations for my research results.

On the other hand, I cannot emphasize how honouring it has been for me to join the “Department of Natural Products and Medicinal Chemistry” in the ICSN, such a leading research institution nationally and internationally, where laborious efforts have materialised into patented innovations, adding to the ever-growing scientific knowledge. Being part of the “Plant Metabolites and Associated Microorganisms: isolation, synthesis and bioactivity” group, first for my Masters internship and then as a PhD fellow, was particularly tempting, especially when considering their long experience with this PhD topic; this is not to mention their strong infrastructure, collaborations, and the promising results and high-rank publications.

For this, I would like to express my sincere gratitude to my PhD director, Dr Fanny Roussi, first for giving me the opportunity to lay hands on this topic during Masters internship, and second for accepting me as part of her team during my PhD. I am grateful to her for her time, attention, and supervision, as well as her caring attitude and valuable advice. Moreover, I cannot thank her enough for giving me the opportunity to attend and present my results in numerous scientific events that have added to me on both personal and professional levels.

My deep gratitude goes as well to Dr Sandy Desrat for his co-supervision, for being there for help and advice when all the doors seemed to be locked, and for mastering the techniques of successful leaders who know well how to get the best out of their students without putting any pressure or making life tough for them. Thank you for your good humour in the lab, and for the numerous outings that we had every now and then, especially the one to Asterix Park!

Special thanks to everyone who has worked on my topic before, particularly to those I have known personally: Dr Marc Litaudon, Dr Vincent Dumontet, Dr Charlotte Gény and Dr Camille Remeur. Thanks for all your efforts and hard work, and for laying the foundations for me to keep going.

I should not forget to mention Tiphaine Peresse, Gwenaëlle Jéséquel, Florent Olivon, Simon Remy and Cécile Apel, as well as our previous colleagues Aline Ducouso, Alba Noël, Melissa Esposito, Laure-Anne Peyrat, Louis-Felix Nothias, Nina Corlay, Sarah Bastide, Florian

Audet and Mathilde Sezerat. Your presence all has added a lot to the cheerful ambiance during work and breaks alike.

Special thanks to Shelly Gapil for being a great friend and someone I could confide in during the past two years, this is not to mention being a cool route and travel companion. I would never forget our quality time with Hazrina Hazni in Geneva or our numerous evenings out. (Let's not talk about all the nagging, complaints and common concerns we shared together).

I cannot but spare special thanks to everyone in CiBi Platform, particularly to Dr Jérôme Bignon, Laure Eloy, Olivier Pamard and Concepcion Garcia, as well as to members of the "Biology and Structural Chemistry" Group: Dr Eric Jacquet, Dr Ewen Lescop, Dr Nadine Assrir and Florian Malard, and to Jean Jean-Pierre LeCaer from the "Mass Spectrometry Group". Thank you all for your time, guidance and all the support you provided me with, be it at the very early stages of my project or when nothing seemed to go right. Working with you has been of great value both personally and professionally.

Thanks to Nicolas Elie, Jean-François Gallard, Karim Hammad, Guillaume Loire and Davide Lê for their dedication in maintaining the mass, NMR and IT common services at their best.

I should not forget to thank our collaborators at the Institut Gustave Roussy: Dr Joëlle Wiels, Dr Aude Robert, Dr Loëticia Favre-Sahbi and Dr Crystal Gov for their valuable work on the cytotoxicity test. I highly acknowledge your patience and efforts.

Words betray me, as always, when it comes to thanking my family who has constantly been by my side despite the distance. Without your support and encouragement that always exceeded my expectations, I would have never surpassed my limits. I might be expected to write something more emotional here, but you know well by now that this is not how or where I can express my gratitude best. What makes the task easier is that words are never necessary between those who can read each other's eyes and minds. All I can hope for is that you keep putting up with my seemingly out-of-the-ordinary choices in life, as this is particularly what makes me different, and YOU raised me up to make a difference.

Now that I am typing the final words of this manuscript, and despite all the moments of grief and despair that I have been through to get this work done, I am sure that someday, I will look back at those times and smile. I am aware that this degree is only the entry ticket to a more challenging professional life and the first step in an unpaved pathway. Yet, I have faith that I am not here by mere coincidence, and an even stronger faith that what lead me all the way will keep guiding me in the darkest tunnels, so let the journey of a thousand miles begin...!

Résumé

La mitochondrie joue un rôle capital dans la mort cellulaire programmée ou apoptose par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl-2. Le dérèglement de l'apoptose dans de nombreux cancers fait de cette voie et des protéines de la famille Bcl-2 des cibles prometteuses pour la thérapie anti-cancéreuse. Le développement de petites molécules ciblant les protéines de la famille Bcl-2 s'est toutefois révélé être un grand défi, et peu d'entre elles ont atteint des études de phase clinique. Cependant, depuis une quinzaine d'années, grâce à des approches variées et souvent innovantes, des composés très actifs ont été développés. Plusieurs composés sont actuellement en essais clinique et une molécule, le venetoclax, a obtenu la première autorisation de mise sur le marché en avril 2016. Ce succès thérapeutique démontre que les protéines de la famille de Bcl-2 sont des cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse.

Les substances naturelles sont une source importante de nouvelles molécules à structures originales, et de nombreux médicaments utilisés actuellement en chimiothérapie sont d'origine naturelle. La meiogynine A est un triterpène dimère qui a été isolé et synthétisé dans notre équipe. Ce composé possède une activité inhibitrice duale des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Des analogues de première et deuxième génération ont été élaborés par la suite, parmi lesquels, certains présentent une activité duale sub-micromolaire. Contrairement aux analogues de première génération, ces composés ne sont cependant pas cytotoxiques, probablement en raison de la présence d'une fonction ester sur la chaîne latérale qui peut s'hydrolyser en un métabolite inactif.

Mon projet de thèse vise à élaborer des analogues de troisième génération de la meiogynine A possédant une activité inhibitrice multiple sub-micromolaire des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 et cytotoxiques sur des lignées cellulaires surexprimant ces mêmes protéines. Pour cela, un essai biologique de mesure d'inhibition de l'interaction Bcl-2/Bim a été mis en place et robotisé afin d'évaluer l'activité biologique des composés synthétisés. De plus, la voie de synthèse bioinspirée d'un précurseur commun des nouveaux analogues a été mise au point à l'échelle de plusieurs grammes. Ce précurseur a permis d'élaborer différents analogues de troisième génération de la meiogynine A en réalisant des pharmacomodulations sur la chaîne latérale afin de remplacer la fonction ester des analogues de deuxième génération par un groupement stable et résistant *in cellulo*. Différentes séries ont été envisagées (alcènes, amines, amides, carbamates et triazoles). L'activité biologique des composés synthétisés a été évaluée sur les trois cibles *in vitro*. Finalement, des analyses de cytotoxicité pour les analogues les plus actifs ont été réalisées par nos collaborateurs à l'Institut Gustave Roussy.

Mots clés

Apoptose, protéine anti-apoptotique, synthèse bioinspirée, pharmacomodulation, polarisation de fluorescence, cytotoxicité

Laboratoire de rattachement

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – UPR 2301

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

1, Avenue de la Terrasse

91198 Gif-sur-Yvette

France

Summary

Apoptosis is used by multicellular organisms to regulate tissue homeostasis through the elimination of useless or potentially harmful cells. The key players of apoptosis are caspases, a family of proteases whose activation is induced by two major signalling pathways. One of these pathways (the intrinsic pathway) is regulated by the Bcl-2 family of proteins. In recent years, numerous studies have shown that overexpression of the antiapoptotic Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1 proteins is involved in the development of many kinds of cancers or confers resistance to apoptosis induced by standard anticancer therapies. Consequently, targeting this family of proteins is a highly promising strategy for tumour treatment.

The feasibility of disrupting protein-protein interactions between anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, using small-molecule inhibitors has been successfully established, and venetoclax was the first to obtain the FDA authorisation in April 2016 as an inhibitor of anti-apoptotic proteins of Bcl-2.

Natural products are still playing a significant role in drug discovery and development process. Thus, from the 1940's to date, 75% of the 175 small molecules used in cancer therapy, are either natural products or derivatives of natural compounds. Screening of plant extracts, marine organisms or microorganisms can provide highly original and functionalized bioactive molecules that are unlikely obtained by screening synthetic libraries. In fact, structural complexity is often a criterion of specificity for biological target.

Meiogynin A is an original molecule isolated from a Malaysian *Annonaceae* and synthesized in our team in 2009. It exhibited a promising inhibitory activity of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1, three anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family whose overexpression is correlated with many cancers. 1st- and 2nd-generation analogs were further elaborated. Despite their remarkable affinity towards target proteins, 2nd-generation analogs lacked cytotoxicity, probably due to the presence of an ester linker that could undergo competitive hydrolysis *in cellulo*, leading to an inactive metabolite.

We aim to develop 3rd-generation analogues of meiogynine A exhibiting high affinity towards multiple anti-apoptotic members of Bcl-2 family as well as cytotoxicity on cancer cells that overexpress these proteins. For this, a new fluorescence polarization inhibition test for Bcl-2/Bim interaction has been implemented, and meiogynine A and its analogues have been tested against the new interaction. In addition to Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid interaction inhibition, these molecules showed an ability to inhibit Bcl-2/Bim interaction. Thus, they are considered multiple inhibitors.

3rd-generation analogues of meiogynine A were obtained by pharmacomodulation of a common precursor that was synthesized on a gram-scale through a bioinspired Diels-Alder

reaction. Several functional groups that have better stability *in vivo* than the ester group were anticipated, such as the amines, amides, carbamates and triazoles. Biological activity of the synthesized analogues was evaluated, and those presenting the best inhibitory profile were evaluated *in cellulo* by our collaborators in the Institut Gustave Roussy.

Keywords

Apoptosis, anti-apoptotic protein, bioinspired synthesis, pharmacomodulation, prodrug, fluorescence polarization, cytotoxicity

Laboratory

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) – UPR 2301
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
1, Avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette
France

Sommaire

REMERCIEMENTS	5
RESUME	9
SUMMARY	11
SOMMAIRE	15
I- LISTE DES ACRONYMES	21
II- LISTE DES FIGURES	25
CHAPITRE I : INTRODUCTION	31
I- LE CANCER	31
A- Généralités	31
B- Chiffres clés du cancer	31
C- Aperçu général sur la thérapie anticancéreuse	33
1- La chimiothérapie conventionnelle et les thérapies ciblées	33
2- La chirurgie	33
3- La radiothérapie	34
4- Les interventions combinées à l'imagerie	34
5- Les nanomédicaments intelligents	34
6- L'immunothérapie	35
7- Les futures perspectives	35
II- L'APOPTOSE	36
A- Définition	36
B- Le mécanisme de l'apoptose :	36
1- La voie extrinsèque	36
2- La voie intrinsèque	36
C- Les acteurs de l'apoptose : les protéines de la famille Bcl-2	37
D- Le mécanisme d'apoptose : la dynamique des interactions protéine-protéine	39
III- LE POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE L'INHIBITION DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2	42
	15

A-	Les peptides BH3-mimétiques	42
B-	Les ASO	43
C-	Les petites molécules inhibitrices (SMIs)	43
1.	Introduction	43
2.	L'inhibition sélective, multiple et la thérapie combinée	43
3.	Exemples de petites molécules BH3-mimétiques inhibitrices des protéines de la famille Bcl-2	44
4.	Récapitulatif des principaux SMIs	59
III-	RESULTATS DU LABORATOIRE	61
A-	Les dérivés du drimane : des inhibiteurs Mcl-1-sélectifs	62
B-	Les kingianines	62
C-	Les analogues de la fissistine	63
D-	La meiogynine A et ses analogues : des inhibiteurs duals de Bcl-xL et Mcl-1	63
E-	Conclusion et objectifs de la thèse	69
	CHAPITRE II : MISE EN PLACE D'UN TEST D'INHIBITION PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE	75
I-	LES ESSAIS BIOLOGIQUES RELATIFS AUX PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 DECRITS DANS LA LITTERATURE	75
A-	L'ELISA	75
B-	Le BRET et le FRET	77
C-	Les billes magnétiques	78
D-	La SPA	79
E-	La cytométrie en flux en mode multiplexe	80
F-	La polarisation de fluorescence	81
1.	Principe du test de polarisation de fluorescence appliqué aux protéines apoptotiques	82
2.	Avantages et inconvénients	82
3.	Historique de l'utilisation d'un test par polarisation de fluorescence dans notre équipe	84
II-	LA MISE EN PLACE D'UN TEST D'INHIBITION PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE	84
A-	Choix du couple de protéines	84
1.	La protéine anti-apoptotique	84
2.	Le peptide pro-apoptotique	88

B-	Mise au point du test	89
1.	Choix des conditions	90
2.	Plan de plaque	90
3.	Choix de la concentration en protéine et détermination de la constante de dissociation K_d	92
4.	Tolérance aux solvants	92
5.	Composés de référence et contrôles positifs	93
6.	Validation du test : le facteur Z'	94
7.	Mesure de fluorescence et traitement des données	95
C-	Résultats biologiques des produits purs isolés ou synthétisés dans l'équipe	99
1.	Les produits issus de l'extraction de plantes	99
2.	Les produits issus de la synthèse organique	102
III-	CONCLUSION	107
CHAPITRE III : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES ANALOGUES DE TROISIÈME GÉNÉRATION DE LA MEIOGYNINE A		113
I-	TRAVAUX ANTERIEURS DU LABORATOIRE SUR LA SYNTHÈSE DES ANALOGUES DE DEUXIÈME GÉNÉRATION DE LA MEIOGYNINE A 29	113
A-	Analyse rétrosynthétique	113
B-	Synthèse du triène 50	114
C-	Synthèse du diénophile 51	115
1.	Synthèse de la cyclohexénone 66	115
2.	Synthèse du diénophile 51	116
D-	Cycloaddition de Diels-Alder bioinspirée finale	117
E-	Analogues de deuxième génération 52 par élongation de la chaîne latérale	118
II-	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	120
III-	SYNTHÈSE MULTI-GRAMME DU PRECURSEUR COMMUN 39 DES ANALOGUES DE TROISIÈME GÉNÉRATION	121
A-	Optimisation de la synthèse de la cyclohexénone 66	121
B-	Essais d'optimisation de la synthèse du triflate 68	122
C-	Optimisation de la synthèse du diénophile 51	124
D-	Optimisation de la synthèse du triène	125
E-	Fin de la synthèse de l'analogue clef 37	126

IV-	SYNTHESE D'ANALOGUES DE TROISIEME GENERATION DE LA MEIOGYNINE A 29	128
A-	Synthèse du dérivé aldéhyde 87	129
B-	Protection des fonctions acides carboxyliques de l'alcool 37 sous forme d'esters méthyliques	130
C-	Oxydation de l'alcool 92 en aldéhyde 93	130
D-	Synthèse de l'alcyne 95	131
E-	Synthèse des amines 73	131
F-	Synthèse des amides 77	133
	1. Synthèse à partir de l'alcool 37	133
	2. Protection des fonctions acides carboxyliques sous forme d'esters acyloxyméthyles	138
	3. Synthèse de l'acide carboxylique 113	139
	4. Synthèse de l'amide 114	139
	5. Activités biologiques des amides 108, 109 et 114 sur protéines	140
	6. Conclusion	142
G-	Synthèse des amides 117	143
	1. Synthèse de l'azoture 122	144
	2. Essais de transformation de l'azoture 122 en amide 126	144
	3. Essais de réduction de l'azoture 118 en amine primaire 119	145
H-	Synthèse des carbamates 134	145
	1. Synthèse	145
	2. Activités biologiques sur protéines	146
	3. Etude de cytotoxicité du carbamate 131-3	147
	4. Conclusion	149
I-	Synthèse des triazoles 76 et 79	150
	1. Synthèse du dérivé alcyne 86	151
	2. Synthèse des triazoles 79	152
V-	ETUDE DE CYTOTOXICITE DE LA MEIOGYNINE A 29	157
VI-	CONCLUSION	158
VII-	CONCLUSION GENERALE	163
VIII-	PARTIE EXPERIMENTALE	169
IX-	LISTE DES REFERENCES	237

I- Liste des acronymes

A

ACN : Acétonitrile
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique cyclique
ALL : Acute Lymphoblastic Leukaemia ou leucémie lymphoblastique aigue
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AML : Acute Myeloid Leukaemia ou leucémie aiguë myéloblastique
APPI : Atmospheric Pressure Photo-Ionization
Ar. : Argon
ARC : Association pour la Recherche sur le Cancer
Arg : Arginine
Asp : Asparagine

B

Bak : BH3 homologous agonist killer
Bax : Bcl-2 associated-x
Bcl-2 : β -cell lymphoma-2
BH : Bcl-2 Homology domains
Bid : BH3 interacting domain death agonist
Bik : Bcl-2 interacting killer
Bim : Bcl-2 interacting mediator
Bmf : Bcl-2 modifying factor
Boo : Bcl-2 homolog of ovary
Bok : Bcl-2 related ovarian killer
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

C

Caspases : CysteinyI-aspartate-cleaving protaase ou protéase à cystéine aspartate-spécifique
CC : Cervical Cancer ou cancer du col de l'utérus
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CF : CarboxyFluoroscéine
CHOP : Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine, Oncovinristine et Prednisone
CI₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50 %
CP : Cancer du Poumon
CS : Cancer du Sein
CST : Cellules Souches Tumorales
Cter : C-terminale

D

Da : Dalton
DCM : Dichlorométhane
DIAD : Diisopropyle azodicarboxylate
DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma ou lymphôme diffus à grandes cellules B
DMF : *N,N*-iméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPA : Diphenyl phosphoryl azide ou l'azoture de diphénylphosphoryle

E

e.e : excès énantiomérique ou enantiomeric excess
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
éq. : equivalent
e.r : enantiomeric ratio
ESI : ElectroSpray Ionization

EtOH : éthanol

EtOAc : Acétate d'éthyle

F

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FDA : Food and Drug Administration

FPA : Fluorescence Polarization Assay

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

G

g : gramme

GC/MS : Chromatographie Gaz couplée à la Spectrométrie de Masse

GST : Glutathion S-Transférase

H

His : Histidine

HL : Hodgkin's Lymphoma ou lymphôme Hodgkinien

HPLC : High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance

HRMS : High Resolution Mass Spectra

Hrk : Hara-kiri

HTS : High Throughput Screening ou Criblage à Haut Débit

I

IBX : Acide 2-iodobenzoïque

ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles

IdRS : Institut de Recherche Servier

IGR : Institut Gustave Roussy

INCa : Institut National du Cancer

IR : Infrared ou Infrarouge

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

I_s : Intensité parallèle

I_p : Intensité perpendiculaire

IPTG : isoPropyl-1-Thio- β -D-Galactopyranoside

K

K_a : Constante d'association

K_d : Constante de dissociation

kDa : kiloDalton

K_i : Constante d'inhibition

L

LC : Liquid Chromatography

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

Leu : Leucine

LLA : Leucémie Lymphoblastique Aigue

M

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia-1

MCL : Mantle Cell Lymphoma ou lymphôme du manteau

MeOH : Méthanol

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

mg : milligramme

MH : Myélome Humain

mL : millilitre

MM : Multiple Myeloma ou myélome multiple

μ M : micromolaire

mM : millimolaire

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeability ou perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie

mP : milliPolarisation

MTBE : Méthyl *tert*-butyl éther

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

MZL : Marginal Zone Lymphoma ou lymphôme de zone marginale

N

NBS : N-BromoSuccinimide

NHL Non-Hodgkin's Lymphoma ou lymphôme non-Hodgkinien

nM : nanomolaire

NMO : N-methylmorpholine-N-oxyde

Nter : N-terminale

P

PC : Cancer de la prostate

pH : power of Hydrogen

ppm : partie par million

PPI : Protein-Protein Interactions ou Interactions Protéine-Protéine

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

R

Rdt : Rendement

r.e. : ratio énantiomérique

RLuc : Luciférase de *Renilla*

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S

SCLC : Small Cell Lung Carcinoma ou carcinomes pulmonaires à petites cellules

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SMI : Small Molecule Inhibitor ou Petite Molécule Inhibitrice

SPA : Scintillation Proximity Assay

T

T.A. : Température Ambiante

TCAF : Triage des Cellules Activées par Fluorescence

THF : Tétrahydrofurane

TLC : Thin Layer Chromatography

TM : TransMembranaire

TMS : Triméthylsilyl

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α ou Facteur de Nécrose Tumorale α

TNFR-1 : Tumor Necrosis Factor Receptor-1

TPAP : Tetrapropylammonium perruthenate

Tyr : Tyrosine

W

WT : Wild Type

Y

YFP : Yellow Fluorescent Protein ou la protéine fluorescente jaune

II- Liste des figures

Figure 1 Incidence et répartition du cancer en France en 2015	32
Figure 2 Le mécanisme de l'apoptose ⁶	37
Figure 3 Structure 3D de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL ²	38
Figure 4 Représentation linéaire du positionnement des domaines d'homologies par rapport aux hélices α ⁸	39
Figure 5 La protéine Bcl-xL en complexe avec la protéine "BH3-seulement" Bim ⁵	39
Figure 6 Le mécanisme d'apoptose ⁹	40
Figure 7 Les trois modèles expliquant les interactions entre les acteurs d'apoptose ⁶	41
Figure 8 Affinités des protéines de la famille Bcl-2 ⁸	42
Figure 9 Structure de l'ABT-737 01	44
Figure 10 Mode de fixation de l'ABT-737 01 dans les poches hydrophobes des protéines cibles ²	45
Figure 11 Docking de l'ABT-737 01 dans la protéine Bcl-xL ⁴	45
Figure 12 Structure de l'ABT-263 02	46
Figure 13 L'ABT-263 02 en complexe avec Bcl-xL ⁴	46
Figure 14 Structure de l'ABT-199 03	47
Figure 15 Simulation 3D du mode de fixation de l'ABT-199 03 dans la protéine cible Bcl-2 ²	47
Figure 16 Mode de fixation de l'ABT-199 03 dans les poches hydrophobes de Bcl-2 ²	47
Figure 17 L'approche par fragment pour le développement du BM-957 06	48
Figure 18 Structure du WEHI-539 07	49
Figure 19 Mode de fixation de WEHI-539 07 dans les poches hydrophobes de Bcl-xL ²	50
Figure 20 Docking moléculaire du mode de fixation de WEHI-539 07 dans la protéine cible Bcl-xL ²⁻³	50
Figure 21 Structure de l'HA14-1 08	51
Figure 22 Modèle de docking moléculaire de l'HA14-1 08 en complexe avec la protéine Bcl-2	51
Figure 23 Structure du S63845 en complexe avec Mcl-1. ⁷	52
Figure 24 Structure du S63845 09	52
Figure 25 Structure commune des dérivés d'isoxazolidine 10	53
Figure 26 Structure de l'obatoclax 11	54
Figure 27 Structure du (R)-gossypol 12	55
Figure 28 Structure de l'apogossypolone 13	55
Figure 29 Etude de docking moléculaire d'apogossypolone 13 dans Bcl-2	56
Figure 30 Structure du TW-37 14	57
Figure 31 Structure du subatoclax 15	57
Figure 32 Structure de l'antimycine A 16	58
Figure 33 Structures du marinopyrrole A 17 et de ses dérivés 18 et 19	59
Figure 34 Coopérations nationales et internationales de notre équipe	61
Figure 35 Structures des dérivés du drimane	62
Figure 36 Structures des kingianines	63
Figure 37 Structures des analogues de la fissistine	63
Figure 38 Photos des parties de la <i>Meiogyne cylindrocarpa</i> , Annonaceae	64

Figure 39 Structure de la meiogynine A 29	64
Figure 40 Analyse rétrosynthétique mettant en jeu l'étape bioinspirée de Diels-Alder	64
Figure 41 Modèle moléculaire de la meiogynine A 29 dans Bcl-xL ¹	65
Figure 42 Structure du composé 32, un analogue de première génération de la meiogynine A 29.....	66
Figure 43 Structure commune des analogues de deuxième génération 33 et leur intermédiaire commun 34	66
Figure 44 Structure du composé 35, un analogue de deuxième génération de la meiogynine A 29.....	67
Figure 45 Structure du composé 36, un analogue de deuxième génération de la meiogynine A 29.....	67
Figure 46 Docking du composé 35 dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL	68
Figure 47 Données de titration du composé 35 sur la protéine Bcl-xL marquée à l'azote 15 (les barres rouges indiquent les résidus élargis).....	68
Figure 48 Docking du composé 36 dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL	69
Figure 49 Possible explication de la non-cytotoxicité d'analogues de deuxième génération de la meiogynine A 29	70
Figure 50 Analyse rétrosynthétique des analogues de troisième génération de la meiogynine A 29.....	70
Figure 51 Principe de l'ELISA : cas d'un inhibiteur de la protéine Bcl-6.....	76
Figure 52 Principe de l'ELISA : cas d'un composé à faible affinité à la protéine Bcl-6.....	76
Figure 53 Principe de la technique BRET utilisé par Vo et coll.....	77
Figure 54 Principe de la technique utilisant des billes magnétiques - cas d'un inhibiteur.....	78
Figure 55 Principe de la technique utilisant des billes magnétiques - cas d'un composé à faible affinité	79
Figure 56 Principe de la technique SPA - cas d'un composé à faible affinité	79
Figure 57 Principe de cytométrie en flux comme utilisé par Cupran et coll.....	80
Figure 58 Principe de spectroscopie de fluorescence.....	81
Figure 59 Principe de teste d'inhibition par polarisation de fluorescence ⁵¹	82
Figure 60 Représentation schématique du phénomène de quenching.....	83
Figure 61 Alignement de la séquence de l'isoforme α de Bcl-2 humaine avec celle de l'isoforme β choisi pour notre test	85
Figure 62 Superposition des squelettes des deux isoformes de Bcl-2 : Bcl-2(1) en rouge et Bcl-2(2) en bleu	85
Figure 63 Le plasmide pET-28a contenant le construit codant pour la protéine Bcl-2	86
Figure 64 Gel SDS-PAGE de l'expression et la purification du deuxième lot de la protéine Bcl-2.....	87
Figure 65 Titrage de la protéine Bcl-2 en présence d'une concentration fixe de Bim-CF (3 nM)	88
Figure 66 Alignement de la séquence du peptide Bim humain avec celle produit par GenePep et utilisée dans nos tests	88
Figure 67 Schéma de l'interaction protéine-ligand.....	89
Figure 68 Plan de plaque d'analyse.....	91

Figure 69 Titration de protéine Bcl-2 en présence d'une quantité fixe de ligand Bim-CF et détermination de K_d	92
Figure 70 Etude de l'effet du DMSO sur les essais de polarisation de fluorescence	93
Figure 71 Tolérance du couple Bcl-2/Bim dans DMSO vs. l'éthanol.....	93
Figure 72 Plan de plaque pour le calcul de Z'	94
Figure 73 Premier volet du tableur Excel	96
Figure 74 Deuxième volet du tableur Excel.....	97
Figure 75 Troisième volet du tableur Excel	98
Figure 76 Dernier volet du tableur Excel.....	99
Figure 77 Structure commune des kingianines 46	101
Figure 78 Structure commune des analogues de la fissionine 47	102
Figure 79 Structure et activité biologique de la meioygnine 29(à gauche), et structure commune 48 des analogues de la meioygnine A 29 (à droite).....	104
Figure 80 Possible explication de la non-cytotoxicité d'analogues de deuxième génération de la meioygnine A 29	107
Figure 81 Liens envisagés pour remplacer la fonction ester dans les analogues de troisième génération	121
Figure 82 Intermédiaires clef 86 et 87	128
Figure 83 Analyse rétrosynthétique des amides 77	134
Figure 84 Structure commune des amides 108, 109 et 114	140
Figure 85 Figure récapitulatif des amides 115 synthétisés.....	143
Figure 86 Analyse rétrosynthétique des amides 117.....	143
Figure 87 Etude de cytotoxicité du composé 131-3 à 10 μ M (mesuré par FACS)	148
Figure 88 Etude de cytotoxicité des composés 131-3 et 132 à 10 μ M (mesuré par FACS) ...	149
Figure 89 Analyse rétrosynthétique des triazoles envisagés	151
Figure 90 Structure de la prodrogue 136-1 et son précurseur diacide 137-1	155
Figure 91 Etude de cytotoxicité du composé 136-1 et son précurseur diacide 137-1 (mesuré par FACS)	155
Figure 92 Etude de cytotoxicité du composé 136-1 pendant 24 h (mesuré par MTT).....	156
Figure 93 Etude de cinétique du composé 136-1 sur une période de 48 h (mesuré par FACS)	157
Figure 94 Les différentes possibilités de fonctionnalisation du triazole 136-1	164
Figure 95 Structure du ligand triazole fluorescent	165

CHAPITRE 1

Chapitre I : Introduction

I- Le cancer

A- Généralités

Le cancer est un terme générique qui regroupe environ 200 maladies génétiques différentes pouvant affecter tous les organes du corps humain et dont la caractéristique commune consiste à produire, à cause d'une série de mutations, des cellules anormales qui se multiplient de façon incontrôlée. En effet, quand une cellule défectueuse échappe à la surveillance du système immunitaire, aux mécanismes de réparation tels que la réparation des brins de l'**ADN (A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique) altérés, ou à un suicide par apoptose, elle devient immortelle, se divise indéfiniment, donnant naissance à une petite tumeur qui grossit puis essaime dans l'organisme en empruntant les vaisseaux sanguins.¹⁰

B- Chiffres clés du cancer

Depuis 2004, le cancer est la première cause de mortalité prématurée en France, devant les maladies cardiovasculaires, et le nombre global de nouveaux cas de cancer en France augmente chaque année.¹⁰ Selon l'Institut National du Cancer (**INCa**), l'incidence du cancer en France métropolitaine était estimée, pour l'année 2015, à **384 442 nouveaux cas diagnostiqués**, dont **210 882 chez l'homme** et **173 560 chez la femme** (Figure 1). En outre, on estime à **149 456**, le nombre de décès par cancer survenus en France en 2015, **84 041**

hommes et 65 415 femmes. Ces données se situent dans la moyenne des pays européens.¹¹⁻¹²

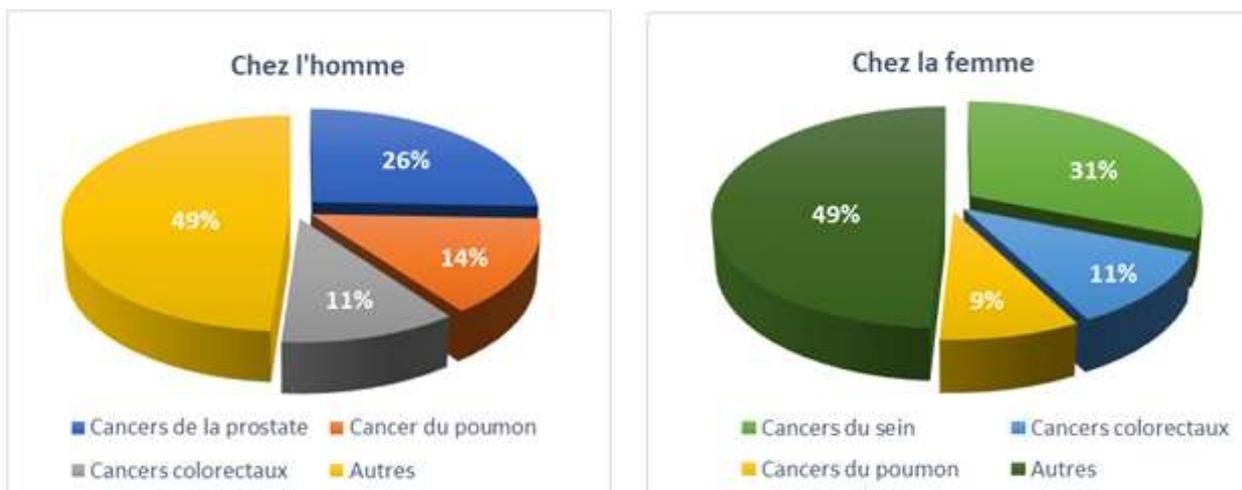


Figure 1 Incidence et répartition du cancer en France en 2015

Au niveau mondial, les cancers ont été responsables de **8,2 millions de décès en 2012 (13 % des décès dans le monde)**, et ce nombre devrait atteindre **11,4 millions en 2025**. Le cancer le plus meurtrier est celui du poumon avec 1,6 million de morts en 2012, devant le foie (750 000), l'estomac (720 000), le cancer colorectal (690 000) et le sein (520 000).¹⁰

Selon le dernier rapport du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), **14,1 millions de nouveaux cas** de cancer ont été diagnostiqués dans le monde en 2014 (environ **1 000 nouveaux cas** sont diagnostiqués chaque jour) et **8,2 millions de personnes** sont décédées d'un cancer. Plus de **60 %** des cas de cancer dans le monde ont été diagnostiqués en Afrique, Asie Amérique centrale et Amérique du sud. Ces régions enregistrent environ **70 %** des décès par cancer dans le monde.¹²

À l'inverse de l'incidence, le taux de mortalité est en constante diminution depuis 25 ans. Sur la période 1989-2010, on observe une amélioration de la survie nette standardisée à 5 ans pour la plupart des cancers. Entre 1989 et 2005, la survie est passée de **80 à 87 %** pour les cancers du sein, de **72 à 94 %** pour les cancers de la prostate, de **54 à 63 %** pour le cancer colorectal mais seulement de **13 à 17 %** pour les cancers du poumon. Cela s'explique par l'amélioration des traitements et des méthodes diagnostiques qui permettent de déceler les cancers à un stade précoce et donc plus facile à prendre en charge : aujourd'hui, un cancer sur deux est guéri en France.^{10, 12}

Au niveau mondial, près de **900 molécules** sont actuellement en cours de développement dans les laboratoires pharmaceutiques. Aujourd'hui, pas loin de **200 médicaments anticancéreux** sont approuvés par les autorités de santé, dont **38 nouvelles molécules** qui ont obtenu des autorisations de mise sur le marché en France entre 2004 et 2012.¹⁰ En 2015, l'autorité de réglementation américaine, la FDA, a approuvé **45 nouveaux anticancéreux** dont 4 sont utilisés pour le traitement du mélanome multiple.¹³ En outre, entre

5 et 10 % des médicaments en études cliniques devraient être commercialisés très prochainement.¹⁰

C- Aperçu général sur la thérapie anticancéreuse

1- La chimiothérapie conventionnelle et les thérapies ciblées

Depuis l'antiquité, des approches de médecine traditionnelle faisant appel à des produits toxiques, comme l'acide nitrique, ont été rapportées pour soigner le cancer.¹⁰ Depuis les années 1940, de petites molécules anticancéreuses élaborées par des techniques classiques de synthèse organique ont émergé et ont permis un premier gain thérapeutique notable.

Alors que les agents cytotoxiques détruisaient sans distinction les cellules saines et malades, tels que le régime **CHOP** (**C**yclophosphamide, **H**ydroxydaunorubicine, **O**ncovinristine et **P**rednisonne) qui cible l'ADN et les microtubules,¹³ les pratiques en oncologie ont été bouleversées suite à l'avancement des connaissances en biologie moléculaire. En effet, grâce à des séquenceurs ultrarapides, des milliers de tumeurs ont été criblées ce qui a permis de déterminer que chez l'homme, plus de **10 % des gènes** pourraient contribuer au développement d'un cancer. A ce jour, près de **350 gènes** associés aux cancers de manière directe ont été identifiés.¹⁰ De plus, la communauté scientifique commence à avoir une vision assez exhaustive des biomarqueurs qui sont associés aux mutations touchant les séquences codantes des principales tumeurs. En outre, la biologie moléculaire a permis de comprendre plus précisément les altérations des voies de signalisations qui sont induites par les cancers.¹³ L'exemple le plus intéressant est l'identification des mutations touchant le récepteur de l'EGF (récepteur au facteur de croissance épidermique humain ou EGFR) dans le cancer du poumon. Ce récepteur à tyrosine kinase est devenu une cible thérapeutique importante avec le développement du **Gefitinib (ZD1839)** au début des années 2000.¹³

Ainsi, **16 des 38 nouveaux traitements anticancéreux** qui ont été mis sur le marché entre 2004 et 2012 en France ont une activité sur une cible cellulaire précise, et aujourd'hui, une dizaine de couples médicament-biomarqueur sont disponibles.¹⁰

2- La chirurgie

L'ablation de tumeurs était déjà pratiquée au temps des pharaons, et le médecin grec Galien recommandait l'excision complétée par une cautérisation à chaud pour éradiquer le cancer.

Aujourd'hui, l'acte chirurgical reste à la base des soins contre les tumeurs solides et le traitement de référence contre la quasi-totalité des tumeurs primaires localisées. Il joue également un rôle important dans le traitement des tumeurs secondaires et des métastases. En 2011, d'après les chiffres de l'INCa, plus de **370 000** patients atteints d'un cancer ont subi une opération chirurgicale.¹⁰⁻¹¹

Depuis quelques années, ces actes chirurgicaux ont été révolutionnés par la collaboration des chirurgiens avec les chimiothérapeutes, avec par exemple l'administration de cytotoxiques qui freinent la croissance des métastases, suivie d'une intervention chirurgicale ou, dans le cas des tumeurs cérébrales, l'administration d'une chimiothérapie au moment de l'exérèse. Très récemment, des robots-chirurgiens guidés par l'imagerie ont permis de réduire de manière considérable la durée des hospitalisations.¹⁰

3- La radiothérapie

Il a fallu attendre la découverte des rayons X par le physicien allemand Röntgen en 1895, puis le développement de la radiothérapie au début de XX^e siècle par Marie Curie et Henri Becquerel pour disposer d'une alternative crédible à l'ablation. La technique repose sur l'irradiation externe de la tumeur par des faisceaux de rayons X haute énergie et d'électrons produits par un accélérateur linéaire. Cette approche est, aujourd'hui, appliquée à de nombreuses tumeurs solides : sein, prostate, foie, poumon et cerveau. Cette discipline a connu ces dernières années une double mutation : une plus grande précision des rayonnements et des dosages améliorés ce qui résulte en une réduction considérable du nombre des séances.¹⁰ On estime à près de **60 %** des malades recevant un traitement par radiothérapie au cours de leurs soins.¹⁰⁻¹¹

4- Les interventions combinées à l'imagerie

L'imagerie est un terme général qui regroupe plusieurs techniques : la fluoroscopie, l'échographie, le scanner, l'imagerie par résonance magnétique (**IRM**), etc. Elle est largement utilisée, non seulement pour affiner un diagnostic, mais aussi pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Son principe repose sur la détection des caractéristiques particulières de la cellule cancéreuse, notamment de son activité biologique, différente de celle des cellules saines.^{10, 14} En couplant une technique d'imagerie à d'autres approches, il est possible de visualiser des tumeurs trop petites pour que les chirurgiens les repèrent à l'œil nu. Elles seront retirées par la suite de manière plus précise et moins invasive qu'auparavant, ou bien détruites grâce à des sondes délivrant de façon très localisée des radiofréquences, de la thermothérapie ou de la cryothérapie. Ces techniques croisées ont déjà permis d'accéder à des tumeurs de certains organes comme le foie ou le pancréas en passant par le système urinaire, le tube digestif, le réseau vasculaire ou la peau.¹⁰

5- Les nanomédicaments intelligents

Les nanomédicaments sont désormais utilisés en cancérologie. Il s'agit de nanoparticules ou de liposomes de taille nanométrique, constituées d'une double membrane lipidique qui ressemble à la membrane cytoplasmique. De ce fait, elles sont capables de circuler dans l'organisme sans éveiller l'attention du système immunitaire. Ces nanoparticules peuvent être biomarquées, c'est-à-dire, elles portent un ligand spécifique d'une cible biologique potentielle. Ceci leur permet d'atteindre leur cible de manière spécifique. Elles peuvent également être chargées d'un principe actif efficace mais très toxique qui n'est libéré

que lorsqu'elles atteignent leur cible. Cela leur permet de détruire sélectivement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets néfastes des agents cytotoxiques.¹⁰ De nombreux nanoparticules chargés sont actuellement sur le marché, comme par exemple l'Abraxane® autorisé en 2005 qui est chargé en paclitaxel. Un deuxième exemple est le Marqibo® autorisé en 2012 et chargé en vincristine.¹⁵

6- L'immunothérapie

L'immunothérapie fait appel à l'intelligence du système immunitaire pour identifier puis éliminer les cellules cancéreuses. Elle a d'ailleurs été reconnue comme l'une des dix découvertes majeures de l'année 2013 par le magazine américain *Science*. Cette approche implique l'association d'un anticorps monoclonal (ex. le trastuzumab) ciblant un récepteur particulier des cellules cancéreuses, et un agent cytotoxique (ex. l'emtansine) qui sera libéré puis internalisé dans la cellule anormale une fois arrivé à destination. Cet anticorps conjugué, commercialisé sous le nom de Kadcyra®, a donné des résultats positifs sur certains cancers du sein dits HER2 positifs. Il est désormais autorisé par les autorités de santé.¹⁰

Une autre approche, en cours de développement par le laboratoire suisse Roche, consiste à associer un anticorps monoclonal avec du plomb radioactif ²¹²Pb radioactif.¹⁰

En outre, des pistes de vaccins préventifs sont administrées à des sujets sains pour les protéger d'une infection favorisant l'apparition de certains cancers. C'est le cas du vaccin contre le papillomavirus humain, responsable du cancer du col de l'utérus.¹⁰

L'immunothérapie est un domaine très prometteur. Alors que la thérapie ciblée donne des réponses transitoires mais quantitativement plus importantes, l'immunothérapie donne des réponses assez durables et qualitativement meilleures.¹⁰

7- Les futures perspectives

Le domaine de la cancérologie commence à s'orienter de plus en plus vers la médecine personnalisée qui tient compte des spécificités de chaque tumeur ainsi que du profil de chaque malade pour apporter des réponses thérapeutiques précises et efficaces.

Par ailleurs, l'identification puis l'élimination des cellules souches tumorales (**CST**) qui sont à l'origine des tumeurs et de métastases sera peut-être la dernière étape de la guerre contre le cancer. Les CST représentent environ 1 cellule sur 10 000 présentes dans une tumeur. Ces cellules difficilement identifiables sont jusqu'à présent peu sensibles aux traitements existants.¹⁰

II- L'apoptose

A- Définition

Dans le but de maintenir l'homéostasie d'un organisme pluricellulaire, toute cellule qui échappe à un fonctionnement normal à cause de l'endommagement de son ADN, et qui représente donc un danger pour l'organisme, est éliminée par différents mécanismes d'autodestruction, tels que l'autophagie, la nécrose, ou l'apoptose.²

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée des cellules défectueuses qui est rapide, irréversible et sous contrôle génétique. Il induit, de plus, un minimum de réponse inflammatoire et de dommage au niveau des tissus adjacents.⁸

B- Le mécanisme de l'apoptose :

D'un point de vue mécanistique, et selon le type de stimulus qui la déclenche, l'apoptose procède selon deux voies principales : la voie extrinsèque, et la voie intrinsèque ou mitochondriale. Elles se terminent, toutes deux, par l'activation des protéases à cystéine dites caspases (**C**ysteiny**l**-**a**s**p**artate-cleaving prote**a**se ou protéase à cystéine aspartate-spécifique) permettant la dégradation du contenu cellulaire.^{2, 5, 8, 16-17}

1- La voie extrinsèque

Comme illustré dans la Figure 2, la voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par la liaison d'un ligand extracellulaire, comme le facteur de nécrose tumorale (**TNF- α**), aux récepteurs de mort (dans ce cas le TNF-R1, Fas/CD95 ou TRAIL-R). Ce complexe induit l'activation de la caspase 8 dite « initiatrice » qui active des caspases dites « effectrices » conduisant à la destruction de la cellule.^{2, 5, 8, 16-17}

2- La voie intrinsèque

Cette voie est contrôlée par la famille des protéines **Bcl-2** (**β -cell lymphoma-2**). Contrairement à la voie extrinsèque, la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure 2) est initiée par un signal intrinsèque comme une activation d'oncogènes, des dommages de l'ADN, la privation des facteurs de croissance ou la perturbation de voies de signalisation.⁸

Cette famille de protéines est donc activée en réponse à un stress cellulaire ; elle induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale extérieure ou MOMP (**M**itochondrial **O**uter **M**embrane **P**ermeability), la libération hors de celle-ci, du cytochrome c dans le cytosol, permettant l'activation des caspases, et par conséquent la mort cellulaire.^{2, 5, 8, 16-17-18}

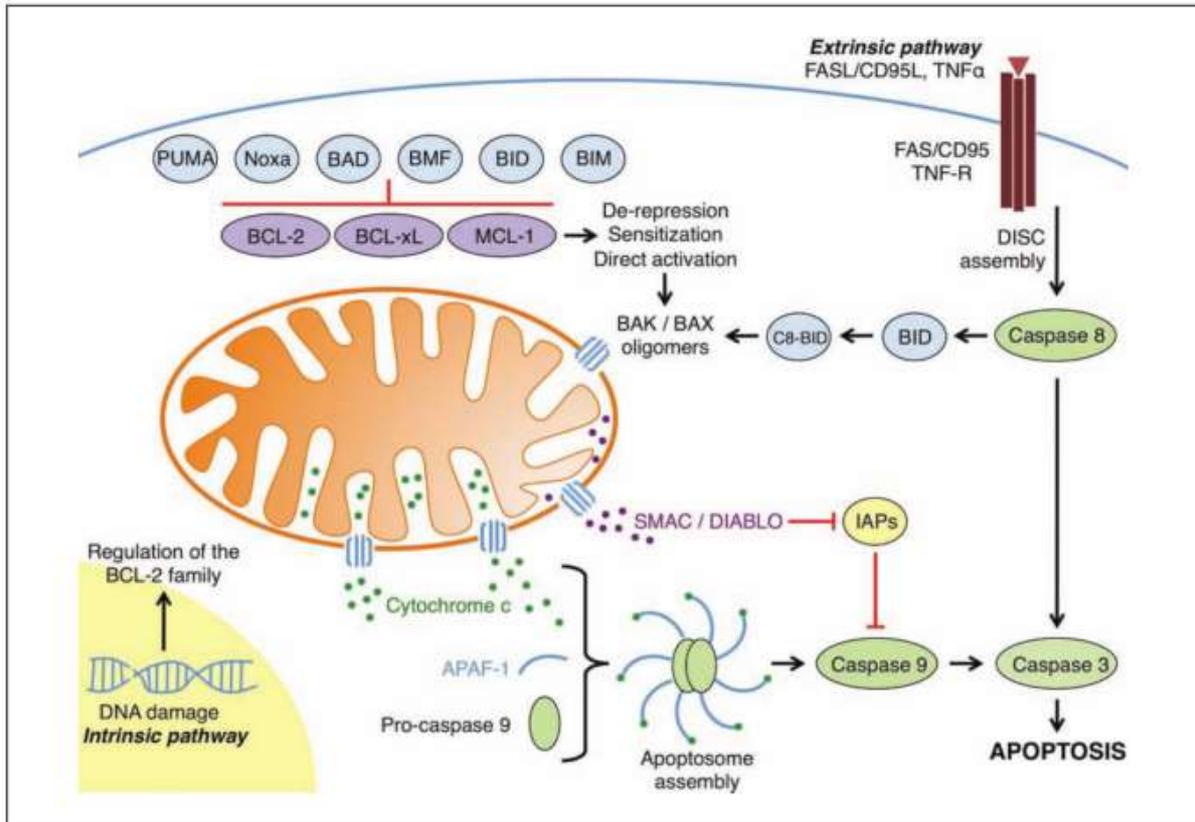


Figure 2 Le mécanisme de l'apoptose ⁶

C- Les acteurs de l'apoptose : les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en deux groupes :

- les protéines anti-apoptotiques : ces protéines ont pour fonction d'inhiber le déclenchement de l'apoptose, et donc favorisent la survie de la cellule. Aujourd'hui, 7 membres de ce groupe sont bien décrits : **Bcl-2** (**β**-cell lymphoma-2), **Bcl-xL** (Bcl-extra Long), **Mcl-1** (**M**yeloid **c**ell **l**eukaemia-1), **Boo** (**B**cl-2 **h**omolog of **o**vary), **Bcl-w**, **Bcl-b**, et **Bfl-1/A1**^{2, 5, 16, 19} ;
- les protéines pro-apoptotiques : comme leur nom l'indique, ces protéines favorisent la mort cellulaire par apoptose.¹⁹

D'un point de vue structural, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 se composent de 9 hélices α . A l'exception des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 9$ qui sont hydrophobes, ces hélices α ont un caractère amphipathique.⁸ La Figure 3 présente une simulation tridimensionnelle de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL figurant sa structure globulaire et le positionnement des différentes hélices α .²

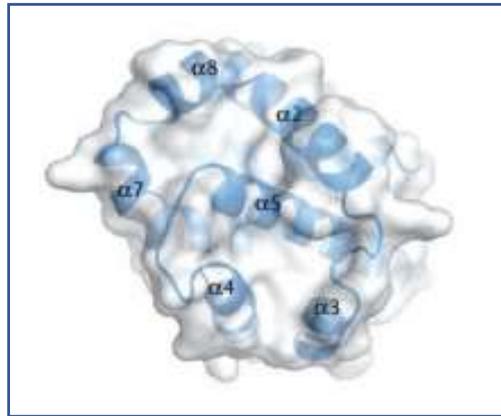


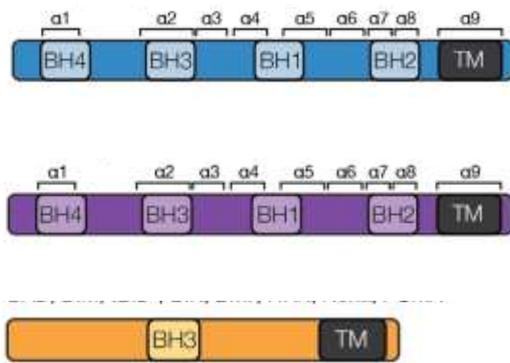
Figure 3 Structure 3D de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL²

Les protéines de la famille Bcl-2 comprennent 1 à 4 domaines d'homologie appelés « **B**cl-2 **H**omology domains » ou **BH1**, **BH2**, **BH3** et **BH4**. Ces actrices de l'apoptose doivent leurs fonctions à ces domaines d'homologie qui leur confèrent leur structure tridimensionnelle, et par conséquent, la capacité à créer entre elles des interactions protéine-protéine « ou **P**rotein-**P**rotein **I**nteractions **P**PIs ». ^{2, 5, 8, 16-17} De plus, grâce à un domaine **T**rans**M**embranaire (**TM**), les protéines telles que Bax, Bak et Bok sont ancrées dans la membrane extérieure de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique, ou dans la membrane nucléaire.²⁰

En fonction de la présence, ou non, de certains domaines d'homologie, les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-groupes :

- Les protéines pro-apoptotiques multidomaines : **Bax** (**B**cl-2 **a**ssociated-**x**), **Bak** (**B**H3 homologous **a**gonist **k**iller), et **Bok** (**B**cl-2 related **o**varian **k**iller). Celles-ci sont localisées dans la membrane mitochondriale. Elles partagent au moins trois domaines d'homologie : BH1, BH2 et BH3.^{2, 5, 16, 19}
- Les protéines pro-apoptotiques « BH3-seulement » : appelées ainsi car elles ne présentent qu'un seul domaine d'homologie (BH3). Ce sont les protéines **Bim** (**B**cl-2 **i**nteracting **m**ediator), **Bid** (**B**H3 **i**nteracting **d**omain death agonist), **Bad**, **Bik** (**B**cl-2 **i**nteracting **k**iller), **Bmf** (**B**cl-2 **m**odifying **f**actor), **Hrk** (**H**ara-**k**iri), **Puma** (**p**53 **u**pregulated **m**odulator of **a**poptosis) et **Noxa** (du Latin "dommage"). Elles sont localisées dans le cytoplasme.^{2, 5, 16, 19}

La Figure 4 est une représentation schématique du positionnement des domaines d'homologie BH des protéines de la famille Bcl-2 par rapport aux hélices α .⁸



Les protéines anti-apoptotiques :

Bcl-2, Bcl-B, Bcl-w, Bcl-xL, Bfl-1/A1, Mcl-1

Les protéines pro-apoptotiques

multidomaines : Bak, Bax, Bok

Les protéines pro-apoptotiques « BH3-

seulement » : Bad, Bim, tBid, Bik, BMF, HRK, Noxa, PUMA

Figure 4 Représentation linéaire du positionnement des domaines d'homologies par rapport aux hélices α ⁸

D- Le mécanisme d'apoptose : la dynamique des interactions protéine-protéine

Dans les conditions physiologiques normales, les protéines anti-apoptotiques, ancrées dans la membrane extérieure de la mitochondrie, ne sont pas actives. Elles séquestrent, dans un sillon hydrophobe, les protéines pro-apoptotiques multidomaines au niveau de leur domaine BH3, formant ainsi des hétérodimères stables.²¹ En réponse à un stress cellulaire, les protéines pro-apoptotiques « BH3-seulement » sont activées par modifications post-traductionnelles. Elles forment des complexes avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce qui permet la désactivation des protéines anti-apoptotiques et libération des protéines pro-apoptotiques multidomaines Bax/Bak.²⁻⁴ La Figure 5 représente la protéine Bcl-xL en complexe avec la protéine "BH3-seulement" Bim.

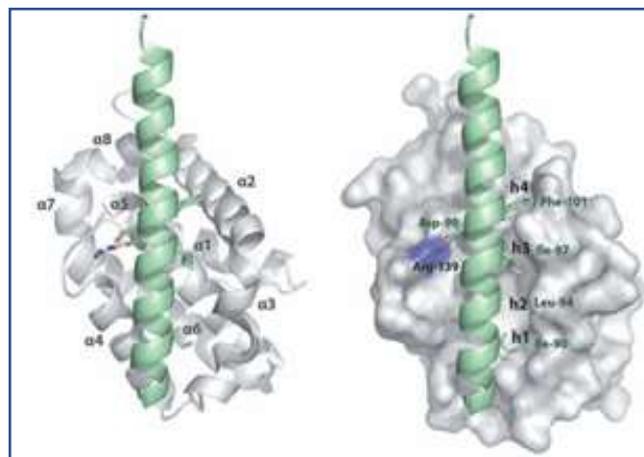


Figure 5 La protéine Bcl-xL en complexe avec la protéine "BH3-seulement" Bim ⁵

Les protéines pro-apoptotiques multidomaines Bax/Bak libres subissent elles-mêmes des changements allostériques induisant la formation d'homo-oligomères, la formation de pores dans la membrane mitochondriale, et la libération du cytochrome *c*. Cela active une cascade de caspases suivie par une série de réponses physiologiques qui se terminent par la mort cellulaire. Les étapes clés de ce processus sont illustrées dans la Figure 6.^{2, 5, 16, 19}

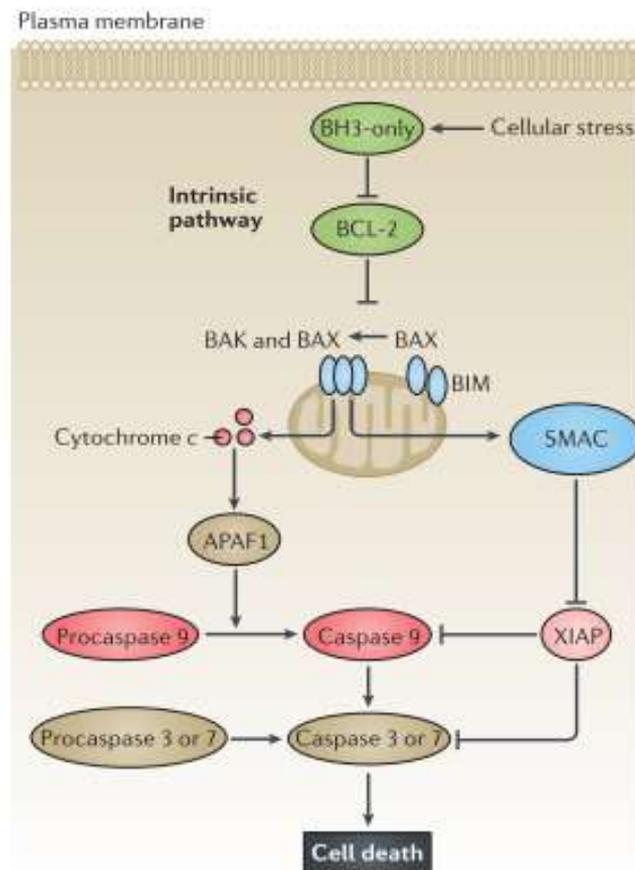


Figure 6 Le mécanisme d'apoptose⁹

Il faut noter que le(s) mécanisme(s) exact(s) par le(s)quel(s) les protéines « BH3-seulement » interagissent avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour promouvoir l'activation Bak/Bax, la perméabilisation de la membrane mitochondriale extérieure, et l'apoptose sont encore mal connus. Trois modèles expliquant les interactions entre ces acteurs d'apoptose s'opposent actuellement :⁶

I. La sensibilisation :

Dans ce modèle, une protéine « BH3-seulement » sensibilisatrice (comme **Bmf**) se lie à une protéine anti-apoptotique (comme **Bcl-2**) ce qui la rend inactive et l'empêche d'inhiber une protéine pro-apoptotique activatrices. Un activateur direct (comme **Bim**) est induit en conséquence. Il active les protéines effectrices (**Bak** et **Bax**), qui homo-oligomérisent et induisent une cascade de réaction qui se termine par la mort cellulaire par apoptose. Selon ce modèle, les protéines « BH3-seulement » ont sensibilisé la cellule à la stimulation apoptotique (Figure 7).⁶

II. La dérépression :

Dans ce modèle, un activateur direct (comme **Bid**) est séquestré par une protéine anti-apoptotique (comme **Bcl-2**). En réponse au stress cellulaire, une protéine de dérépression « BH3-seulement » (comme **Puma**) est induite. Elle se lie à **Bcl-2**, déplaçant ainsi l'activateur direct **Bid** et lui permettant d'activer les effecteurs qui induisent l'apoptose (Figure 7).⁶

III. La neutralisation :

Dans ce modèle, Bak et Bax sont liés à l'état basal et inhibés par les protéines anti-apoptotiques. Lors d'un stress cellulaire, des protéines « BH3-seulement » (comme **Bad**) sont induites et se lient aux protéines anti-apoptotiques, libérant les protéines effectrices Bak/Bax qui peuvent oligomériser et induire l'apoptose. Ce modèle ne prend pas en compte les interactions directes entre les protéines anti-apoptotiques activatrices et effectrices (Figure 7).⁶

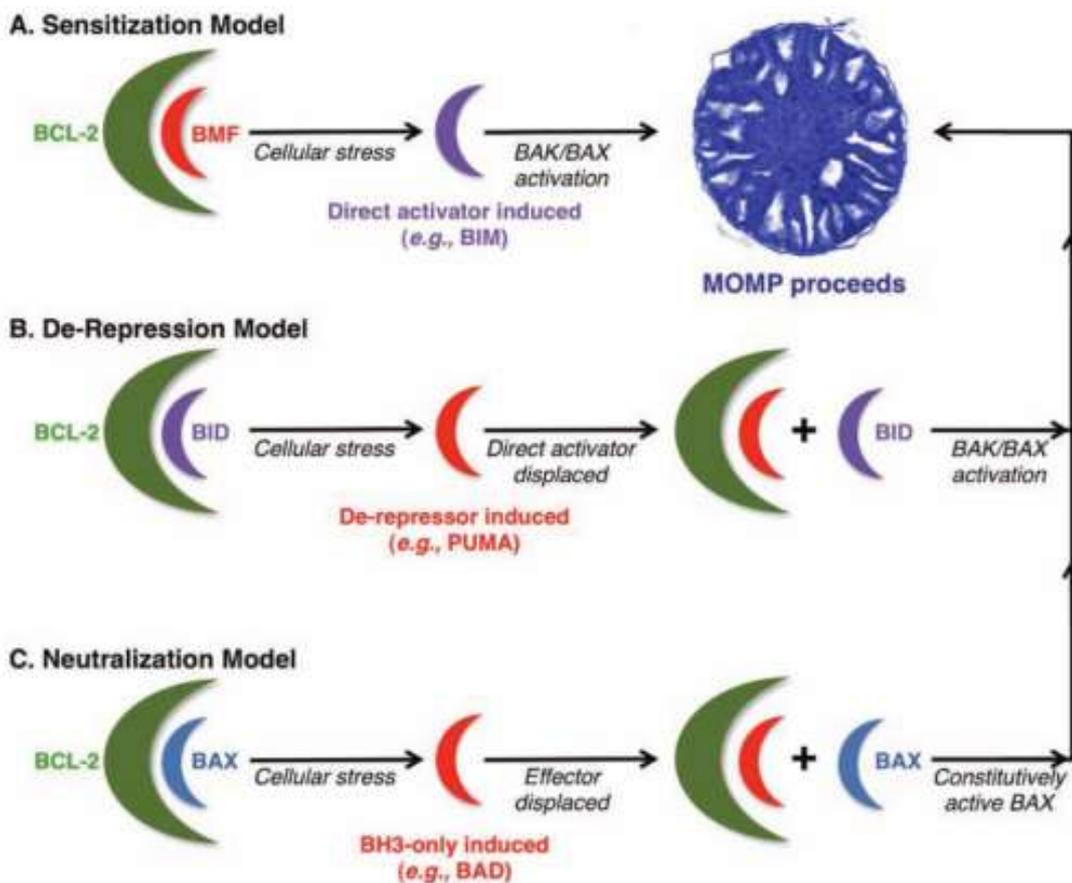


Figure 7 Les trois modèles expliquant les interactions entre les acteurs d'apoptose ⁶

Quel que soit le mécanisme par lequel les protéines pro-apoptotiques interagissent avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour promouvoir l'apoptose, le profil d'affinité des unes par rapport aux autres est bien identifié (Figure 8).⁸ En effet, les protéines pro-apoptotiques « BH3-seulement » Bim, PUMA et tBid sont capables de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques ainsi qu'aux protéines pro-apoptotiques multidomaines Bak et

Bax. Alors que Bax est capable de se lier à toutes les protéines anti-apoptotique, la protéine Bak n'est capable qu'à se lier à certaines protéines anti-apoptotique : Bcl-xL, Mcl-1 et Bfl-1.

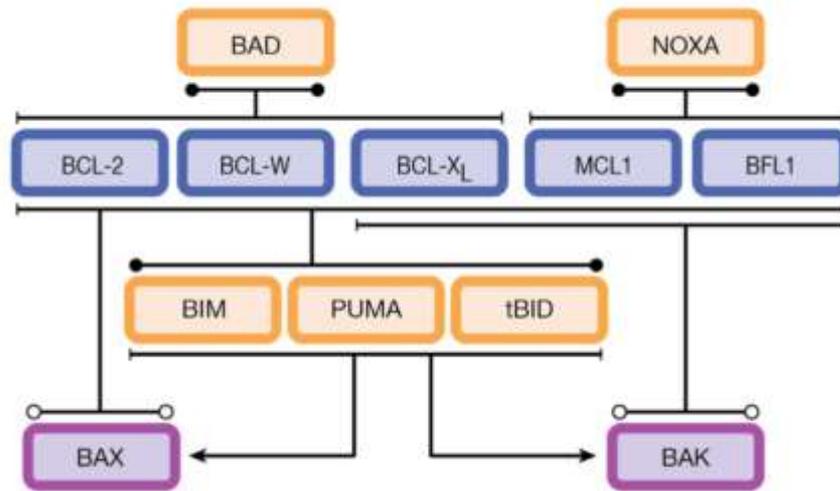


Figure 8 Affinités des protéines de la famille Bcl-2 ⁸

Différentes mutations délétères qui touchent les gènes des protéines de cette famille ont été identifiés. Elles peuvent conduire par exemple à la surexpression des protéines anti-apoptotiques, ou la sous-expression des protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Ceci a pour conséquence de perturber l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, et de rendre défectueuse la voie de signalisation conduisant à l'apoptose. La cellule devient immortelle et commence à se multiplier de manière incontrôlée. ^{16, 19} Quand elle échappe à la surveillance du système immunitaire ou aux mécanismes de réparation cellulaire, elle évolue en tumeur. C'est le scénario que l'on retrouve dans environ 50 % des cancers, comme certains cancers de la prostate, du sein, des poumons ou du colon. ¹⁰

III- Le potentiel thérapeutique de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Depuis une quinzaine d'années, la restauration sélective du processus de l'apoptose est un axe de recherche très important en oncologie et les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont des cibles thérapeutiques de choix. Différentes stratégies d'élaboration de BH3-mimétiques ont été développées : ^{8, 22}

A- Les peptides BH3-mimétiques

Les peptides BH3-mimétiques sont des peptides qui, comme leur nom l'indique, miment le domaine BH3 des protéines apoptotiques et sont des antagonistes des interactions entre les protéines pro- et les protéines anti-apoptotiques. Le problème majeur réside dans leur stabilité physiologique. De manière à limiter leur hydrolyse, des foldamères ²³ ou des peptides agrafés ²⁴ ont été décrits. Si les peptides et les peptidomimétiques synthétisés semblent très actifs, aucun n'est cependant testé en clinique. ²⁵

B- Les ASO

Les ASO sont des petits morceaux d'ADN simple brin, inhibiteurs de l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En formant un hétérodimère avec des séquences complémentaires dans les ARN messagers cibles, ils interfèrent avec l'expression des gènes codants pour les protéines anti-apoptotiques. Malgré la liaison non spécifique des ASO et leur instabilité, plusieurs d'entre eux ont atteint le stade clinique. On peut citer l'oblimersen qui est actuellement en phase II pour le traitement de la leucémie, du lymphôme et des cancers de la prostate, du côlon et du sein, et en phase III pour le mélanome et le myélome. En revanche, il n'a pas obtenu l'autorisation de la FDA pour le traitement de la leucémie lymphocytaire chronique récidivante ou réfractaire, puisqu'il n'a pas montré d'amélioration significative par rapport au traitement de référence. Par ailleurs, la co-administration d'ASO avec des anticancéreux existants est une approche pour laquelle des études cliniques sont en cours pour plusieurs cancers.²⁵

C- Les petites molécules inhibitrices (SMIs)

1. Introduction

Egalement appelées "**SMI**" ("**S**mall **M**olecule **I**nhibitors"), ce sont des composés organiques dont le poids moléculaire est inférieur à 900 Da.^{22, 25} Une fois dans la cellule, ces petites molécules entrent en compétition avec les protéines pro-apoptotiques multi domaines et se comportent en mimes des protéines « BH3-seulement ». En se liant au sillon hydrophobe des protéines anti-apoptotiques, ils inhibent leur activité et libèrent les protéines pro-apoptotiques « BH3-seulement ». Ceci a pour conséquence l'activation des protéines pro-apoptotiques multidomaines Bax/Bak qui forment des pores dans la membrane mitochondriale extérieure, activant ainsi la chaîne des caspases donc déclenchant l'apoptose.^{9, 13, 26}

2. L'inhibition sélective, multiple et la thérapie combinée

De nombreuses SMIs ciblant cette famille de protéines ont été développées dont plusieurs sont actuellement en essais cliniques ou précliniques. Il s'agit soit :

- d'inhibiteurs à large spectre, dits PAN inhibiteurs, actifs au micromolaire ou au sub-micromolaire sur plusieurs sous types de protéines^{5, 16, 27} ;
- d'inhibiteurs sélectifs, actifs au nanomolaire sur une protéine anti-apoptotique, notamment Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1.^{5, 16, 28} Malgré l'efficacité des inhibiteurs sélectifs, leur action est limitée dans le temps par un phénomène de résistance liée à la surexpression de la protéine anti-apoptotique non ciblée.^{10, 13} La stratégie thérapeutique actuelle pour limiter la résistance consiste à les administrer en polychimiothérapie avec un agent thérapeutique et/ou cytotoxique qui agit sur une cible différente. Il semble également prometteur de développer des inhibiteurs

multiples possédant une très bonne affinité pour plusieurs protéines anti-apoptotiques ou de co-administrer plusieurs inhibiteurs sélectifs.^{29, 30}

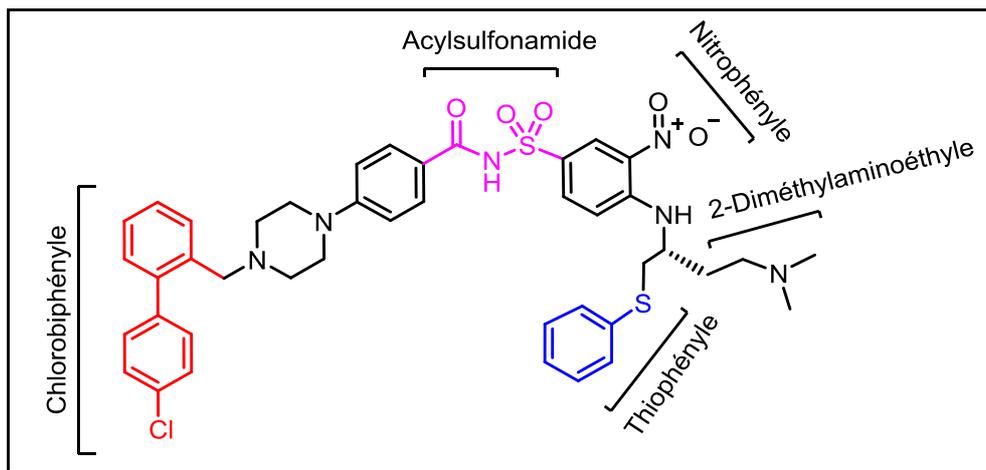
3. Exemples de petites molécules BH3-mimétiques inhibitrices des protéines de la famille Bcl-2

a) Les molécules non-naturelles

(1) La famille des acyles sulfonamides

(a) L'ABT-737 : un inhibiteur dual des protéines Bcl-2 et Bcl-xL

AbbVie (anciennement Abbott) est pionnier dans le développement des BH3-mimétiques ciblant la famille des protéines Bcl-2. Une approche de criblage par RMN, a abouti à l'identification de ligands capables de se fixer dans les poches P2 et P4 de la protéine Bcl-xL avec une affinité de l'ordre de 0,3 à 0,4 mM. La liaison des fragments (Figure 9), suivie de travaux d'optimisation structurale, a abouti à élaboration d'une molécule, l'ABT-737 **01**, possédant une affinité 100 000 fois plus importante pour la protéine cible que celle des deux fragments qui la constituent ($CI_{50} < 1$ nM pour Bcl-2 et $< 0,5$ nM pour Bcl-xL).⁹



01

Figure 9 Structure de l'ABT-737 01

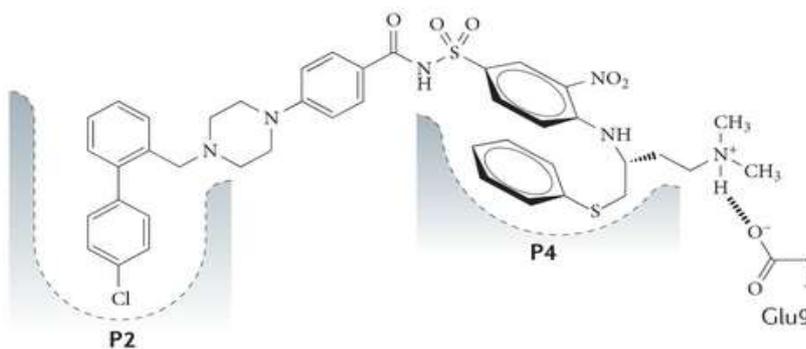


Figure 10 Mode de fixation de l'ABT-737 **01** dans les poches hydrophobes des protéines cibles ²

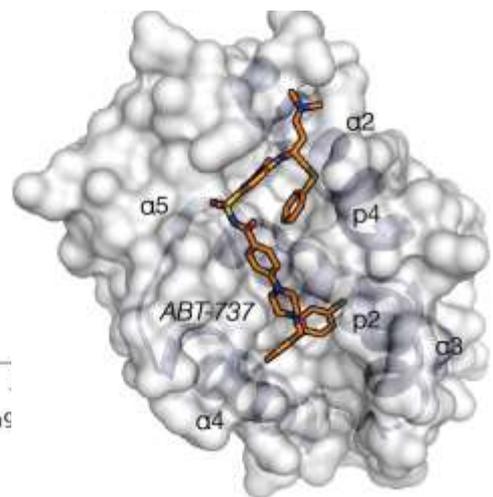


Figure 11 Docking de l'ABT-737 **01** dans la protéine Bcl-xL ⁴

L'ABT-737 **01**, est le premier représentant d'une série d'inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2. Il est mimétique du domaine BH3 de la protéine Bad et donc très actif sur Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w (Figure 10, Figure 11). Le groupe Novartis a décrit la synthèse d'analogues d'ABT-737 **01** dont le motif acyle sulfonamide a été remplacé par des hétérocycles comme le naphthyle. Ceci a conduit à une perte complète d'affinité, ce qui démontre le rôle essentiel du NH acide de l'acyle sulfonamide.⁵

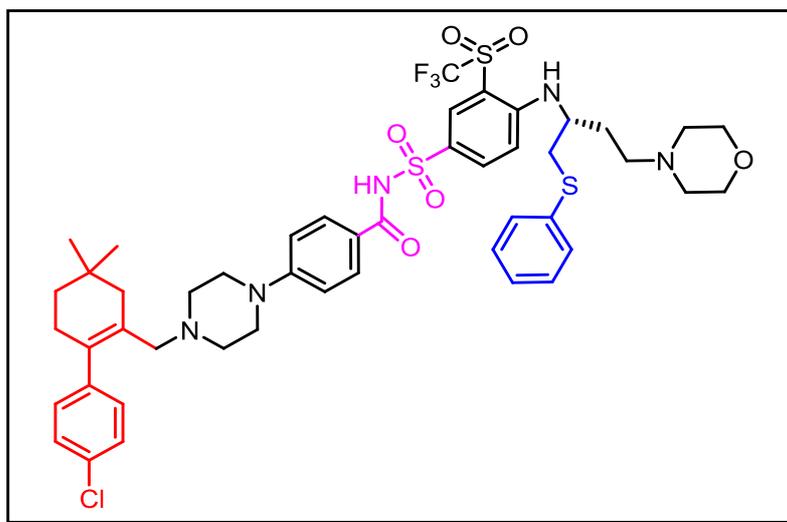
L'ABT-737 **01** a montré une excellente activité *in vitro* sur différentes lignées cellulaires (comme les cellules de leucémie lymphoïde aigue ou chronique primaire ^{16, 31}) et surtout une bonne activité antitumorale en monothérapie dans des modèles de lymphômes, de carcinomes pulmonaires à petites cellules (SCLC), et de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC).⁹

Il a été mis en évidence que la réponse cellulaire à l'ABT-737 **01** est inversement proportionnelle aux niveaux de Mcl-1 exprimés dans la cellule. Effectivement, Mcl-1 permet de maintenir les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose car l'ABT-737 **01** n'a pas d'affinité pour cette protéine qui joue un rôle primordial dans le myélome multiple, certains lymphômes et tumeurs solides.¹³ En conséquence, seules les tumeurs surexprimant uniquement les protéines Bcl-2, Bcl-xL et/ou Bcl-w sont sensibles au traitement par l'ABT-737 **01**.⁵ De plus, il a démontré une faible biodisponibilité à cause d'une forte interaction avec l'albumine sanguine et son utilisation a été limitée à la recherche préclinique.^{9, 13}

(b) L'ABT-263 ou navitoclax : un inhibiteur dual des protéines Bcl-2 et Bcl-xL

Comme son prédécesseur, l'ABT-263 **02** (Figure 12) est mimétique du domaine BH3 de la protéine Bad et antagoniste des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w mais sans affinité pour Mcl-1. Sa biodisponibilité est cependant bien meilleure et il est administré par voie orale. La structure de cette molécule en complexe avec Bcl-xL montre un enfouissement remarquable

au niveau de la poche P2 de la protéine Bcl-xL du groupe chlorophényle terminal. D'autre part, le motif acyle sulfonamide interagit avec la partie N-terminale de l'hélice α 5 de la cible.⁴



02

Figure 12 Structure de l'ABT-263 **02**

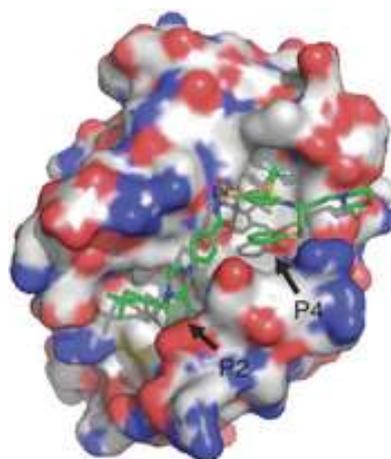


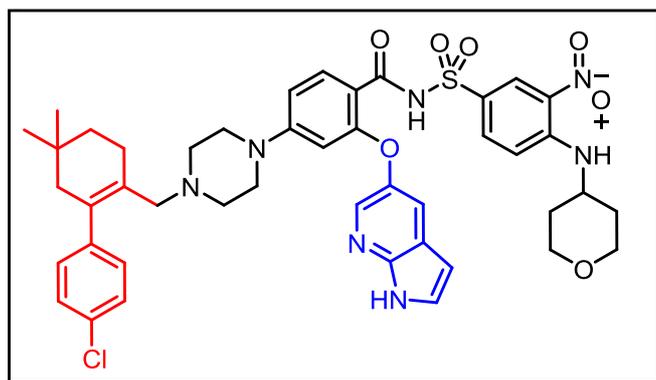
Figure 13 L'ABT-263 **02** en complexe avec Bcl-xL ⁴

Lors des études précliniques, le navitoclax **02** a montré sa capacité à inhiber, en monothérapie, la croissance des SCLC dans des modèles de xénogreffes. Il s'est également montré efficace sur des tumeurs solides lorsqu'il est administré en polychimiothérapie, ce qui l'a qualifié pour des études cliniques.⁹

Malgré sa bonne tolérance durant les études précliniques, le navitoclax **02** a provoqué des thrombocytopénies (diminution du nombre de plaquettes) et des neutropénies (diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles) sévères mais temporaires. Cela est dû principalement au rôle essentiel de Bcl-xL dans le contrôle de la durée de vie des cellules sanguines. Alors que ces cellules peuvent représenter d'excellents biomarqueurs de l'inhibition de Bcl-xL,^{5, 9} la toxicité dose-limitante associée à l'ABT-263 **02** lors des essais cliniques, surtout lorsqu'il est administré en monothérapie, a conduit au développement de composés Bcl-2-sélectifs afin d'améliorer la fenêtre thérapeutique des BH3-mimétiques.^{5,9, 13}

(c) L'ABT-199 ou venetoclax (Venclexta™) : un inhibiteur Bcl-2-sélectif

AbbVie a, pour finir, conçu l'ABT-199 **03** (Figure 14), une molécule dont l'affinité pour Bcl-xL est de trois log inférieure à celle pour Bcl-2.⁵ Pour cela, les chercheurs ont exploité les différences structurales entre ces deux protéines.⁸ Les études de cristallographie aux rayons X de Bcl-2 en complexe avec l'ABT-199 **03** (Figure 15, Figure 16) montrent que c'est une liaison hydrogène entre le groupe azaindole et le résidu Asp¹⁰³ de Bcl-2 qui lui permet d'avoir une affinité sélective (< 0,01 nM pour Bcl-2 vs. 48 nM pour Bcl-xL et 245 nM pour Bcl-w).^{9, 32}



03

Figure 14 Structure de l'ABT-199 **03**

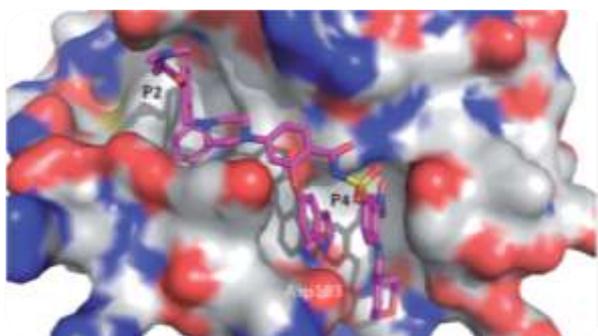


Figure 15 Simulation 3D du mode de fixation de l'ABT-199 **03** dans la protéine cible Bcl-2²

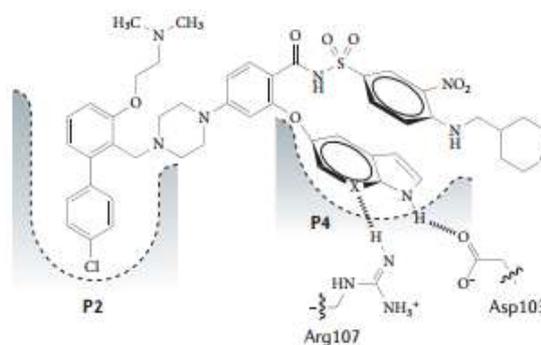


Figure 16 Mode de fixation de l'ABT-199 **03** dans les poches hydrophobes de Bcl-2²

L'ABT-199 **03** induit la mort cellulaire des cellules cancéreuses Bcl-2-dépendantes. Dans les modèles précliniques, il a montré une bonne efficacité sur différentes tumeurs, dont des leucémies, des lymphômes non-Hodgkinien (NHL) ainsi que des myélomes sans provoquer de thrombocytémie.^{5, 13}

Lors des études cliniques de phase I et II sur la leucémie lymphoïde chronique (LLC) dépendante de Bcl-2, 79 % des patients traités ont montré une réponse positive au venetoclax **03**, y compris ceux avec un mauvais pronostic ou présentant une résistance à la chimiothérapie.¹³

En avril 2016, suite aux résultats encourageants des essais cliniques, le venetoclax **03** a obtenu, aux Etats-Unis, l'autorisation de mise sur le marché par la FDA sous le nom Venclexta™ pour la leucémie lymphocytaire chronique (LLC).^{9, 13} C'est le premier inhibiteur sélectif des protéines de la famille Bcl-2 autorisé.¹³ Ce succès thérapeutique valide la stratégie d'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par des petites molécules BH3-mimétiques.⁸

L'administration du venetoclax **03** en association avec le rituximab, l'obinutuzumab ou le rituximab suivi par le bendamustine chez des patients atteint d'une LCC récidivante ou réfractaire a montré une efficacité significative.⁹

(d) Les dérivés de l'ABT-737 **01** : le BM-957

Par une approche de modélisation moléculaire mimant les interactions pharmacophores/Bcl-xL, deux scaffolds déjà utilisés en clinique ont été sélectionnés comme points de départ pour la conception de nouveaux antagonistes des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, le Lipitor® (Atorvastatine, **04**) et le Célécoxib® **05** qui présentent un motif hétérocyclique à 5 chaînons bi-substitué par des aryles ont été combinés pour conduire au BM-957 **06** (Figure 17) dont les affinités sont inférieures à 1 nM pour Bcl-2 et Bcl-xL.³³

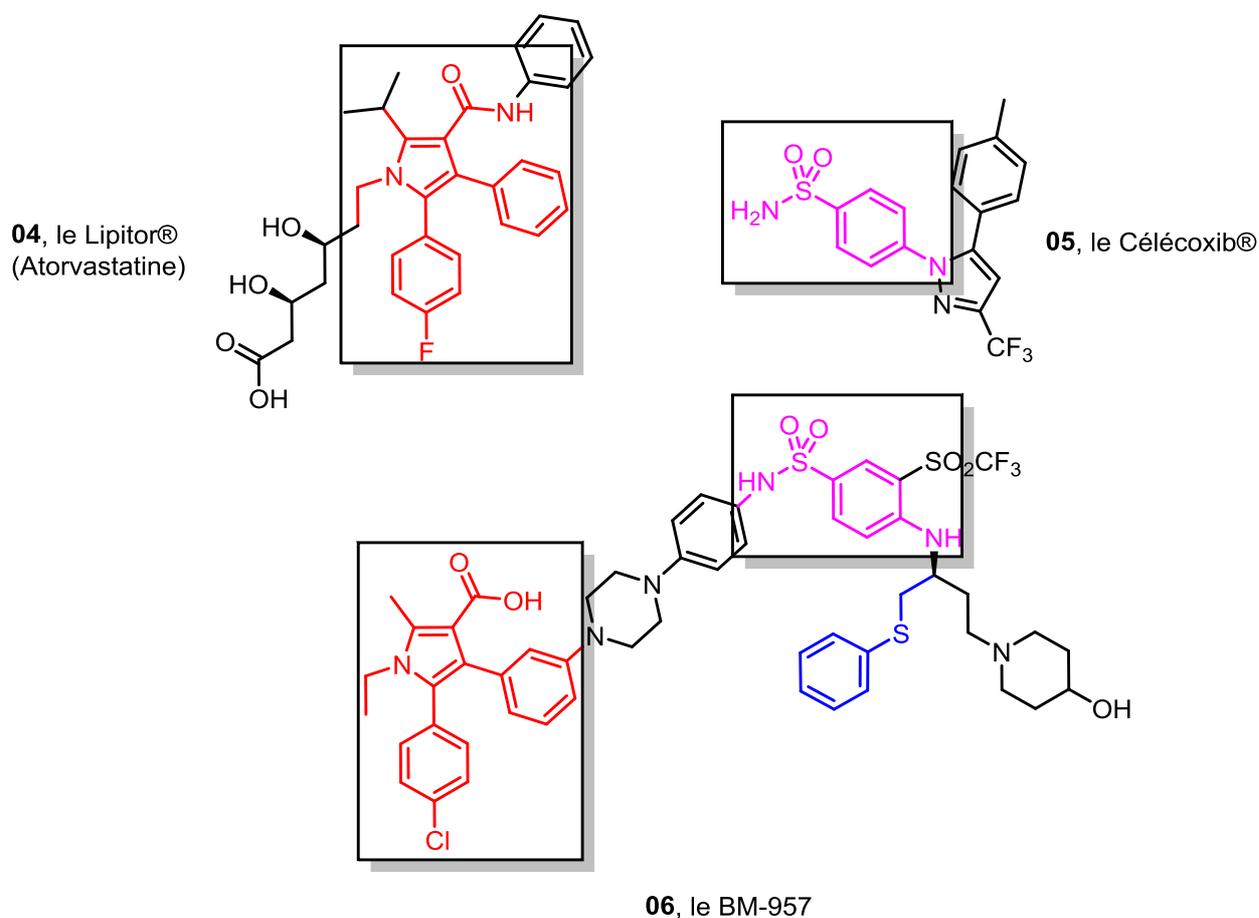


Figure 17 L'approche par fragment pour le développement du BM-957 **06**

Une inhibition de la croissance des lignes cellulaires cancéreuses H1147 et H146 de SCLC a été observée avec des valeurs de Cl_{50} autour de 60-90 nM. En outre, le BM-957 **06** induit une régression tumorale rapide et complète *in vivo* sur des modèles de xénogreffe (H146) pour des doses allant de 30 à 100 nM.⁵

(2) La série WEHI : des inhibiteurs Bcl-xL-sélectifs

Même si des cas de neutropénie et de thrombocytopénie réversibles ont été associés à l'inhibition de Bcl-xL, le développement d'un composé capable d'inhiber sélectivement cette protéine anti-apoptotique a cependant été envisagé, vu le grand nombre de tumeurs solides dépendantes de Bcl-xL pour leur survie.^{8, 13} Dans ce contexte, le groupe de Roy en collaboration avec Genentech a effectué la synthèse du WEHI-539 **07** (Figure 18), le premier inhibiteur sélectif à Bcl-xL, issu d'une combinaison d'approches classiques de chimie médicinale, de criblage à haut débit (HTS) et de conception rationnelle structure-guidée.^{5, 9}

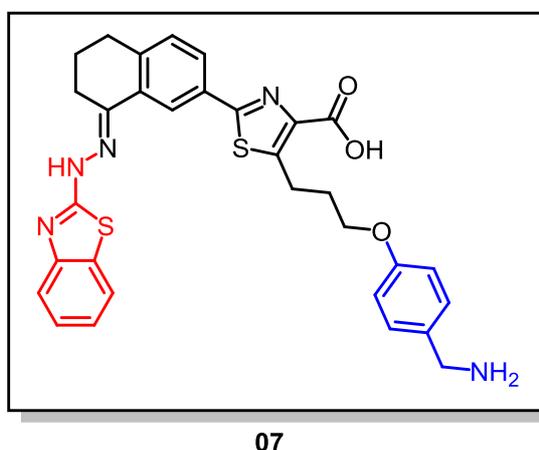


Figure 18 Structure du WEHI-539 **07**

Le composé WEHI-539 **07**, un dérivé disubstitué d'acide 4-thiazole, montre une affinité inférieure à 1 nM et une forte sélectivité (> 400 fois) vis-à-vis de Bcl-xL par rapport aux autres protéines de la famille Bcl-2.³⁴ Les données structurales montrent que le WEHI-539 **07**, comme l'ABT-737 **01**, induit des changements allostériques importants autour de la poche P2 de Bcl-xL permettant à celle-ci d'interagir avec le groupement benzothiazole. La sélectivité du WEHI-539 **07** pour Bcl-xL pourrait être expliquée par la formation de liaisons hydrogènes dans la poche P2 entre le NH de l'hydrazone et le carbonyle du résidu Ser¹⁰⁶ d'une part, et entre l'azote de benzothiazole et le NH du résidu Leu¹⁰⁸ d'autre part.¹⁵ Sa structure de base a été

optimisée par études de RSA et étendue pour permettre l'interaction avec la poche hydrophobe P4 (Figure 19, Figure 20).^{5, 34}

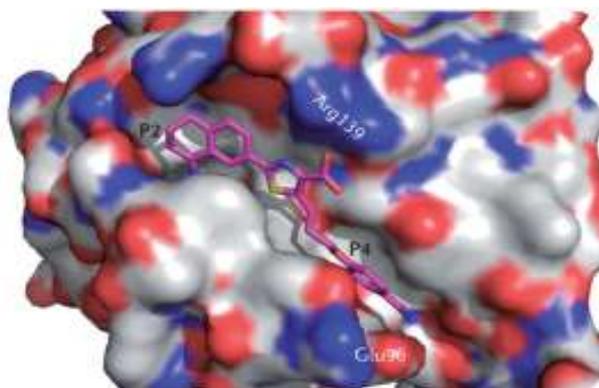


Figure 20 Docking moléculaire du mode de fixation de WEHI-539 **07** dans la protéine cible Bcl-xL ²⁻³

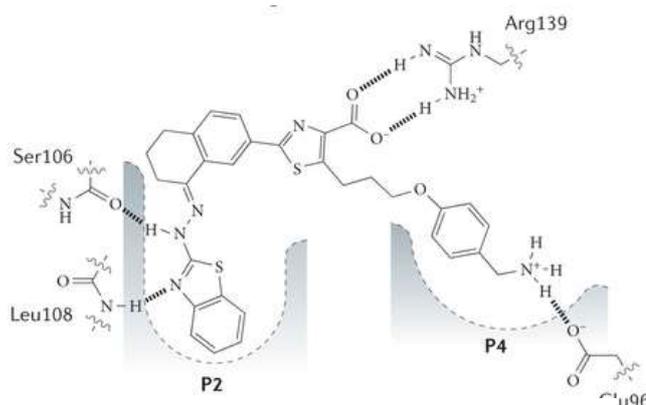
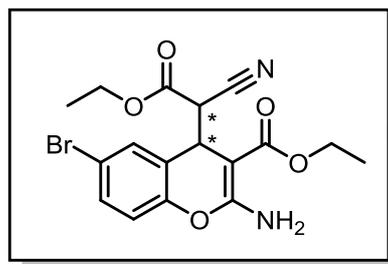


Figure 19 Mode de fixation de WEHI-539 **07** dans les poches hydrophobes de Bcl-xL ²

La sélectivité du WEHI-539 **07** *in vitro* a été confirmée sur des lignées cellulaires surexprimant Bcl-x. Alors qu'il induit une thrombocytopénie transitoire chez la souris au bout de 6 h de traitement, le niveau de plaquettes sanguines est reconstitué après 72 h. D'autre part, le WEHI-539 **07** s'est montré capable d'inhiber la croissance de cancers du sein à petites cellules (carcinome neuroendocrine) dans des modèles de souris xéno greffées.³⁴ Ainsi, en jouant sur la dose administrée ou sur une administration combinée, le WEHI-539 **07** pourrait apporter un bénéfice aux patients atteints de tumeurs solides Bcl-xL-dépendantes.^{8, 13}

(3) L'HA14-1 : un inhibiteur Bcl-2-sélectif

Une petite molécule, l'HA14-1 **08**, identifiée à l'issue d'un criblage *in silico*, a été décrite comme étant un inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-2 (Figure 21).³⁵ Ce composé induit, à 10 μ M, l'apoptose des cellules de leucémie myéloïde aigue humaines (HL-60) qui surexpriment Bcl-2 (Figure 22).^{36, 37}



08

Figure 21 Structure de l'HA14-1 08

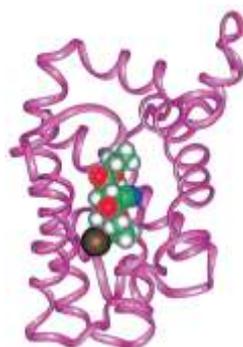


Figure 22 Modèle de docking moléculaire de l'HA14-1 08 en complexe avec la protéine Bcl-2

De plus, il a été montré que l'HA14-1 08 est capable d'améliorer la sensibilité des cellules de glioblastome humaines à la chimiothérapie et la radiothérapie. En outre, il ralentit la croissance des glioblastomes dans des modèles de souris xénotransplantées en co-administration avec un agent cytotoxique. A faible concentration, l'HA14-1 08 est capable de sensibiliser plusieurs types de tumeurs Bcl-2-dépendantes à la chimiothérapie et la radiothérapie.³⁵

(4) Le S63845 : un inhibiteur sélectif de Mcl-1

Les laboratoires Servier ont développé récemment un inhibiteur sélectif très puissant de la protéine Mcl-1 : le S63845 (Figure 24). Grâce à sa structure originale, il est capable de se lier à Mcl-1 (Figure 23) avec une affinité sub-nanomolaire (0,2 nM) et d'induire l'apoptose sur des lignées cancéreuses lymphoïdes Mcl-1 dépendantes (ex $CI_{50} = 4$ nM sur H929). En outre, il induit une régression de xénotransplant de lymphomes myéloïdes aigus humains avec une rémission complète chez 6 sur 8 souris au bout de 80 jours.⁹ De plus, il est actif en monothérapie ou en co-administration avec des inhibiteurs de kinase.⁷ Un dérivé de ce composé est actuellement en phase clinique I.

Cet inhibiteur est très intéressant car utilisé en polychimiothérapie, il devrait contribuer à surmonter la résistance aux acyle sulfonamides qui ciblent Bcl-xL mais aussi à d'autres agents de chimiothérapie tels que la gemcitabine, la vincristine et le taxol.^{8, 9}

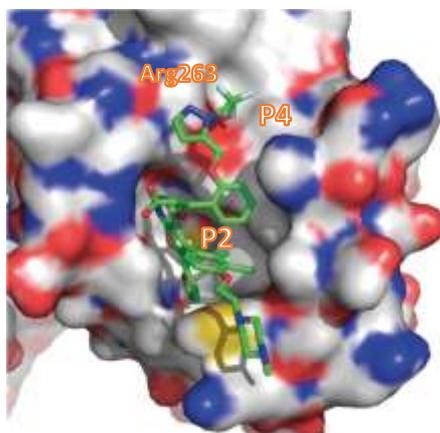
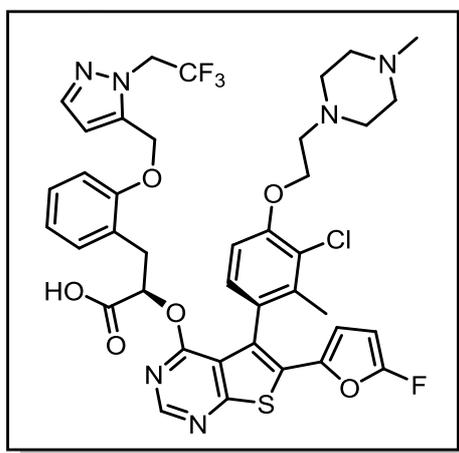


Figure 23 Structure du S63845 en complexe avec Mcl-1. ⁷

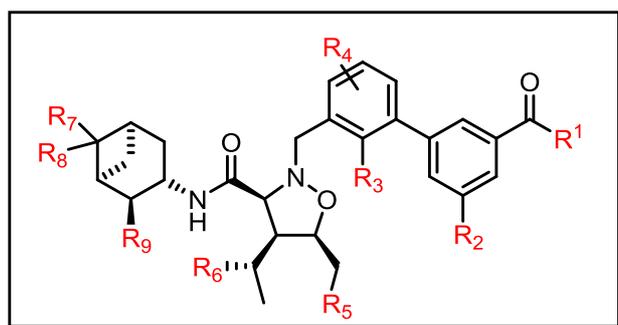


09

Figure 24 Structure du S63845 09

(5) Les dérivés d'isoxazolidine : des inhibiteurs duals de Bcl-2 et Bcl-xL

Le groupe de Schreiber a élaboré une série de petites molécules dérivées de l'isoxazolidine **10** (Figure 25). Certains de ces dérivés sont des inhibiteurs duals de Bcl-2 et Bcl-xL, d'autres sont sélectifs de la protéine Bcl-2, les meilleurs composés possédant des affinités inférieures à 1 nM. Depuis 2005, plusieurs dérivés d'isoxazolidine sont en cours de développement en collaboration avec Novartis même si, dans la littérature on ne trouve pas d'information sur l'état d'avancement de ces dérivés.¹⁶



10

Figure 25 Structure commune des dérivés d'isoxazolidine 10

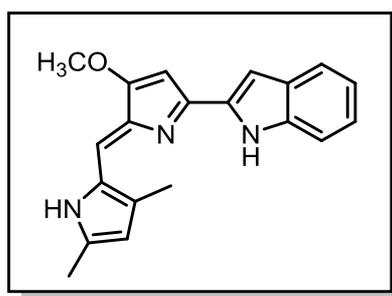
b) Les inhibiteurs d'origine naturelle

Les substances naturelles représentent une source importante de nouvelles molécules bioactives de structure originale. Leur complexité structurale est synonyme de spécificité pour une ou plusieurs cibles biologiques. Depuis les années 1940, 75 % des 175 petites molécules utilisées en chimiothérapie sont d'origine naturelle. Ainsi, le paclitaxel (Taxol®), l'ecteinascidine-743 (Yondelis®), ou bien l'eribuline (Halaven®) sont des exemples de molécules complexes isolées suite à des criblages d'extraits de plantes, d'organismes marins ou de microorganismes, puis optimisées en laboratoire.³⁸ Le criblage d'activité biologique d'extractothèques a donné lieu au développement de plusieurs molécules d'origine naturelle à activité inhibitrice des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.⁵ Néanmoins, malgré l'avancement de certains inhibiteurs jusqu'aux études cliniques, aucun composé n'a encore réussi à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM).^{9, 13}

(1) Les inhibiteurs multiples

(a) L'obatoclax (GX-15-070)

L'obatoclax ou GX-15-070 **11** (Figure 26, Gemin X Biotechnologies, Montréal, QC, Canada) est une petite molécule dérivée d'un produit naturel, la progidiosine. Son affinité pour plusieurs protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-w) a été déterminée par des tests de polarisation de fluorescence.^{5, 39, 40}



11

Figure 26 Structure de l'obatoclox 11

D'après les expériences de docking, l'obatoclox **11** occuperait une poche hydrophobe distante de celles occupées par les membres de la famille des acyle sulfonamides.⁴⁰ Il se lierait à Mcl-1 *via* une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de l'histidine His²⁵² qui se trouve dans un sillon conservé pour plusieurs membres de la famille Bcl-2.³⁹

Plus tard, il a été montré que l'obatoclox **11** est capable de surmonter la résistance à l'apoptose conférée par la surexpression de Mcl-1. Ceci a pour conséquence l'augmentation de taux de la protéine pro-apoptotiques Bim à l'état libre, et donc la restauration de la sensibilité à l'ABT-737 **01**.³⁹

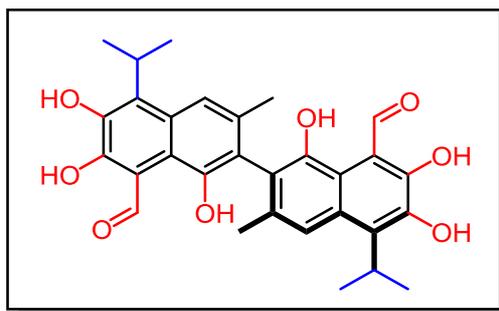
L'obatoclox **11** a montré une bonne activité antitumorale sur plusieurs modèles de tumeurs greffées chez des souris même lorsqu'il est administré en monothérapie. De plus, il est capable de restaurer l'apoptose en potentialisant l'effet du cisplatine autant dans les lignées cellulaires sensibles que résistantes à cet agent cytotoxique.³⁹

Cependant, les essais cliniques n'ont montré qu'une efficacité modeste pour la leucémie lymphoïde chronique (LLC), et aucun bénéfice pour la myélofibrose ou le cancer du poumon à petites cellules (SCLC). Bien que l'obatoclox **11** ait réussi à atteindre les essais cliniques de phase I/II en mono- et polychimiothérapie contre certaines hémopathies, les effets secondaires neurologiques ont limité son avancement dans les études cliniques, et le médicament n'a pas été autorisé par la FDA.^{5, 13, 39}

(b) La famille du gossypol

(i) *Le gossypol*

Le (*R*)-gossypol ou A-101 **12** (Figure 27, Ascenta Therapeutics, Malvern, PA, USA) est une substance naturelle polyphénolique isolée du coton. Identifiée à l'issue d'un criblage virtuel (*in silico*) par le groupe de Wang en 2002, cette molécule a montré une affinité sub-micromolaire pour Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (480 nM, 320 nM et 180 nM respectivement).^{5, 39}



12

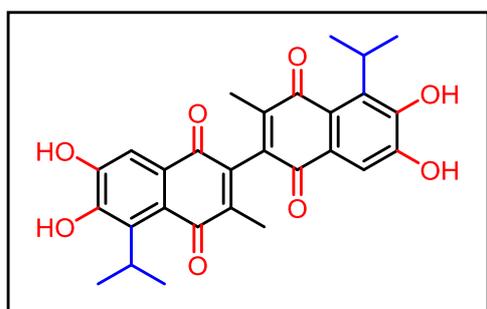
Figure 27 Structure du (R)-gossypol 12

Cette molécule BH3-mimétique est active sur des lignées cellulaires de myélome multiple et de lymphôme à cellules β . Cependant, elle est capable de tuer les cellules **MEF** (**M**ouse **E**mbyronic **F**ibroblast) de manière indépendante des protéines Bax/Bak, ce qui suggère que son effet cytotoxique ne repose pas uniquement sur sa capacité à perturber les interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques.⁵

Le gossypol **12** est entré en études de phase clinique, où il a démontré sa capacité à retarder l'apparition du cancer de la prostate indépendant des androgènes *in vivo*, et à induire une chimiosensibilisation au docétaxel des cellules cancéreuses de la prostate (PC-3) *in vitro* et *in vivo* en augmentant la disponibilité des protéines pro-apoptotiques Puma et Noxa.³⁹ En revanche, il s'est montré modérément ou peu efficace en monothérapie contre le cancer de la prostate résistant à la castration et en mono- ou polychimiothérapie contre le carcinome pulmonaire à petites cellules (SCLC).⁵

Le mode d'interaction entre le gossypol **12** et les protéines de la famille Bcl-2 a été élucidé par RMN hétéronucléaire. Les différents groupements hydroxyle ainsi que le motif carbonyle de la benzophénone se sont révélés indispensables pour l'interaction avec les acides aminés au sein des poches hydrophobes de la protéine cible. Plusieurs dérivés du gossypol **12** ont été élaborés par la suite, tel que l'apogossypolone **13**, le TW-37 **14**, et le subatoclax **15**.⁴¹

(ii) L'apogossypolone



13

Figure 28 Structure de l'apogossypolone 13

Ce dérivé de troisième génération **13** (Figure 28) a été conçu par le groupe de Mohammad en 2008 après criblage guidé par RMN.³⁹ Sur la Figure 29, le modèle de docking de l'apogossypolone **13** dans Bcl-2 est représenté : ce composé se fixe dans les poches P1 et P2 de Bcl-2 grâce à des interactions hydrophobes des deux groupes isopropyle et à la formation de plusieurs liaisons hydrogènes (par exemple entre un hydroxyle et le résidu Tyr¹⁹⁹, ou un carbonyle et l'Arg¹⁴³) (Figure 29).^{16, 42}

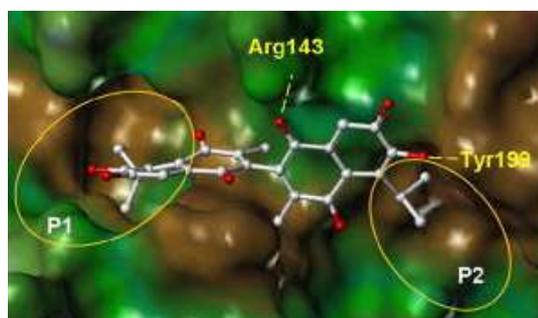


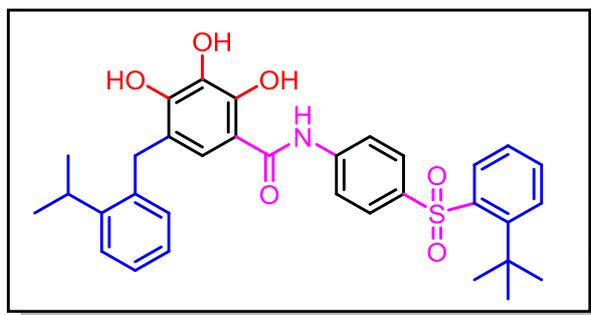
Figure 29 Etude de docking moléculaire d'apogossypolone **13** dans Bcl-2

L'apogossypolone **13**, comme l'ABT-737 **01** a montré une excellente affinité pour Bcl-2 et Mcl-1 (35 et 25 nM respectivement), et une affinité moins importante pour Bcl-xL (660 nM).³⁹ En outre, elle possède la capacité à empêcher, de manière dose-dépendante, la croissance de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (comme le lymphôme folliculaire, avec une CI_{50} de 109 nM), elle est efficace *in vivo* en monothérapie chez les souris transgéniques ou xénotreffées, et présente surtout une très faible toxicité. Ceci en fait un lead prometteur pour la thérapie anti-cancéreuse. Il est actuellement en étude clinique de phase I/II.^{16, 39}

(iii) Le TW-37

D'après des études de docking du gossypol **12** et de l'apogossypolone **13** dans les protéines de la famille de Bcl-2, le système polyphénolique est important pour l'interaction avec la cible. Ainsi, l'agrandissement de la partie hydrophobe de la molécule pourra assurer une meilleure fixation dans les poches hydrophobes.^{39, 41}

Le groupe de Wang a rapporté en 2006 la conception d'un nouvel inhibiteur des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, le TW-37 **14** (Figure 30). Il se caractérise par la présence de liens de type amide et sulfone et présente une activité forte sur Bcl-2 et Mcl-1 (260 et 290 nM respectivement), et une affinité moindre pour Bcl-xL (1100 nM).^{16, 39}



14

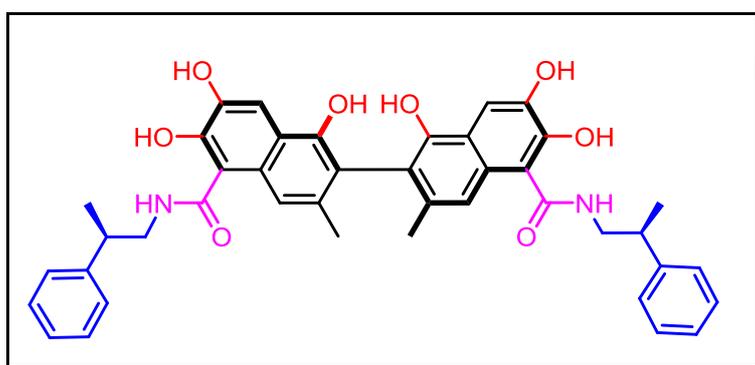
Figure 30 Structure du TW-37 14

En 2007, le groupe de Mohammad a démontré que le TW-37 **14** inhibait la prolifération cellulaire des cellules de lymphôme WSU-DLCL à 290 nM, et induisait l'apoptose dans 71.4 % des cellules à 0,4 μ M. De plus, le TW-37 **14** améliore l'efficacité de l'association médicamenteuse CHOP (cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisolone) dans des modèles de souris. Ces résultats sont cohérents avec ceux du groupe de Katib qui ont testé le TW-37 **14** sur les cellules de lymphôme B.³⁹

(iv) *Le subatoclax (BI-97C1)*

En 2009, l'équipe de Pellecchia a effectué la dérivation (guidée par RMN et par docking) du gossypol **12**. Parmi les composés synthétisés, le composé racémique BI-97C1, nommé plus tard le subatoclax **15** (Figure 31), était le plus efficace.³⁹

Ce dérivé du gossypol **12** a des affinités pour Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 de l'ordre du sub-micromolaire (320, 310 et 20 nM respectivement).^{5, 13} Il induit l'apoptose dans la lignée RS11846 de lymphôme humain,³⁹ et est efficace tant *in vitro* qu'*in vivo* sur des modèles de xénotransplante de cancer de la prostate. Il induit également une régression des tumeurs de la prostate résistantes à la castration.⁵

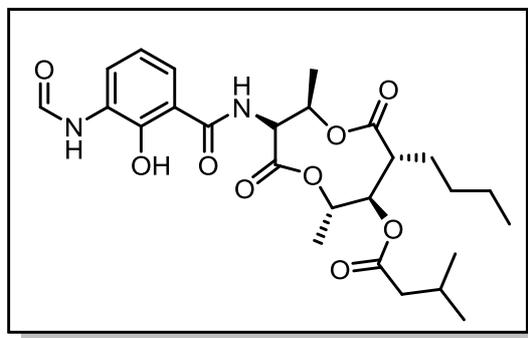


15

Figure 31 Structure du subatoclax 15

(c) L'antimycine A : un inhibiteur multiple

En 2001, le groupe de Tzung a montré que l'antimycine A **16** (Figure 32), un antibiotique isolé d'un *Streptomyces sp.*, induisait la mort cellulaire par apoptose de lignées multirésistantes Bcl-xL-dépendantes. L'interaction de l'antimycine A **16** avec Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL a été confirmée par la suite ($Cl_{50} = 2,5 ; 3$ et $2,7 \mu M$ respectivement).^{39, 43}



16

Figure 32 Structure de l'antimycine A **16**

(2) Les dérivés du marinopyrrole A : des inhibiteurs sélectifs de Mcl-1

Le marinopyrrole A **17** (Figure 33) est un antibiotique isolé d'un *Streptomyces sp.* en 2009 par le groupe de Wang. Il est Mcl-1 sélectif donc capable, à priori, de surmonter la résistance cellulaire à l'ABT-737 **01**. Cependant, *in cellulo*, le marinopyrrole A **17** présente des activités très faibles et comparables sur des lignées Bcl-2- ou Mcl-1-dépendantes (2 et 2,5 mM respectivement).³⁹

En 2015, le groupe de Qin a entrepris une étude de relation structure-activité sur ce produit naturel, et a élaboré des analogues du marinopyrrole A **17** dont un, **18** (Figure 33), est 16 fois plus sélectif pour l'interaction Mcl-1/Bim ($Cl_{50} = 6,1$ mM) que pour Bcl-xL/Bim ($Cl_{50} > 100$ mM). Un autre analogue, **19** (Figure 33), est un très faible inhibiteur dual des interactions Mcl-1/Bim et Bcl-xL/Bim (0,6 et 0,5 mM respectivement). Il présente également une très faible cytotoxicité sur des cellules de cancer du sein.³⁹

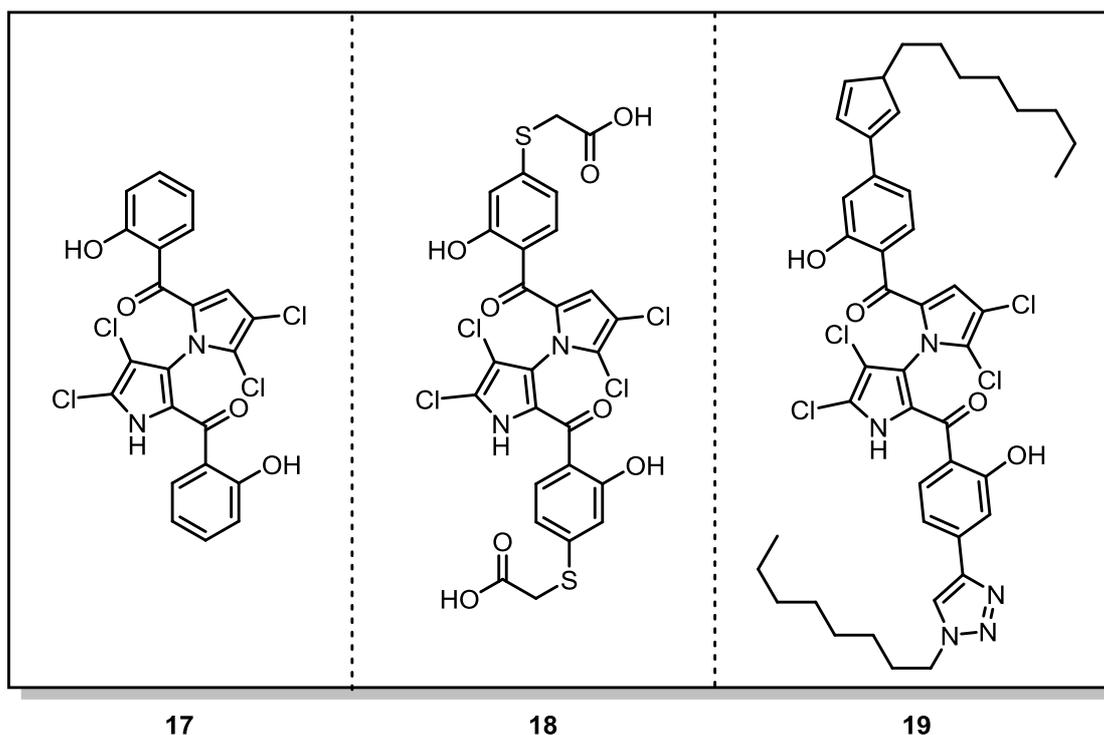


Figure 33 Structures du marinopyrrole A 17 et de ses dérivés 18 et 19

4. Récapitulatif des principaux SMI

Le tableau ci-dessous rassemble les principaux inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (cibles protéiques et cellulaires, affinités, stade de l'étude).

Tableau 1 Tableau récapitulatif des petites molécules BH3-mimétiques inhibitrices des protéines de la famille Bcl-2^{9, 16, 25, 44}

Catégorie	Composé	Cible	Affinité	Stade d'étude	Type de cancer
Inhibiteurs non-naturels	ABT-737	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w	K_i Bcl-xL < 0,5 nM K_i Bcl-2 < 1 nM K_i Bcl-w = 0,9 nM K_i Mcl-1 > 1 μM	Phase clinique	AML, CP, NHL, HL, MM, CS, CC, MCL
	ABT-263 (Navitoclax)	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w	K_i Bcl-xL < 0,5 nM K_i Bcl-2 < 1 nM K_i Bcl-w < 1 nM K_i Mcl-1 = 550 μM	Phase clinique II	AML, NHL, LLC, MM, ALL, CP, MCL
	ABT-199 (Venetoclax)	Bcl-2, Bcl-xL	K_i Bcl-xL = 48 nM K_i Bcl-2 < 0,01 nM K_i Bcl-w = 245 nM	AMM 2016 USA	LLC, MM
	BM-957	Bcl-2, Bcl-xL	K_i Bcl-xL < 1 nM K_i Bcl-2 < 1 nM	-	SCLC

	WEHI-539	Bcl-xL	$K_i \text{ Bcl-xL} < 1 \text{ nM}$	Phase préclinique	Cancer du sein à petites cellules, tumeurs solides
	HA14-1	Bcl-2	-	-	AML, glioblastome
	S63845	Mcl-1	$K_i \text{ Mcl-1} = 0,2 \text{ nM}$	Phase clinique I	AML
	Isoxazolidine	Bcl-2, Bcl-xL	$K_i \text{ Bcl-xL} < 1 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} < 1 \text{ nM}$	-	-
Inhibiteurs multiples d'origine naturelle	Obatoclox (GX15-070, GminX)	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1	$K_i \text{ Bcl-xL} = 4,7 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} = 1,1 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-w} = 7,0 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Mcl-1} = 2,9 \mu\text{M}$	Phase clinique II	SCLC, CS, CC, PC, LLC, AML, MCL
	Gossypol (AT-101)	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1	$K_i \text{ Bcl-xL} = 0,48 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} = 0,32 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Mcl-1} = 0,18 \mu\text{M}$	Phase Clinique II	MM, LLC, DLBCL, PC
	Apogossypolone	Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1	$K_i \text{ Bcl-xL} = 0,66 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} = 0,03 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Mcl-1} = 0,02 \mu\text{M}$	Phase I/II	NHL, ALL, MCL, LLC, MZL
	TW-37	Mcl-1	$K_i \text{ Bcl-xL} = 1,11 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} = 0,29 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Mcl-1} = 0,26 \mu\text{M}$	Phase préclinique	PC, MH, DLCL
	Subatoclox (BI-97C1)	Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1	$K_i \text{ Bcl-xL} = 0,31 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Bcl-2} = 0,32 \mu\text{M}$ $K_i \text{ Mcl-1} = 0,02 \mu\text{M}$	Phase préclinique	CP

AML : Acute Myeloid Leukaemia ou leucémie aiguë myéloblastique

CP : Cancer du Poumon

NHL Non-Hodgkin's Lymphoma ou lymphôme non-Hodgkinien

HL : Hodgkin's Lymphoma ou lymphôme Hodgkinien

MM : Multiple Myeloma ou myélome multiple

CS : Cancer du Sein

CC : Cervical Cancer ou cancer du col de l'utérus

MCL : Mantle Cell Lymphoma ou lymphôme du manteau

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

ALL : Acute Lymphoblastic Leukaemia ou leucémie lymphoblastique aiguë

SCLC : Small Cell Lung Carcinoma ou carcinomes pulmonaires à petites cellules

PC : Cancer de la prostate DLBCL

MZL : Marginal Zone Lymphoma ou lymphôme de zone marginale

MH : Myélome Humain

III-Résultats du laboratoire

Un des objectifs de l'équipe « **Métabolites de Plantes et Micro-organismes Associés : Isolement, synthèse et bioactivité** » à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles est de découvrir, à partir des plantes supérieures et de leurs micro-organismes associés, de nouvelles molécules biologiquement actives et/ou possédant des structures originales. Pour cela, plusieurs accords de partenariat avec des Universités de pays à forte biodiversité en endémisme ont été mis en place (Figure 34).⁴⁵

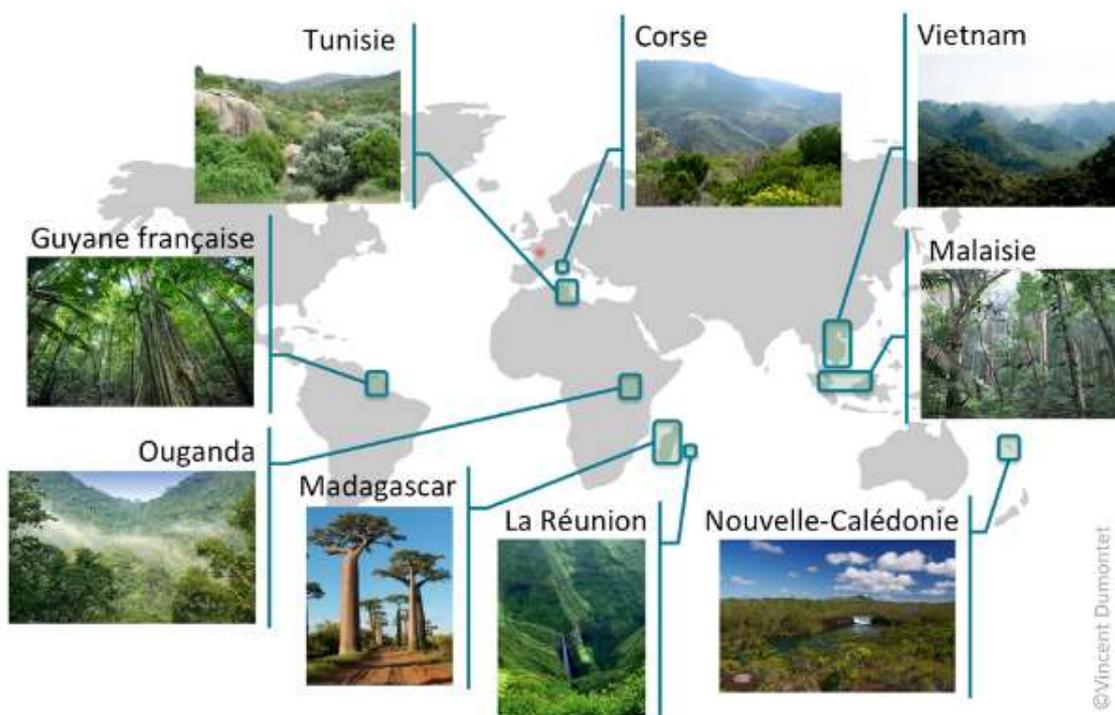


Figure 34 Coopérations nationales et internationales de notre équipe

Des prospections et des récoltes sont effectuées régulièrement par les partenaires de l'ICSN de façon à constituer une collection de plantes endémiques la plus représentative possible de ces régions. À partir des différentes parties des plantes récoltées, des extraits sont systématiquement préparés et distribués dans des plaques multi-puits afin d'être criblés. La collection d'extraits de plantes ou extractothèque ICSN est la plus grande collection d'extraits naturels dans le domaine public en France. Elle rassemble plus de 14 000 extraits préparés à partir de 6 500 plantes (305 sur 457 des familles botaniques répertoriées).⁴⁵

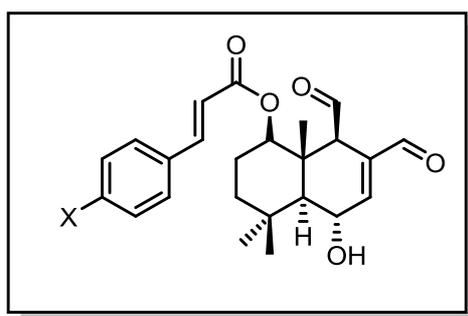
Des collaborations avec des équipes de biologistes, qui font des criblages biologiques sur des cibles variées, permettent la valorisation de cette librairie d'extraits. Les "hits" sélectionnés font ensuite l'objet d'études phytochimiques, chimiques et biologiques, et pour certains, de travaux d'hémisynthèse, de synthèse totale et/ou de pharmacomodulation.⁴⁵

Depuis une dizaine d'années, notre équipe développe de nouvelles molécules bioactives naturelles ou hémisynthétiques qui ciblent les protéines anti-apoptotiques de la

famille de Bcl-2. Dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Recherche Servier (IdRS), plus de 6 000 extraits de plantes ont été testés sur la protéine anti-apoptotique Bcl-xL par un test de polarisation de fluorescence mettant en jeu l'interaction Bcl-xL/Bak. Le projet s'est orienté par la suite vers la recherche d'inhibiteurs duals Bcl-xL et Mcl-1. Ainsi, entre 2008 et 2015, de nouvelles structures chimiques originales et extrêmement variées ont été isolées dans l'équipe. Elles sont actives sur Bcl-xL et/ou Mcl-1 avec des affinités comprises entre 1 et 18 μM . Nous citons parmi celles-ci les familles suivantes :

A- Les dérivés du drimane : des inhibiteurs Mcl-1-sélectifs

Les drimanes (Figure 35) sont des sésquiterpénoïdes isolés de plusieurs familles de plantes comme les Cannellaceae, les Winteraceae, les Polygonaceae. De nombreux nouveaux dérivés du drimane ont été isolés de *Zygogynum baillonii* (Winteraceae), une plante endémique de Nouvelle Calédonie. L'ensemble de ces molécules naturelles est inactif sur Bcl-xL mais présente une bonne activité sur Mcl-1.^{46, 47} Des travaux sont actuellement en cours dans l'équipe sur cette famille de molécules, en collaboration avec l'équipe de Joëlle Wiels à l'Institut Gustave Roussy (thèse de Florian Daressy 2017-2020).



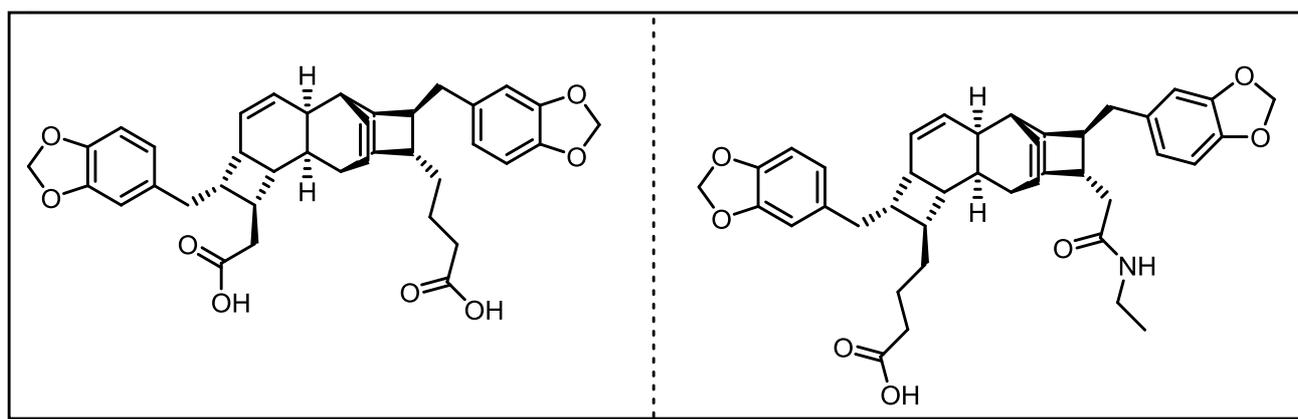
20 : X = OCH₃
21 : X = H

Figure 35 Structures des dérivés du drimane

B- Les kingianines

Dans le cadre des travaux de thèse d'Aurélien Leverrier (2007-2010), le criblage de plantes provenant de Malaisie a permis la sélection de plusieurs espèces possédant une bonne affinité pour la protéine Bcl-xL. L'étude phytochimique d'*Endiandra kingiana* (Lauraceae) a conduit à l'isolement d'une série de polycétides originaux racémiques, les kingianines A-N, possédant un squelette carboné pentacyclique nouveau.⁴⁸⁻⁴⁹

La (\pm)-kingianine G est la plus active ($K_i = 2 \mu\text{M}$). D'autre part, certains énantiomères obtenus après purification par HPLC chirale présentent de bonnes affinités, comme la (-)-kingianine G ($K_i = 1 \mu\text{M}$), la (+)-kingianine G ($K_i = 5 \mu\text{M}$), et la (-)-kingianine L ($K_i = 4 \mu\text{M}$) (Figure 36).⁴⁹⁻⁵⁰



Kingianine G

22

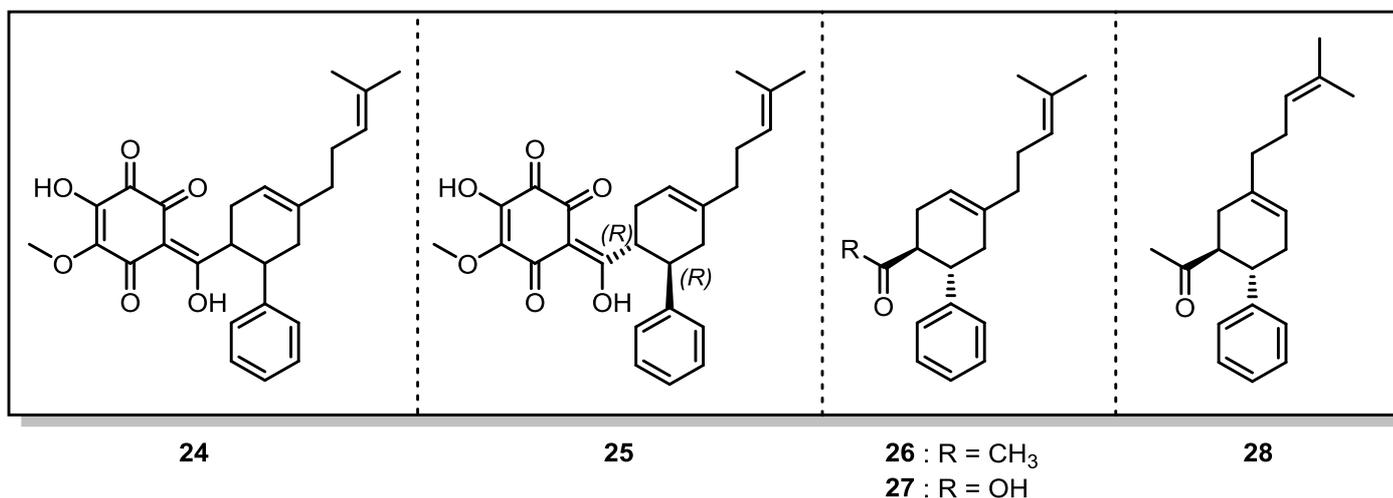
Kingianine L

23

Figure 36 Structures des kingianines

C- Les analogues de la fissistine

Sur la base des résultats des tests d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid, une purification bioguidée de l'extrait de l'écorce de *Fissistigma latifolium* a conduit à l'identification de 5 nouveaux composés racémiques (Figure 37) : la (±)-écarlottone ((-)-**24** et (+)-**25**, respectivement après séparation par HPLC chirale), la (±)-fislatifolone **26**, la (±)-isofislatifolone **27** et l'acide (±)-fislatifolique **28**. La (+)-écarlottone **25** a présenté une bonne activité inhibitrice des deux protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 (4,8 et 2,4 μ M respectivement), ce qui fait de ce composé un candidat prometteur pour des travaux de pharmacomodulation.⁵¹⁻⁵² Ceux-ci sont actuellement en cours dans l'équipe (thèse de Shelly Gapil, 2015-2018).



24

25

26 : R = CH₃

27 : R = OH

28

Figure 37 Structures des analogues de la fissistine

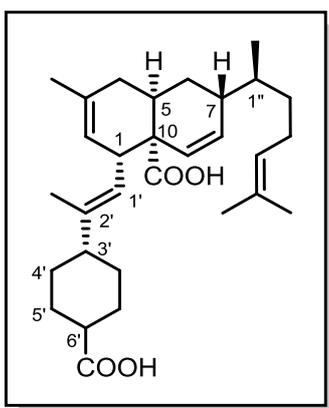
D- La meiogynine A et ses analogues : des inhibiteurs duals de Bcl-xL et Mcl-1

Parmi 1470 extraits de plantes malaysiennes qui ont été criblés en 2009, l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *Meiogyne cylindrocarpa* (*Annonaceae*, Figure 38) a montré une bonne inhibition de l'interaction Bcl-xL/Bak.^{39, 53}



Figure 38 Photos des parties de la *Meioygne cylindrocarpa*, Annonaceae

Une purification bioguidée de cet extrait a conduit à l'isolement de la meioygnine A **29** (Figure 39). Ce composé sesquiterpénique très original possède un squelette carboné de type *cis*-décàline, quatre doubles liaisons, cinq centres asymétriques (1, 5, 10, 7 et 1''), et deux fonctions acide carboxylique, dont l'une est à la jonction des deux cycles de la *cis*-décàline.⁵³



29

Figure 39 Structure de la meioygnine A **29**

Une voie probable de biosynthèse de la meioygnine A **29** pourrait impliquer une réaction de Diels-Alder bio-catalysée entre deux unités sesquiterpéniques **30** et **31**.^{53, 54} Inspirée par cette hypothèse, la synthèse totale de la meioygnine A **29** a été réalisée au laboratoire en 11 étapes par une approche convergente et sélective ; la dernière étape consistant en une cycloaddition de Diels-Alder entre le triène **30** et un diénophile chiral **31** (Figure 40).⁵⁴

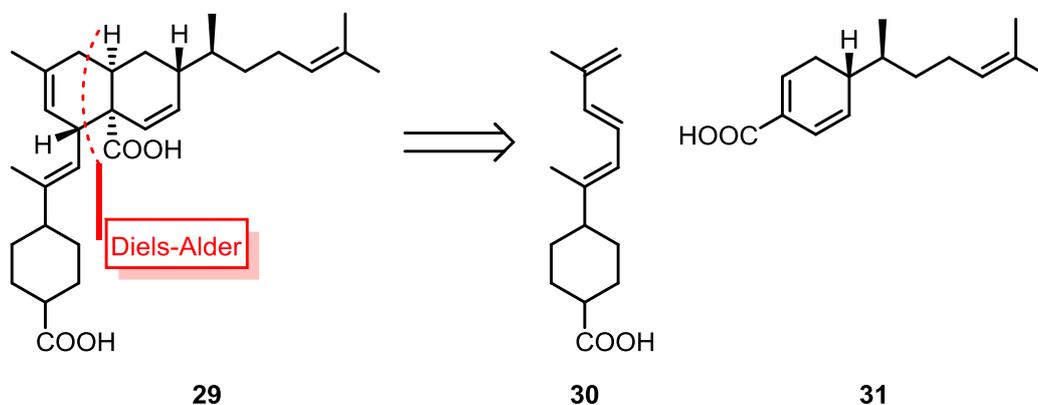


Figure 40 Analyse rétrosynthétique mettant en jeu l'étape bioinspirée de Diels-Alder

Cette synthèse a permis de déterminer la configuration absolue de la meiogynine A **29** et d'élaborer une voie de synthèse d'analogues (dans le cadre de l'ANR JC ApoMeioA, porteur : F. Roussi). L'affinité de la meiogynine A **29** pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1 a été évaluée par des essais de compétition par polarisation de fluorescence avec le domaine BH3 des protéines Bak et Bid marquées. La molécule présente une affinité de 10,8 μM pour Bcl-xL et de 5,2 μM pour Mcl-1.⁵³ D'autre part, un de ses diastéréomères (présentant une configuration opposée sur C1") a été trouvé trois fois plus actif.

Une collaboration a été mise en place avec une équipe de RMN (E. Guittet, ICSN, collaboration N. Birlirakis et G. Rivière) afin de déterminer le site de fixation de la meiogynine A **33** et de ses analogues sur Bcl-xL et sur Mcl-1 par des expériences RMN d'interaction protéines-ligand. Cette étude a démontré que ces composés se fixent dans Bcl-xL et Mcl-1, au niveau d'un sillon hydrophobe (siège des interactions avec la plupart des autres inhibiteurs connus), selon une stœchiométrie 1:1. L'étude a également permis de déterminer les acides aminés plus particulièrement impliqués dans cette interaction.

En parallèle, et grâce à une collaboration avec l'équipe de modélisation moléculaire de B. Iorga à l'ICSN, des études de docking *in silico* sur Bcl-xL ont permis de proposer un modèle de fixation plus précis (Dr C. Colas). L'interaction de la meiogynine A **33** et/ou de ses dérivés avec la protéine serait principalement due à des interactions hydrophobes ainsi qu'à deux interactions des fonctions acides avec deux résidus d'arginines (Arg¹³² pour le groupe COOH en position 10, et Arg¹³⁹ pour le groupe COOH en position 6', Figure 42). Ces études ont également permis d'identifier les modifications chimiques à effectuer (principalement en modifiant la chaîne latérale prényle).¹

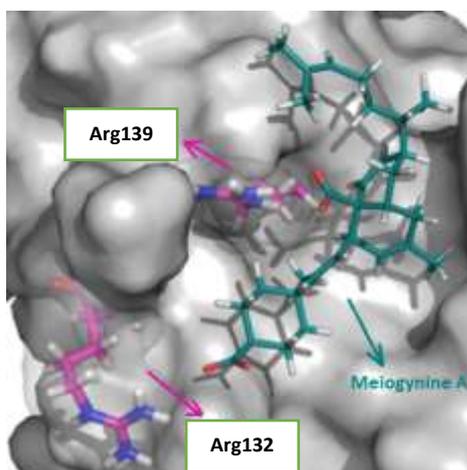


Figure 41 Modèle moléculaire de la meiogynine A **29** dans Bcl-xL ¹

Si la meiogynine A **33** est active sur les protéines cibles, elle n'est cependant pas cytotoxique. C'est pourquoi, des travaux de pharmacomodulation ont été entrepris, et des analogues de première génération ont été conçus, ce qui a permis d'établir les premières relations structure-activité. Un exemple est le composé **32** (Figure 42), où le cyclohexane dans la partie sud de la molécule a été remplacé par un cycle aromatique. Ces analogues possèdent

une affinité comparable à celle de la meiogynine A **29** (K_i du composé **32** = 4,7 μM pour Bcl-xL et 6,3 μM pour Mcl-1)^{1, 55} mais sont cytotoxiques sur de plusieurs lignées de lymphôme (CI_{50} < 10 μM), et induisent l'apoptose en activant la voie intrinsèque (Joëlle Wiels, IGR).¹

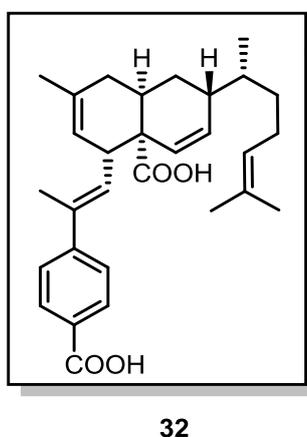


Figure 42 Structure du composé **32**, un analogue de première génération de la meiogynine A **29**

Par la suite, des analogues de deuxième génération **33** portant un atome de chlore sur le carbone 2', et plus actifs sur les protéines cibles ont été synthétisés en modulant la chaîne latérale. Le rôle de l'atome de chlore en position 2' est d'augmenter la réactivité du triène cible lors de la réaction de Diels-Alder. D'autre part, il pourrait permettre la fonctionnalisation de la partie ouest des analogues par des couplages organométalliques. Un intermédiaire commun **34** a été synthétisé (Figure 43). La présence d'un chlore en position 7'' a permis de le fonctionnaliser par couplage de type Buchwald-Hartwig et d'introduire différents motifs aromatiques.^{39, 56, 57}

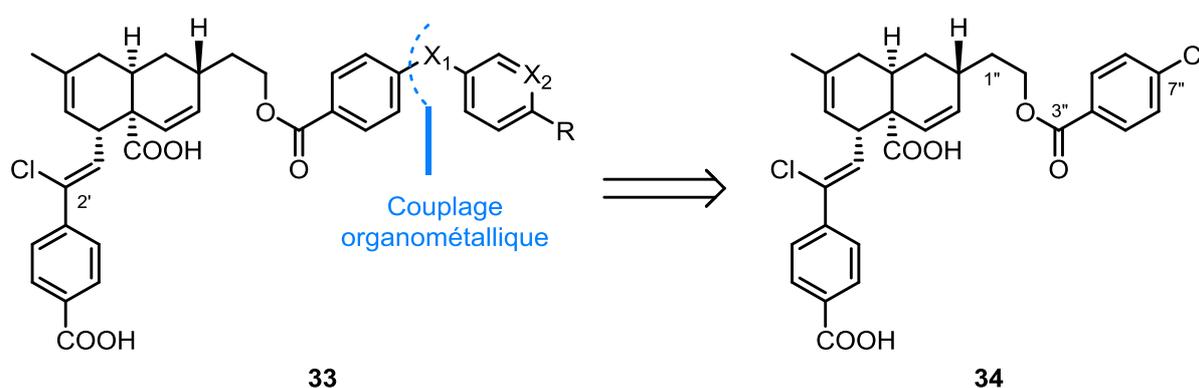
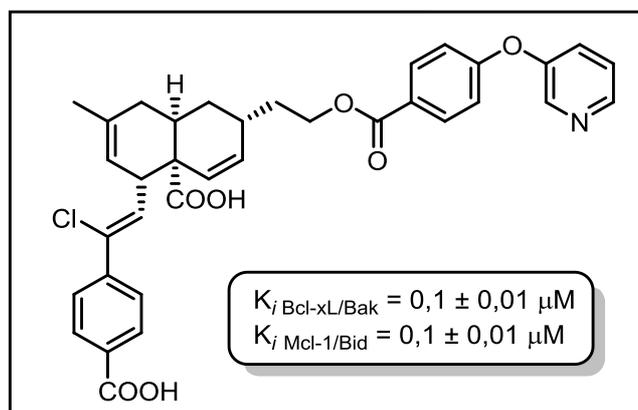


Figure 43 Structure commune des analogues de deuxième génération **33** et leur intermédiaire commun **34**

Parmi la vingtaine d'analogues élaborés, le composé **35** s'est révélé être 50 fois plus actif que la meiogynine A **29** et aussi actif que certains inhibiteurs multiples actuellement en essais cliniques, avec une affinité de 0,1 μM pour les interactions Mcl-1/Bid et Bcl-xL/Bak (

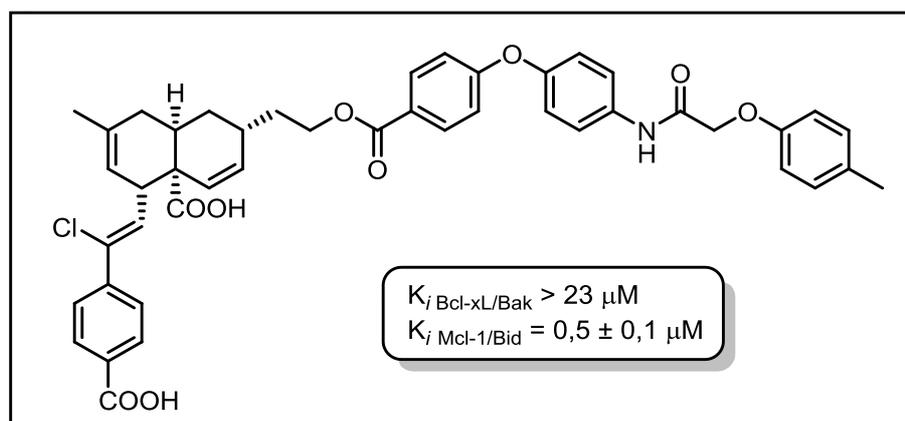
Figure 44).^{39, 56, 57}



35

Figure 44 Structure du composé **35**, un analogue de deuxième génération de la meioygnine A **29**

En outre, un composé, la molécule **36** (Figure 45), s'est montré sélectif vis à vis de Mcl-1 avec une affinité de $0,5 \mu\text{M}$.^{39, 56}



36

Figure 45 Structure du composé **36**, un analogue de deuxième génération de la meioygnine A **29**

Dans le but de mieux comprendre le mode d'interaction des analogues de la meioygnine A **29** avec leurs cibles, des expériences de docking ont été réalisées sur les composés **35** et **36** en utilisant un conformère de Bcl-xL généré par dynamique moléculaire.^{56, 58} D'après ces expériences, le positionnement du composé **35** au sein de Bcl-xL est similaire à celui de la meioygnine A **29** à cause d'interactions hydrophobes avec des résidus du sillon ainsi

qu'à deux liaisons hydrogène entre le groupe biaryl éther oxygène et l'azote de la pyridine du composé **35** avec la chaîne latérale des résidus Arg¹⁰⁰ et Tyr¹⁹⁵ (Figure 46).⁵⁶

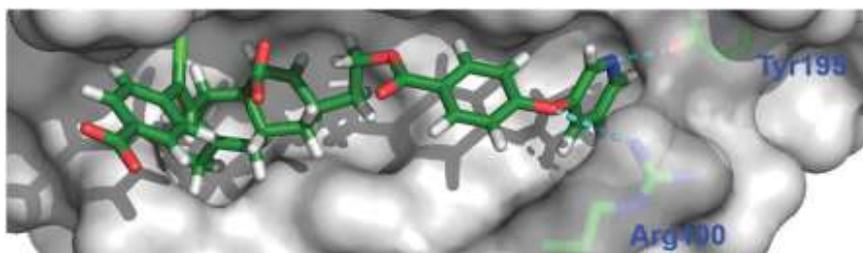


Figure 46 Docking du composé **35** dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL

D'autre part, une étude de l'interaction du composé **35** avec Bcl-xL a été réalisée par RMN par Gwladys Rivière (Equipe d'Éric Guittet, ICSN). Les données obtenues ont montré que les résidus impliqués sont localisés au niveau des poches hydrophobes 1 et 2 (représentées par des boules jaunes et noires respectivement, Figure 47).

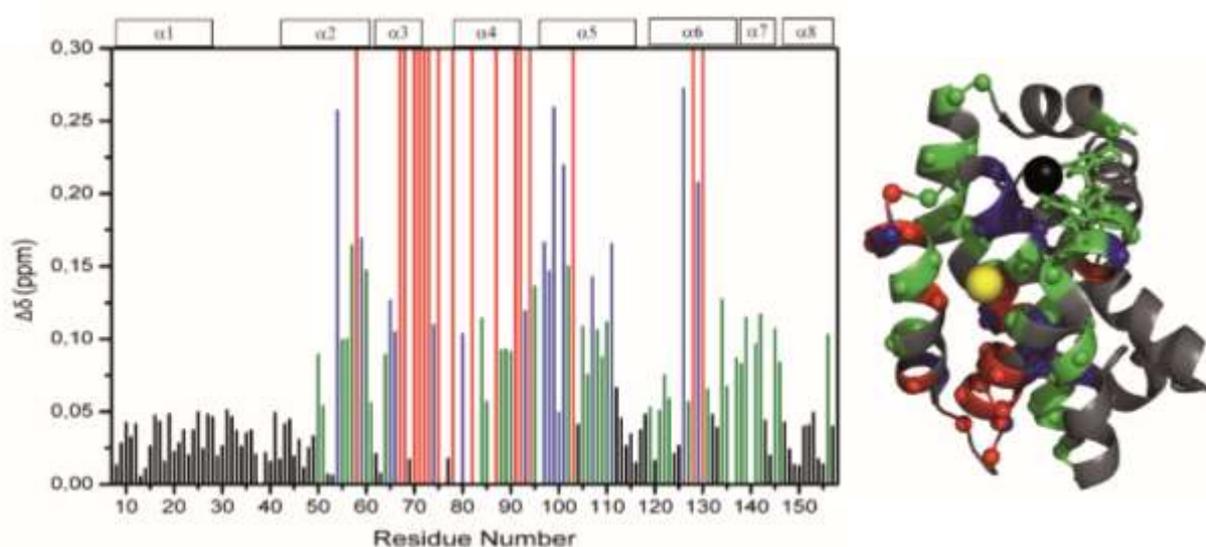
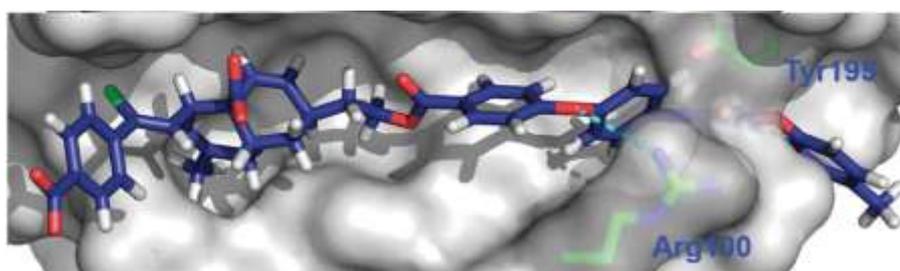


Figure 47 Données de titration du composé **35** sur la protéine Bcl-xL marquée à l'azote 15 (les barres rouges indiquent les résidus élargis)

Le docking a montré que le composé **36** ne peut pas se fixer dans le même site de liaison que le composé **35** à cause d'une gêne stérique entre le groupement 4-amido et les résidus Arg¹⁰⁰ et Tyr¹⁹⁵. Ce résultat est en accord avec la mauvaise affinité observée pour ce composé avec la protéine Bcl-xL (Figure 48).⁵⁶



Ces résultats confirment l'influence de la chaîne latérale dans l'interaction protéine-ligand. En effet, grâce aux interactions hydrophobe et aux liaisons hydrogène entre la chaîne latérale du ligand et certains acides aminés de la protéine cible, on peut grandement gagner en affinité et/ou en sélectivité.

E- Conclusion et objectifs de la thèse

Figure 48 Docking du composé 36 dans le sillon hydrophobe de Bcl-xL

Le dérèglement de l'apoptose dans de nombreux cancers fait de cette voie et des protéines de la famille Bcl-2 des cibles prometteuses pour la thérapie anti-cancéreuse. Le développement de petites molécules ciblant les protéines de la famille Bcl-2 s'est révélé être un grand défi. Cependant, depuis une quinzaine d'année, grâce à des approches variées et souvent innovantes, des composés très actifs ont été développés. Plusieurs composés sont actuellement en essais cliniques et une molécule, le venetoclax, a obtenu la première autorisation de mise sur le marché en avril 2016. Ce succès thérapeutique démontre que les protéines de la famille de Bcl-2 sont des cibles pertinentes.

La majorité des inhibiteurs en cours de développement sont sélectifs d'une protéine anti-apoptotique de cette famille et de nombreux cas de résistance liés à la surexpression de protéines anti-apoptotiques non ciblées ont été rapportés dans la littérature. C'est pourquoi, il semble prometteur de trouver des inhibiteurs multiples possédant une très bonne affinité sur plusieurs protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, notamment, Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 ou d'envisager d'associer deux inhibiteurs sélectifs dans un même traitement.

Les substances naturelles sont une source importante de nouvelles molécules à structures originales, et de nombreuses petites molécules utilisées actuellement en chimiothérapie sont d'origine naturelle. La meiogynine A **29** est un inhibiteur dual des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 qui a été isolé et synthétisé dans notre équipe. Des analogues de première et de deuxième génération ont été élaborés par la suite. Certains d'entre eux, comme le composé **35**, présentent une activité duale sub-micromolaire. Contrairement aux analogues de première génération, ces composés ne sont cependant pas cytotoxiques, probablement en raison de la présence d'une fonction ester sur la chaîne latérale qui peut s'hydrolyser en un métabolite inactif **37** (Figure 49).

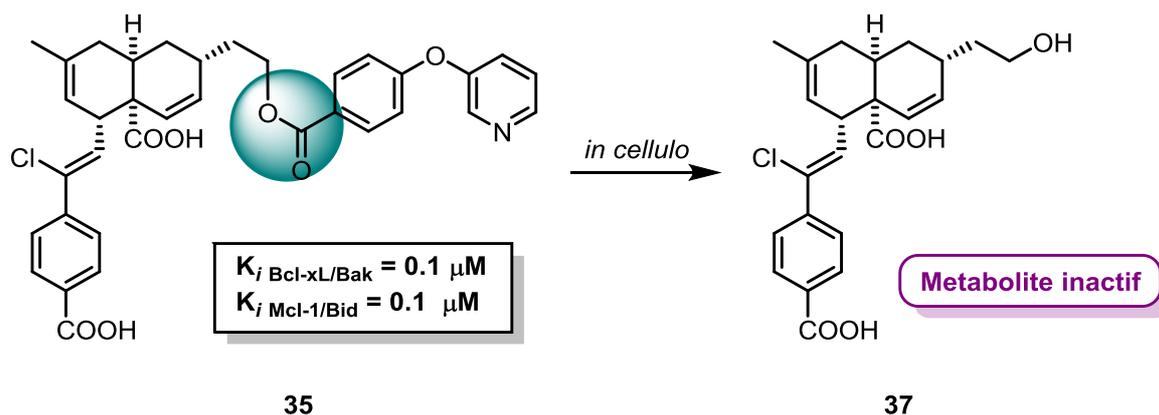


Figure 49 Possible explication de la non-cytotoxicité d'analogues de deuxième génération de la meiogynine A 29

Ainsi, mon projet de thèse vise à développer des inhibiteurs multiples, duals ou sélectifs des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 et cytotoxiques sur des lignées cellulaires sur exprimant ces mêmes protéines.

Pour cela, un essai biologique de mesure d'inhibition de l'interaction Bcl-2/Bim sera mis en place et robotisé afin d'évaluer l'activité biologique des composés synthétisés. De plus, la voie de synthèse bioinspirée d'un précurseur commun **39** des nouveaux analogues sera mis au point à l'échelle de plusieurs grammes. Ce précurseur **39** permettra d'élaborer différents analogues **38** de troisième génération de la meiogynine A **29** dont l'ester de la chaîne latérale sera remplacé par une fonction plus stable *in cellulo* (Figure 50). Il apparaît que ce groupement résistant *in cellulo* qui va remplacer le lien ester doit être :

- 1) peu encombrant pour répondre aux contraintes spatiales mises en évidence par les expériences de docking décrites plus haut ;
- 2) il doit permettre de garder le même espacement entre la décaline et le premier cycle aromatique de la chaîne latérale.

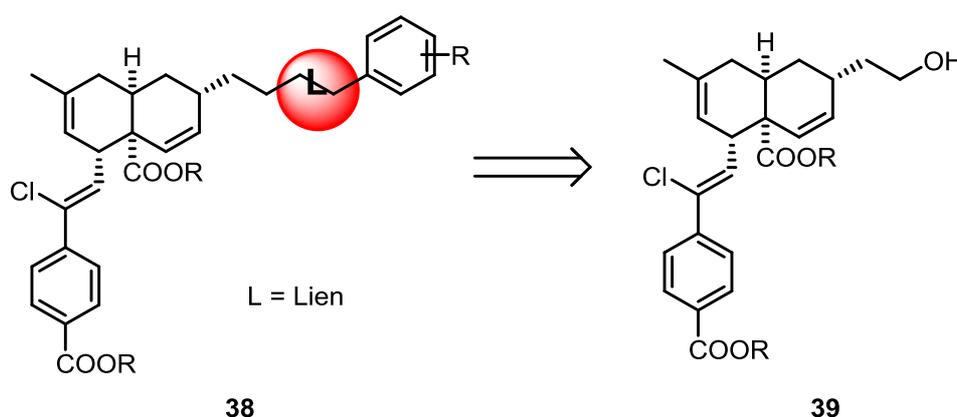


Figure 50 Analyse rétrosynthétique des analogues de troisième génération de la meiogynine A 29

L'activité biologique des composés synthétisés sera évaluée sur les trois cibles *in vitro*. Ensuite, des analyses de cytotoxicité pour les analogues les plus actifs de chaque famille seront réalisées par nos collaborateurs à l'Institut Gustave Roussy.

CHAPITRE 2

Chapitre II : Mise en Place d'un Test d'Inhibition par Polarisation de Fluorescence

I- Les essais biologiques relatifs aux protéines de la famille Bcl-2 décrits dans la littérature

Le développement de petites molécules antagonistes des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 nécessite la mise en place d'une méthode d'évaluation de l'activité inhibitrice ou modulatrice de ces molécules *vis-à-vis* des interactions protéine-protéine. De nombreuses techniques permettant l'étude des interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques ont ainsi été développées depuis une quinzaine d'années. Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients. De ce fait, il est conseillé de combiner au moins deux techniques différentes afin de confirmer qu'une molécule est un hit.

A- L'ELISA

La méthode **ELISA** (**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) est une méthode de dosage immuno-enzymatique sur support solide. L'ELISA est la technique la plus utilisée en immunologie, autant pour les essais quantitatifs que qualitatifs. De plus, c'est la méthode utilisée par plusieurs groupes de recherche, comme le groupe de Yasui qui a très récemment identifié un nouvel inhibiteur de l'interaction entre la protéine Bcl-6 et son corépresseur BCoR. Cet inhibiteur, issu d'un criblage à haut débit suivi par une optimisation structurale des hits sélectionnés, pourra faire un lead pour certains cancers et maladies auto-immunes.⁵⁹

D'un point de vue expérimental, un complexe peptide BCoR-biotine est ajouté dans une plaque dont les puits sont recouverts avec de la streptavidine. La très forte affinité streptavidine-biotine permet de fixer le peptide BCoR sur la plaque. L'excès du complexe

peptide BCoR-biotine est ensuite lavé. Un mélange comprenant la protéine Bcl-6 avec un tag histidine et le composé à tester est ajouté dans les puits.⁵⁹ Nous distinguons deux cas :

- Le composé est suffisamment affin pour la protéine Bcl-6 : il se lie à cette dernière. Ce complexe est ensuite éliminé par lavage (Figure 51).⁵⁹

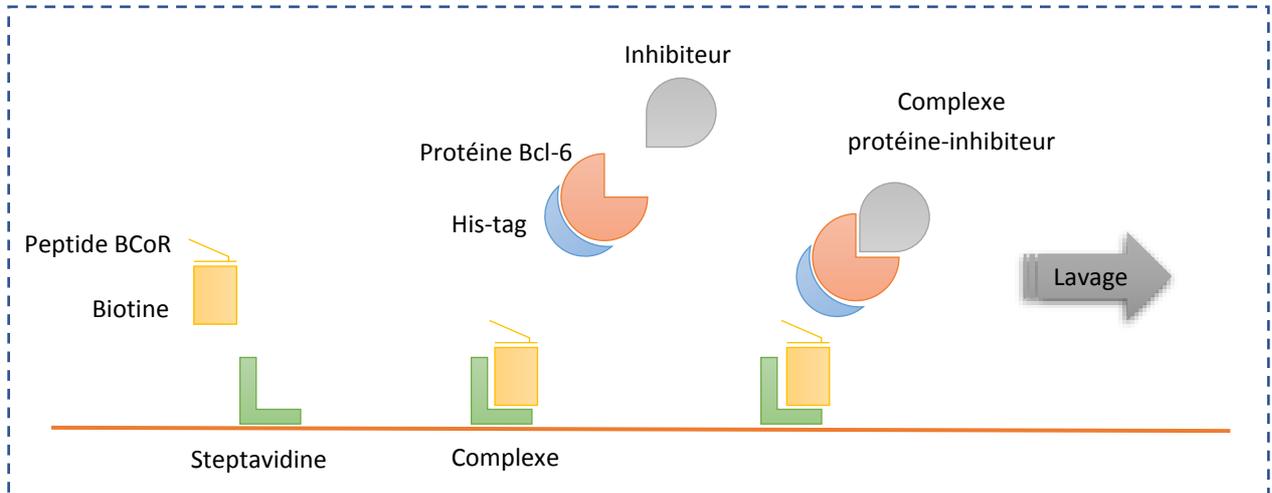


Figure 51 Principe de l'ELISA : cas d'un inhibiteur de la protéine Bcl-6

- Le composé n'a pas d'affinité pour la protéine cible : la protéine Bcl-6 va se lier au peptide BCoR. Seul le composé sera éliminé au lavage.⁵⁹

Ensuite, un anticorps anti-tag histidine conjugué à une peroxydase (HRP) est ajouté aux puits. Cet anticorps conjugué vient se fixer sur le tag histidine des protéines anti-apoptotique. Après lavage, la quantité en peroxydase dans les puits est mesurée en ajoutant un agent luminescent (Figure 52). Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport aux témoins positifs (des puits qui ne contiennent pas la protéine Bcl-6), et aux témoins négatifs (des puits ne contenant pas de composé).⁵⁹

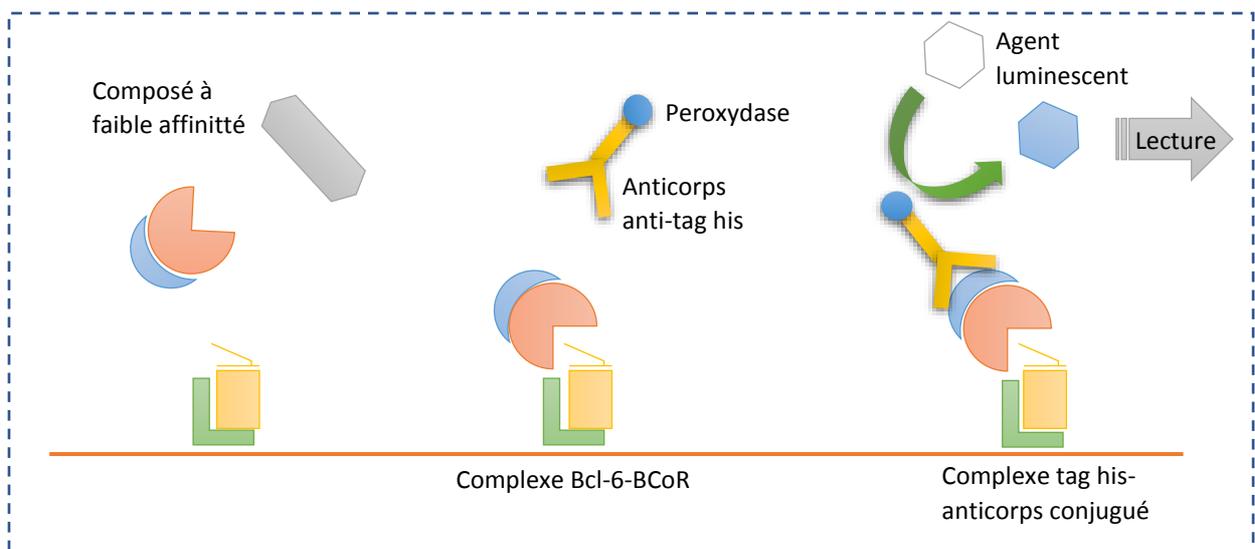


Figure 52 Principe de l'ELISA : cas d'un composé à faible affinité à la protéine Bcl-6

Malgré le coût relativement élevé des plaques et des kits spécifiques à chaque test d'ELISA, ainsi que les nombreuses étapes de lavage, un des avantages de cette méthode est qu'elle n'implique pas l'utilisation des cellules entières. L'ELISA permet également d'établir une relation dose-réponse pour les composés testés, et déterminer ainsi la concentration inhibitrice CI_{50} .⁵⁹

B- Le BRET et le FRET

Des méthodes qui impliquent le transfert d'énergie entre composés fluorescents sont également utilisées pour la recherche d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, le **BRET** (**B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) et le **FRET** (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) ont été par exemple utilisés par le groupe de Vo.⁶⁰⁻⁶¹

Le BRET implique un peptide pro-apoptotique fusionné à la luciférase de *Renilla* (RLuc) et une protéine anti-apoptotique fusionnée avec la protéine fluorescente jaune (YFP). Ces composants sont transférés dans des plaques multi-puits contenant le composé à évaluer et la coelentérazine, un substrat de la luciférase. Si le produit n'a pas d'affinité pour la protéine anti-apoptotique, le peptide pro-apoptotique occupe le site de fixation de la protéine anti-apoptotique. En parallèle, la luciférase oxyde la coelentérazine et émet un photon. Comme la luciférase est suffisamment proche de la protéine YFP ($< 100 \text{ \AA}$) grâce à la liaison entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, la YFP sera excitée par le photon émis, et va émettre en conséquence de la lumière à 530 nm (Figure 53).⁶¹

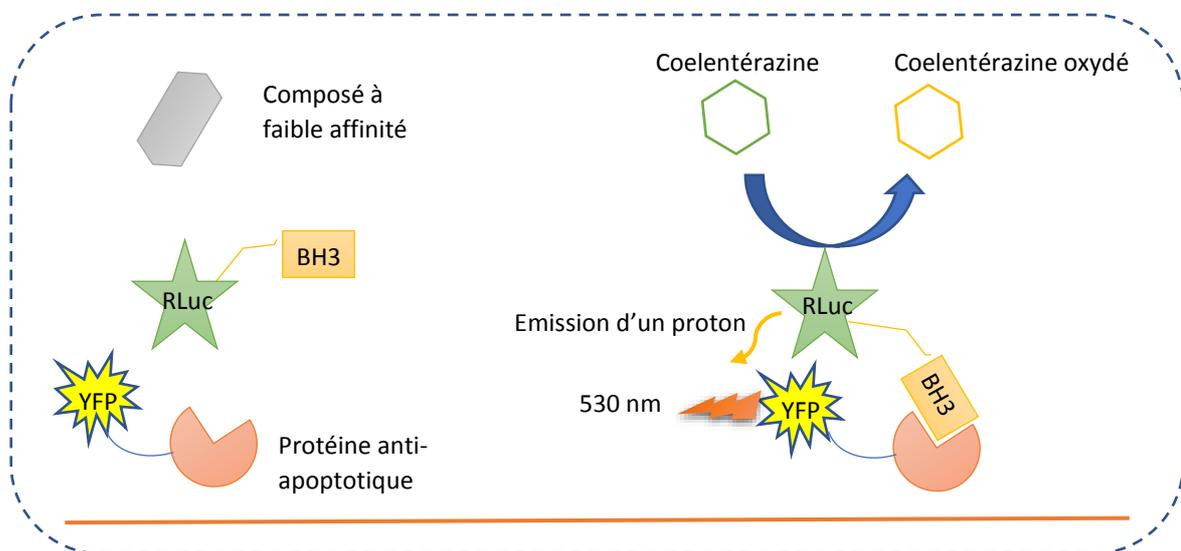


Figure 53 Principe de la technique BRET utilisé par Vo et coll.

Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence appelé plus communément **FRET** (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) est un phénomène de la mécanique quantique qui se produit entre un donneur fluorescent et un accepteur fluorescent. Le principe de la technique du FRET est globalement similaire à celui du BRET, mis à part le type de fluorophore utilisé. Un exemple du donneur fluorescent utilisé dans le FRET est la **GFP** (**G**reen **F**luorescent

Protein) ou la Protéine Verte Fluorescente, dont le pic d'absorption majoritaire est à 395 nm. La photoactivation de ce donneur entraîne une réaction autocatalytique provoquant l'émission d'une lumière verte avec un pic d'émission à 508 nm. Les accepteurs d'énergie utilisés, tels que la Cyanine 5 (Cy5), présentent des propriétés spectrales dans le proche infrarouge. En association avec la microscopie à fluorescence, la technique du FRET ouvre également une nouvelle approche en biologie. Elle permet d'étudier des activités protéiques *in vitro* ou dans la cellule, comme rapporté récemment par Vartak et coll.⁶²

Le FRET permet de mesurer des interactions protéine-protéine, des activités enzymatiques ou encore des activations protéiques.⁶² En revanche, le FRET, aussi bien que le BRET, ne sont pas compatibles lorsqu'il y a un recouvrement entre les spectres d'excitation et d'émission.

C- Les billes magnétiques

Dans le but de cribler une banque d'extraits microbiens, un essai de compétition impliquant l'utilisation de billes magnétiques a été mis en place par le groupe de Pisoni.⁶³ Dans cet essai, un agent chélatant, l'acide nitriloacétique est immobilisé sur des billes de saccharoses. Il permet de fixer à la surface des billes des ions Ni^{2+} . Les billes chargées sont incubées dans un premier temps avec la protéine anti-apoptotique comportant un tag histidine et le composé à tester. Grâce au tag histidine, la protéine anti-apoptotique se fixe sur les billes par interaction avec les ions de Ni^{2+} . Un peptide pro-apoptotique marqué à la fluorescéine est ensuite ajouté. Une étape de lavage permet d'éliminer l'excès de protéine, peptide, et/ou de composé. Le signal est lu au fluorimètre dans des tubes fixés sur un support aimanté. Ceci permet de distinguer si :⁶³

- Le composé est un bon inhibiteur de la protéine anti-apoptotique. Dans ce cas, le peptide pro-apoptotique fluorescent est déplacé de son site de fixation sur la protéine anti-apoptotique. En conséquence, le signal de fluorescence est minimal (Figure 54).⁶³

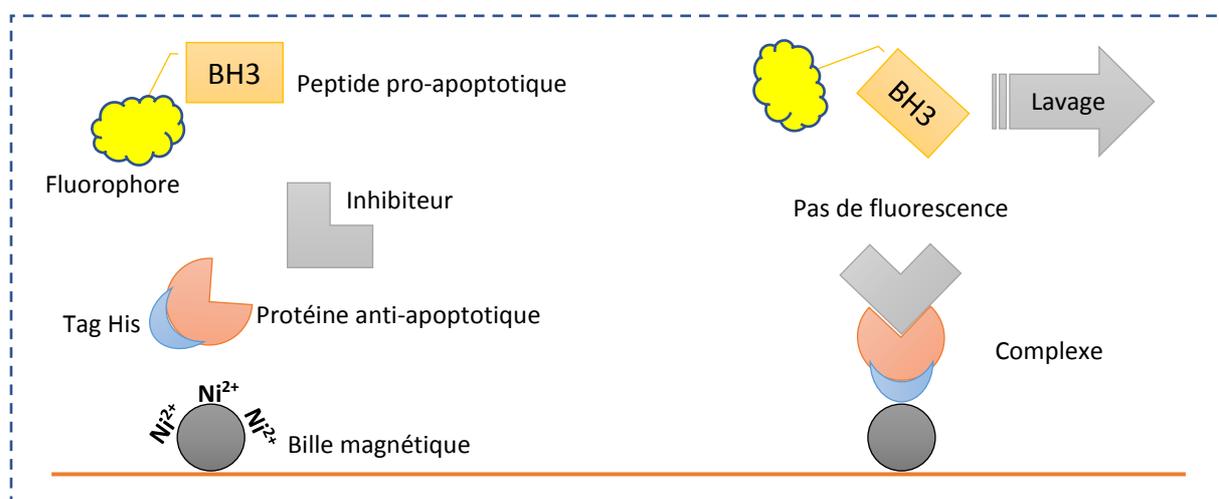


Figure 54 Principe de la technique utilisant des billes magnétiques - cas d'un inhibiteur

- Le composé n'a pas d'affinité pour la protéine anti-apoptotique. Le peptide fluorescent reste en complexe avec sa cible, et le signal de fluorescence est maximal (Figure 55).⁶³

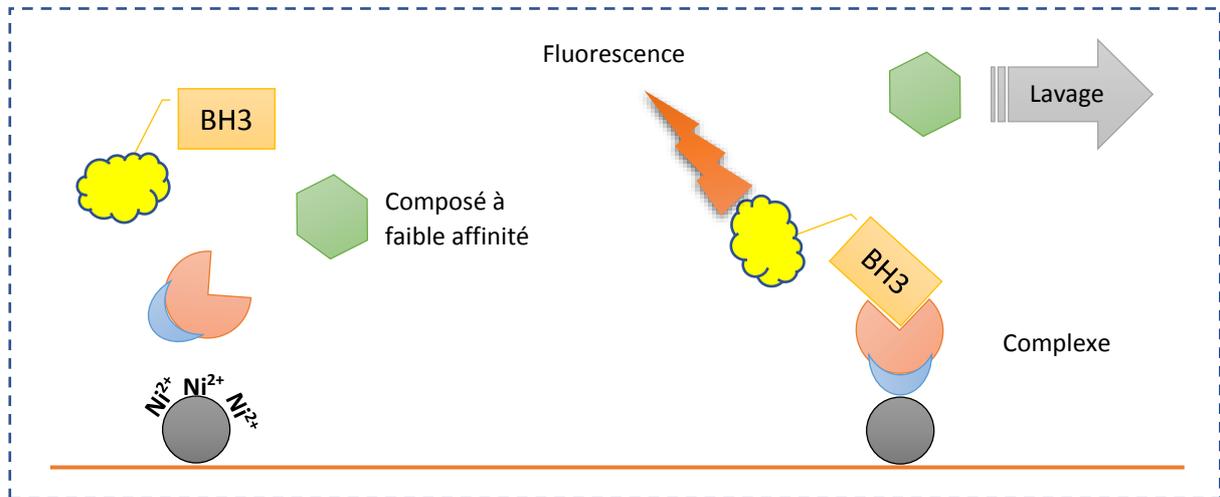


Figure 55 Principe de la technique utilisant des billes magnétiques - cas d'un composé à faible affinité

C'est une technique rapide, surtout lorsqu'elle est automatisée. De plus, certains modèles de lecteurs pourront être programmés pour qu'ils donnent des valeurs corrigées dans le cas d'autofluorescence de certains composés ou extraits.⁶⁴

D- La SPA

La SPA, ou Scintillation Proximity Assay, implique la fixation de la protéine anti-apoptotique à des billes magnétiques chargées avec des ions Cu^{2+} . Par ailleurs, le peptide BH3 est lié à une biotine, elle-même complexée à une streptavidine marquée au ^{35}S . Lorsque le peptide pro-apoptotique se lie à la protéine anti-apoptotique, il y a un transfert d'un électron de la streptavidine marquée à la bille scintillante qui émet alors un photon (Figure 56).⁶⁵

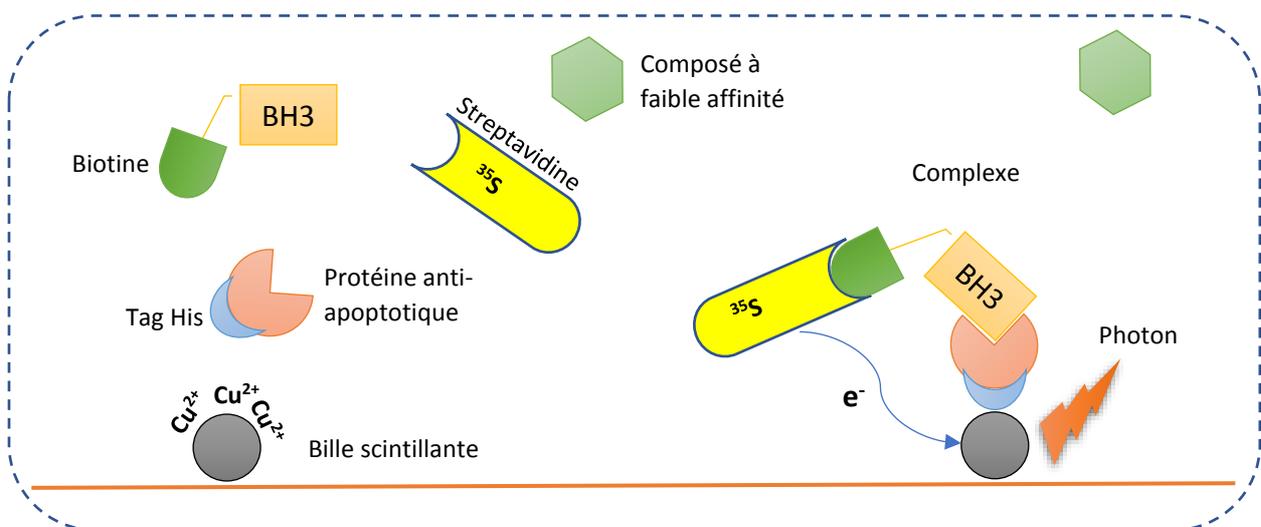


Figure 56 Principe de la technique SPA - cas d'un composé à faible affinité

La SPA est la méthode choisie par Whitfield et *coll.* pour la mise en évidence d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Malgré son coût relativement élevé à cause de l'utilisation de radio-isotopes, cette technique est assez rapide ; elle n'implique aucune étape de lavage. Elle n'est également pas sensible à l'autofluorescence de certains composés ou extraits.⁶⁵

E- La cytométrie en flux en mode multiplexe

La cytométrie en flux est une technique qui permet de caractériser, de manière qualitative et quantitative, des particules (cellules, composés, ... etc.) en milieu liquide. Il s'agit d'analyser les signaux optiques émis par une particule coupant le faisceau de lumière. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules, c'est-à-dire, ils correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule ou à leur structure (comme par exemple la présence de certains chromophores).⁶⁶

Lorsqu'elle est appliquée à l'étude des interactions protéine-protéine, cette méthode d'analyse implique l'utilisation de billes fluorescentes de polystyrène de différentes tailles et présentant des intensités de fluorescence de différents niveaux. Grâce à une couche extérieure de glutathion (GSH), ces billes sont capables de fixer des protéines anti-apoptotiques fusionnées avec la glutathion S-transférase (GST). Ensuite, un mélange contenant le composé à tester avec un peptide BH3 marqué à la fluorescéine est ajouté. Les signaux optiques captés suite à la fixation (ou non) du peptide marqué passent par des filtres optiques. Ils sont ensuite amplifiés, numérisés et traités par un ordinateur. L'intensité de fluorescence, et donc la quantité d'inhibiteur fixé est ainsi déterminée (Figure 57).⁶⁷⁻⁶⁸

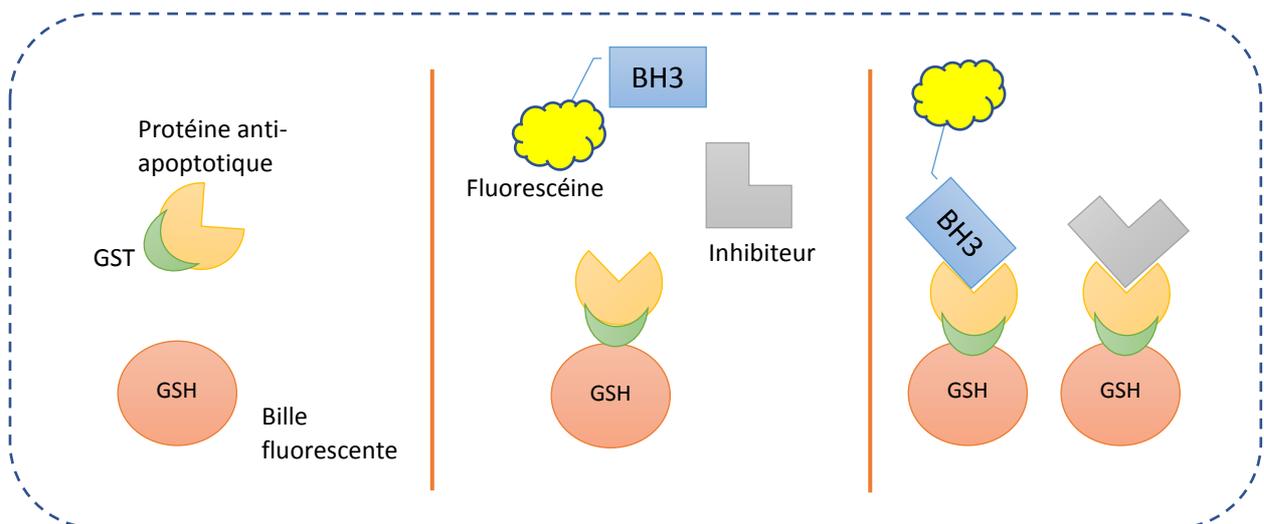


Figure 57 Principe de cytométrie en flux comme utilisé par Cupran et *coll.*

L'avantage de cette technique est qu'elle peut être réalisée en mode multiplexe, c'est-à-dire, qu'elle permet l'évaluation de chaque composé sur plusieurs protéines anti-apoptotiques dans un même essai. Elle est donc bien adaptée au criblage à haut débit.⁶⁸

F- La polarisation de fluorescence

La polarisation de fluorescence (**F**luorescence **P**olarization **A**ssay ou **FPA**) repose sur la théorie de fluorescence des molécules. Le principe de cette théorie repose sur le fait que les molécules existent dans de nombreux états énergétiques : des états de basse énergie et des états de plus haute énergie. Chacun de ces états électroniques possède des niveaux vibrationnels variés. La spectroscopie de fluorescence implique l'utilisation de la lumière polarisée. Celle-ci peut être absorbée par les molécules selon sa fréquence. En conséquence, les molécules, naturellement à l'état fondamental, accroissent leur énergie vers un des nombreux niveaux vibrationnels des niveaux électroniques. En retournant à l'état fondamental, les molécules excitées émettront de la lumière de plus basse énergie par rapport à la lumière excitante. Par analyse des fréquences émises, aussi appelées le spectre d'émission, la structure des différents niveaux de vibration peut être déterminée (Figure 58).⁶⁹⁻⁷¹

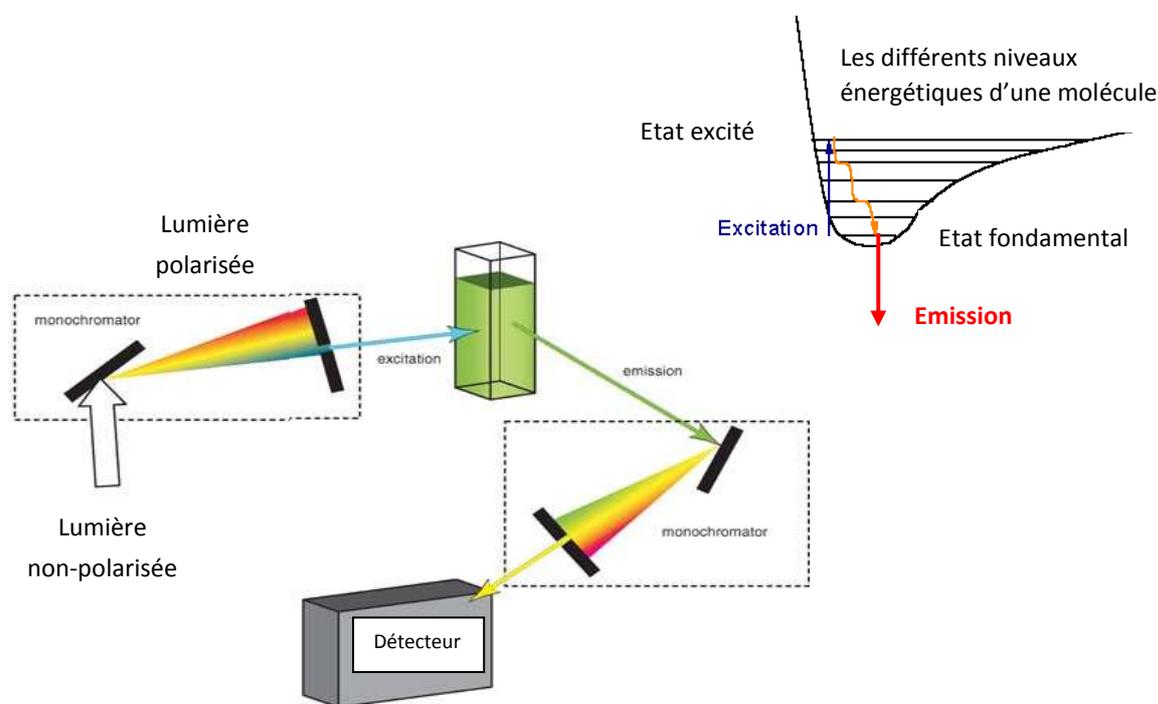


Figure 58 Principe de spectroscopie de fluorescence

La théorie de fluorescence des molécules a vu plusieurs applications depuis son développement par Perrin en 1926,^{68, 72} comme la mesure de la liaison de colorants à la protéine plasmique, l'albumine.⁷³ En outre, elle est largement utilisée en criblage qui a pour cible les interactions protéine-protéine. Plus récemment, elle est devenue la méthode de choix de Qian et Zhang pour la recherche des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.^{69, 71, 26, 74-75}

1. Principe du test de polarisation de fluorescence appliqué aux protéines apoptotiques

La spectroscopie de fluorescence permet l'analyse quantitative de la liaison d'un composé aux protéines anti-apoptotiques, *via* le déplacement de ce composé par un peptide fluorescent.^{69, 71, 76} On peut distinguer 2 cas selon l'affinité du composé testé :

- Le composé X se lie avec une bonne affinité à la protéine anti-apoptotique : le peptide BH3 fluorescent ne réussit pas à le déplacer. Il reste à l'état libre, et émet la lumière polarisée dans tous les plans, le signal de polarisation est faible.^{69, 71, 76}
- Le composé Y n'a pas d'affinité pour la protéine anti-apoptotique : il ne réussit pas à se fixer au niveau du sillon hydrophobe de la protéine anti-apoptotique, qui reste libre et fixe le peptide BH3 fluorescent pour former un gros complexe peu mobile. Ce complexe émet de la fluorescence dans le même plan que celui dans lequel il est excité. La valeur de polarisation est donc plus importante.^{69, 71, 76} Ceci est illustré dans la Figure 59.

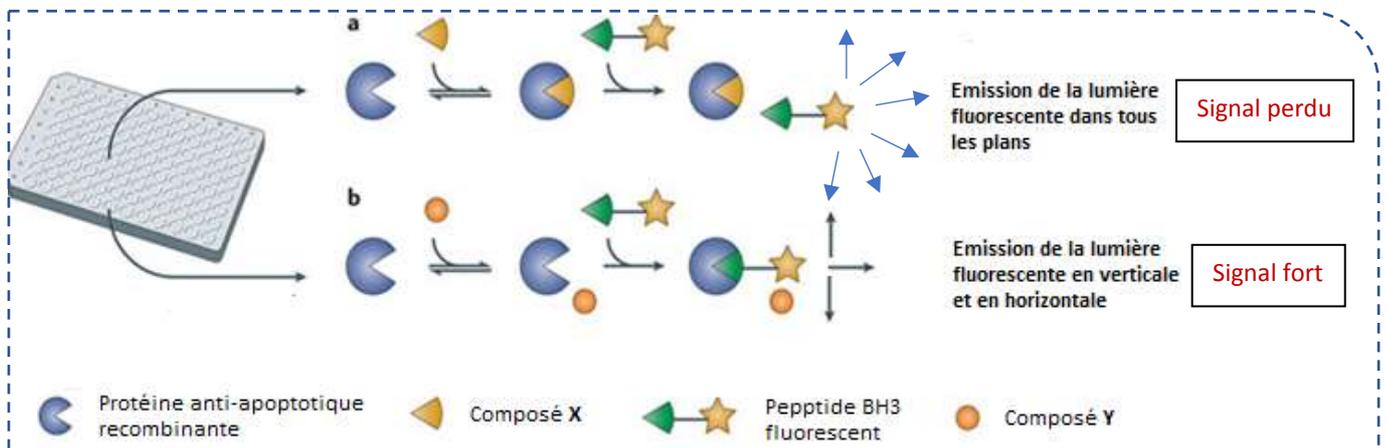


Figure 59 Principe de teste d'inhibition par polarisation de fluorescence⁵¹

La polarisation de fluorescence est exprimée en unités de millipolarisation (mP), qui sont calculées à partir de l'équation suivante^{69, 71} :

$$mP = 1000 * \left(\frac{I_s - I_p}{I_s + I_p} \right)$$

où : I_s correspond à l'intensité parallèle et I_p à l'intensité perpendiculaire.

Le profil de liaison du composé à tester est construit en traçant la variation des valeurs de mP en fonction de la concentration du composé testé à une concentration donnée du peptide fluorescent.^{69, 77}

2. Avantages et inconvénients

Cette technique est considérée sensible, rapide, robuste, économique, et relativement facile à mettre en place. Elle est bien adaptée à l'étude des interactions protéine-petites molécules et permet de réaliser des criblages à haut débit. Néanmoins, elle présente plusieurs

inconvenients comme les phénomènes de quenching et le fait qu'elle est incompatible avec l'utilisation de composés auto-fluorescents.^{69, 75-76, 78}

a) *Le phénomène de quenching :*

Il se peut que certains composés testés soient excités par le signal de fluorescence émis par le peptide fluorescent. En conséquence, ces composés excités émettent un signal qui interfère avec le signal lumineux mesuré comme représenté dans la Figure 60, ce qui fausse la mesure.

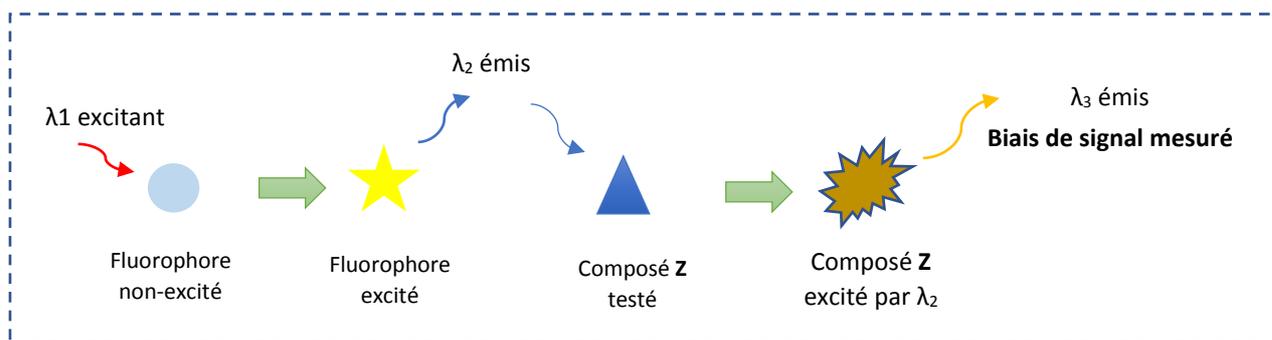


Figure 60 Représentation schématique du phénomène de quenching

b) *L'auto-fluorescence des produits et des extraits :*

Certains composés testés peuvent être intrinsèquement fluorescents à la longueur d'onde excitante. Ils émettent donc de la lumière à une longueur d'onde égale à ou proche de celle du fluorophore. Le signal de fluorescence mesuré est donc biaisé et cela conduit à des résultats faux.⁷⁹

Vu qu'en polarisation de fluorescence nous faisons une mesure ratiométrique d'intensité parallèle et perpendiculaire, l'impact du phénomène de quenching ou d'autofluorescence est partiellement réduit. En outre, le calcul de l'intensité totale I_T pour les puits de chaque plaque permet de détecter la présence de ces phénomènes. Celle-ci est calculée pour chaque puits selon la formule suivante :

$$I_T = I_s + 2 I_p$$

Où : I_T correspond à l'intensité totale, I_s correspond à l'intensité parallèle et I_p à l'intensité perpendiculaire.

La moyenne intensités totales des puits d'une plaque est considérée 100 %. Si un puits présente une valeur d'intensité totale I_T supérieure à 120 % ou inférieure à 80 %, celui-ci est exclu.⁸⁰

3. Historique de l'utilisation d'un test par polarisation de fluorescence dans notre équipe

Dans le cadre d'une collaboration entre l'ICSN et l'Institut de Recherche Servier (IdRS) visant à rechercher des inhibiteurs naturels de la protéine Bcl-xL, un test d'inhibition par polarisation de fluorescence sur Bcl-xL avait été mis au point et validé à l'IdRS. Par la suite, notre équipe s'est intéressée à la recherche d'inhibiteurs duals de Bcl-xL et Mcl-1 (ANR JC ApoMeioA). Cette évolution dans le programme de recherche et l'arrêt de la collaboration avec l'IdRS sur la cible Bcl-xL, ont nécessité la mise en place et la validation de deux essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1 à l'ICSN. Ces tests, développés et robotisés par Charlotte Gény et Vincent Dumontet, ont permis d'évaluer 850 extraits de plantes et fractions ainsi que 170 produits de synthèse, dont plusieurs ont montré une activité inhibitrice prometteuse sur les deux cibles.⁵²

La protéine Bcl-2 est surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses.⁷⁹ De plus, elle est impliquée dans la résistance à la chimiothérapie, c'est pourquoi, elle est considérée comme une cible potentielle pour le développement de nouveaux anticancéreux.^{79, 81} Dans la continuité de nos travaux, il nous a semblé indispensable de mettre en place un test biologique sur la protéine Bcl-2 afin d'être plus exhaustif dans l'évaluation biologique des protéines de cette famille sur les composés naturels et de synthèse déjà isolés dans l'équipe. C'est tout naturellement que nous nous sommes tournés vers la mise au point d'un test par polarisation de fluorescence similaire à celui que nous avons déjà mis au point. Pour se faire, nous nous sommes appuyés sur des collaborations avec des collègues biologistes et biochimistes de l'ICSN (**Plateforme CiBi** : Jérôme Bignon, Laure Eloy, Olivier Pamard ; **équipe d'Éric Guittet** : Éric Jacquet).

II- La mise en place d'un test d'inhibition par polarisation de fluorescence

A- Choix du couple de protéines

1. La protéine anti-apoptotique

La protéine Bcl-2 humaine existe sous deux isoformes :

1. L'isoforme α ou l'isoforme 2 : qui se compose de 239 acides aminés
2. L'isoforme β ou l'isoforme 1 : se composant de 205 acides aminés. Cet isoforme est amputé de 34 acides aminés en position C-terminale (Δ Cter) par rapport à l'isoforme α . C'est dans le but d'améliorer la solubilité de cette protéine que nous avons donc choisi d'utiliser pour notre test l'isoforme β de Bcl-2.⁸² (Figure 61).

Isoform α	1 MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDA GDVGAAPPGAAPAPGIFS	50
Isoform β	1 MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDA GDVGAAPPGAAPAPGIFS	50
Isoform α	51 SQPGHTPHPAASRD PVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVH LTLRQA	100
Isoform β	51 SQPGHTPHPAASRD PVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVH LTLRQA	100
Isoform α	101 GDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAF	150
Isoform β	101 GDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAF	150
Isoform α	151 FEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLH LHTWIQDNGGWDAFVE	200
Isoform β	151 FEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLH LHTWIQDNGGW-----	195
Isoform α	201 LYGPSMRPLDFDFSWLSLKTLLSLALV GACITLGAYLGHK	239
	:. . .	:. :
Isoform β	196 -----V GALGD-----VSLG-----	205

Figure 61 Alignement de la séquence de l'isoforme α de Bcl-2 humaine avec celle de l'isoforme β choisi pour notre test

La structure des deux isoformes est constituée de 6 hélices α avec un sillon hydrophobe sur la surface. La structure globale de la protéine Bcl-2(1) est constituée de deux hélices centrales, principalement hydrophobes (les hélices 5 et 6) et de quatre hélices α amphipathiques. L'hélice (1) (résidus 11-24) est reliée à l'hélice (2) (résidus 93-108) par une boucle raccourcie artificielle dérivée de la protéine Bcl-xL. Cette boucle se déstructure en solution. Les hélices 1 et 2, orientées parallèlement les unes par rapport aux autres, se croisent à un angle d'environ 45° . Une boucle longue, qui contient un tour de l'hélice 310, relie l'hélice 2 à l'hélice 4 (résidus 126-137) ce qui se traduit par une orientation presque orthogonale de ces deux hélices. Les hélices 4, 5 (résidus 144-163) et 6 (résidus 167-192) sont orientées d'une manière presque antiparallèle avec un coude en hélice 6 à l'His¹⁸⁴. Un tour irrégulier composé de deux résidus de glycine relie les hélices 6 à 7 (résidus 195-202), qui oriente l'hélice 7 orthogonale aux hélices 4, 5 et 6 (Figure 62).³

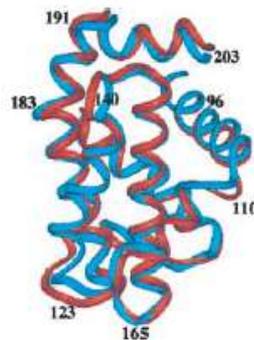


Figure 62 Superposition des squelettes des deux isoformes de Bcl-2 : Bcl-2(1) en rouge et Bcl-2(2) en bleu

Nous avons produit la protéine Bcl-2 à l'ICSN en collaboration avec l'équipe de E. Guittet. Au préalable, un brin d'ADNc contenant un fragment codant pour l'isoforme β de Bcl-2 et comportant un tag histidine en position N-terminale a été synthétisé. Un gène de résistance à la kanamycine a été incorporé à la construction afin de permettre la sélection des bactéries compétentes. Ce fragment a ensuite été inséré dans un vecteur, le plasmide pET28a qui se compose d'un total de 5369 paires de bases (Figure 63).

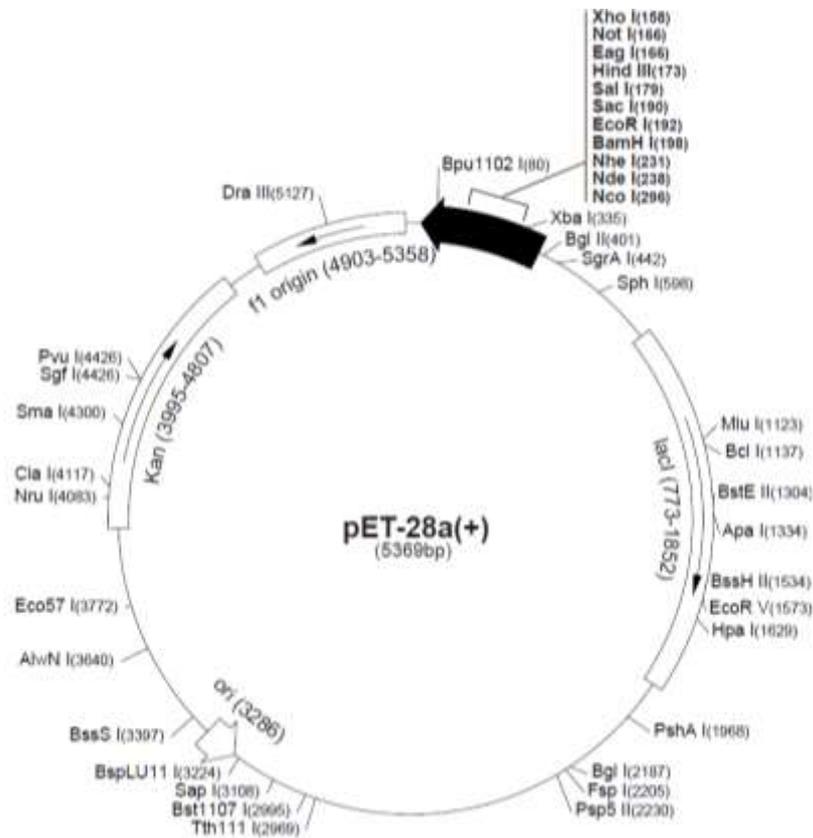


Figure 63 Le plasmide pET-28a contenant le construit codant pour la protéine Bcl-2

Bcl-2 a été produite dans des bactéries *E. coli* après incorporation du plasmide pET-28 par choc thermique et clonage. Ces bactéries ont été cultivées à 4 °C sur des boîtes de Pétri (milieu de culture LB contenant de la kanamycine à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les colonies transformées, résistantes à la kanamycine, ont été remises en culture, à 37 °C, jusqu'à une densité optique DO_{600} de 0,6. Un inducteur, l'**IPTG** (isopropyl-1- β -D-galactopyranoside), qui permet la transduction du gène de Bcl-2, a ensuite été ajouté. En fonction de la température, la production de Bcl-2 varie : le rendement en protéine recombinante est meilleur et la quantité de corps d'inclusion formés beaucoup plus faible à 20 °C en 24h qu'à 37 °C pendant 4h. En outre, l'ajout d'un stabilisant de protéine dans le tampon comme le glycérol, empêche l'agrégation de la protéine Bcl-2.

Après centrifugation du milieu de culture, le surnageant a été filtré puis transféré sur une colonne de nickel (AKTA Protein Purification Systems) équilibrée avec un tampon (pH 8) contenant 50 mM de Tris HCl, 500 mM de NaCl et 20 mM d'imidazole. La présence de Hisx6

tag à l'extrémité N-terminale de la protéine Bcl-2 a permis sa purification sur une colonne Ni-AKTA. En effet, grâce au tag histidine, la protéine Bcl-2 est retenue par une résine à base de nickel. Après élution des impuretés, la protéine est éluée par une solution d'imidazole à 500 mM. Cette première purification a été suivie d'une purification sur une colonne Superdex75 prep 180 mL. Les fractions collectées ont été analysées par électrophorèse (

Figure 64) :

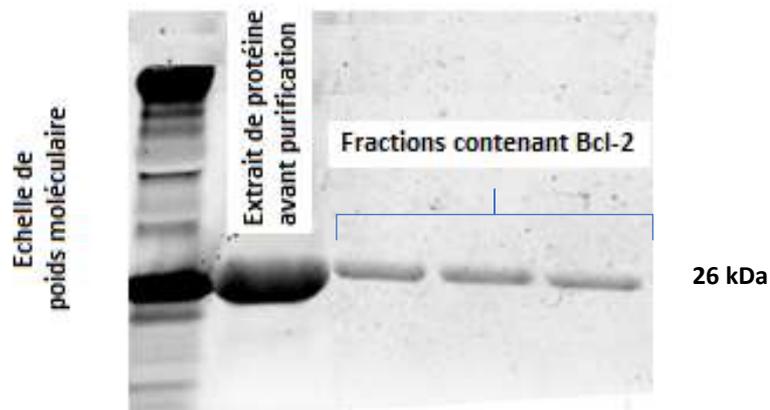


Figure 64 Gel SDS-PAGE de l'expression et la purification du deuxième lot de la protéine Bcl-2

En moyenne, 2 mg de la protéine Bcl-2 ont été obtenus par litre de culture d'*E. coli* soit 17 mg au total. La protéine Bcl-2 a été concentrée à 75 μ M et conservée à -80 °C.

2. Le peptide pro-apoptotique

Le choix du peptide pro-apoptotique associé à la protéine Bcl-2 s'est porté sur Bim. En effet, lors du titrage de la protéine Bcl-2 en présence d'une quantité fixe du peptide Bim-CF (3 nM), ce dernier présente un rapport signal sur bruit correct ainsi qu'une différence entre les maxima et minima d'environ 120 mP (Figure 65). Cette amplitude du signal est suffisante pour assurer une bonne qualité de l'essai. Elle est également comparable à celles obtenues lors du titrage de Bcl-xL et Mcl-1 avec 15 nM de Bak-CF et Bid-CF respectivement ($\Delta = 160$ mP pour Bcl-xL/Bak et 90 mP pour Mcl-1/Bid).⁵²

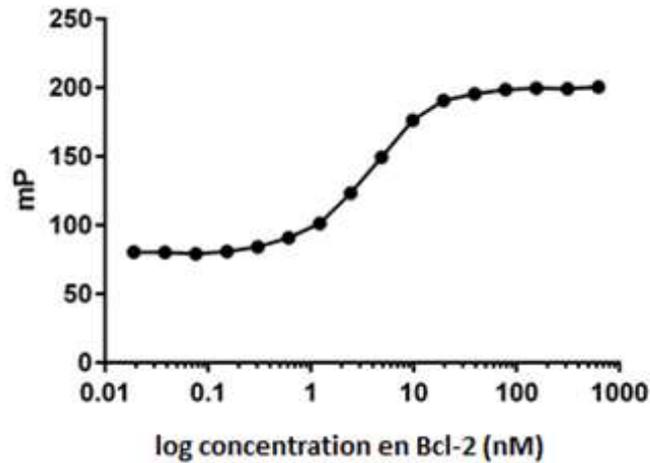


Figure 65 Titration de la protéine Bcl-2 en présence d'une concentration fixe de Bim-CF (3 nM)

Le domaine BH3 du peptide Bim humain responsable de son interaction avec la protéine Bcl-2, a été produit par la société GenePep SA, Montpellier, France (Figure 66), sous une forme non marquée Bim-**WT** (**W**ild **T**ype) et sous une forme marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine en position N-terminale (Bim-CF).

Bim humain	1	MAKQPSDVSSSECDREGRQLQPAERPPQLRPGAPTSLSQTEPQGNPEGNHGG	50
Bim (GenePep)	0	-----	0
Bim humain	51	EGDSCPHGSPQGPLAPPASPGPFATRSPLFIFMRRSLLSRSSSGYFSFD	100
Bim (GenePep)	0	-----	0
Bim humain	101	TDRSPAPMSCDKSTQTPSPPCQAFNHYLSAMASMRQAEPADMRPEIWIAQ	150
Bim (GenePep)	1	-----DMRPEIWIAQ	10
Bim humain	151	ELRRIGDEFNAYYARVFLNNYQAAEDHPRMVILRLRLRYIVRLVWRMH	198
Bim (GenePep)	11	ELRRIGDEFNAYYAR-----	25

Figure 66 Alignement de la séquence du peptide Bim humain avec celle produit par GenePep et utilisée dans nos tests
Domaine BH3

B- Mise au point du test

Pour la mise au point du test, nous nous sommes basés sur la méthode de Qian et *coll.* qui repose sur la mesure d'une interaction protéine-ligand selon l'équilibre présenté dans la Figure 67 :²⁶

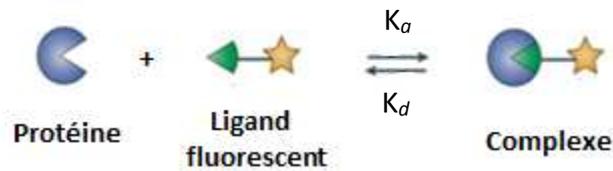


Figure 67 Schéma de l'interaction protéine-ligand

Chaque couple protéine-ligand est défini par deux constantes : le K_a qui correspond à la constante d'association et le K_d qui correspond à la constante de dissociation à l'équilibre. Plus la valeur de K_d est faible, plus l'affinité du ligand pour la protéine est importante.²⁶ Celle-ci est calculée à partir de la formule suivante :²⁶

$$K_d = \frac{[P]_{\text{éq}} * [L - CF]_{\text{éq}}}{[PL - CF]_{\text{éq}}}$$

où : $[P]_{\text{éq}}$ correspond à la concentration en protéine libre à l'équilibre, $[L - CF]_{\text{éq}}$ à la concentration en peptide marqué libre à l'équilibre et $[PL - CF]_{\text{éq}}$ à la concentration en complexe protéine-ligand marqué à l'équilibre.

Le K_d dit réel peut-être obtenu précisément par l'emploi de la calorimétrie à titrage isotherme. La polarisation de fluorescence ne permettant pas d'obtenir le K_d réel, il peut cependant être obtenu de manière approximative en réalisant un titrage de la protéine par le ligand-CF. On parle alors de K_d apparent ($K_{d \text{ app}}$). Afin d'éviter toute ambiguïté dans la suite du manuscrit, le terme K_d sera employé au lieu de $K_{d \text{ app}}$.²⁶

Lorsqu'on parle d'un test d'inhibition, on parle d'une **C**oncentration **I**nhibitrice **C** I_{50} : c'est la concentration de composé qui inhibe 50 % de la liaison spécifique de ligand marqué. Elle est dépendante de la concentration en composé en question, ainsi que de la valeur de K_d , c'est-à-dire, de l'affinité du ligand marqué vis-à-vis la protéine. Comme pour le K_d , plus la valeur de $C I_{50}$ est faible, plus l'affinité du composé testé pour la protéine est importante.²⁶

La $C I_{50}$ ne permet une comparaison correcte entre différents composés que si tous les paramètres dans lesquels les tests ont été conduits sont identiques. De ce fait, on se base sur une valeur ajustée : le K_i ou constante d'inhibition. Celui-ci est calculé à partir de la formule suivante :^{35, 75, 83}

$$K_i = \frac{CI_{50} * \left(\frac{PL_0}{2}\right) * K_d}{(L_T * P_T) + \left(\frac{PL_0}{2}\right)\left(\left(\frac{PL_0}{2}\right) - P_T - L_T - K_d\right)}$$

où : PL_0 correspond au complexe protéine-ligand à $t = 0$, L_T au ligand total, P_T à la protéine totale. PL_0 se calcule à partir de la formule suivante :^{35, 75, 83}

$$PL_0 = \frac{L_T + P_T + K_d - \sqrt{((L_T + P_T + K_d)^2 - 4L_T * P_T)}}{2}$$

1. Choix des conditions

Lors de la mise en place du test, un tampon phosphate classique a été utilisé pour solubiliser la protéine et les peptides. Il est composé de 20 mM de Na_2HPO_4 , de 50 mM de NaCl, de 2 μ M d'EDTA, et de 0.05 % d'acide pluronique qui est un tensio-actif permettant une meilleure solubilisation des protéines. Le pH de 7,4 est ajusté avec de l'acide chlorhydrique. Le tampon est ensuite passé sur un filtre de 0,22 μ M de diamètre afin d'éviter toute contamination.⁵²

Contrairement aux tests sur Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid précédemment mis en place dans notre équipe qui sont effectués en plaques 96 puits, nous avons adapté le nouveau test à des microplaques de 384 puits (robot pipeteur diluteur de type Beckman Coulter Biomek FXP). Ceci a permis un gain considérable en temps et en protéines car le volume réactionnel de chaque puit est réduit de 40 à 20 μ L. D'autre part, le test peut être conduit en quadruplicate ce qui assure une meilleure robustesse des valeurs obtenues.

Une fois que l'ensemble des partenaires de l'essai de polarisation de fluorescence ont été injectés dans les puits, la microplaque est couverte avec un film adhésif afin d'éviter toute évaporation, et centrifugée à température ambiante pendant 2 minutes. Pour un signal de polarisation de fluorescence optimal, les microplaques sont incubées dans l'obscurité à température ambiante pendant au moins 1 heure avant lecture. Cette période d'incubation s'est révélée essentielle pour que la réaction atteigne l'état d'équilibre.

2. Plan de plaque

Nous avons adapté le protocole ainsi que le plan de plaque mis en œuvre par C. Gény sur Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid pour le nouveau test sur Bcl-2/Bim. Il consiste à faire une gamme de concentrations croissantes d'un inhibiteur potentiel afin de déterminer la valeur de sa CI_{50} , et par conséquent celle de son K_i .

Comme on peut le voir dans la Figure 68, la plaque est divisée en plusieurs sections :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Ligand-WT 5 nM				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM	Blanc protéine											
B																								
C	Ligand-WT 10 nM				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												
D																								
E	Ligand-WT 50 nM				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM	(Témoin -) Blanc DMSO											
F																								
G	Ligand-WT 100 nM				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												
H																								
I	Ligand-WT 500 nM				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												
J																								
K	Ligand-WT 1 μ M				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												
L																								
M	(Témoin +) Blanc ligand-WT 10 μ M				100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM	Blanc ligand-CF											
N																								
O					100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												
P					100 μ M	33,3 μ M	11,1 μ M	3,7 μ M	1,23 μ M	410 nM	137 nM	46 nM												

Figure 68 Plan de plaque d'analyse

- colonnes 1-4 : elles contiennent 4 gammes identiques de ligand-WT permettant de définir la valeur de K_i de cette référence interne et de définir le témoin positif qui correspond à 100 % de liaison de ligand-WT avec la protéine, donc 0 % liaison de ligand-CF et 0 % de polarisation. L'inhibition de l'interaction protéine-ligand-CF est alors totale. Ces puits contiennent une gamme de concentration croissante, de la ligne A vers la ligne P, de ligand-WT et d'une concentration fixe de protéine et de ligand-CF.
- colonnes 5-20 : elles contiennent des gammes de concentration décroissantes de composés à tester et des concentrations fixes de protéine et de ligand-CF. Comme mentionné précédemment, chaque concentration est réalisée en quadruplicate. Ces gammes permettent de déterminer la constante d'inhibition K_i des composés *vis-à-vis* la protéine anti-apoptotique.
- colonnes 21-24 : s'agit de puits de contrôle :
 - lignes A-D : les puits ne contiennent que la protéine seule.
 - lignes E-L : il s'agit des contrôles négatifs. Ceci correspond à 100 % de liaison de ligand-CF avec la protéine, donc 100 % de polarisation et 0 % d'inhibition. Ces puits contiennent une concentration fixe de protéine et de ligand-CF, et du DMSO à la place de l'inhibiteur.
 - lignes M-P : les puits ne contiennent que le ligand-CF seul.

3. Choix de la concentration en protéine et détermination de la constante de dissociation K_d

La constante de dissociation K_d du couple Bcl-2/Bim a été déterminée par titration de quantités croissantes de protéine Bcl-2 (de 0,02 à 625 nM) avec une quantité fixe de peptide fluorescent Bim-CF (3 nM).^{35, 83} La valeur de K_d du couple Bcl-2/Bim a été calculée à l'aide de logiciel GraphPad Prism après le "fitting" de la courbe obtenu. Comme le montre la Figure 69, elle est égale à 3,7 nM.

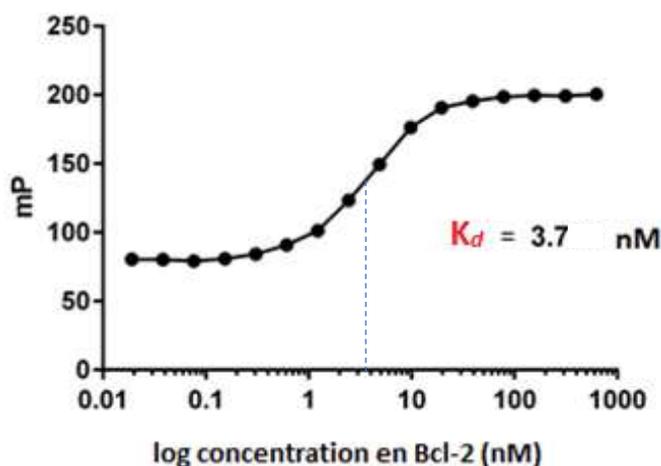


Figure 69 Titrage de protéine Bcl-2 en présence d'une quantité fixe de ligand Bim-CF et détermination de K_d

4. Tolérance aux solvants

Le **DMSO** (diméthyle sulfoxyde) est le solvant le plus couramment utilisé pour solubiliser les substances naturelles ou les composés de synthèse lors d'un test biologique en tampon aqueux. De plus, tous les extraits de l'extractothèque de l'ICSN sont conservés dans du DMSO. Par conséquent, il était important de déterminer la tolérance au DMSO de notre test, et la concentration en DMSO acceptable.⁷⁸

Des gammes de concentrations croissantes en DMSO ont été réalisées en présence de 100 nM de Bcl-2 et 3 nM de Bim-CF (correspondant à 100 % de polarisation). Comme la montre la Figure 70, pour des concentrations allant de 0 à 12,5 % de DMSO, aucune modification significative du signal n'a été observée. Bien que cet essai puisse au moins tolérer jusqu'à 12,5 % de DMSO, la concentration en DMSO choisie est de 3,5 %.⁷⁸⁻⁷⁹

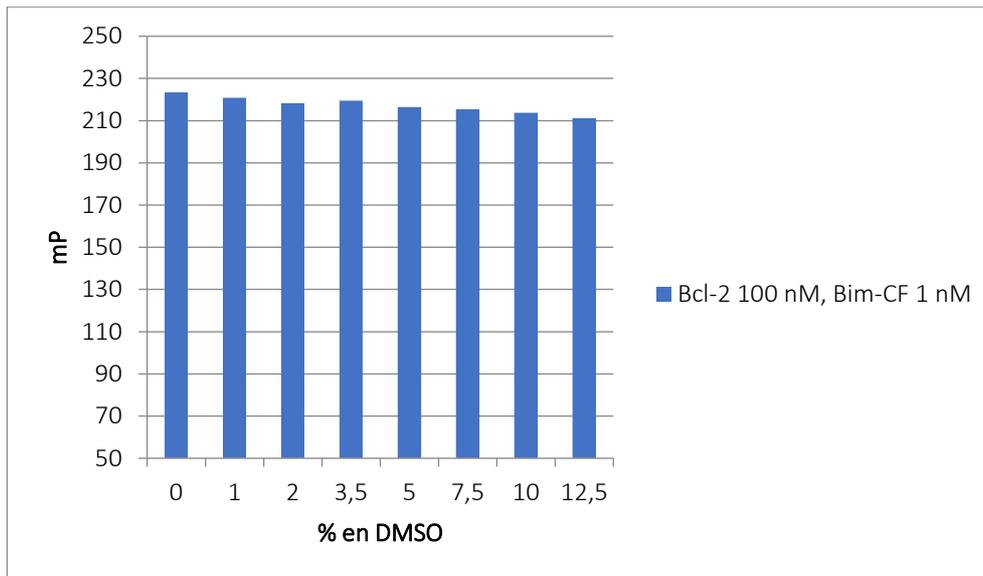


Figure 70 Etude de l'effet du DMSO sur les essais de polarisation de fluorescence

Nous avons également comparé le comportement du couple Bcl-2/Bim dans le DMSO et dans l'éthanol, et leurs impacts éventuels sur la qualité du signal. Pour cela, une gamme croissante de Bim-WT a été titrée par une concentration fixe de Bcl-2 (100 nM) dans les deux solvants. Comme le montre la courbe de titration de la Figure 71, il n'y a aucun effet de la nature du solvant sur les courbes, ni sur l'amplitude des signaux.

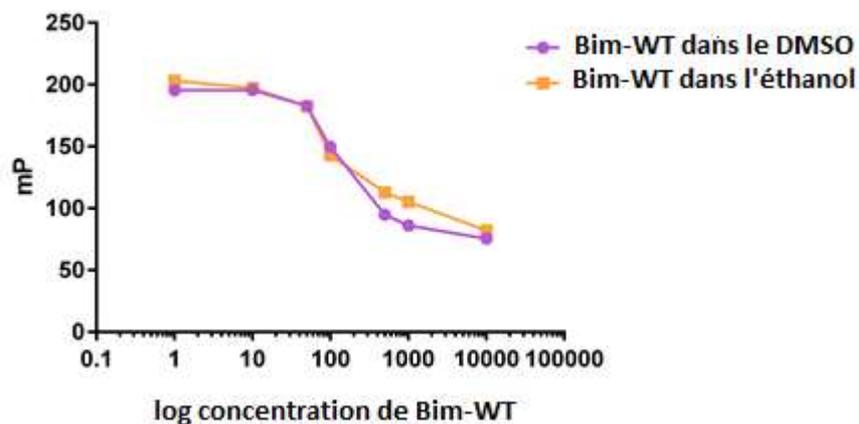


Figure 71 Tolérance du couple Bcl-2/Bim dans DMSO vs. l'éthanol

5. Composés de référence et contrôles positifs

Parallèlement aux puits de contrôle positifs (Bcl-2/Ligand-WT/Ligand-CF), négatifs (Bcl-2/Bim-CF), et blancs de Bcl-2 et de Bim/CF que nous réalisons pour chaque essai, nous avons choisi d'utiliser systématiquement l'ABT-737 **01** ($K_i = 54$ nM) en tant que référence externe/contrôle positif pour l'interaction Bcl-2/Bim.

6. Validation du test : le facteur Z'

Afin d'évaluer la qualité, la précision et la robustesse de notre test d'inhibition par polarisation de fluorescence, nous nous sommes basés sur un coefficient appelé "le facteur Z'". Proposé par Zhang *et coll.*, ce paramètre est largement utilisé comme mesure de contrôle de qualité dans le criblage à haut débit.^{78, 84} Il mesure la différence de signal de fluorescence entre les puits du contrôle positif et ceux du contrôle négatif.^{35, 78, 83-84} Il est calculé à partir de l'équation suivante :

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{t+}) + (3\sigma_{t-})}{|(\mu_{t+}) - (\mu_{t-})|}$$

où : σ correspond à l'écart type, μ à la moyenne, $t+$ au contrôle positif, et $t-$ au contrôle négatif.

En termes de pourcentage d'inhibition, il s'agit de :

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{100\% PF}) + (3\sigma_{0\% PF})}{|(\mu_{100\% PF}) - (\mu_{0\% PF})|}$$

où : **100 % PF** correspond au 100% de polarisation, et **0 % PF** au 0 % de polarisation.

Zhang *et coll.* ont proposé les critères suivants :⁸⁴

- $Z' = 1$: l'essai est idéal
- $1 > Z' \geq 0,75$: l'essai est excellent
- $0,75 > Z' \geq 0,5$: l'essai est correct
- $Z' < 0,5$: l'essai est médiocre

Pour déterminer le Z', nous avons suivi le plan de plaque présenté dans la Figure 72. Il consiste à réaliser un damier en alternant des puits correspondant au 0 % et au 100 % de polarisation de fluorescence.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		Blanc protéine			
B	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF					
C	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
D	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	
E	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
F	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	
G	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
H	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	
I	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
J	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	
K	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
L	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	
M	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		Blanc ligand-CF			
N	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF					
O	0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF	
P	100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF		100 % PF		0 % PF	

Figure 72 Plan de plaque pour le calcul de Z'

Nous avons entrepris ensuite l'étude de la stabilité de de notre essai au cours du temps en mesurant le signal de fluorescence de la plaque précédente à différents temps d'incubation et jusqu'à 48 heures.^{79, 83}

Les valeurs de Z' obtenues aux différents temps indiquent que le signal de fluorescence est stable entre 2 et 24 h (valeur de Z' entre 0,84 et 0,87). A des durées inférieures à 2 h, il apparait que l'état d'équilibre entre la protéine et le ligand n'est pas atteint. Enfin, la protéine commence à se dégrader au bout de 24 h.

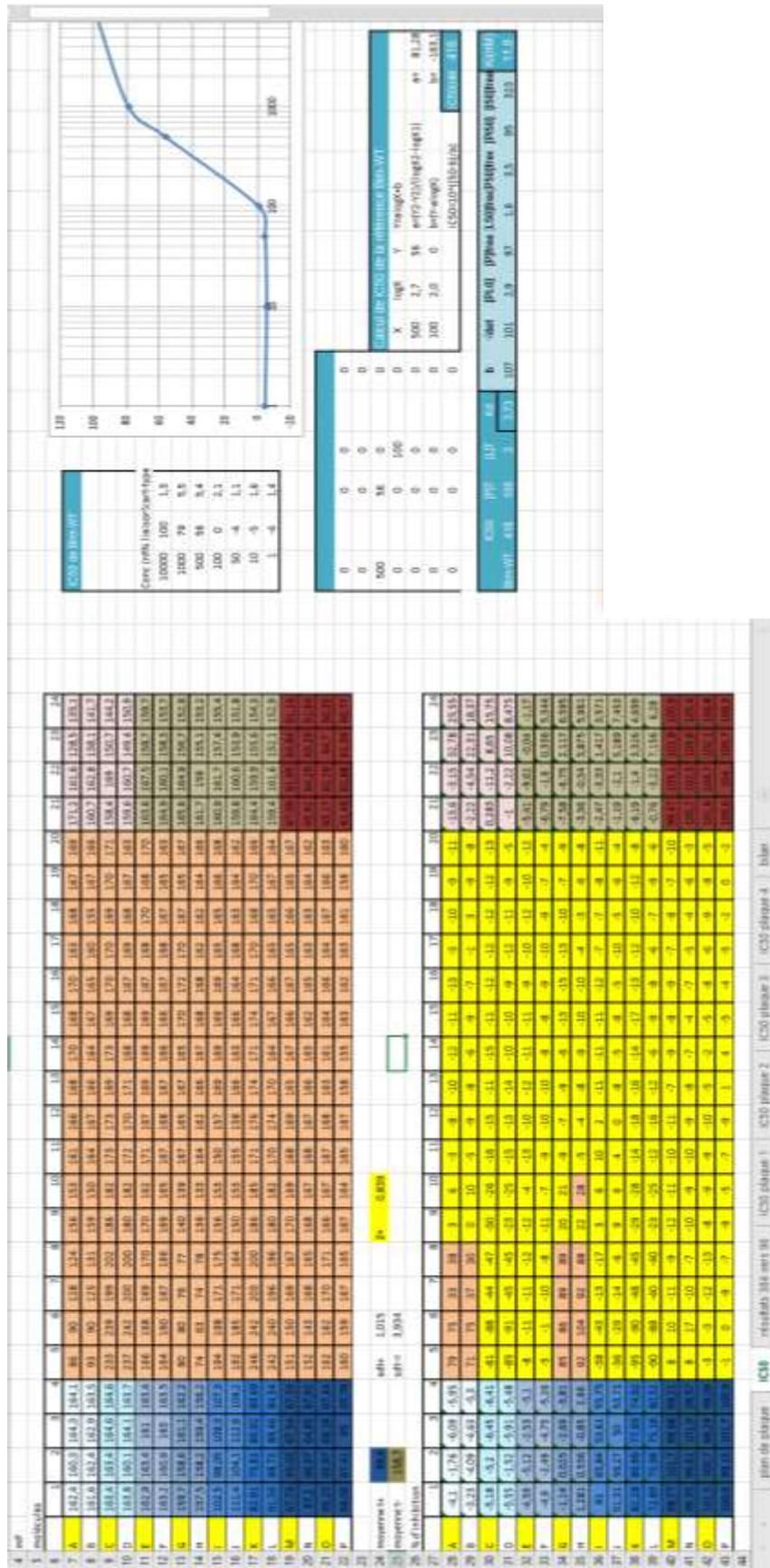
Le facteur Z' a, par la suite, été déterminé systématiquement pour chaque plaque de mesure.

7. Mesure de fluorescence et traitement des données

La polarisation de fluorescence est mesurée à 23 °C à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm à l'aide d'un appareil Beckman Coulter Paradigm™ géré par le logiciel SoftMax Pro 6.1. En suivant les recommandations du fournisseur, nous avons appliqué à nos valeurs mesurées un facteur $G = 1,2$ qui est un facteur de correction relatif à l'appareil et aux plaques de mesure.

Les valeurs brutes d'intensités parallèle et perpendiculaire mesurées pour chaque puit, ainsi que les rapports mP correspondants sont récupérés sous format .xls (Excel™). Un tableur Excel™ a été conçu pour faciliter le traitement des données.

Le **premier volet** du tableur « plan de plaque » permet de rapporter les références de composés testés et leur répartition dans les différentes lignes (Figure 73) :



Le **troisième volet** permet de calculer le pourcentage d'inhibition des molécules ou extraits à partir des intensités parallèles et perpendiculaires rapportées dans le volet précédent (Figure 75). Plus le pourcentage d'inhibition est élevé, plus l'affinité pour la cible est importante.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB				
3	calculés page précédente																															
4																																
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24								
6	A	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125			
7	B	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108			
8	C	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92			
9	D	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75	-75			
10	E	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58			
11	F	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42	-42		
12	G	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25		
13	H	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8		
14	I	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
15	J	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
16	K	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	
17	L	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	
18	M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	
19	N	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
20	O	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108
21	P	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
22																																
23	plaque 1																															
24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																plaque 2				
25	A	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125	-125		
26	B	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	-92	
27	C	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	-58	
28	D	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	-25	
29	E	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
résultats 384 vers 96																																
								IC50 plaque 1				IC50 plaque 2				IC50 plaque 3				IC50 plaque 4				bilan								

Figure 75 Troisième volet du tableur Excel

Les **volets n° 4-7** « IC₅₀ plaque 1-4 » correspondent, respectivement, à chaque plaque individuelle du quadruplicate. Des courbes de variation des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration des composés sont générées. Celles-ci permettent de calculer les valeurs de K_i et de CI₅₀.

Le dernier volet « bilan » compile les données obtenues sur les volets 4-7 pour définir les moyennes et écart-types, et tracer les courbes dose-réponse de chaque composé testé (Figure 76).



Figure 76 Dernier volet du tableau Excel

On considère qu'un composé est un bon inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 lorsque le pourcentage d'inhibition est supérieur à 50 %. Plus la valeur de K_i est faible, plus le composé possède une forte affinité pour la cible. Eu égard aux concentrations des composants du test, un composé est considéré inactif quand il présente un K_i supérieur à 23 μM.

C- Résultats biologiques des produits purs isolés ou synthétisés dans l'équipe

1. Les produits issus de l'extraction de plantes

a) Les dérivés du drimane

Nous avons testé l'activité des composés de la famille des drimanes vis à vis des trois protéines Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-2. Hormis le composé **40** qui est un inhibiteur dual des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, nous avons pu déterminer que cinq composés **41-45** sont des inhibiteurs sélectifs de la protéine Mcl-1 avec des affinités de l'ordre du micromolaire au sub-micromolaire (Tableau 2). Cette famille de composés est actuellement en cours d'étude dans notre équipe en collaboration avec une équipe de l'Institut Gustave Roussy.

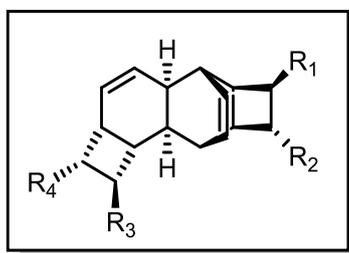
Tableau 2 Evaluation biologique des composés de la famille des drimanes

N° de molécule	Structure	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
40		8,6 ± 0,9	0,5 ± 0,02	>23
41		>23	1,8 ± 0,1	>23
42		>23	0,3 ± 0,02	>23
43		>23	2 ± 0,1	>23
44		>23	5,3 ± 0,3	>23
45		>23	6 ± 0,1	>23

b) Les kingianines

Nous avons testé 19 composés de la famille des kingianines **46** (Figure 77). Les valeurs de $K_i \pm SD$ pour les composés les plus intéressants sont rapportées en μM dans le Tableau 3.

Parmi ces composés, la kingianine E (**46-1**) est un inhibiteur sélectif de l'interaction Mcl-1/Bid, alors que quatre kingianines : les (+)-K (**46-9**), (+)-L (**46-11**), (±)-M (**46-12**) et (±)-N (**46-13**) sont de bons inhibiteurs duals de Mcl-1 et Bcl-2. En outre, les kingianines F (**46-2**), (-)-G (**46-3**), (-)-H (**46-4**), (+)-H (**46-5**), (-)-J (**46-6**), (+)-J (**46-7**), (-)-K (**46-8**) et (-)-L (**46-10**) sont de très bons inhibiteurs multiples, avec des affinités de l'ordre du micromolaire au sub-micromolaire.



46

Figure 77 Structure commune des kingianines 46

Tableau 3 Evaluation biologique des composés de la famille des kingianines 46 ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

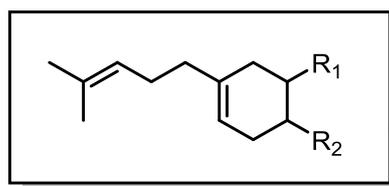
N° de molécule	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
E 46-1					>23	10 ± 2	>23
F 46-2					1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,01
(-)-G 46-3					8 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,04
(-)-H 46-4					5,5 ± 0,2	1,1 ± 0,04	0,2 ± 0,03
(+)-H 46-5					11 ± 0,7	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,04
(-)-J 46-6					9 ± 0,7	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,04

(+)-J 46-7					$13 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$
(-)-K 46-8					$5 \pm 0,5$	$1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,4$
(+)-K 46-9					>23	$1,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
(-)-L 46-10					$8 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,1$
(+)-L 46-11					>23	$2 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$
(±)-M 46-12					>23	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,5$
(±)-N 46-13					>23	$0,8 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

2. Les produits issus de la synthèse organique

a) Les analogues de la fissistine

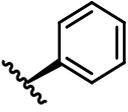
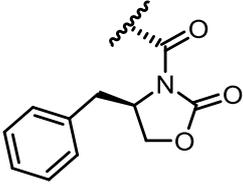
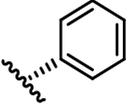
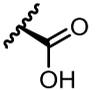
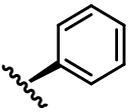
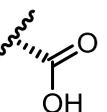
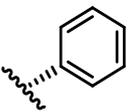
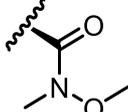
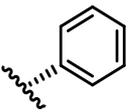
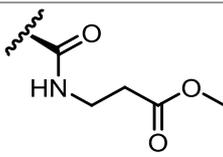
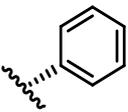
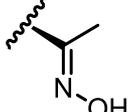
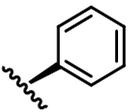
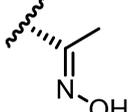
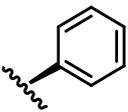
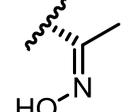
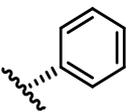
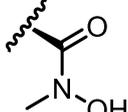
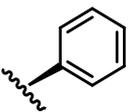
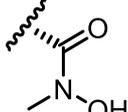
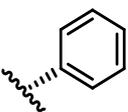
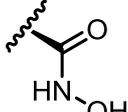
Parmi les soixante et un analogues et/ou intermédiaires de synthèse appartenant à la famille de la fissistine **47** (Figure 78), onze composés ont montré une sélectivité pour Mcl-1, trois composés sont Bcl-2-sélectifs, neufs sont de bons inhibiteurs duals de Mcl-1 et Bcl-2, et trois sont inhibiteurs de Bcl-xL et Mcl-1 (Tableau 4).



47

Figure 78 Structure commune des analogues de la fissistine **47**

Tableau 4 Evaluation biologique des analogues de la fissionine 47 ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

N° de molécule	R ₁	R ₂	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
47-1			>23	8,4 ± 0,4	>23
47-2			5,5 ± 0,4	5,8 ± 0,1	>23
47-3			9,5 ± 0,6	8,6 ± 0,6	>23
47-4			>23	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,04
47-5			>23	5,5 ± 0,3	3,1 ± 2,2
47-6			>23	3 ± 0,1	>23
47-7			>23	7,1 ± 0,3	>23
47-8			>23	8,7 ± 0,8	>23
47-9			>23	7,2 ± 0,5	2,1 ± 0,2
47-10			>23	9,2 ± 0,6	2,3 ± 0,3
47-11			19 ± 1	7,3 ± 0,4	0,6 ± 0,1

47-12			17,4 ± 0,6	8,2 ± 0,4	0,7 ± 0,1
47-13			>23	>23	2,7 ± 0,7
47-14			>23	8,5 ± 0,4	>23
47-15			>23	>23	2,2 ± 0,3

b) *La meiogynine et ses analogues de deuxième génération*

L'activité inhibitrice sur les interactions Bcl-xL/Bak, Mcl-1/Bid, et Bcl-2/Bim de la meiogynine A **29** et de ses analogues de deuxième génération de structure commune **50** (Figure 79) a été évaluée. Tous ces inhibiteurs duals des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 ont également une très bonne activité sur la protéine Bcl-2 (K_i de l'ordre du micromolaire au sub-micromolaire), ce qui fait de ces composés des inhibiteurs multiples des trois protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 Tableau 5.

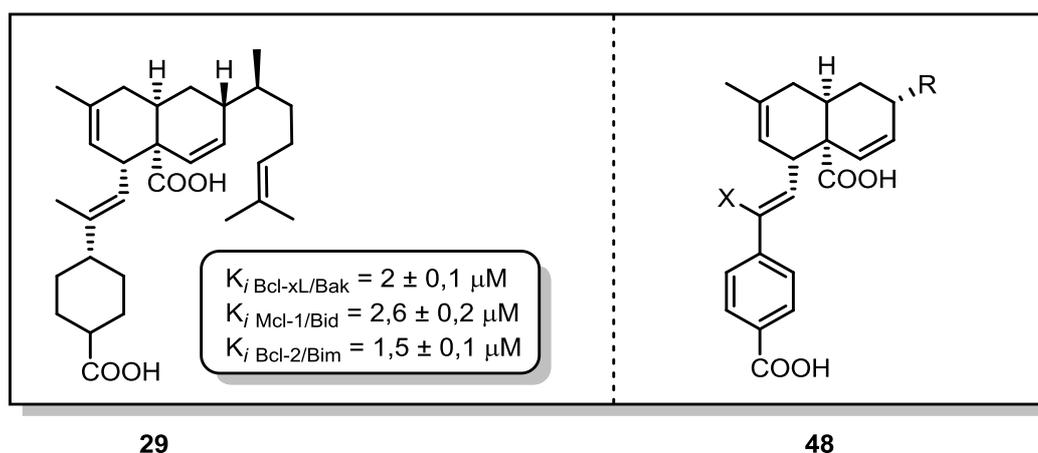
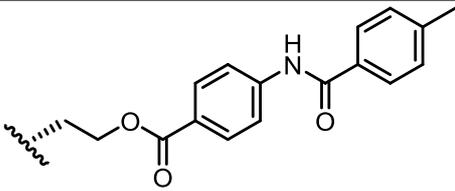
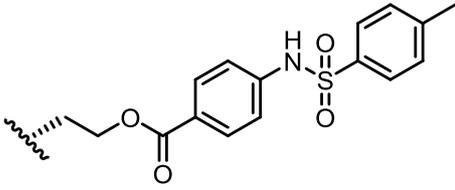
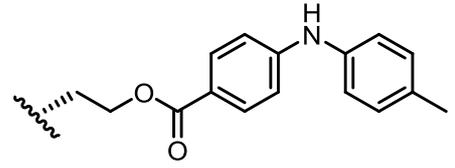
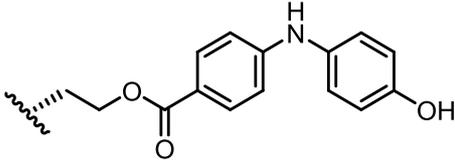
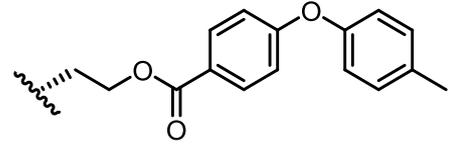
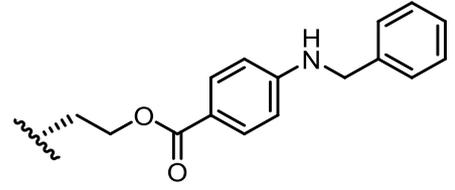
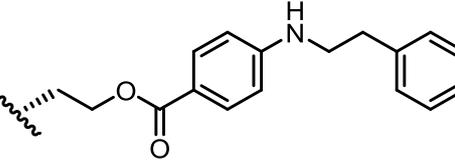
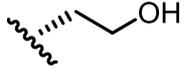
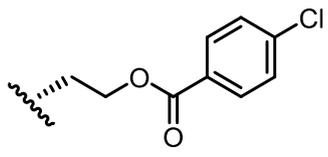
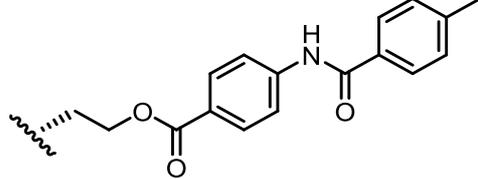


Figure 79 Structure et activité biologique de la meiogynine **29** (à gauche), et structure commune **48** des analogues de la meiogynine A **29** (à droite)

Tableau 5 Evaluation biologique des analogues de deuxième génération de la meiogynine A 29 ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

N° de molécule	X	R	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
48-1	CH ₃		3 ± 0,1	0,8 ± 0,01	0,9 ± 0,03
48-2	CH ₃		2,1 ± 0,06	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,04
48-3	CH ₃		0,9 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01
48-4	CH ₃		1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01
48-5	CH ₃		0,6 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,004
48-6	CH ₃		1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01
48-7	CH ₃		2,3 ± 0,05	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,04
37	Cl		>23	8,4 ± 0,9	>23
34	Cl		0,5 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,04
48-8	Cl		0,9 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01

48-9	Cl		$1 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,01$
48-10	Cl		$1,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,01$
48-11	Cl		$1,5 \pm 0,06$	$0,3 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,07$
48-12	Cl		$1,8 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,01$
48-13	Cl		$1,7 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,01$
48-14	Cl		$0,7 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$
48-15	Cl		$6 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,6$	$2 \pm 0,1$
35	Cl		$0,1 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,4$
36	Cl		$4,3 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,01$

La majorité des analogues de deuxième génération de la meiogynine **A 29** montrent une meilleure affinité pour les trois protéines anti-apoptotique par rapport à la meiogynine **A 29**. En effet, la longueur de la chaîne latérale a un impact sur l'affinité des composés. De plus, elle contribue à la sélectivité de certains composés pour Mcl-1 et Bcl-2, comme le composé **36** possédant trois cycles aromatiques sur la chaîne latérale. Par ailleurs, malgré l'activité remarquable de l'analogue pyridine **35** sur Bcl-xL et Mcl-1 ($0,1 \mu\text{M}$, 50 fois plus actif que la

meiogynine A **29**)⁵⁶, il n'est pas aussi actif sur Bcl-2. Ceci peut indiquer que l'atome d'azote du cycle pyridine n'est pas aussi important pour l'interaction avec Bcl-2 que pour celle avec Bcl-xL ou Mcl-1.⁵⁶

D'ailleurs, malgré ces activités remarquables, la présence du lien ester sur la chaîne latérale rend ces composés sensibles aux estérases cellulaires, ce qui peut conduire en conséquence à la formation du métabolite diacide alcool **37** inactif sur Bcl-xL et Bcl-2 (Figure 80), d'où la nécessité de remplacer l'ester par un groupement résistant à l'estérase.

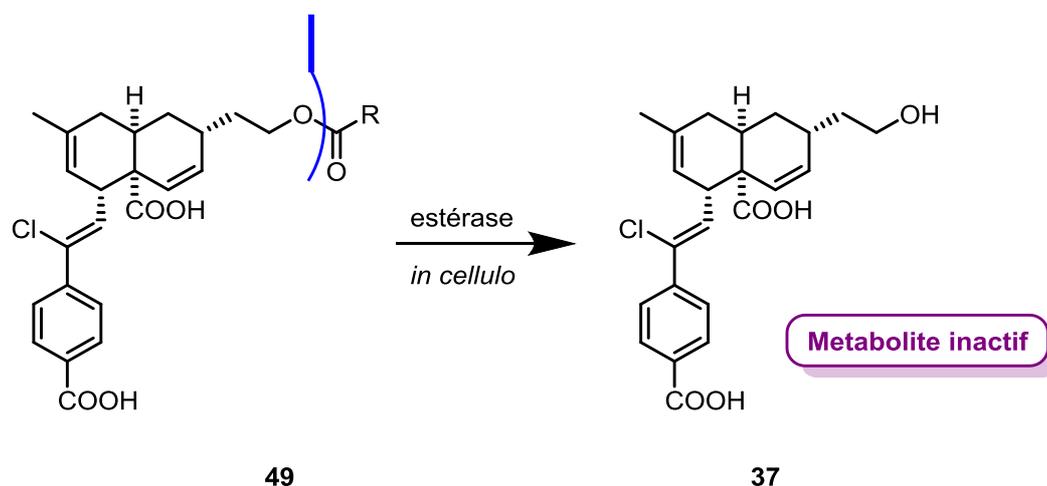


Figure 80 Possible explication de la non-cytotoxicité d'analogues de deuxième génération de la meiogynine A **29**

III- Conclusion

Le développement de petites molécules antagonistes des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 nécessite la mise en place d'une méthode d'évaluation de l'activité inhibitrice ou modulatrice de ces molécules *vis-à-vis* des interactions protéine-protéine. De nombreuses techniques permettant l'étude des interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques ont ainsi été développées depuis une quinzaine d'années. L'ELISA, le FRET, le BRET, les billes magnétiques, la SPA, la cytométrie en flux ainsi que la polarisation de fluorescence sont des exemples des techniques utilisées pour étudier les interactions des protéines de la famille Bcl-2. A chacune de ces techniques ses avantages et ses inconvénients, c'est pourquoi, au moins deux techniques différentes sont combinées afin de confirmer qu'une molécule est un hit.

Malgré l'efficacité des inhibiteurs sélectifs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, leur action est limitée dans le temps par un phénomène de résistance liée à la surexpression de la protéine anti-apoptotique non ciblée. La stratégie thérapeutique actuelle pour limiter la résistance consiste à les administrer en polychimiothérapie avec un agent thérapeutique et/ou cytotoxique qui agit sur une cible différente. Il semble également prometteur de développer des inhibiteurs multiples possédant une très bonne affinité pour plusieurs protéines anti-apoptotiques ou de co-administrer plusieurs inhibiteurs sélectifs.

Deux essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1 sont déjà mis en place et robotisés à l'ICSN. La protéine Bcl-2 est considérée comme une cible potentielle pour le développement de nouveaux anticancéreux étant donné qu'elle est surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses et impliquée dans la résistance à la chimiothérapie. De ce fait, il nous a semblé indispensable de mettre en place un test biologique sur la protéine Bcl-2. Pour cela, nous avons produit 17 mg de la protéine Bcl-2 recombinante par des bactéries compétentes d'*E. coli*. La protéine a été purifiée sur une colonne AKTA-Ni puis sur une colonne Superdex.

La mise en place du nouveau test nécessitait la bonne sélection et la maîtrise d'une variété de conditions. Ainsi, le choix du peptide pro-apoptotique associé à la protéine Bcl-2 s'est porté sur Bim dont la constante de dissociation (K_d) est de 3,7 nM. La performance du test est excellente avec une valeur Z' de 0,85, et nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour les inhibiteurs de référence.

A l'aide de ce nouveau test, nous avons déterminé avec précision et une bonne reproductibilité les affinités des produits issus de l'extraction de plantes (les dérivés du drimane et les kingianines), ainsi que celles des petites molécules issues de la synthèse organique (les analogues de la fissistine et ceux de la meiogynine A **29**). La meiogynine A **29** ainsi que ses analogues testés sont des inhibiteurs multiples des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. De plus, la majorité des analogues de deuxième génération de la meiogynine A **29** possèdent une meilleure affinité pour les trois protéines anti-apoptotique que la meiogynine A **29**.

Des pharmacomodulations sont anticipées afin d'élaborer des inhibiteurs multiples et cytotoxiques. Ceux qui possèdent une valeur de K_i de l'ordre du submicromolaire subiront ensuite une évaluation biologique plus avancée, à réaliser par nos collaborateurs à l'institut Gustave Roussy (J. Wiels).

CHAPITRE 3

Chapitre III : Synthèse et Evaluation Biologique des Analogues de troisième Génération de la Meigynine A

I- Travaux antérieurs du laboratoire sur la synthèse des analogues de deuxième génération de la meigynine A **29**

A- Analyse rétrosynthétique

Les analogues de deuxième génération de la meigynine A **29**, possédant une structure commune **33**, ont été élaborés *via* une voie de synthèse convergente bioinspirée à partir de 3 unités : le triène **50**, le diénophile **51**, et des dérivés aromatiques fonctionnalisés **52** (Schéma 1).⁵⁶ Le triène **50** et le diénophile **51** sont, quant à eux, accessibles à partir de réactifs commerciaux : le méthyle *p*-iodobenzoate **53** et l'alcool *p*-méthoxyphénylique **59** respectivement.

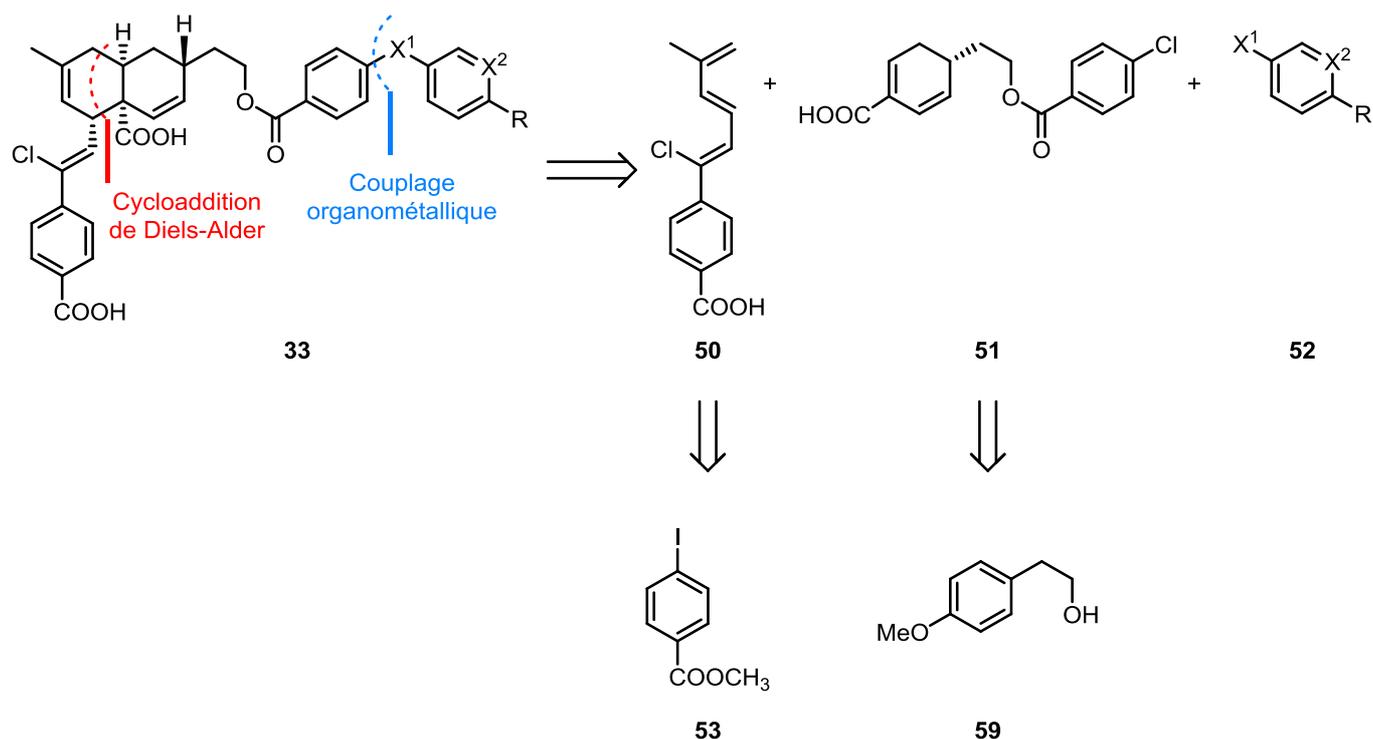


Schéma 1 Analyse rétrosynthétique des analogues de deuxième génération de la meiyoginine A 29

B- Synthèse du triène 50

Le triène **50** a été obtenu en 5 étapes linéaires avec un rendement global de 38 % et un contrôle parfait de stéréochimie des doubles liaisons. Après un couplage de Sonogashira entre le méthyle *p*-iodobenzoate **53** et le (triisopropylsilyl)acétylène, le dérivé silylé isolé a été converti en une étape en bromoalcyne **54** par désilylation-bromation "one-pot" en présence de quantités stœchiométriques de fluorure d'argent (AgF) et de *N*-bromosuccinimide (NBS). Une hydrochloration pallado-catalysée a été ensuite effectuée en utilisant le chlorure de lithium (LiCl) comme source de chlore.⁸⁵ Cette réaction a permis, en effet, d'introduire un atome de chlore de manière stéréo- et régio-sélective, conduisant exclusivement au (*Z*)-1-bromo-2-chloro-alcène avec un rendement de 80 %. Le rôle de l'atome de chlore est d'augmenter la réactivité du triène cible lors de la réaction de Diels-Alder. D'autre part, il pourrait permettre la fonctionnalisation de la partie ouest des analogues par des couplages organométalliques.

L'ester a ensuite été saponifié en milieu basique pour donner de manière quantitative l'acide benzoïque **55**. Finalement, le (*Z*)-1-bromo-2-chloro-alcène **55** a été engagé dans un couplage de Suzuki avec l'ester boronique **58** (obtenu par *cis*-hydrozirconation en présence du réactif de Schwartz sur la butène-3-yne **56**, suivie d'un échange Zr-B avec le pinacolborane **57**) pour donner le triène **50** avec un rendement de 52 %) (Schéma 2).⁵⁶ La voie de synthèse conduisant à ce triène **50** est plutôt efficace. Seule cette dernière étape de couplage palladocatalysée nécessiterait une optimisation afin d'améliorer le rendement observé.

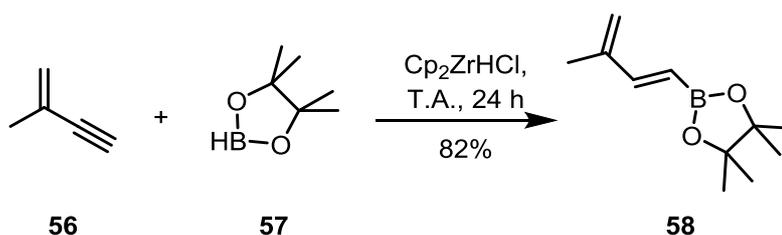
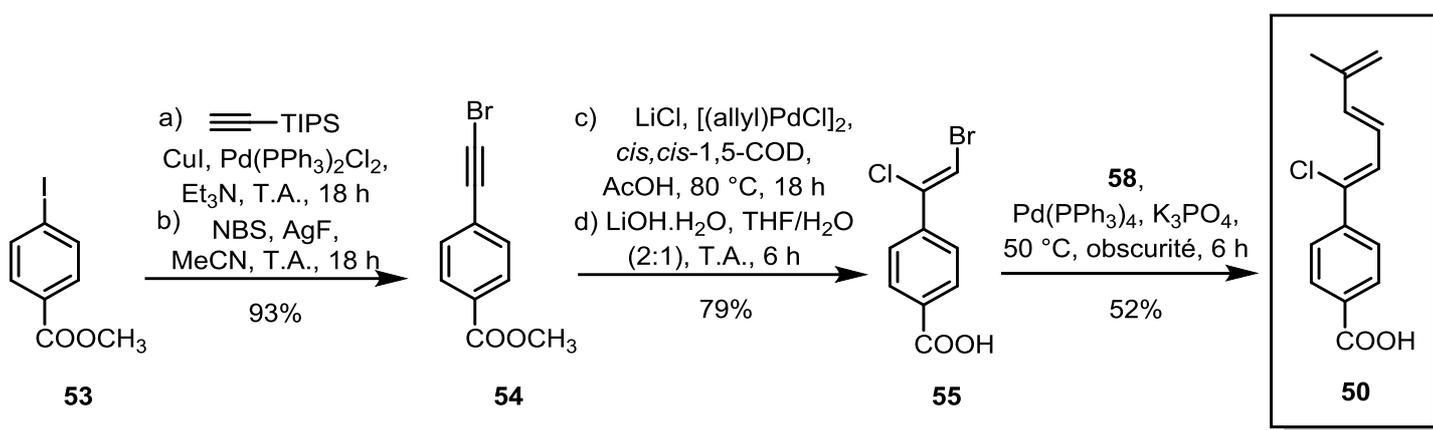


Schéma 2 Synthèse du triène 50

C- Synthèse du diénophile 51

1. Synthèse de la cyclohexénone 66

Afin d'élaborer le diénophile chiral (*R*)-**51**, la cyclohexanone **63** a été synthétisée à partir de l'alcool *p*-méthoxyphényléthyle **59**. Une réduction de Birch avec du lithium (**59-60**) suivie par un clivage de l'éther d'énol en milieu acide (**60-61**) et d'une hydrogénation de la double liaison (**61-62**) ont conduit à la cyclohexanone prochirale désirée **62** avec un rendement de 87 % sur 3 étapes. L'alcool terminal a ensuite subi une estérification avec le chlorure de *p*-chlorobenzoyl. Ce groupement est une première étape vers l'élongation de la chaîne latérale des analogues de deuxième génération par la suite (Schéma 3). Cette voie de synthèse robuste a pu être appliquée à l'échelle de plusieurs grammes.⁵⁶

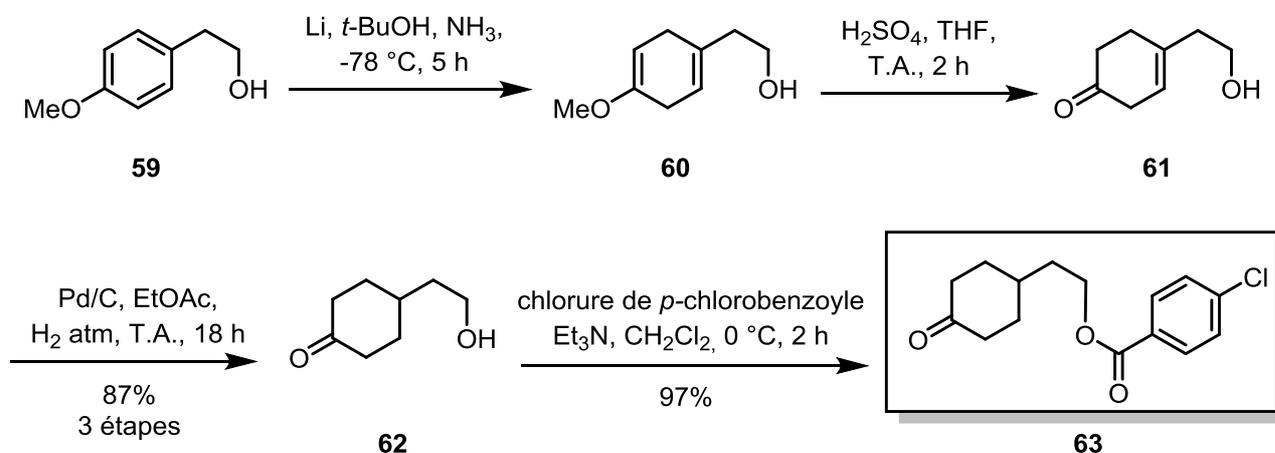


Schéma 3 Synthèse de la cyclohexanone 63

La cyclohexanone **63** a ensuite été convertie en cyclohexénone chirale **66** en deux étapes avec un excellent ratio énantiomérique *r.e.* de 94:6. Ceci implique la déprotonation énantiosélective avec un amidure de lithium chiral, généré par action du *n*-BuLi sur la bis[(*R*)-1-phényl]amine **64** suivie du piégeage *in situ* de l'énolate par le chlorure de triméthylsilyle. Cette étape a conduit à la formation de l'éther d'énol silylé correspondant **65**. L'étape suivante a permis de convertir cet éther d'énol en cyclohexénone **66** par une oxydation de Saegusa sous atmosphère d'oxygène en présence d'une quantité catalytique d'acétate de palladium(II).⁸⁶⁻⁸⁷ Cette synthèse permet d'obtenir la cyclohexénone chirale **66** avec, à chaque fois, un excellent ratio énantiomérique *r.e.* de 94:6 (Schéma 4).⁵⁶

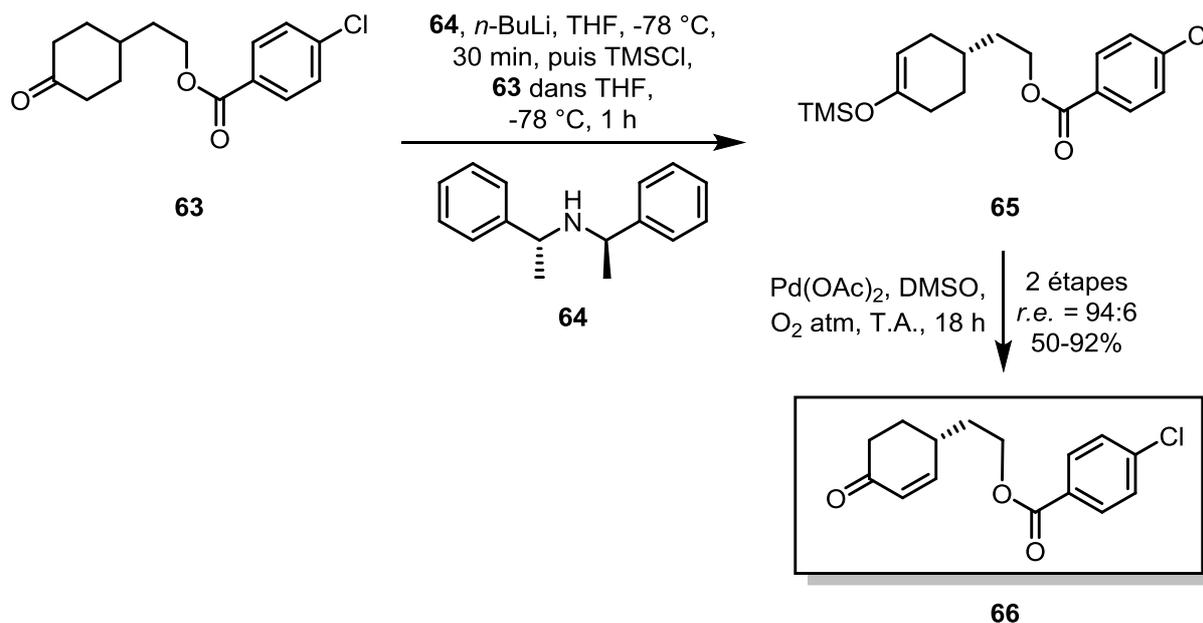


Schéma 4 Synthèse de la cyclohexénone **66**

2. Synthèse du diénophile **51**

Afin d'introduire l'acide carboxylique, la cyclohexénone **66** a d'abord été convertie en éther d'énol triflique **68** avec un rendement de 86 % par formation de l'éther d'énol en présence de NaHMDS puis piégeage par un donneur de triflate, le réactif de Comins **67**.⁸⁸ L'éther d'énol triflique **68** a subi ensuite une carbonylation pallado-catalysée en présence d'une quantité catalytique de triphénylphosphine et d'un excès d'acétate de potassium. A petite échelle (jusqu'à 1 g), le diénophile **51** est obtenu avec un rendement de 84 % (Schéma 5).⁵⁶ Cependant, à cause de sa structure diénique, ce composé **51** est instable, et a tendance à s'aromatiser.

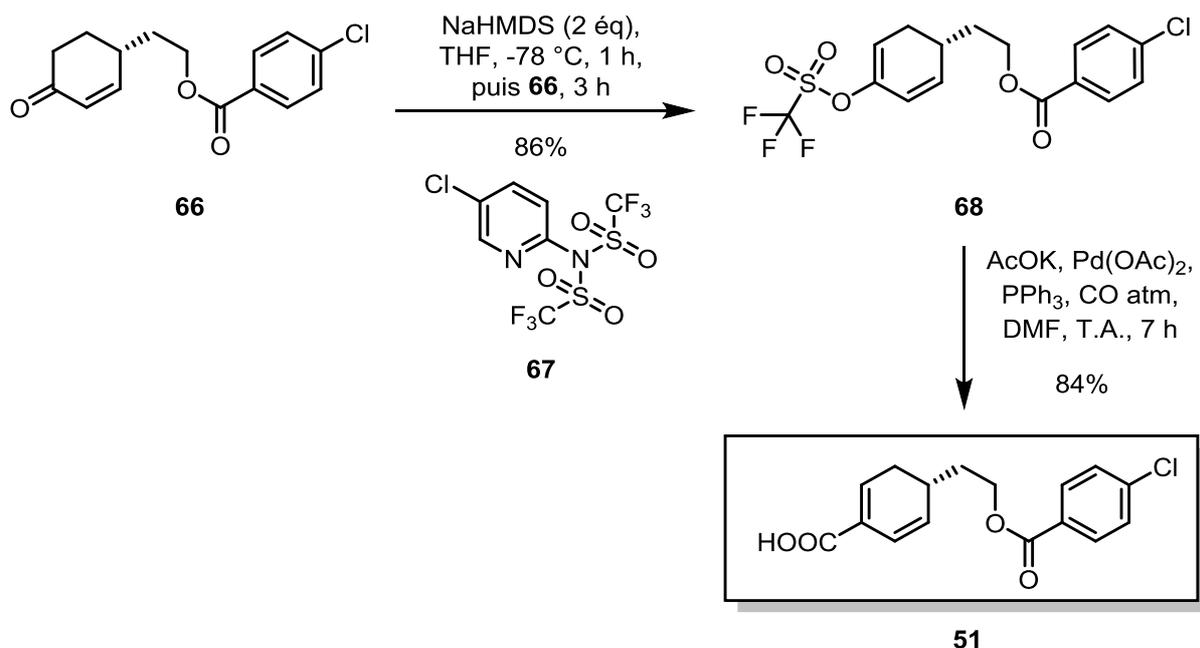


Schéma 5 Synthèse du diénophile 51

D- Cycloaddition de Diels-Alder bioinspirée finale

La réaction de cycloaddition de Diels-Alder entre le triène **50** et le diénophile **51** a été effectuée en présence d'une quantité sous-stœchiométrique d'acide 2-bromophénylboronique **69** pendant 18 heures au reflux du 1,2-dichloroéthane (Schéma 6).⁵⁶ Le cycloadduit **34** a été obtenu avec un très bon rendement de 80 % et un excellent contrôle *endo/exo* (> 95 %).

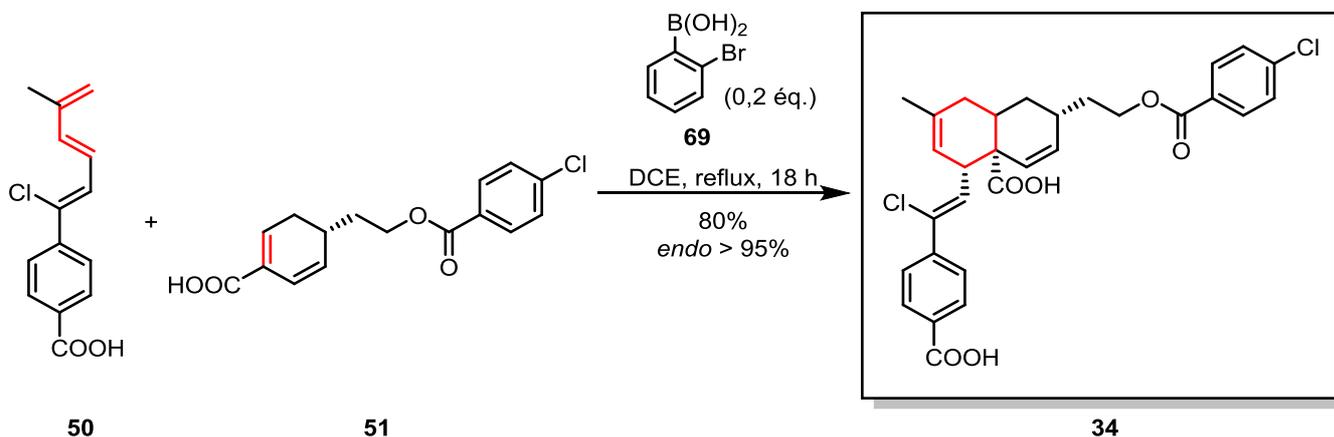
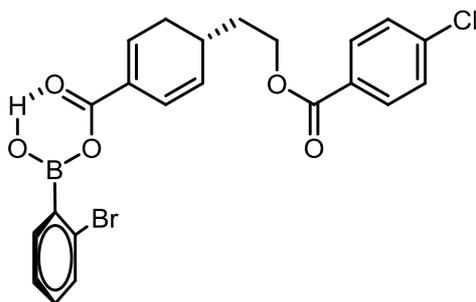


Schéma 6 Synthèse bioinspirée du cycloadduit 34

Lors de la cycloaddition [4+2], l'acide 2-bromophénylboronique **69** conduit, en se chélatant à l'acide carboxylique α,β -insaturé du diénophile **51**, à un intermédiaire monoacylboronate **70** (Schéma 7)⁸⁹ dont l'énergie de la LUMO est abaissée par rapport au diénophile **51**, ce qui favorise son interaction avec la HOMO du triène.⁹⁰



70

Schéma 7 Structure de l'intermédiaire monoacylboronate 70

La stéréosélectivité de cette réaction s'explique par la présence d'un centre chiral au niveau diénophile qui favorise l'approche *endo* du diénophile **51** en *anti* de la chaîne latérale, permettant ainsi un bon contrôle des centres chiraux en 1, 5 et 10 (Schéma 8). De plus, le diénophile **51** réagit de manière exclusive avec le diène le moins encombré, ce qui assure une bonne régiosélectivité. D'autre part, la présence d'un atome de chlore en position benzylique améliore la réactivité du triène conjugué **50** connu pour sa faible réactivité.⁵⁶

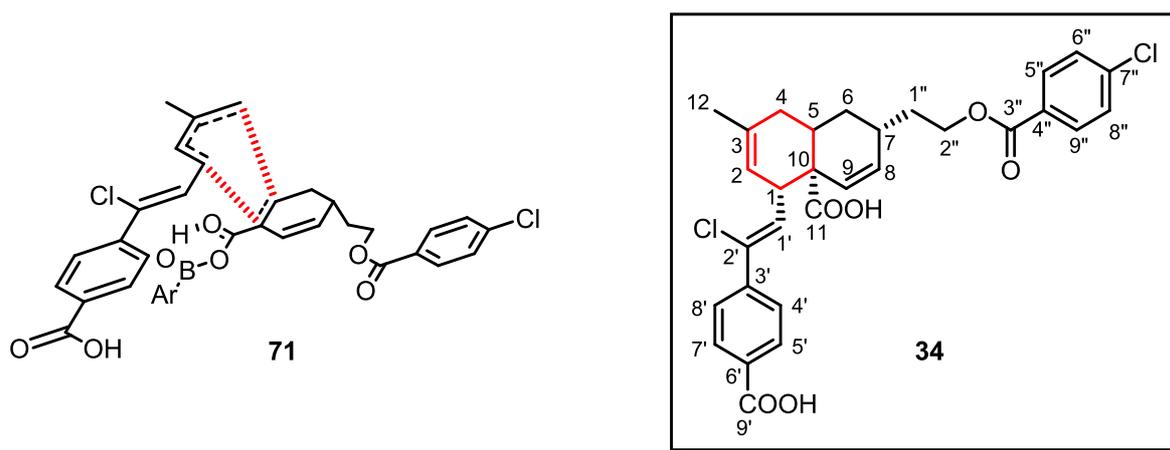


Schéma 8 Etat de transition *endo*

E- Analogues de deuxième génération **52** par élongation de la chaîne latérale

La chaîne latérale du composé **34** a ensuite été allongée avec des groupements aromatiques *via* une réaction de couplage de Buchwald-Hartwig avec des amides, des sulfonamides, des alkylamines, des anilines ou des phénols. En utilisant le monodentate biaryl phosphine-Pd **72** comme catalyseur (Schéma 9), une série d'analogues **33** a été obtenue avec des rendements moyens à très bons (Tableau 6).⁵⁶

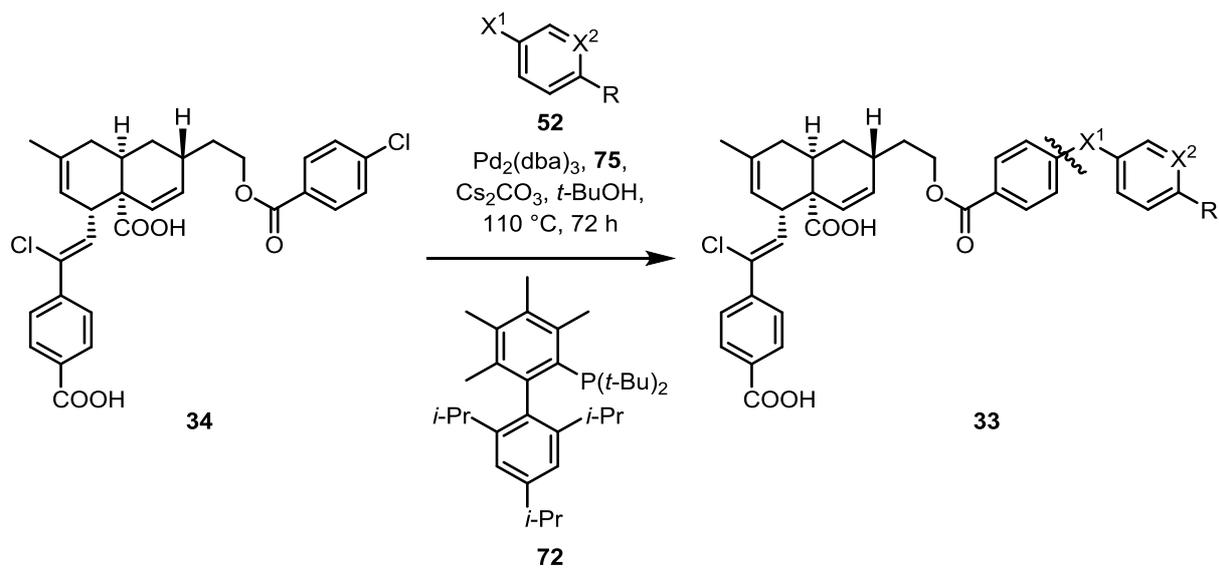


Schéma 9 Réaction de couplage organométallique donnant accès aux analogues **33**

Tableau 6 Fonctionnalisation des esters **34** par couplage de Buchwald-Hartwig

N° de molécule	33	Rdt %
48-8		48
48-11		74
48-12		46
48-13		86
48-14		89
35		75
36		20

II- Objectifs des travaux de thèse

Malgré l'activité biologique remarquable des analogues de deuxième génération de la meioyngine A **29** (Cf. Chapitre II), aucun effet cytotoxique sur des lignées de lymphôme B surexprimant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 n'a été observé. En effet, la présence du lien ester sur la chaîne latérale rend ces composés sensibles aux estérases cellulaires, pouvant ainsi conduire à la formation d'un métabolite diacide alcool **37**, inactif sur Bcl-xL et Bcl-2 (Schéma 10). Notre objectif a donc été de remplacer l'ester par un groupement plus résistant *in cellulo* tout en conservant, et si possible en améliorant, l'activité pro-apoptotique.

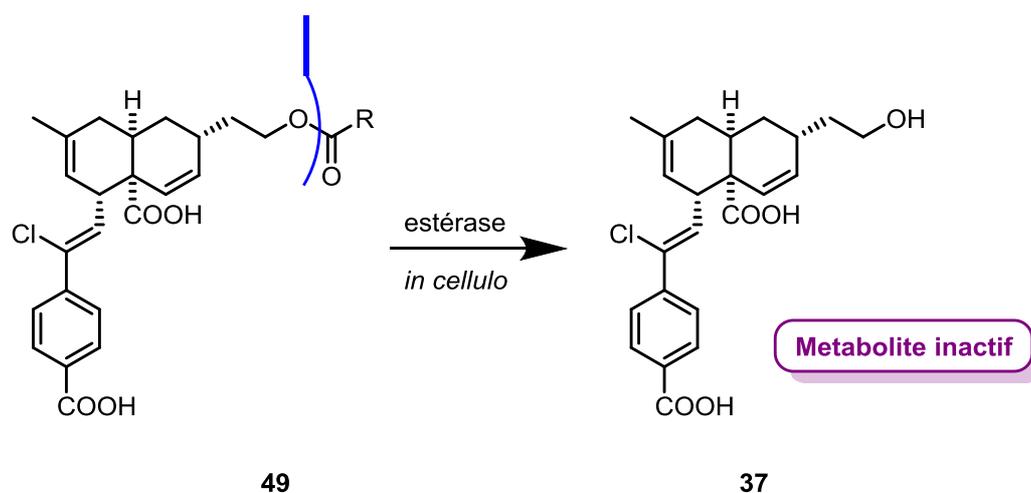


Schéma 10 Possible explication de la non-cytotoxicité d'analogues de deuxième génération de la meioyngine A **29**

Afin d'atteindre cet objectif, un précurseur commun **39** des nouveaux analogues a été synthétisé en quantité importante. Ce précurseur **39** a ensuite permis d'élaborer différents analogues **38** de la meioyngine A **29** en réalisant différentes pharmacomodulations au niveau de la chaîne latérale (Schéma 11).

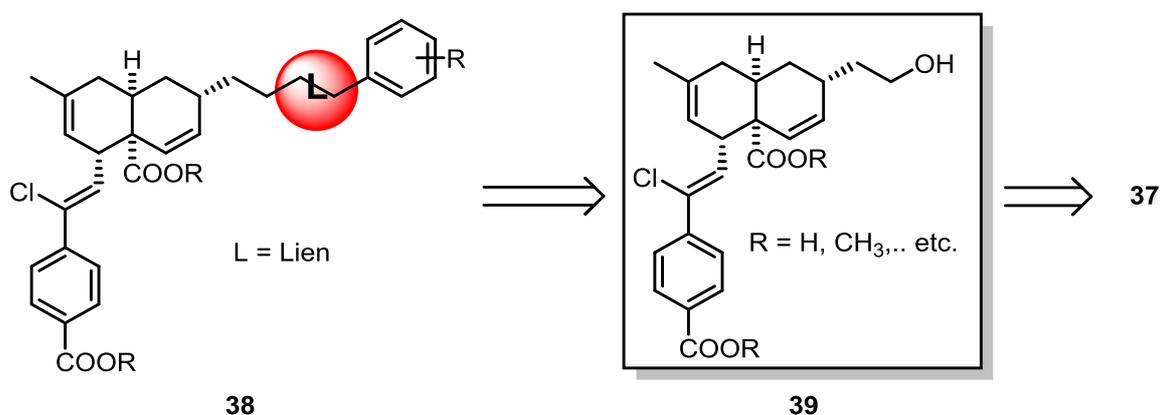


Schéma 11 Analyse rétrosynthétique des analogues de troisième génération de la meioyngine A **29**

Le nouveau lien devait respecter certains critères : être résistant *in cellulo*, présenter un faible encombrement stérique (car situé dans le site actif au niveau d'une région

stériquement contrainte) et permettre un espacement suffisant entre la décaline et le premier cycle aromatique de la chaîne latérale. Différents liens ont été envisagés : amine **73**, amide **74** et **77**, alcène **75**, triazole **76** et **79**, ou encore carbamate **78** (Figure 81) :

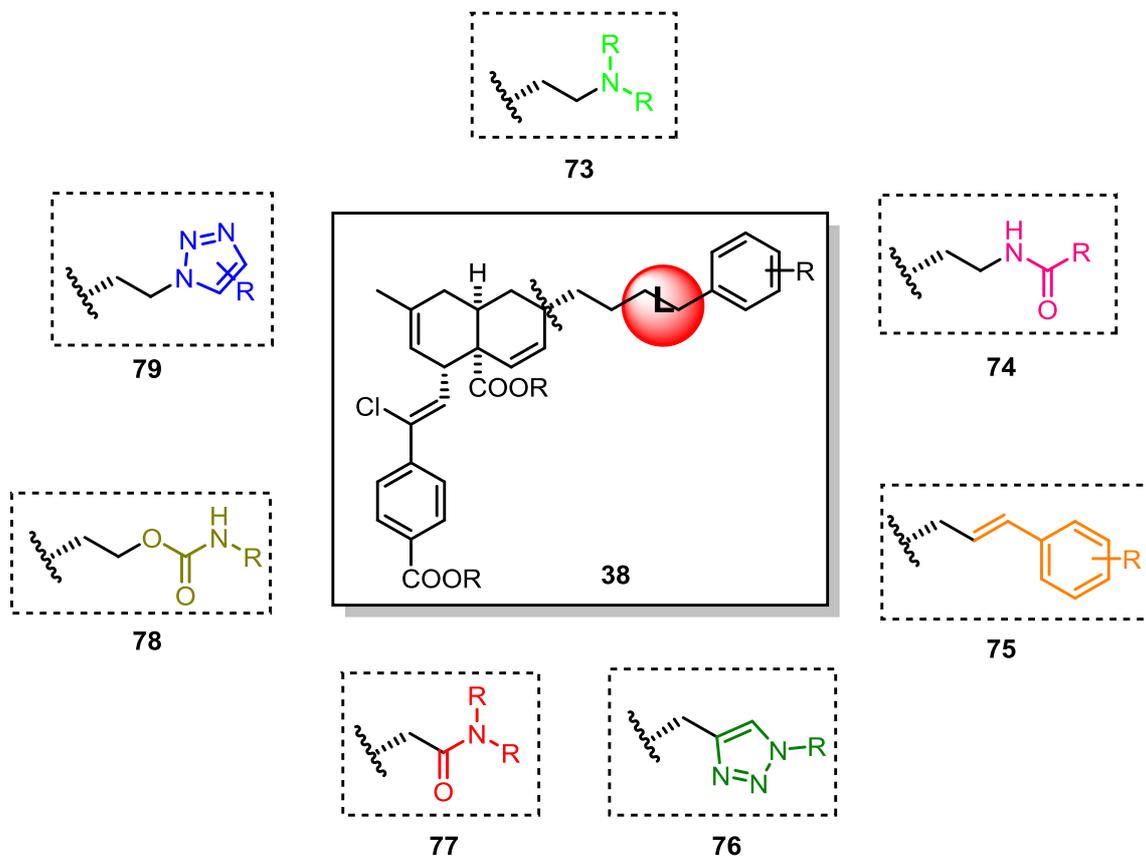


Figure 81 Liens envisagés pour remplacer la fonction ester dans les analogues de troisième génération

Certaines étapes dans la voie de synthèse des analogues de deuxième génération ont dû être optimisées pour permettre l'accès au précurseur commun **39** des analogues de troisième génération de la meiogynine A **29** à l'échelle de plusieurs grammes, parmi lesquelles :

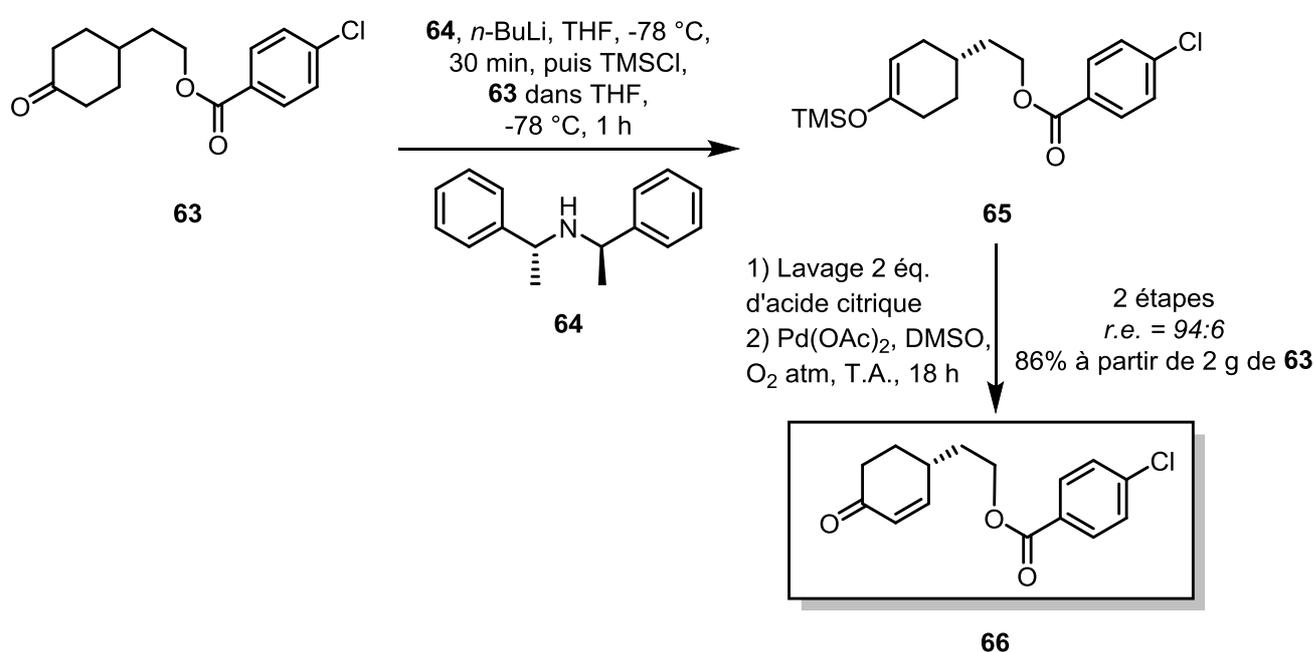
- 1) La synthèse de la cyclohexénone **66**
- 2) La synthèse du triflate **68**
- 3) La synthèse du diénophile **51**
- 4) La synthèse du triène **50**
- 5) La cycloaddition de Diels-Alder

III-Synthèse multi-gramme du précurseur commun **39** des analogues de troisième génération

A- Optimisation de la synthèse de la cyclohexénone **66**

Même si nous souhaitons remplacer la fonction ester de la chaîne latérale par un groupement plus résistant *in cellulo*, nous avons conservé le chlorure de *p*-chlorobenzoyl comme groupement protecteur pour la synthèse de la cyclohexénone **66**. En effet, cette voie

de synthèse suivie a permis d'obtenir le produit **66** avec un excellent ratio énantiomérique *r.e.* de 94:6. Nous avons cependant rencontré des problèmes de rendement dus à l'instabilité de l'éther d'énol triflique chiral **65** dans les conditions de lavage acide permettant d'éliminer la base organique, néfaste pour l'oxydation de Saegusa.⁵⁶ Il a fallu trouver des conditions adéquates pour le traitement acide afin d'éliminer et de recycler l'amine chirale **64** assez coûteuse, tout en évitant la dégradation de l'éther d'énol **65**. Ceci a été réalisé en effectuant le lavage de l'éther d'énol **65** avec 2 éq. d'acide citrique en solution aqueuse (Schéma 12). Cependant, nous avons pu mettre en évidence lors de la montée en échelle que les rendements de réaction chutent notablement (Tableau, Schéma 12). En effet, la quantité du produit **66** isolé à partir de 5 g de **63** est inférieure à celle obtenue à partir de 2 g (1,35 vs. 1,72). Par conséquent, nous avons réalisé cette étape en plusieurs batchs de 2 g. A cette échelle, nous avons obtenu la cyclohexénone **66** avec 86 % de rendement.



Echelle	500 mg	2 g	3,5 g	5 g
Rdt 2 étapes	70%	86%	34%	27%
Masse de 66	350 mg	1,72 g	1,19 g	1,35 g

Schéma 12 Optimisation de la synthèse de la cyclohexénone **66**

B- Essais d'optimisation de la synthèse du triflate **68**

Le réactif de Comins **67**⁸⁸ est un donneur de triflate efficace qui a permis d'obtenir l'éther d'énol triflique **68** avec un bon rendement de 86 % (Schéma 13). Cependant, il est coûteux. Sa synthèse au laboratoire est facile mais sa purification par distillation est longue et fastidieuse. De ce fait, nous avons entrepris des essais de remplacement du réactif de Comins **67** par d'autres réactifs commerciaux.

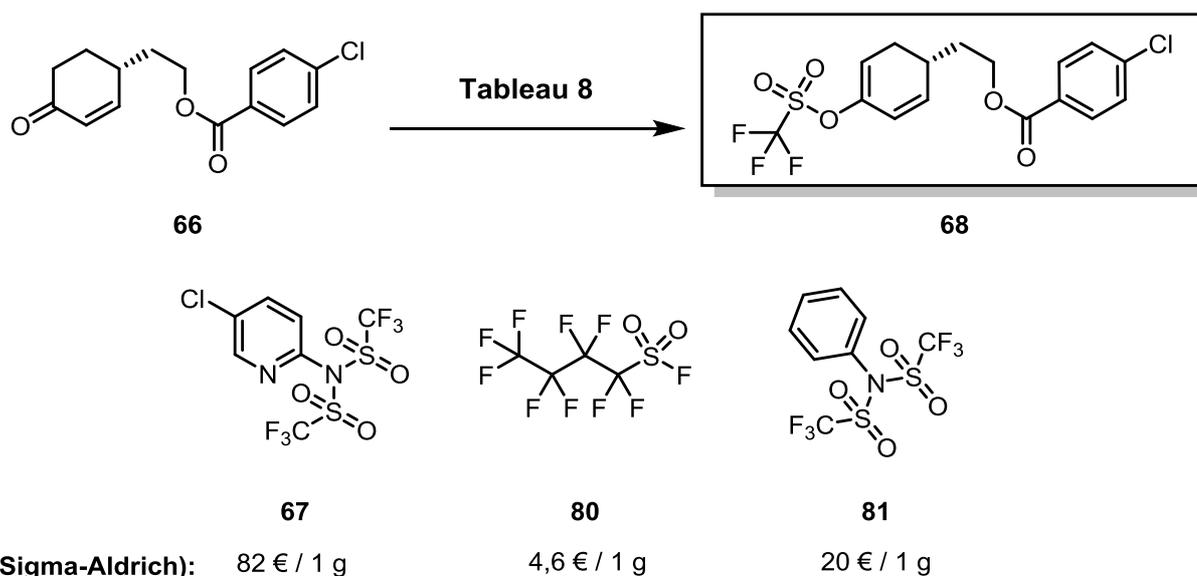


Schéma 13 Synthèse du triflate 68

Le fluorure de perfluorobutanesulfonyle **80** et le *N*-phényl-bis(trifluoromethanesulfonyl)amide) **81**, moins coûteux, ont été testés à différentes concentrations en faisant varier la nature et le nombre d'équivalents de la base (Tableau 7). Quelle que soit la base utilisée, une conversion partielle et de nombreux produits de dégradation ont été observés avec le fluorure de perfluorobutanesulfonyle **80**. Par ailleurs, si la conversion est totale en utilisant 2 éq. du *N*-phényl-bis(trifluoromethanesulfonyl)amide) **81**, le reste du réactif n'a pu être séparé du produit **68** souhaité. Le réactif de Comins **67**, malgré ses inconvénients est resté le réactif de choix pour notre substrat **66**.

Tableau 7 Les essais de remplacement du réactif de Comins 67

Entrée	Base	Donneur de triflate	Rdt %		Remarques
			66	68	
1	NaHMDS (2,0 éq.)	80 (1,5 éq.)	55	27	Dégradation
2	NaHMDS (1,1 éq.)	80 (3,0 éq.)	7	2	Dégradation
3	LDA (2,0 éq.)	80 (3,0 éq.)	14	18	Dégradation
4	LDA (1,5 éq.)	80 (2,0 éq.)	80	4	-
5	LDA (1,2 éq.)	80 (1,2 éq.)	57	10	Dégradation
6	LDA (1,2 éq.)	80 (3,0 éq.)	-	-	Dégradation
7	NaHMDS (2,0 éq.)	81 (1,5 éq.)	44	56	Conversion partielle
8	NaHMDS (2,0 éq.)	81 (2,0 éq.)	0	100	Conversion totale, 81 inséparable de 68

C- Optimisation de la synthèse du diénophile 51

Alors que la carbonylation pallado-catalysée a permis d'obtenir le diénophile **51** avec un rendement de 84 % sur une petite échelle (jusqu'à 1 g), celui-ci a tendance à s'aromatiser lorsque la réaction est effectuée sur plusieurs grammes et à conduire à un mélange inséparable du diénophile **51** et de son analogue **82** (Schéma 14). L'acide benzoïque **82** n'étant pas séparable du diénophile **51**, nous avons essayé d'améliorer ce résultat en faisant varier deux paramètres : la nature de base et le temps de réaction.

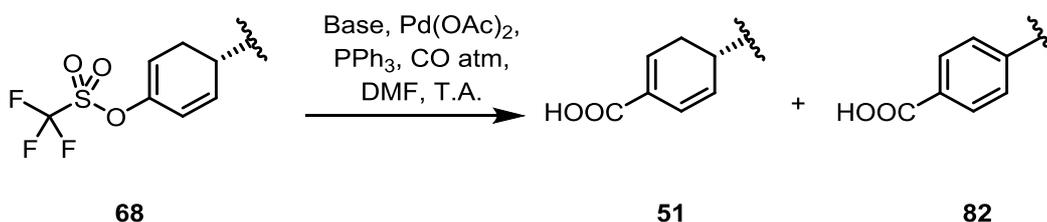


Schéma 14 Essais de synthèse du diénophile 51 à l'échelle de plusieurs grammes

Tableau 8 Les essais d'optimisation de la réaction de carbonylation

Entrée	Base	Temps de réaction (h)	Ratio 51/82
1	AcOK (4 éq.)	7	0:100
2	AcOK (4 éq.)	3	66:34
3	AcOK (4 éq.)	1	82:18
4	<i>i</i> Pr ₂ NEt (2.2 éq.)	3	77:23
5	NEt ₃ (4 éq.)	3	5:5
6	K ₂ CO ₃ (4 éq.)	3	91:9

Comme le montre le Tableau 8, lorsqu'on utilise l'acétate de potassium comme base, la diminution de temps de réaction de 7 à 1 h permet de réduire sans empêcher la formation du composé d'aromatisation **71**. Des ratios médiocres ont été obtenus avec des bases organiques comme la *N,N*-diisopropyléthylamine et la triéthylamine (entrées 4 et 5). Cependant, l'utilisation de carbonate de potassium (4 éq.) pendant 3 heures a permis de limiter fortement l'aromatisation (< 10 %, entrée 6). Dans ces conditions, la carbonylation conduit au diénophile **51** à l'échelle de plusieurs grammes avec 67 % de rendement et 9 % d'aromatisation (Schéma 15).

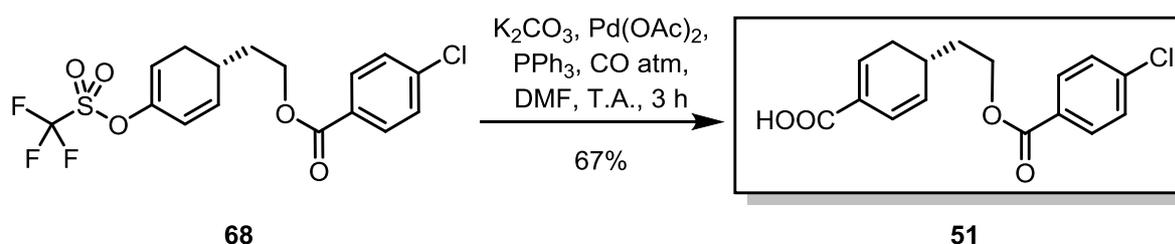


Schéma 15 Synthèse optimisée du diénophile **51** à l'échelle de plusieurs grammes

L'amélioration de la synthèse du diénophile chiral **51** a permis de l'obtenir à grande échelle avec un rendement global de 48 % sur 7 étapes linéaires (contre 73 % pour une échelle inférieure à 1 g).

D- Optimisation de la synthèse du triène

Compte tenu du rendement moyen (52 %) de la réaction de couplage de Suzuki entre l'acide benzoïque (*Z*)-1-bromo-2-chloroalcène **55** et l'ester boronique **58**, nous avons réalisé le couplage de Suzuki directement sur l'ester méthylique du (*Z*)-1-bromo-2-chloroalcène **83** (Schéma 16) ce qui a permis d'obtenir le triène **84** avec un très bon rendement de 83 %.

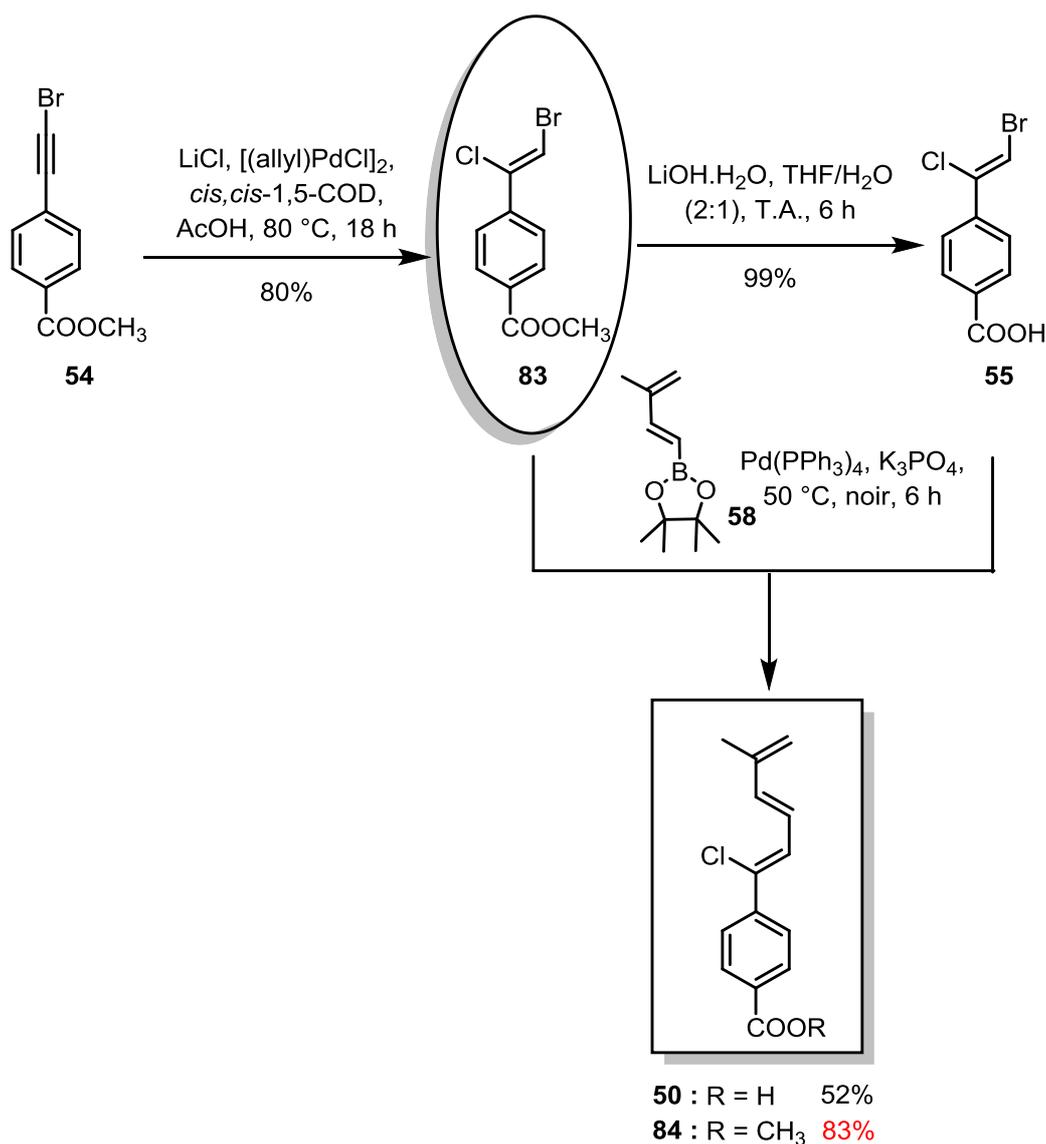


Schéma 16 Optimisation de la synthèse du triène

Ce gain en rendement peut être expliqué par une meilleure réactivité de l'ester méthylique du (Z)-1-bromo-2-chloroalcène **83** par rapport à son analogue acide benzoïque **55** et par une purification plus aisée du produit de réaction. Ainsi, nous avons pu obtenir le triène **84** à l'échelle de plusieurs grammes en 4 étapes linéaires au lieu de 5, avec une bonne reproductibilité et un rendement global de 53 %.

E- Fin de la synthèse de l'analogue clef **37**

La cycloaddition de Diels-Alder a été effectuée avec le triène **84** et le diénophile **51** en présence d'une quantité sous-stœchiométrique (0,5 éq.) de l'acide 2-bromophénylboronique **72** pendant 18 heures au reflux du 1,2-dichloroéthane (Schéma 17). Une meilleure reproductibilité a pu être observée, notamment du fait d'une diminution de l'homocycloaddition du triène, en préactivant le diénophile **51** avec le catalyseur **69** pendant 20 min avant l'ajout du triène **84** pour permettre la préformation de l'intermédiaire monoacylboronate **70** qui est plus réactif.

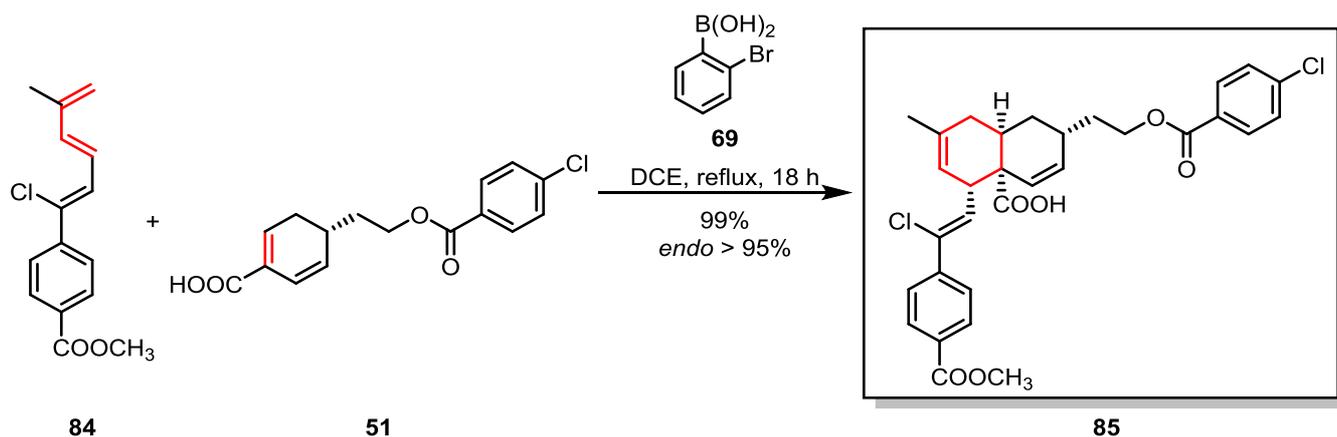


Schéma 17 Synthèse bioinspirée du cycloadduit **85**

Dans ces conditions, le cycloadduit **87** a été obtenu avec rendement quantitatif à l'échelle de 1 g et une excellente stéréosélectivité (ratio *endo/exo* > 95:5). Il a ensuite été saponifié en présence de lithine pour donner l'alcool diacide **37** de manière quantitative (Schéma 18).

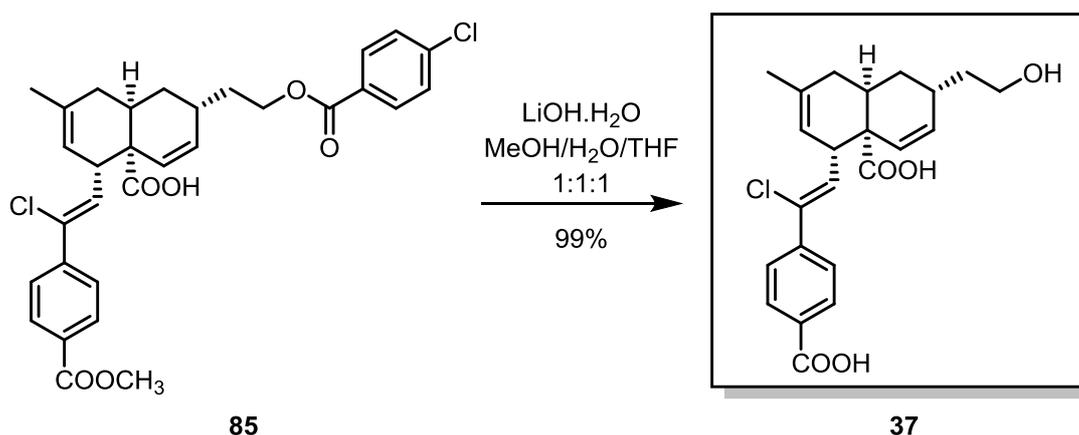


Schéma 18 Hydrolyse du cycloadduit **85**

Ainsi, 2,5 g du précurseur **37** des analogues de troisième génération de la meiogynine A **29** ont été isolés par synthèse convergente, multi-étape et bioinspirée à partir du méthyle *p*-iodobenzoate **53** et du *p*-méthoxyphényl alcool **59**. Cette voie de synthèse a assuré un excellent contrôle de la stéréochimie avec un ratio énantiomérique *r.e.* de 93:7, ratio *endo/exo* > 95:5, et 3 centres asymétriques. Le précurseur a été isolé avec un rendement global de 47 % sur 9 étapes linéaires (Schéma 19).

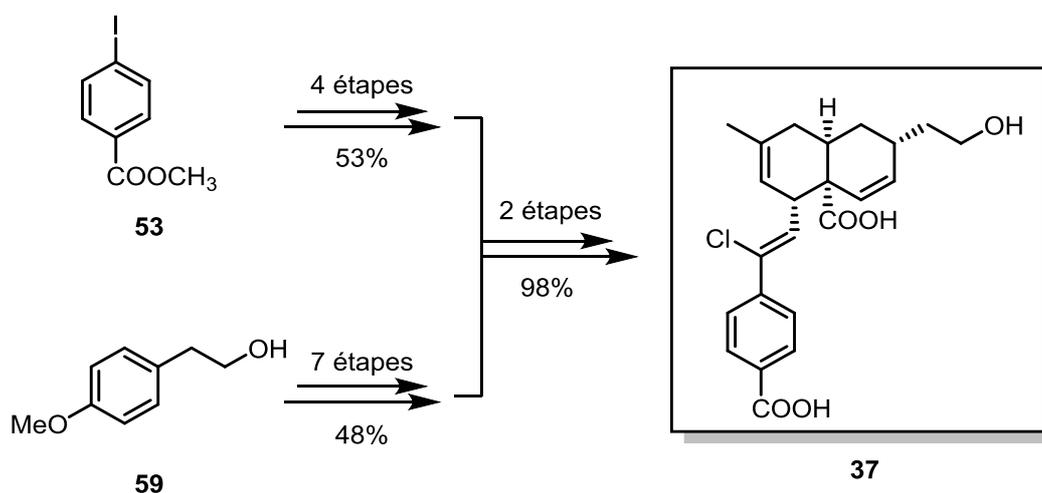


Schéma 19 Schéma récapitulatif de la synthèse convergente multi-étape du précurseur **37**

IV- Synthèse d'analogues de troisième génération de la meiogynine A 29

Différentes pharmacomodulations, visant à remplacer le lien ester ont été envisagées à partir du précurseur **37**. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de l'aldéhyde **87**, un précurseur général de ces analogues de troisième génération car pouvant conduire aux composés amines **73**, alcènes **75** et triazoles **76** via un intermédiaire alcyne **86** (Figure 82).

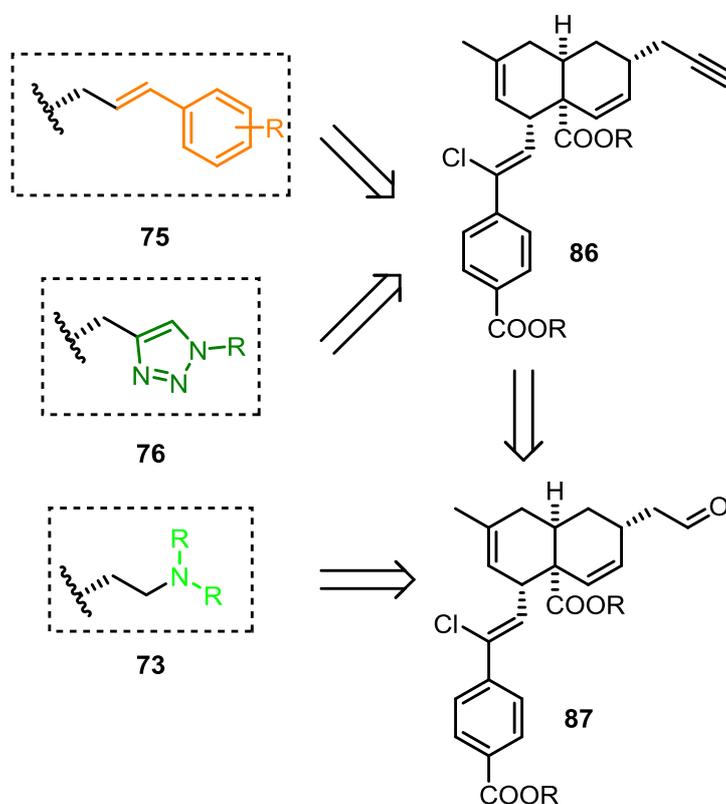


Figure 82 Intermédiaires clef **86** et **87**

A- Synthèse du dérivé aldéhyde **87**

Pour réaliser la transformation du précurseur alcool **37** en aldéhyde **88**, plusieurs méthodes ont été testées (Schéma 20 et Tableau 9) :

- l'oxydation de Ley-Griffith par le *N*-methylmorpholine-*N*-oxyde (NMO) en présence d'une quantité catalytique du tetrapropylammonium perruthenate ($n\text{-Pr}_4\text{N}^+\text{RuO}_4^-$ ou TPAP) ;⁹¹
- l'oxydation par le dioxyde de manganèse MnO_2 ;
- l'oxydation de Swern ;⁹²
- l'oxydation par l'acide 2-iodoxylbenzoïque (IBX **89**) ;
- l'oxydation par le periodinane de Dess-Martin (DMP **90**).⁹³

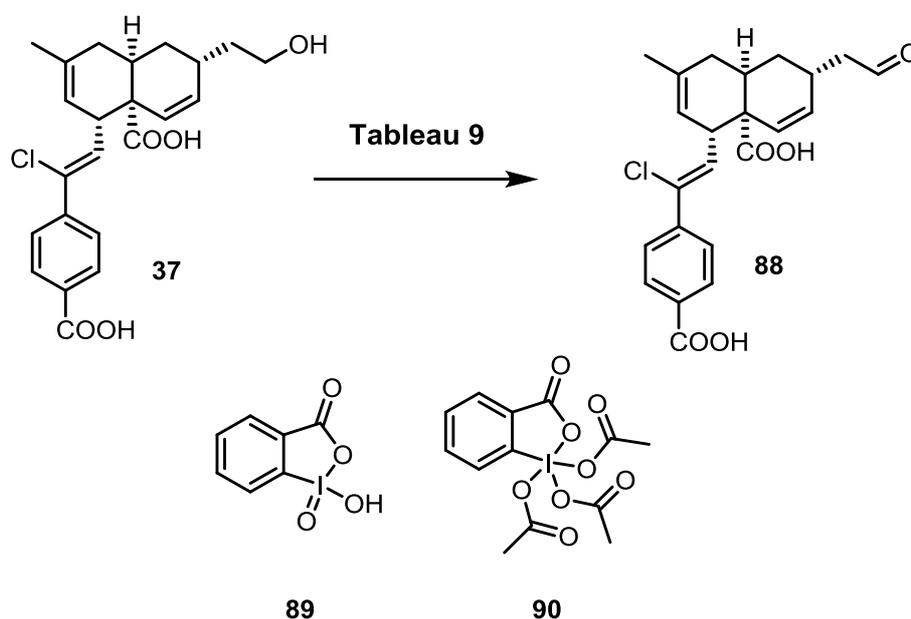


Schéma 20 Transformation de l'alcool **37** en aldéhyde **88**

Tableau 9 Essais d'oxydation de l'alcool **37** en aldéhyde **88**

Entrée	Conditions	Résultats
1	NMO (1.5 éq.), TPAP (0.05 éq.), ACN, T.A. ⁹¹	Produit de départ 37
2	MnO_2 (5 éq.), dioxane, T.A., 24 h	Produit de départ 37
3	$(\text{COCl})_2$ (1.5 éq.), DMSO (6 éq.), Et_3N (7.5 éq.), CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ⁹²	Produits de suroxydation
4	IBX 89 (3 éq.), dioxane/ CH_2Cl_2 (1:1), $40\text{ }^\circ\text{C}$	Conversion totale Produit inséparable de l'IBX 89
5	DMP 90 (3 éq.), dioxane, $40\text{ }^\circ\text{C}$ ⁹³	Conversion totale Produit inséparable du DMP 90

Dans les conditions relativement douces de Ley-Griffith et avec le MnO_2 , aucune transformation n'a été observée, seul du produit de départ a été récupéré (entrées 1 et 2). L'oxydation de Swern a, quant-à-elle donné des produits de suroxydation (entrée 3). Finalement, les oxydations avec l'IBX **89** et le DMP **90** (entrées 4 et 5) se sont montrées les plus efficaces. Cependant, ces deux réactifs ainsi que leurs produits de réduction n'ont pas pu être séparés du produit **88** par chromatographie flash sur gel de silice quel que soit le système d'éluant utilisé. Afin de faciliter l'isolement du dérivé aldéhyde, nous avons entrepris la protection des fonctions acides carboxyliques du précurseur alcool **37** sous forme d'esters méthyliques.

B- Protection des fonctions acides carboxyliques de l'alcool **37** sous forme d'esters méthyliques

Pour introduire les esters méthyliques, le triméthylsilyldiazométhane **91**, un agent méthylant commercial remplaçant le diazométhane très explosif a été utilisé.⁹⁴ Cette réaction rapide et quantitative a permis de masquer les fonctions acides carboxyliques de l'alcool **37** et d'obtenir ainsi un dérivé **92** moins polaire donc plus facilement séparable des réactifs d'oxydation (Schéma 21).

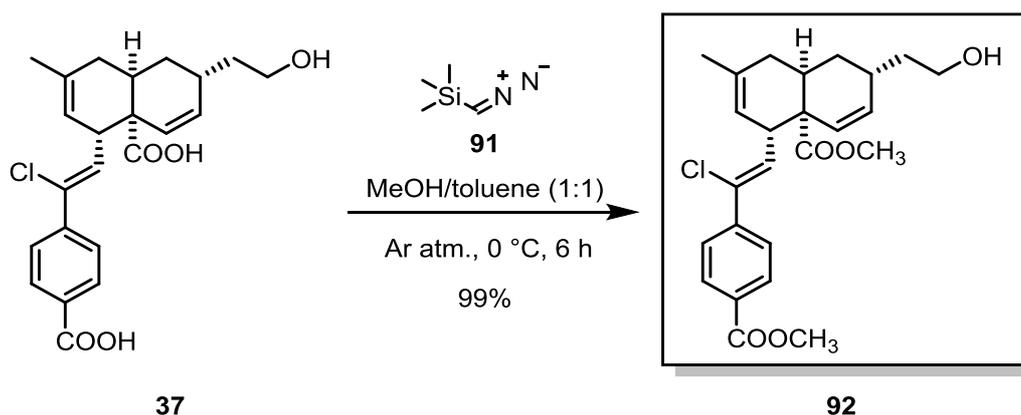


Schéma 21 Protection des fonctions acides carboxyliques de l'alcool **37** sous forme d'esters méthyliques

C- Oxydation de l'alcool **92** en aldéhyde **93**

A partir de l'alcool **92**, le dérivé aldéhyde **93** a pu être isolé avec un rendement de 95 % en utilisant du periodinane de Dess-Martin (DMP **90**) à $40\text{ }^\circ\text{C}$ dans du dichlorométhane qui assure une bonne solubilité du produit de départ **92** (Schéma 22). D'autre part, le produit **93** a pu être séparé du reste de DMP **90** et des produits de réduction de ce dernier par chromatographie flash sur gel de silice en utilisant un mélange d'heptane/acétate d'éthyle.

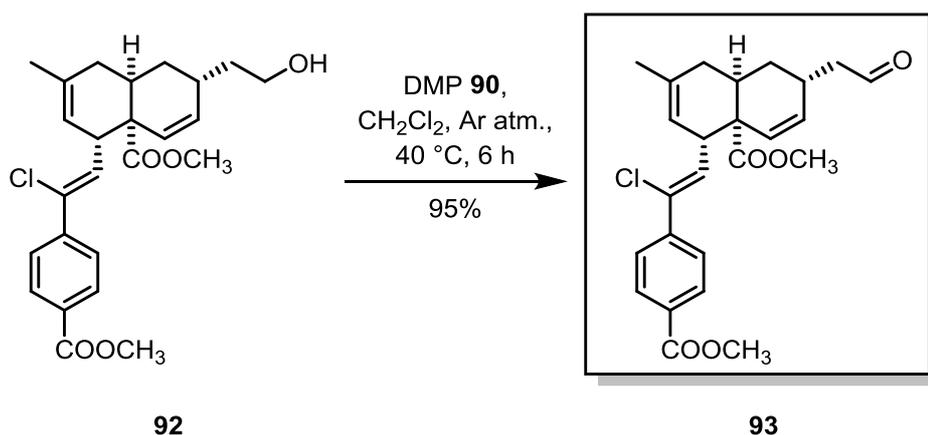


Schéma 22 Oxydation de l'alcool **92** en aldéhyde **93**

D- Synthèse de l'alcyne **95**

La transformation de l'aldéhyde **93** en alcyne terminal **95** a été effectuée en suivant la procédure d'Ohira-Bestmann par action du diméthyl-1-diazo-2-oxopropylphosphonate **94** dans le méthanol. Cette réaction "one-pot" relativement douce a permis d'isoler l'alcyne **98** avec un rendement de 50 % (Schéma 23).⁹⁵⁻⁹⁶ Cependant, l'alcyne **95** s'est montré instable, notamment lors de la purification sur gel de silice ; cette voie de synthèse vers les alcènes **75** et les triazoles **76** a donc été abandonnée.

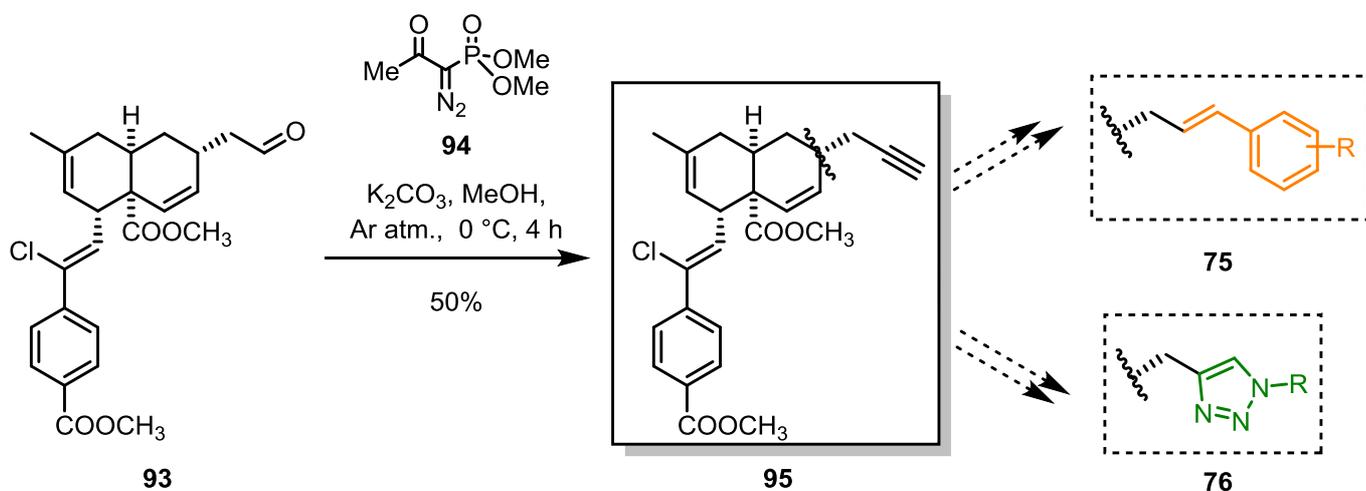


Schéma 23 Transformation de l'aldéhyde **93** en alcyne **95**

E- Synthèse des amines **73**

A partir de l'aldéhyde **93**, nous avons envisagé d'introduire un lien amine sur la chaîne latérale par une réaction classique d'amination réductrice avec une amine primaire ou secondaire fonctionnalisée en présence d'un hydrure de bore. Deux conditions ont été testées en utilisant la *p*-chlorobenzylamine **96**. Cette amine a été choisie car l'atome de chlore en position *para* du cycle aromatique pourrait éventuellement permettre de prolonger la chaîne latérale par des couplages organométalliques :

- le triacétoxyhydruroborate de sodium $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ à 70 °C dans le 1,2-dichloroéthane pendant 12 h ;⁹⁷
- le tétrahydruroborate de sodium NaBH_4 à température ambiante dans le THF anhydre pendant 24 h, en présence d'une quantité stœchiométrique d'isopropoxyde de titane $\text{Ti}(i\text{-PrO})_4$.⁹⁸

Alors que le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ n'a pas été efficace sur ce substrat **93** dans les conditions testées, nous avons pu obtenir l'amine **97** avec un rendement de 40 % en utilisant le borohydrure de sodium comme réducteur. Les fonctions esters de l'amine **97** ont ensuite été saponifiées en présence de lithine pour donner l'amine diacide **98** de manière quantitative (Schéma 24). Avant l'élaborer des analogues plus élaborés en allongeant la chaîne latérale au niveau de l'atome de chlore, l'activité biologique des amines **97** et **98** a été évaluée par les tests d'inhibition par polarisation de fluorescence des interactions Bcl-2/Bim, Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid. L'amine diester **97** n'est active sur aucune de protéines anti-apoptotiques testées ($K_i > 23 \mu\text{M}$) alors que l'amine **98**, également inactive sur Bcl-2 et Bcl-xL ($K_i > 23 \mu\text{M}$) présente une affinité moyenne pour Mcl-1 ($K_i = 16 \mu\text{M}$). Cette activité est décevante si on la compare à celle du composé **34** (sub-micromolaire pour les trois protéines) de longueur similaire. La fonction amine, facilement protonable au pH physiologique freine peut-être l'interaction du composé **98** avec les acides aminés plutôt hydrophobes du site actif. C'est pourquoi, nous sommes tournés vers d'autres types de liens, tels que les amides, les carbamates ou les triazoles.

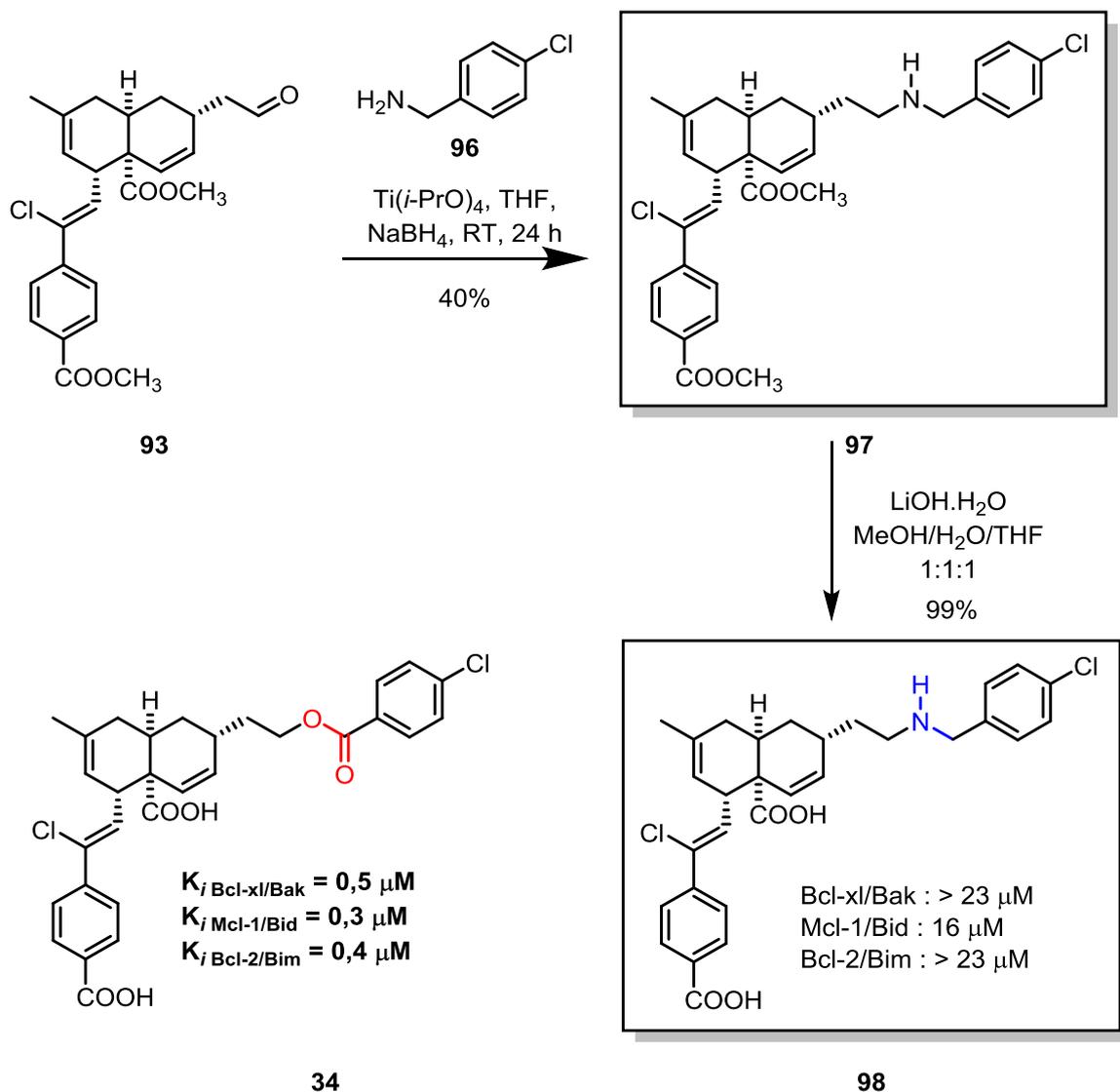


Schéma 24 Amination réductrice de l'aldéhyde 96

F- Synthèse des amides 77

1. Synthèse à partir de l'alcool 37

Les amides **77** peuvent être préparés par une procédure de couplage oxydatif aérobie "one-pot" mettant en jeu l'alcool **99** et une amine primaire ou secondaire fonctionnalisée, ou par une approche plus classique en oxydant l'alcool **99** en acide carboxylique **100** qui est ensuite engagé dans un couplage peptidique avec une amine primaire ou secondaire fonctionnalisée (Figure 83).

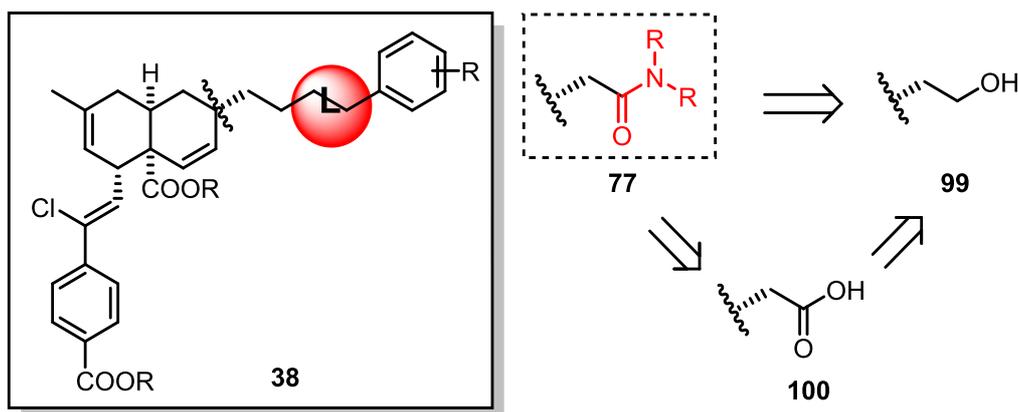


Figure 83 Analyse rétrosynthétique des amides 77

Dans un premier temps, nous avons testé une approche récente de couplage oxydatif aérobie mettant en jeu l'alcool **92** et la *p*-chlorobenzylamine **96** catalysée par un système Cu^I/nitroxyl (ABNO **101** : *N*-oxyl 9-azabicyclo[3.3.1]nonane ou AZADO **102** : *N*-oxyl 2-azaadamantane) en présence de tris(2-pyridylméthyl)amine (ou TPA **103**). Le mécanisme de cette réaction "one-pot" est montré dans le Schéma 25 : L'alcool est oxydé en aldéhyde qui réagit avec l'amine pour former un hémiaminal qui est ensuite oxydé en amide.

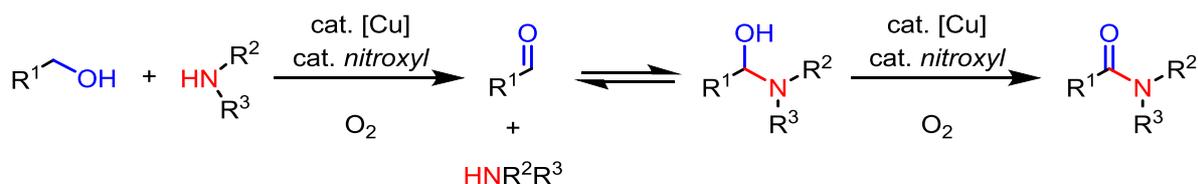


Schéma 25 Mécanisme de couplage oxydatif des alcools et amines

Toutefois, cette approche n'a pas été efficace, et nous avons récupéré principalement le produit de départ **92** avec le dérivé aldéhyde **93** comme sous-produit minoritaire (Schéma 26).⁹⁹⁻¹⁰⁰

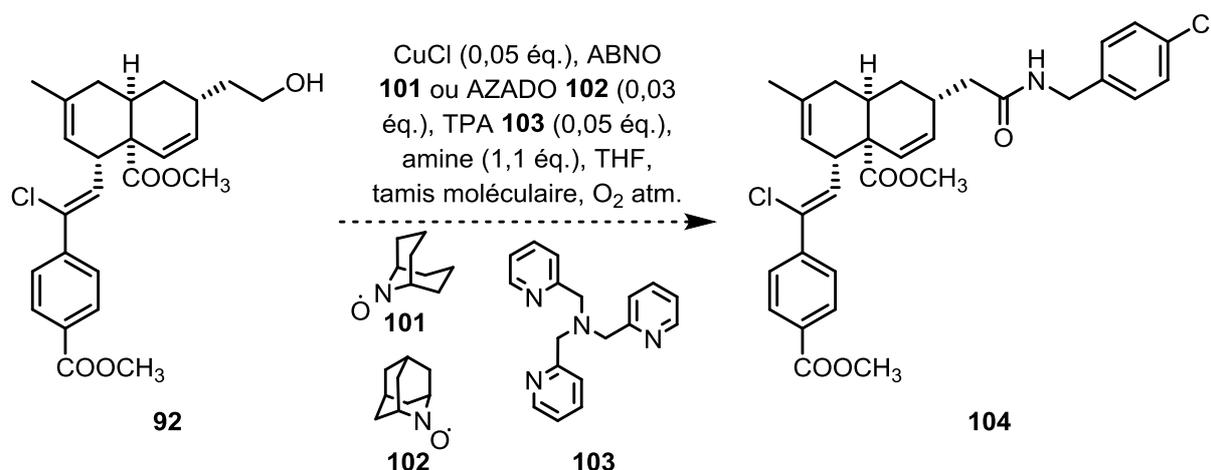


Schéma 26 Essais de formation d'amide **104** par une procédure "one-pot" catalysée par Cu/ABNO

Finalement, nous nous sommes tournés vers une voie plus classique qui consiste à réaliser une réaction de couplage peptidique entre un acide carboxylique **100** et une amine

primaire ou secondaire fonctionnalisée. De ce fait, nous avons entrepris l'oxydation de l'alcool **92** en acide carboxylique. L'acide carboxylique **106** a été obtenu suivant la version modifiée par Zhao de l'oxydation d'Anelli, c'est-à-dire par action du radical 2,2,6,6-tetraméthylpiperidine-1-oxyle (ou TEMPO **105**) sur l'alcool **92** à pH 6,5 en présence du chlorite de sodium et d'une solution d'hypochlorite de sodium 2,6 % comme réoxydant (Schéma 27). Dans ces conditions, nous avons obtenu l'acide carboxylique **106** avec 93 % de rendement.

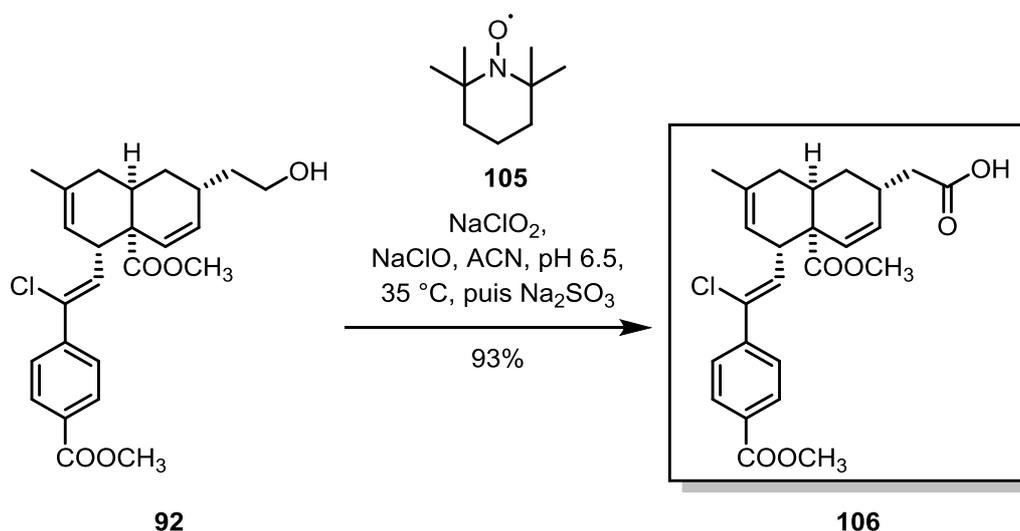


Schéma 27 Oxydation de l'alcool **92** en acide carboxylique **106**

A partir de l'acide carboxylique **106**, des couplages peptidiques avec différentes amines aromatiques ont été réalisés. Sept amides **108** ont pu être isolés en utilisant le HATU **107** comme agent de couplage en présence de la base de Hünig (ou *N,N*-diisopropyléthylamine, DIPEA). Les conversions étant totales après 24 h, les rendements modérés observés (15-50 %) sont principalement liés à des problèmes lors de la purification sur gel de silice (Schéma 28).

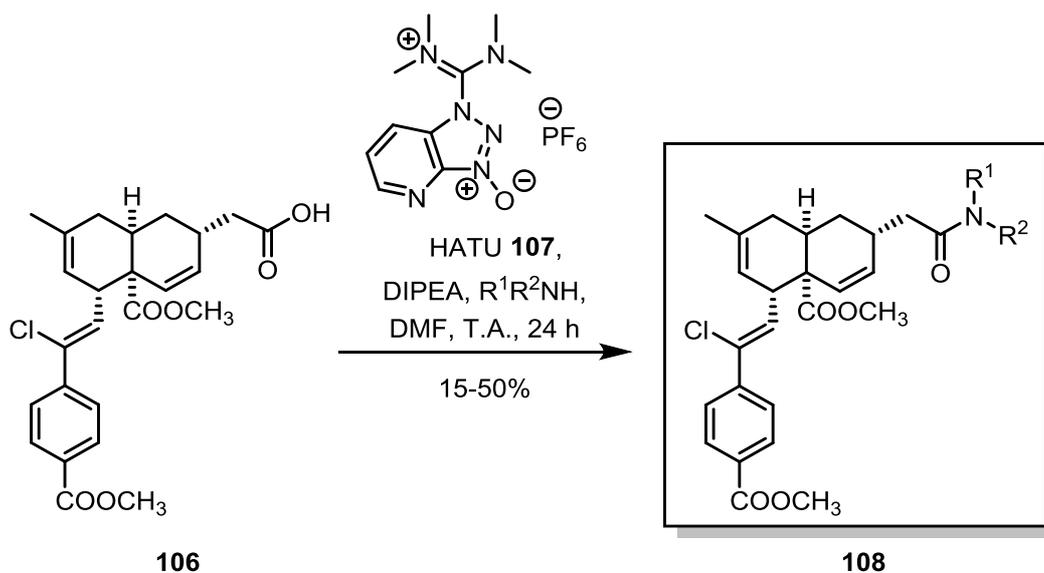


Tableau 10 Bilan des amides **108** synthétisés

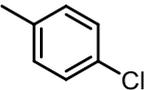
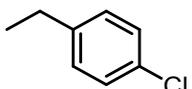
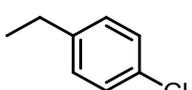
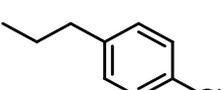
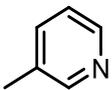
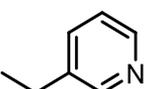
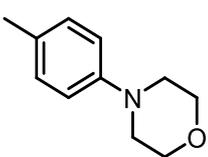
N° de molécule	R ¹	R ²	Rdt %
108-1	H		50 %
108-2	H		44 %
108-3	CH ₃		25 %
108-4	H		15 %
108-5	H		50 %
108-6	H		50 %
108-7	H		50 %

Schéma 28 Synthèse des amides **108** par couplage peptidique

Nous avons entrepris par la suite la déprotection des deux esters méthyliques des amides **108**. Etant donné que dans les conditions précédemment utilisées (en présence de lithine), seul l'ester benzoïque est hydrolysé, plusieurs autres conditions ont été testées :

- l'hydrolyse en milieu basique (jusqu'à 10 éq. d'hydroxyde de sodium NaOH ou d'hydroxyde de potassium KOH) aux microondes (Monowave 50, Anton Paar) à 120 °C pendant 10 min ;¹⁰¹
- l'iodure de lithium LiI (3 éq.) au reflux du DMF ;
- l'iodure de sodium NaI (8 éq.) en présence du TMSCl (4 éq.) au reflux d'ACN ;
- le chlorure de lithium LiCl (4 éq.) au reflux du THF, ou dans le DMF aux microondes à 100 °C pendant 20 min ;¹⁰²
- le *tert*-butoxyde de potassium *t*-BuOK (4 éq.) dans le DMSO à température ambiante, ou aux microondes à 120 °C pendant 10 min ;¹⁰³
- le *tert*-butoxyde de sodium *t*-BuONa (2,5 éq.) au reflux du DMSO ;
- le triméthylsilanolate de potassium TMSOK (5 éq.) au reflux du THF, ou aux microondes à 110 °C pendant 30 min.

Quelles que soient les conditions, seul le benzoate en 6' est hydrolysé. L'ester en position 10 semble trop encombré stériquement pour être saponifié. Le fait d'avoir réussi à saponifier l'ester en position 10 de l'amine **98** mais pas des amides **109** pourrait s'expliquer par une liaison hydrogène qui se forme entre le carbonyle de la fonction amide et l'ester méthylique en position 10. Finalement, en réalisant une hydrolyse en milieu basique (4 éq. de NaOH) aux microondes (Monowave 50, Anton Paar) à 120 °C pendant 10 min, quatre amides **109** ont pu être isolés de manière quantitative (Schéma 29) :

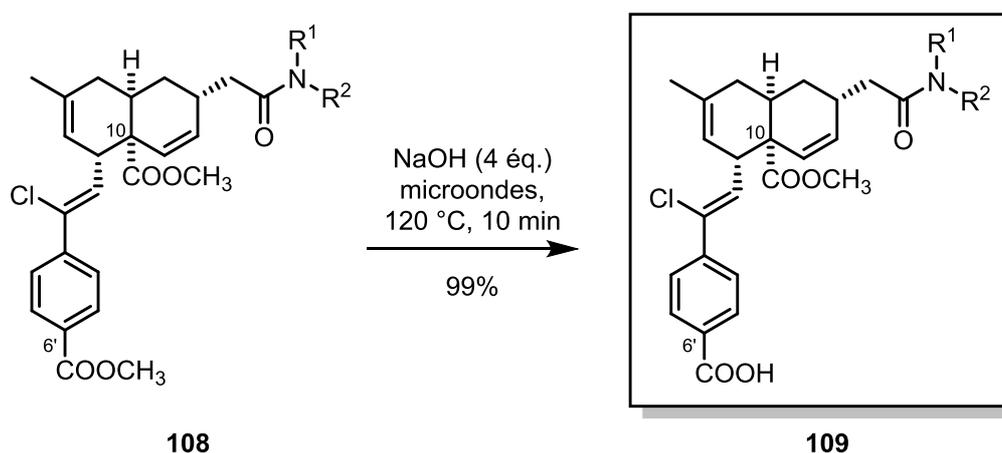
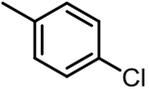
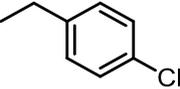
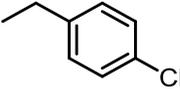
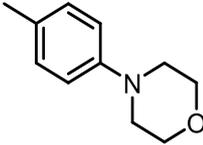


Schéma 29 Saponification des fonctions acides carboxyliques des amides **109**

Tableau 11 Bilan des amides **109** synthétisés

N° de molécule	109-1	109-2	109-3	109-4
R ¹	H	H	CH ₃	H
R ²				

2. Protection des fonctions acides carboxyliques sous forme d'esters acyloxyméthyles

Vu les difficultés rencontrées déprotéger les groupes acides carboxyliques lorsqu'ils sont sous forme ester méthylique, nous avons envisagé d'utiliser un autre groupement protecteur plus labile. Ainsi, nous avons opté pour l'ester acyloxyméthyle.¹⁰⁴ Ce groupement protecteur est en effet connu pour rendre une molécule non-chargée et plus lipophile, ce qui facilite sa pénétration au niveau de la membrane cellulaire.¹⁰⁵ Ces esters sont hydrolysés *in cellulo* par des estérases non-spécifiques. Ce type d'ester est très peu décrit dans la littérature et à priori très peu utilisé comme groupe protecteur en synthèse. Nous avons cependant postulé que les acides carboxyliques pourraient être restaurés dans des conditions plus douces que celles utilisées pour la saponification des esters méthyliques. En effet, la fonction acétate de l'ester acyloxyméthyle est beaucoup plus accessible car plus éloignée de la décaline (Schéma 30).

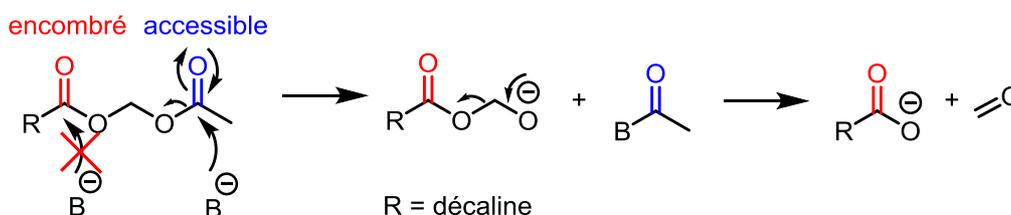


Schéma 30 Mécanisme de déprotection des acides carboxyliques masqués sous forme d'esters acyloxyméthyles

Les fonctions acides carboxyliques du précurseur commun **37** ont été protégées en milieu basique en utilisant 2 éq. de bromure d'acyloxyméthyle **110** dans du DMF à température ambiante. L'alcool disubstitué **111** a été isolé avec un rendement de 68 %.¹⁰⁶ Il est important de noter que tout excès du réactif **110** conduit à la formation d'un analogue trisubstitué **112** dont, non seulement les fonctions acides carboxyliques sont protégées, mais aussi la fonction alcool sur la chaîne latérale. De ce fait, le contrôle du nombre d'équivalents du bromure d'acyloxyméthyle **110** est important pour obtenir exclusivement le dérivé disubstitué **111** de notre substrat **37** (Schéma 31).

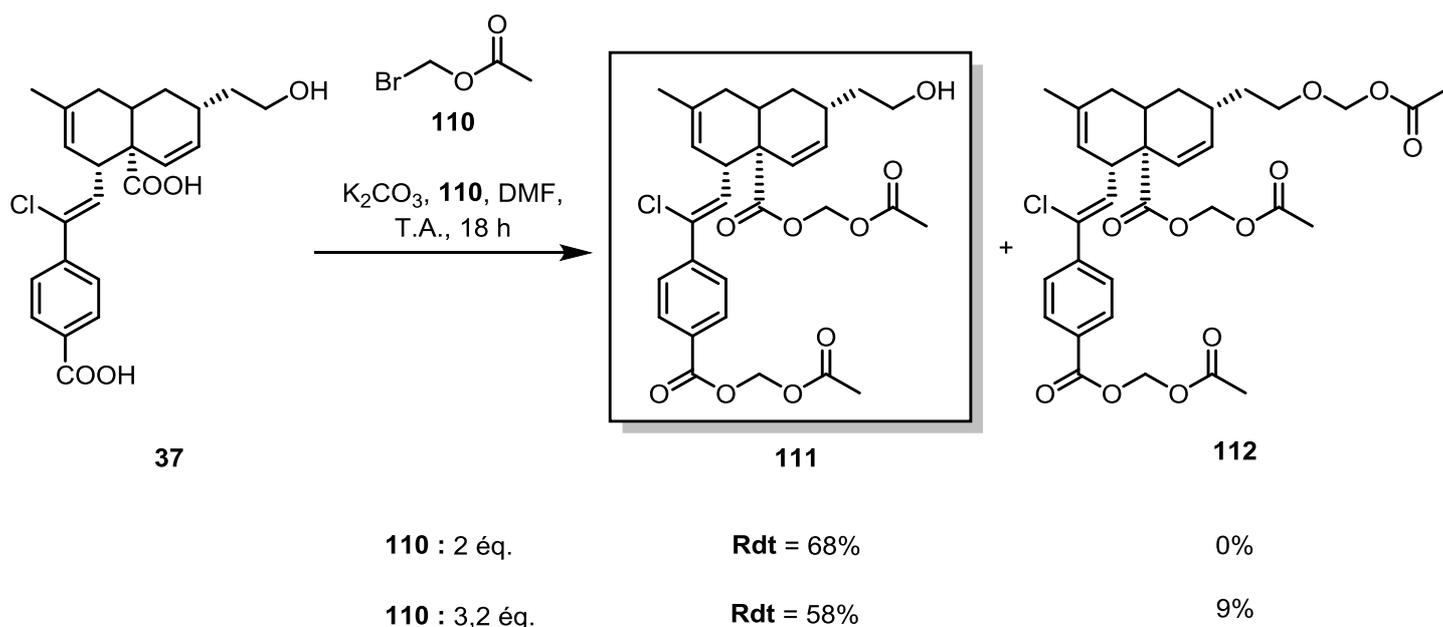


Schéma 31 Protection des fonctions acides carboxyliques sous forme d'esters acyloxyméthyles

3. Synthèse de l'acide carboxylique **113**

Après protection des fonctions acides carboxyliques en positions 10 et 6' sous forme d'ester acyloxyméthyle, l'alcool disubstitué **111** a été oxydé suivant la version modifiée par Zhao de l'oxydation d'Anelli comme précédemment décrit. Ainsi, nous avons obtenu l'acide carboxylique disubstitué **113** avec un rendement de 70 % (Schéma 32).

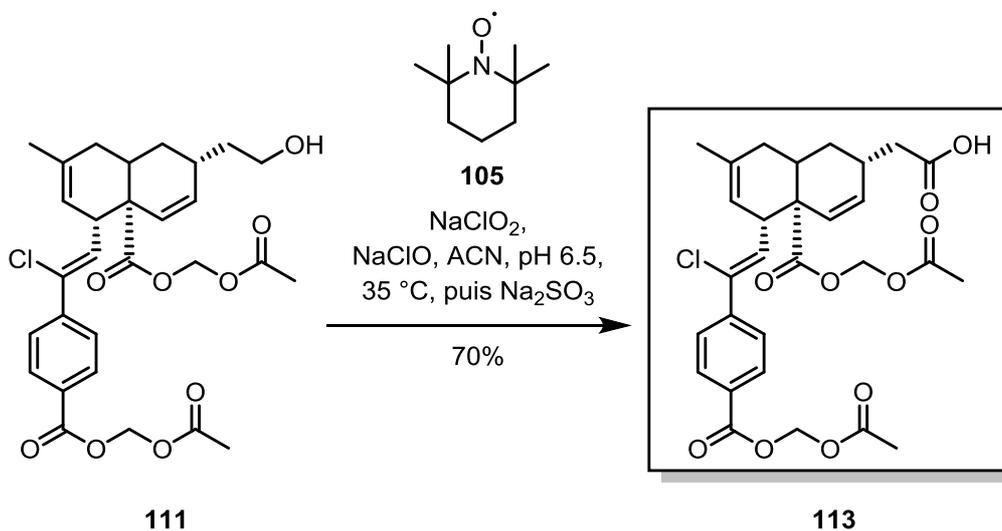


Schéma 32 Oxydation de l'alcool **111** en acide carboxylique **113**

4. Synthèse de l'amide **114**

L'acide carboxylique **113** a ensuite été engagé dans une réaction de couplage peptidique avec la *p*-chlorobenzylamine catalysée par le HATU **107** en présence de la base de Hünig. L'amide disubstitué a été isolé avec un rendement de 50 %. Les esters ont été hydrolysés de manière quantitative par action du carbonate de potassium dans le MeOH à température ambiante, pour donner l'amide diacide **114** (Schéma 33).

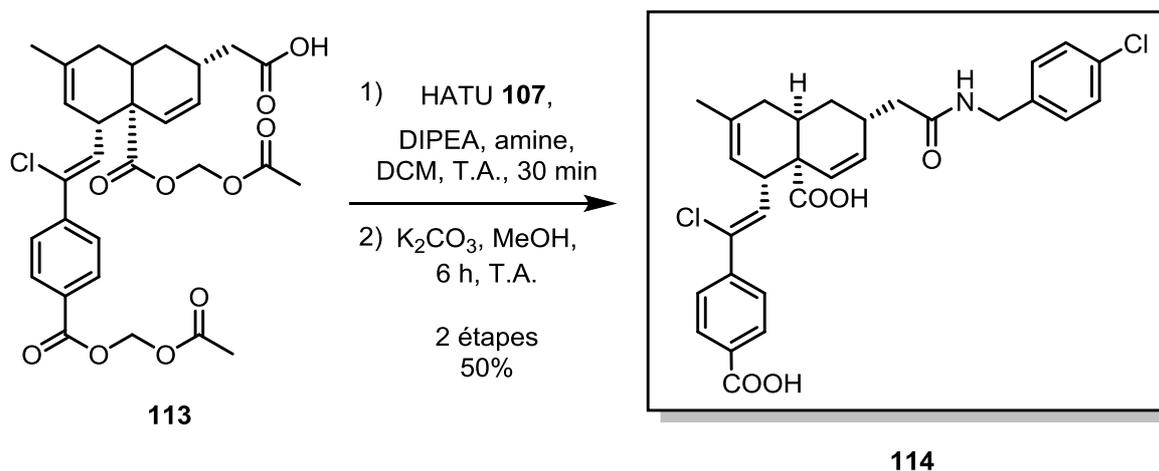


Schéma 33 Synthèse de l'amide diacide **114** à partir de l'acide carboxylique disubstitué **113**

Ces résultats montrent que le groupement acyloxyméthyle est un très bon groupement protecteur des fonctions acides carboxyliques, facilement déprotégeable même sur des acides carboxyliques encombrés.

5. Activités biologiques des amides **108**, **109** et **114** sur protéines

L'activité biologique des différents amides **108**, **109** et **114** de structure commune **115** (Figure 84) a été évaluée par polarisation de fluorescence sur Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Les valeurs de $K_i \pm SD$ sont rapportées en μM dans le Tableau 12 :

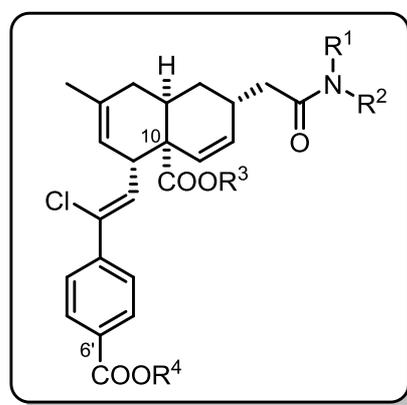
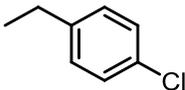
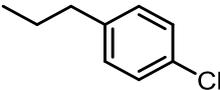
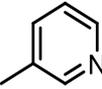
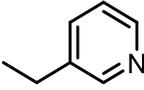
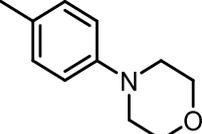
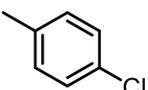
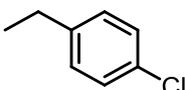
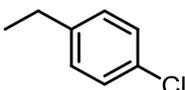
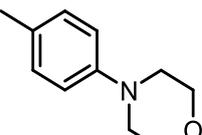
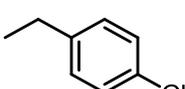


Figure 84 Structure commune des amides **108**, **109** et **114**

Tableau 12 Activités biologiques des amides **108**, **109** et **114** synthétisés par couplage peptidique ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

N° de molécule	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
108-1	H		CH ₃	CH ₃	>23	>23	>23
108-2	H		CH ₃	CH ₃	>23	>23	>23

108-3	CH ₃		CH ₃	CH ₃	>23	17,5 ± 1,5	>23
108-4	H		CH ₃	CH ₃	>23	8,4 ± 0,4	>23
108-5	H		CH ₃	CH ₃	>23	>23	>23
108-6	H		CH ₃	CH ₃	>23	0,7 ± 0,06	>23
108-7	H		CH ₃	CH ₃	>23	>23	>23
109-1	H		CH ₃	H	2,7 ± 0,2	1 ± 0,2	0,7 ± 0,02
109-2	H		CH ₃	H	2,7 ± 0,4	4,5 ± 1,4	0,6 ± 0,02
109-3	CH ₃		CH ₃	H	>23	1,9 ± 0,2	>23
109-4	H		CH ₃	H	9,9 ± 0,9	6,8 ± 1,3	>23
114	H		H	H	14,1 ± 0,4	3,6 ± 1,1	>23

A part les amides **108-4** et **108-6** qui sont de bons inhibiteurs sélectifs de l'interaction Mcl-1/Bid, les amides **108**, dont les fonctions acides carboxyliques en positions 10 et 6' sont masquées sous forme d'esters méthyliques, n'ont pas d'effet inhibiteur sur les interactions Bcl-xL/Bak, Mcl-1/Bid ou Bcl-2/Bim. L'azote de la pyridine de l'amide **108-6** pourrait être impliqué dans une interaction spécifique avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1, d'où la forte affinité de cet analogue pour la protéine cible.

En outre, nous pouvons remarquer le gain d'affinité des amides monoacides **109** par rapport à leurs analogues **108**, ce qui souligne l'importance d'avoir au moins une fonction acide en position 6' pour l'interaction avec les protéines cible. De plus, la présence d'un amide N-substitué semble important pour l'interaction avec les protéines Bcl-2 et Bcl-xL mais pas avec Mcl-1. En effet, l'affinité de l'amide N, N-disubstitué pour Bcl-2 et Bcl-xL diminue de manière significative (**109-3** vs. **109-2**).

D'autre part, la fonction acide carboxylique en position 10 de l'amide **114** n'améliore pas l'affinité de ce composé par rapport à celle de son analogue mono-ester **109-2**.

6. Conclusion

En conclusion, nous avons préparé 12 amides fonctionnalisés **115** par couplage peptidique à partir du précurseur commun **37**.

- 7 amides **108** dont les fonctions acides carboxyliques en positions 10 et 6' sont méthylées ;
- 4 amides **109** dont la fonction acide carboxylique en position 10 est méthylée alors que celle en position 6' est libre ;
- 1 amide **114** dont les fonctions acides carboxyliques en positions 10 et 6' sont libres.

Au cours de cette synthèse, nous avons pu démontrer le potentiel de l'ester acyloxyméthyle comme groupement protecteur efficace et facile à déprotéger en conditions assez douces.

L'activité biologique de ces amides a été évaluée par polarisation de fluorescence sur Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Parmi les amides testés, l'amide **108-6** est un inhibiteur sélectif de Mcl-1 dont l'affinité est de l'ordre du submicromolaire. Par ailleurs, l'amide **109-1** est un inhibiteur multiple des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Figure 85).

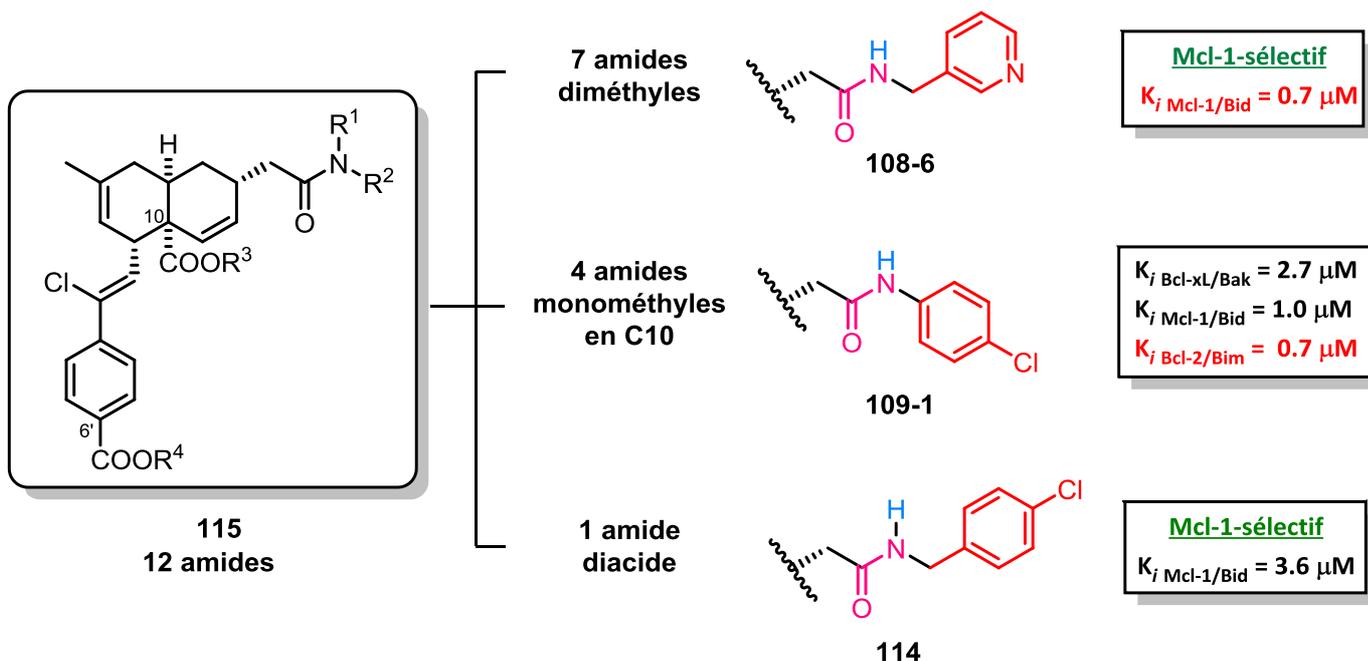


Figure 85 Figure récapitulatif des amides **115** synthétisés

Ces résultats montrent que de fins changements sur les acides carboxyliques et/ou sur la chaîne latérale permettent de moduler l'activité biologique et la sélectivité. Cependant, à part ces trois exemples, les activités pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 des composés synthétisés de cette famille "amide" restent faibles. C'est pourquoi, nous avons exploré d'autres familles de composés.

G- Synthèse des amides **117**

En regardant la structure des composés les plus actifs parmi les analogues de deuxième génération de la meiogynine A **29**, nous remarquons que le premier cycle aromatique sur chaîne latérale se trouve en position 5" de la décaline, au pied d'un carbonyle en 4". De ce fait, nous avons envisagé la synthèse d'amides **117**. Ces composés pourraient être préparés à partir de l'alcool **99** qui pourrait être substitué par un azoture **118** précurseur de l'amine **119** (Figure 86).

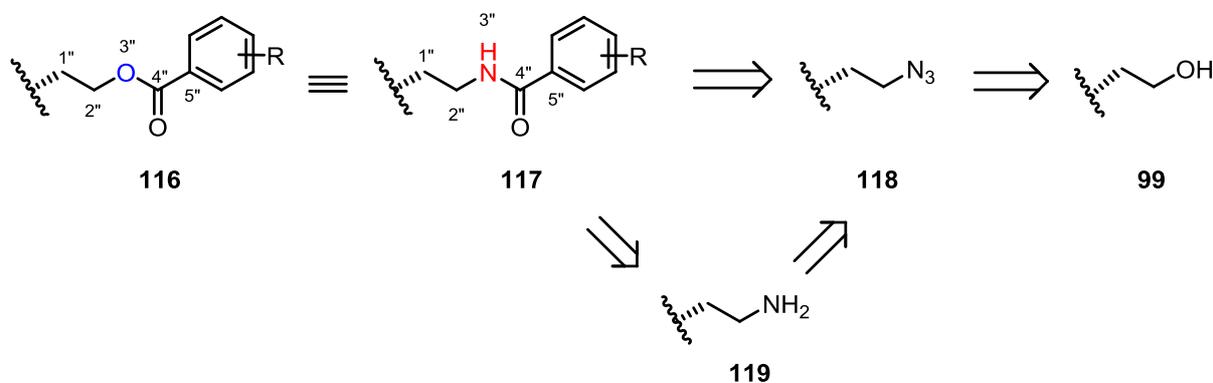


Figure 86 Analyse rétrosynthétique des amides **117**

1. Synthèse de l'azoture **122**

Nous avons entrepris la transformation du précurseur alcool disubstitué **111** en azoture **122** par une réaction d'azidation en présence de triphénylphosphine (PPh₃), de diisopropyle azodicarboxylate (DIAD, **120**), et de l'azoture de diphenylphosphoryle (DPPA, **121**) à température ambiante pendant 48 h. Ainsi, nous avons obtenu l'azoture disubstitué **122** avec un rendement de 89 % (Schéma 34).

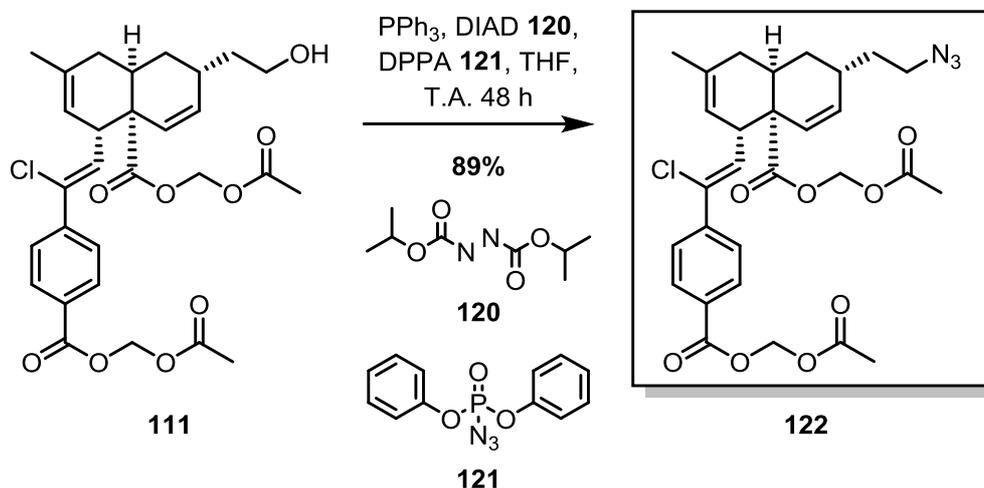


Schéma 34 Synthèse de l'azoture **122** à partir de l'alcool **111**

2. Essais de transformation de l'azoture **122** en amide **126**

L'azoture **122** a ensuite été engagé avec de l'acide *p*-chlorobenzoïque **123** dans une réaction de ligation de Staudingers-Vilarassa *one-pot* en présence de triméthylphosphine **124** et d'une quantité catalytique de 2,2'-dipyridyl disulfide **125** à température ambiante.¹⁰⁷ Toutefois, cette méthode n'a pas donné l'amide **126** souhaité mais seulement des produits de dégradation. Ceci peut s'expliquer par la difficulté à manipuler la triméthylphosphine **124** très sensible à l'air malgré toutes les précautions prises (Schéma 35).

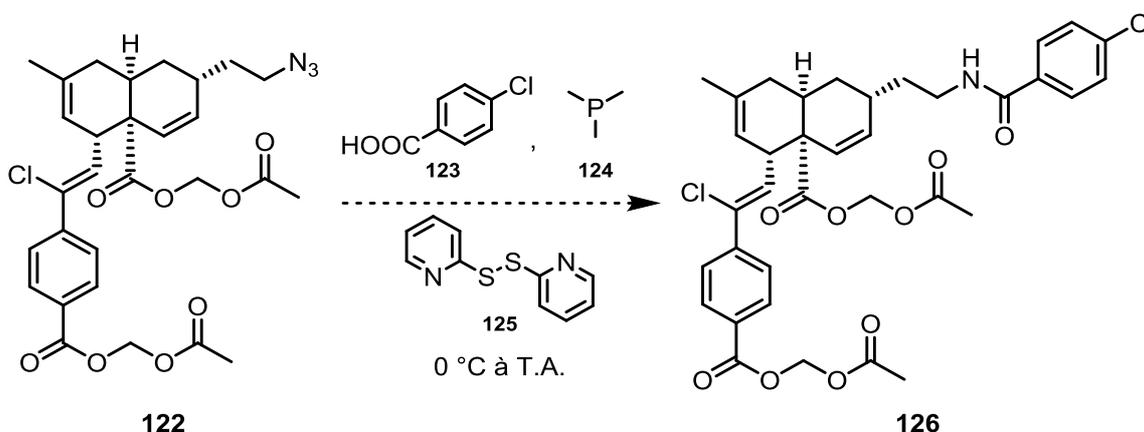


Schéma 35 Essai de transformation de l'azoture **122** en amide **126**

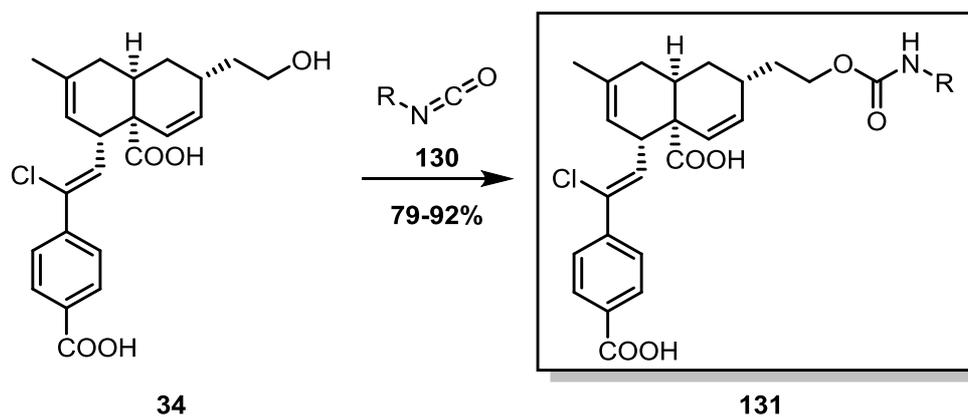


Schéma 37 Synthèse des carbamates **131** à partir de l'alcool **34**

Tableau 13 Bilan des carbamates **131** synthétisés

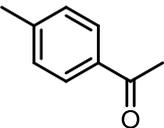
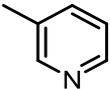
N° de molécule	131-1	131-2	131-3	131-4	131-5	131-6
R						
Rdt %	83 %	86 %	92 %	79 %	91 %	90 %

2. Activités biologiques sur protéines

L'activité biologique des carbamates **131-1** à **-6** a été évaluée par polarisation de fluorescence sur Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Les valeurs de $K_i \pm SD$ sont rapportées en μM dans le Tableau 14.

Tableau 14 Activités biologiques des carbamates **131** ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

N° de molécule	R	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
131-1		$3,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
131-2		$4,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$
131-3		$0,8 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,1$
131-4		$2,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,1$

131-5		$1,9 \pm 0,03$	$1,5 \pm 2,1$	$2,9 \pm 0,4$
131-6		$8,5 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,5$	>23

Les carbamates **131-1** à **-5** se sont révélés être des inhibiteurs multiples des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ils présentent une affinité de l'ordre du micromolaire (**131-1**, **-2** et **-5**) au sub-micromolaire (**131-3** et **-4**). Ces activités peuvent s'expliquer par la présence d'un atome d'halogène (chlore ou brome) ou d'un groupement acétyle en positions *meta* ou *para* du cycle aromatique de la chaîne latérale qui peuvent être à l'origine d'une interaction avec les protéines cibles. En effet, le dérivé pyridine **131-6**, non substitué sur le cycle aromatique est dix fois moins actif que les composés **131-1** à **-5**.

3. Etude de cytotoxicité du carbamate **131-3**

Une étude de cytotoxicité a été entreprise pour le carbamate le plus actif **131-3** grâce à une collaboration avec l'équipe de Joëlle Wiels de l'Institut Gustave Roussy, UMR 8126, spécialisé en oncogénèse et en résistance à l'apoptose des cellules de lymphôme. Ainsi, la valeur de CI_{50} et la spécificité de ce composé ont été déterminées *in vitro* sur des lignées de lymphôme qui surexpriment une ou plusieurs protéines de la famille Bcl-2, et dont le profil de dépendance aux protéines anti-apoptotiques a été préalablement déterminé.

Ainsi, le carbamate **131-3** a été testé sur 4 lignées cellulaires de lymphôme :

- Remb1 : une lignée lymphoblastoïde Bcl-xL-dépendante ;
- BL2 : une lignée de lymphôme de Burkitt Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante ;
- RS4;11 : une lignée de lymphôme Bcl-2-dépendante ;
- H929 : une lignée de lymphôme Mcl-1-dépendante.

Les résultats (rapportés dans la Figure 87) indiquent le pourcentage de mort par apoptose après 24 h des cellules non-traitées (contrôle négatif, en gris) et des cellules traitées par 10 μ M du composé **131-3** (en orange), déterminé par **FACS** (**F**luorescence-**A**ctivated **C**ell **S**orting ou le triage des cellules activées par fluorescence « TCAF »). Le carbamate **131-3**, actif au sub-micromolaire sur les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-2, n'induit pas de mort cellulaire par apoptose dans des lignées de lymphôme B surexprimant ces protéines. Il n'a donc pas d'effet cytotoxique *in cellulo* malgré son activité inhibitrice *in vitro*. Ceci peut s'expliquer par la présence des deux groupements acides carboxyliques en positions 10 et 6' qui rendent la molécule chargée au pH physiologique ce qui pourrait l'empêcher de pénétrer la membrane cytoplasmique de la cellule cible.

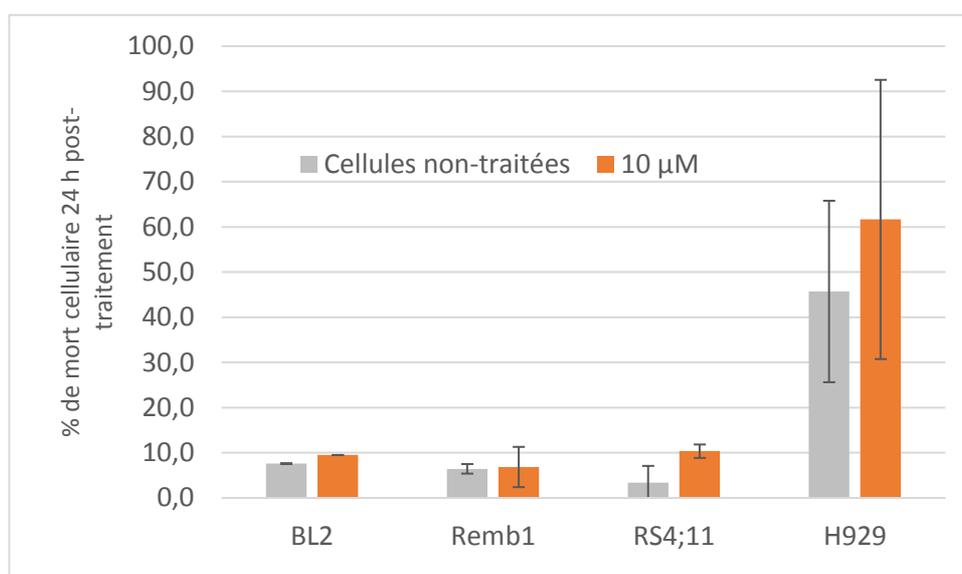


Figure 87 Etude de cytotoxicité du composé **131-3** à 10 μ M (mesuré par FACS)

Afin de faciliter la pénétration membranaire du carbamate **131-3**, nous avons masqué les groupements acides carboxyliques en positions 10 et 6' sous forme d'esters acyloxyméthyles suivant l'approche décrit précédemment. Ainsi, nous avons obtenu de manière quantitative une prodrogue **132** moins polaire que **131-3** et qui a plus de chances de pénétrer la membrane cellulaire. Cette prodrogue **132** inactive *in vitro* devrait subir une hydrolyse *in cellulo* par des estérases non-spécifiques pour redonner l'analogue diacide **131-3** actif (Schéma 38).

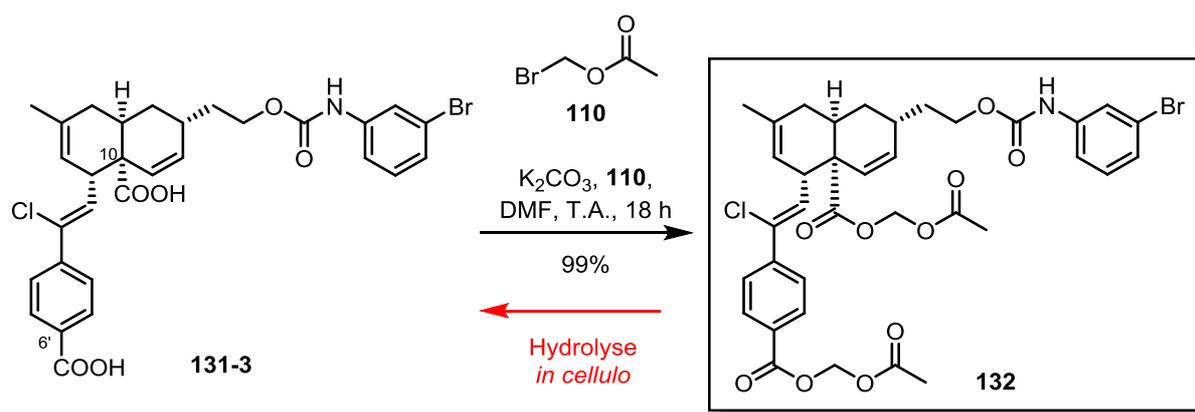


Schéma 38 Protection des fonctions acides carboxyliques du carbamate **131-3** sous forme d'esters acyloxyméthyles

La prodrogue **132** a été testée sur les mêmes lignées de lymphôme : Remb1, BL2, RS4;11 et H929 (Figure 88 : cellules non-traitées (en vert), cellules traitées à 10 μM du composé diacide **131-3** (en bleu), et cellules traitées à 10 μM de la prodrogue **132** (en jaune)). Cependant, la prodrogue **132** n'induit pas plus de mort cellulaire par apoptose que le dérivé diacide **131-3** (ce dernier étant même légèrement plus cytotoxique sur la lignée Bcl-2-dépendante H929) et dans tous les cas, le pourcentage de mort cellulaire ne dépasse 40 %.

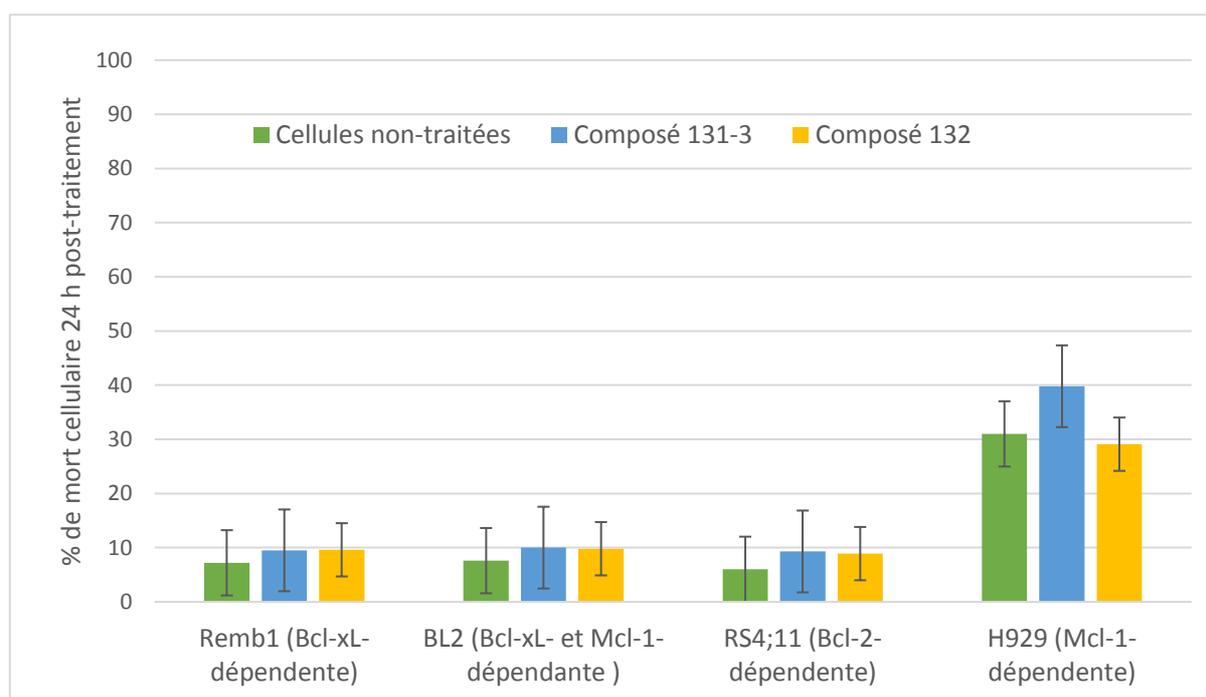


Figure 88 Etude de cytotoxicité des composés **131-3** et **132** à 10 μM (mesuré par FACS)

4. Conclusion

En conclusion, nous avons préparé 6 carbamates fonctionnalisés **131** en une étape à partir du précurseur alcool **37** et de différents isocyanates avec des très bons rendements. Ces carbamates **131** sont très actifs, de l'ordre du micromolaire au submicromolaire sur les trois protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Le carbamate le plus actif **131-3** a été converti en prodrogue **132** pour une étude de cytotoxicité sur des lignées de lymphôme B.

Cependant, cet analogue n'a montré aucune cytotoxicité à 10 μM à 24 h sur les lignées testées. Une augmentation du temps d'incubation (48 h ou 72 h) et/ou de la concentration en composé ($> 10 \mu\text{M}$) sont à étudier pour des résultats plus concluants.

I- Synthèse des triazoles 76 et 79

Nous avons par la suite entrepris la synthèse de composés possédant un lien triazole par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre (I) aussi connue sous l'acronyme CuAAC (*copper(I)-catalyzed azide-alkyne*). Cette réaction permet la formation d'un triazole par une réaction de cycloaddition entre une première molécule portant un alcyne et une seconde portant un groupement azoture. Découverte en 1963 par R. Huisgen, cette réaction a été initialement décrite comme étant lente et générant un mélange de régioisomères disubstitués en 1,4 et en 1,5 lorsqu'elle est réalisée à plus de 100 °C. En 2002, M. Meldal puis K. B. Sharpless ont montré qu'en présence d'une quantité catalytique de sels de cuivre (I), le composé 1,4 est formé de façon régiosélective à température ambiante selon le mécanisme décrit ci-dessous (Schéma 39).¹¹⁰ La formation d'un complexe π -alcyne avec un sel de Cu(I), obtenu par réduction du Cu(II) par l'ascorbate de sodium, conduit à un acétylénure de cuivre. Ce dernier réagit avec l'azoture pour former un métallacycle à 6 atomes, stabilisé par un atome de cuivre. Ensuite, une contraction de cycle conduisant à un dérivé triazole-cuivre est suivie d'une protonolyse qui donne le triazole et le Cu(I) est régénéré. Cette réaction représente désormais une approche classique et incontournable dans la conception de nouvelles biomolécules ou de molécules à visée thérapeutique. Lorsque le couplage se fait avec des ligands marqués, cette approche permet la détection, la localisation précise et la qualification de biomolécules *in cellulo*.¹¹¹⁻¹¹²

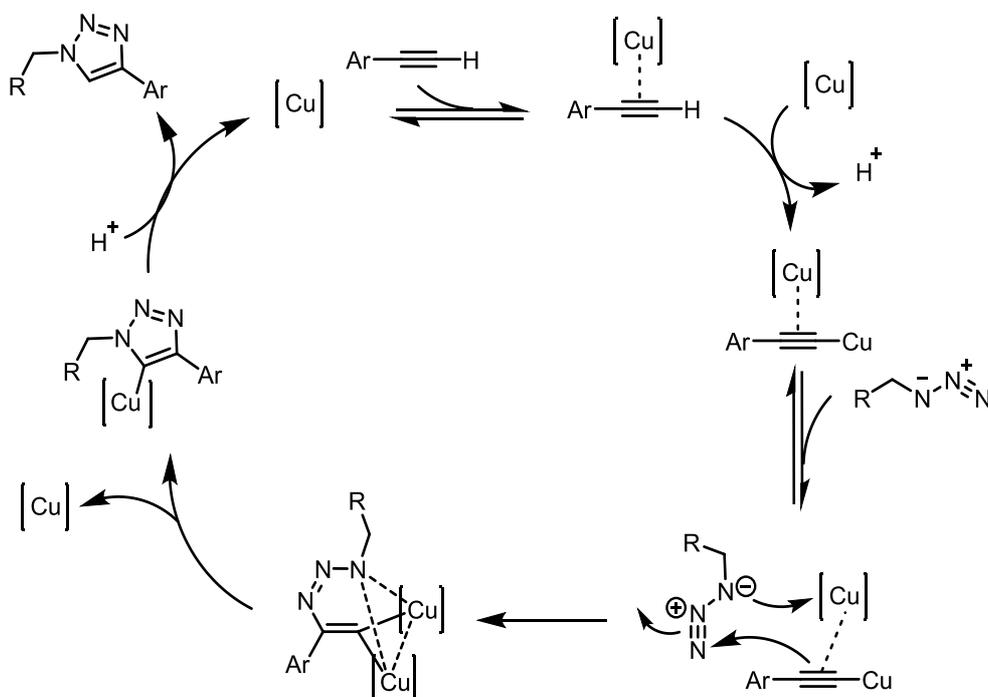


Schéma 39 Mécanisme de la réaction de click¹¹²

Deux séries de composés ont été envisagées par cette approche (Figure 89) :

- des triazoles **76** accessibles à partir de l'alcyne **86** provenant de l'aldéhyde **87** ;
- des triazoles **79** accessibles à partir de l'azoture **118** provenant de l'alcool **99**.

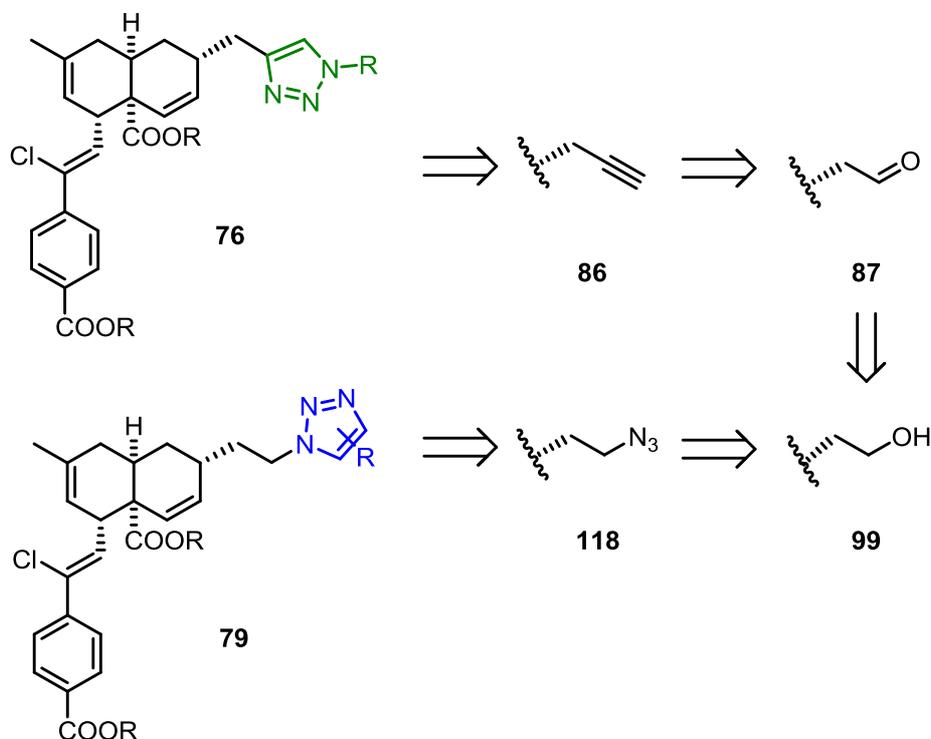


Figure 89 Analyse rétrosynthétique des triazoles envisagés

1. Synthèse du dérivé alcyne **86**

L'alcool diprotégé **111** a été oxydé en aldéhyde **133** de manière quantitative en utilisant du Dess-Martin periodinane (DMP **90**) à 40 °C dans le dichlorométhane pendant 16 h. L'alcyne a ensuite été obtenu suivant la procédure d'Ohira-Bestmann avec du diméthyl-1-diazo-2-oxopropylphosphonate **94** dans le méthanol.⁹⁵⁻⁹⁶ Cependant, les groupements esters acyloxyméthyles n'ont pas résistés à ces conditions expérimentales, et nous avons isolé exclusivement le dérivé alcyne diacide **134** (Schéma 40). Ce composé s'est montré très instable, notamment lors de la purification sur gel de silice. Cette voie de synthèse vers les triazoles **76** a dû être abandonnée, et nous nous sommes tournés vers les triazoles **79** accessibles à partir de l'azoture **118** provenant de l'alcool **99**.

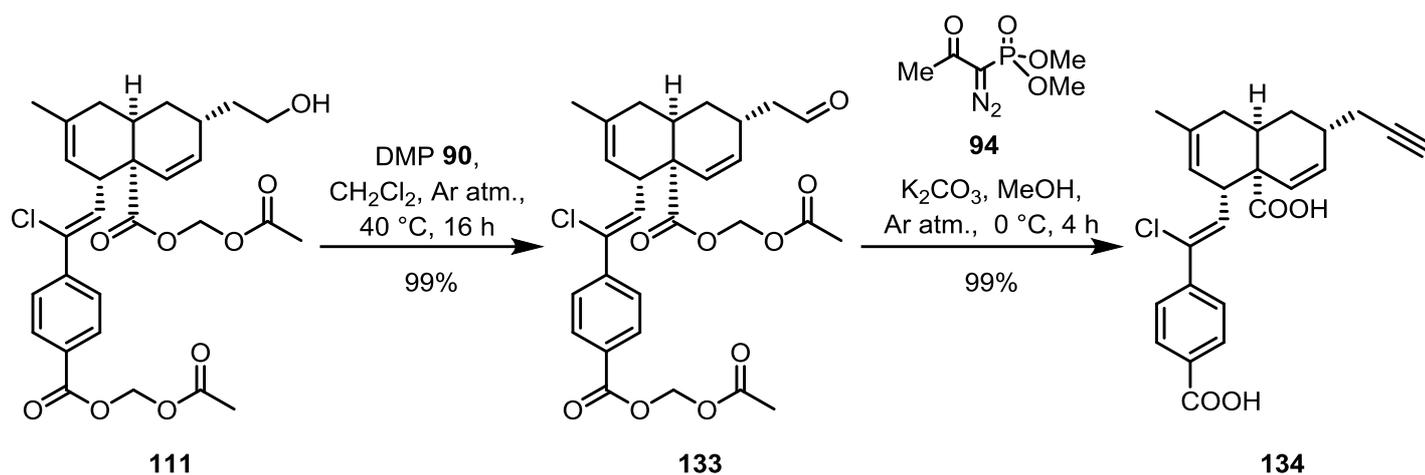


Schéma 40 Essais de synthèse du dérivé alcyne **134**

2. Synthèse des triazoles **79**

L'azoture **122**, dont la synthèse avait préalablement été mise au point pour accéder aux composés amides **74**, a été mis en réaction avec des alcynes fonctionnalisés **135** en présence d'une quantité catalytique du sulfate de cuivre pentahydrate $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et d'acide benzoïque dans un mélange *tert*-butanol/eau 2:1 à 60 °C pendant 24 h (Schéma 41).¹¹³

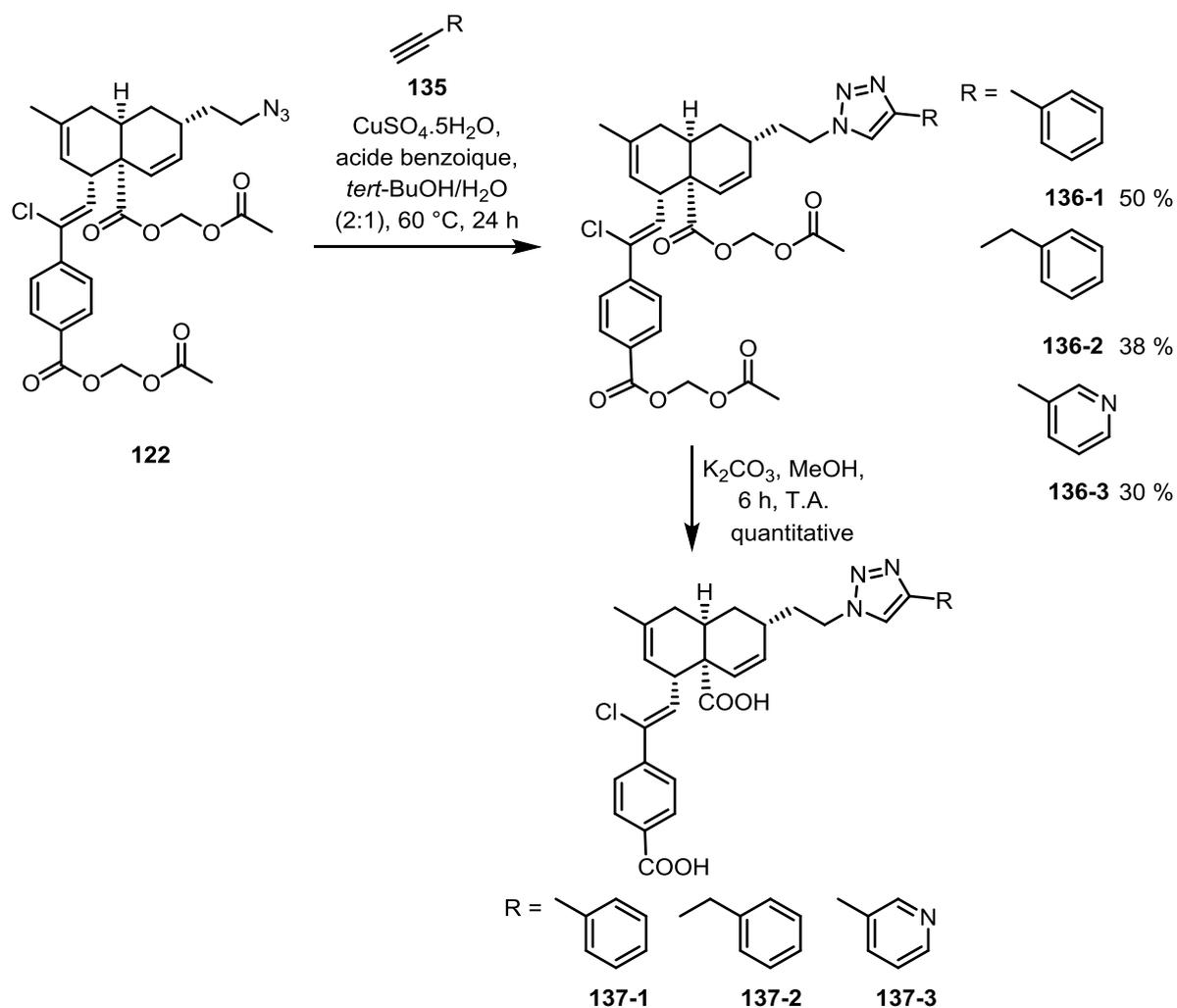


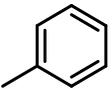
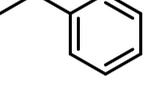
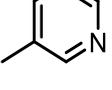
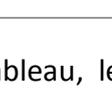
Schéma 41 Synthèse des triazoles **136** et **137**

Les groupements protecteurs acyloxyméthyles ont résisté à ces conditions expérimentales mais le taux de conversion a varié selon la nature de l'alcyne utilisé, et donc sa réactivité : la réaction est totale avec le phénylacétylène, alors que du produit de départ est récupéré avec le 3-phényl-1-propyne ou l'éthynylpyridine même utilisés en excès. Par ailleurs, les rendements modérés observés (30-50 %) sont principalement liés à des problèmes lors de la purification sur gel de silice. Les triazoles disubstitués **136** ont subi ensuite une hydrolyse en milieu basique dans le méthanol à température ambiante. Ceci a permis d'obtenir de manière quantitative les analogues diacides correspondants **137** (Schéma 41).

a) *Activités biologiques des triazoles **136** et **137** sur protéines*

L'activité biologique des triazoles **136-1** à **-3** et **137-1** à **3** a été évaluée par polarisation de fluorescence sur Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Les valeurs de $K_i \pm \text{SD}$ sont rapportées en μM dans le Tableau 15.

Tableau 15 Activités biologiques des triazoles **136** et **137** ($K_i \pm SD$ rapportées en μM)

N° de molécule	R	Bcl-xL/Bak	Mcl-1/Bid	Bcl-2/Bim
136-1		16,5 ± 1,9	13,7 ± 5,0	2,5 ± 0,2
137-1		2,4 ± 0,02	0,5 ± 0,04	1,5 ± 0,4
136-2		>23	>23	>23
137-2		>23	2,1 ± 0,3	2,2 ± 1,1
136-3		>23	>23	>23
137-3		>23	>23	>23

Comme le montre le tableau, les di-esters **139** sont globalement inactifs sauf le composé **136-1**. D'autre part, le triazole **137-1** est un inhibiteur multiple des trois interactions testées : Bcl-xL/Bak, Mcl-1/Bid et Bcl-2/Bim avec une affinité de l'ordre de sub-micromolaire pour la protéine anti-apoptotique Mcl-1. D'autre part, le triazole **137-2** est un inhibiteur dual des protéines Mcl-1 et Bcl-2. Le décalage du cycle aromatique d'un cran sur la chaîne latérale du composé **137-2** a donc abouti à une perte d'affinité pour la protéine Bcl-xL. Par ailleurs, le remplacement du cycle benzénique par un cycle pyridine (composé **137-3**) abouti à une perte totale d'affinité sur les trois protéines cibles.

b) Etude de cytotoxicité du triazole

Une étude de cytotoxicité a été réalisée par l'équipe de Joëlle Wiels pour la prodrogue triazole **136-1** et son précurseur diacide **137-1** dont l'activité biologique sur les trois protéines était la plus intéressante. Comme pour la série carbamate, la prodrogue **136-1** a été testée sur les 4 lignées cellulaires de lymphôme qui surexpriment une ou plusieurs protéines de la famille Bcl-2 : Remb1, BL2, RS4;11 et H929. Les résultats rapportés dans la Figure 91 correspondent au pourcentage de mort par apoptose déterminé par FACS après un traitement de 24 h (en vert : contrôle négatif, en bleu : cellules traitées avec 10 μM du triazole diacide **137-1**, en jaune : cellules traitées avec 10 μM de la prodrogue **136-1**).

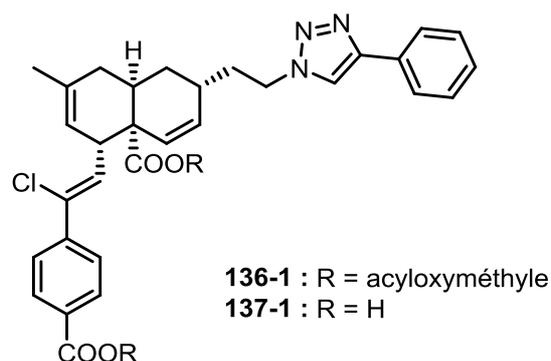


Figure 90 Structure de la prodrogue **136-1** et son précurseur diacide **137-1**

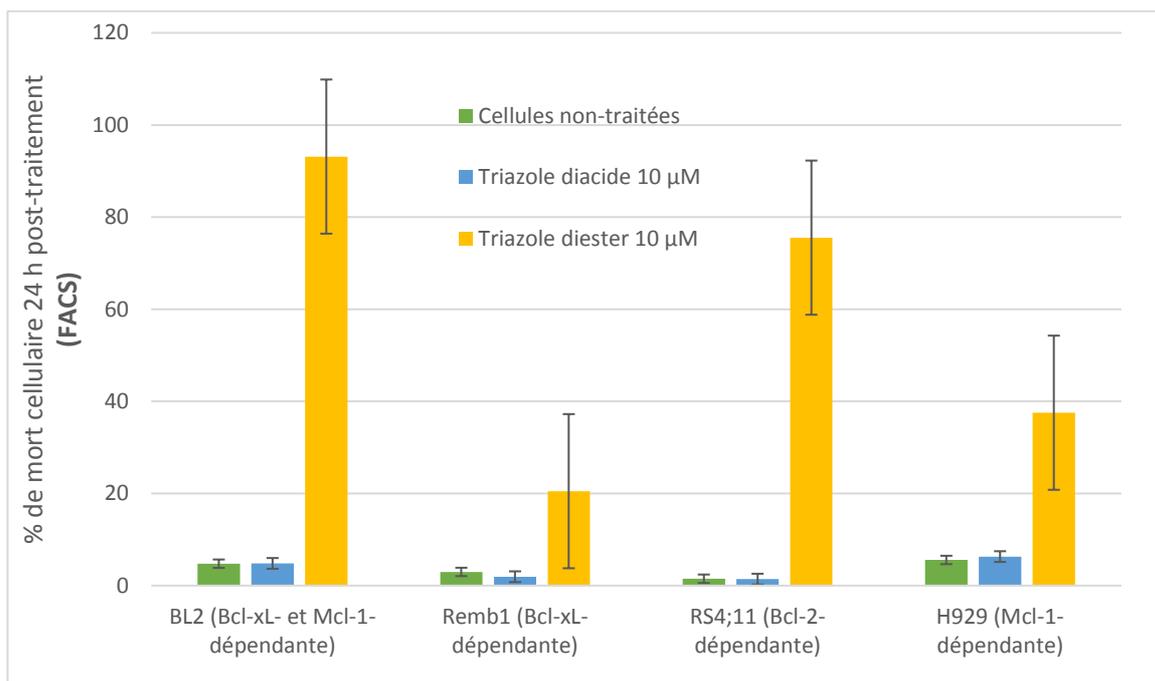


Figure 91 Etude de cytotoxicité du composé **136-1** et son précurseur diacide **137-1** (mesuré par FACS)

Le triazole diacide **137-1** n'a aucun effet cytotoxique à 10 μM sur les quatre lignées cellulaires testées. En revanche, la prodrogue **136-1** induit, à 10 μM, une mort cellulaire par apoptose dans 92 % des cellules de la lignée Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante BL2. Un effet similaire est observé à cette même concentration sur 77 % des cellules de la lignée Bcl-2-dépendante RS4 ;11. En revanche, ce composé a un effet plus modéré sur la lignée Mcl-1-dépendante H929 et est inactif sur la lignée Bcl-xL-dépendante Remb1.

Ces résultats ont été confirmés par un test colorimétrique qui utilise le sel de tétrazolium MTT pour mesurer l'activité enzymatique cellulaire, et donc estimer le nombre de cellules vivantes actives. La CI_{50} du composé **136-1** est de 9,4 μM pour la lignée BL2 (Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante), 9,6 μM pour la lignée H929 (Mcl-1-dépendante), 12 μM pour la lignée RS4 ;11 (Bcl-2-dépendante) et est inactive sur la lignée Remb1 (Bcl-xL-dépendante) (Figure 92).

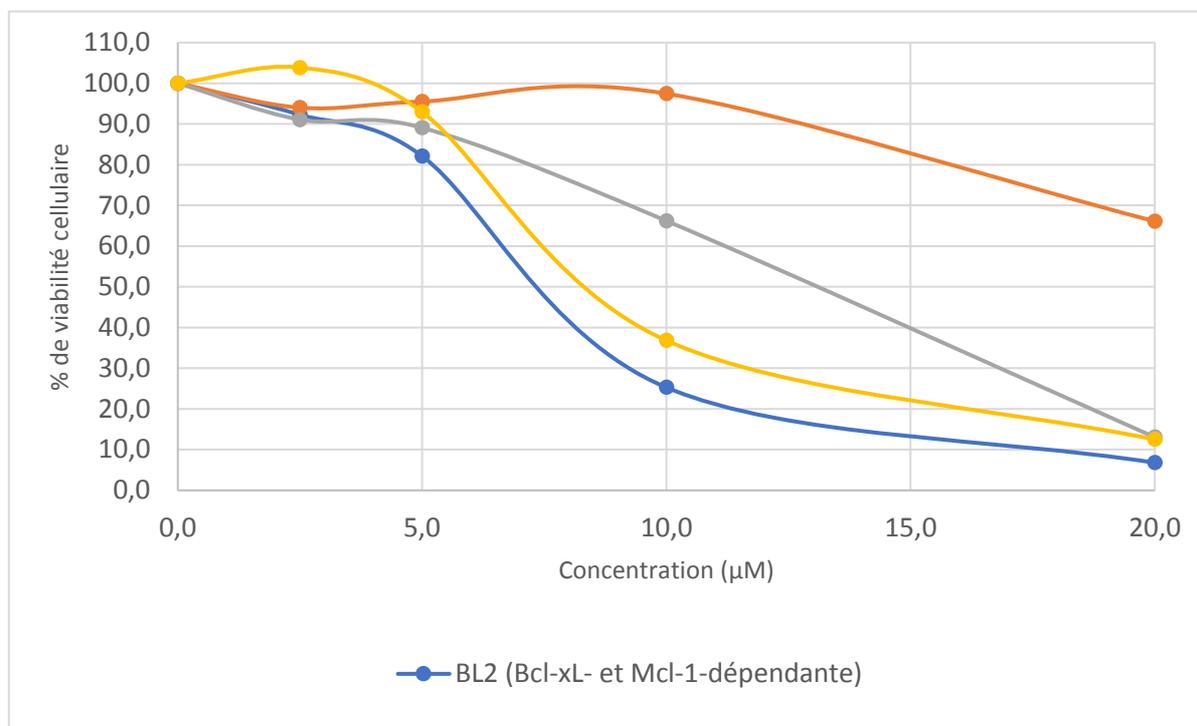


Figure 92 Etude de cytotoxicité du composé **136-1** pendant 24 h (mesuré par MTT)

De plus, l'effet cytotoxique du composé **136-1** sur la lignée BL2 est comparable à celles des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 l'ABT-737 **01** et l'ABT-199 **03**. Il est donc un bon promoteur d'apoptose (Tableau 16).

Tableau 16 Comparaison de l'effet cytotoxique du triazole **136-1** par rapport à l'ABT-737 et -199

Composé	CI_{50} (μM)			
	BL2	Remb1	RS4 ;11	H929
136-1	9,4	> 20	12	9,6
ABT-737	> 10	1,4	0,33	ND
ABT-199	> 10	5,5	0,33	ND

Une étude de cinétique de l'action du composé **136-1** a été entreprise sur une période de 48 h par la technique du FACS. Alors que ce triazole n'a pas d'effet cytotoxique au bout de 5 h sur les 4 lignées de lymphôme B étudiées, l'augmentation du temps d'incubation à 48 h

entraîne une légère amélioration de pourcentage de mort cellulaire par apoptose dans les lignées BL2 et H929 par rapport à leurs valeurs respectives à 24 h (de 94 à 97 % pour BL2, et de 58 à 72 % pour H929). En revanche, le temps d'incubation n'a pas d'effet significatif sur les lignées Remb1 et RS4;11 (Figure 93).

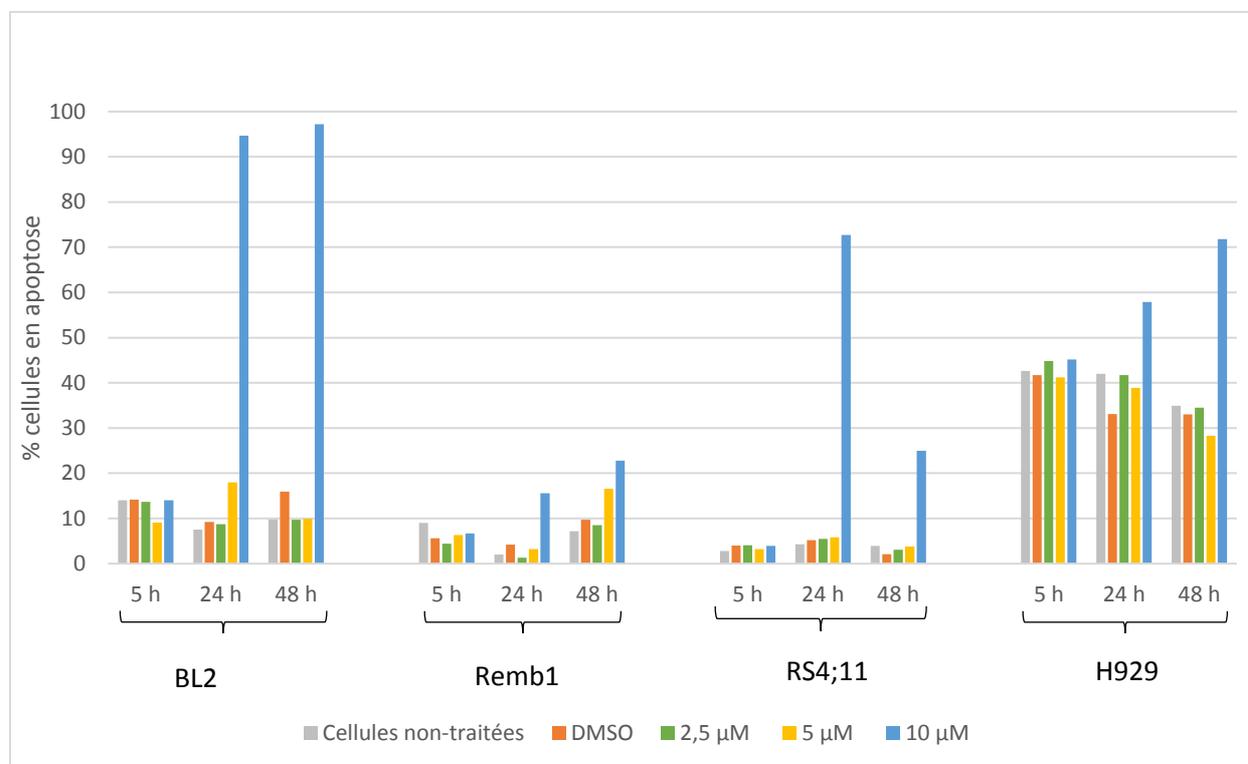


Figure 93 Etude de cinétique du composé **136-1** sur une période de 48 h (mesuré par FACS)

En conclusion, le composé **136-1** est cytotoxique pour les lignées BL2 (Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante), H929 (Mcl-1-dépendante) et RS4;11 (Bcl-2-dépendante). Comme elle est très peu active elle-même sur les protéines de la famille de Bcl-2, il est probable que *in cellulo*, les deux fonctions esters soient hydrolysées pour libérer le diacide **137-1** actif au sub-micromolaire. Les essais de cytotoxicité semblent montrer que ce composé cible les lignées qui sur-expriment Mcl-1 et Bcl-2. C'est donc, *in cellulo*, un inhibiteur dual.

V- Etude de cytotoxicité de la meiogynine A **29**

Comme nous l'avons présenté en introduction, la meiogynine A **29** n'est pas cytotoxique *in cellulo* malgré son activité inhibitrice *in vitro* des protéines Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1.¹ Par analogie avec les résultats précédents, nous avons voulu déterminer si la protection des groupements acides carboxyliques en positions 10 et 6' sous forme d'esters acyloxyméthyles conduisait à une prodrogue cytotoxique **138** (Schéma 42). Cette prodrogue **138** a été testée sur les lignées de lymphôme (Remb1, BL2, RS4;11 et H929) sans résultat : la prodrogue de la meiogynine A n'est pas active.

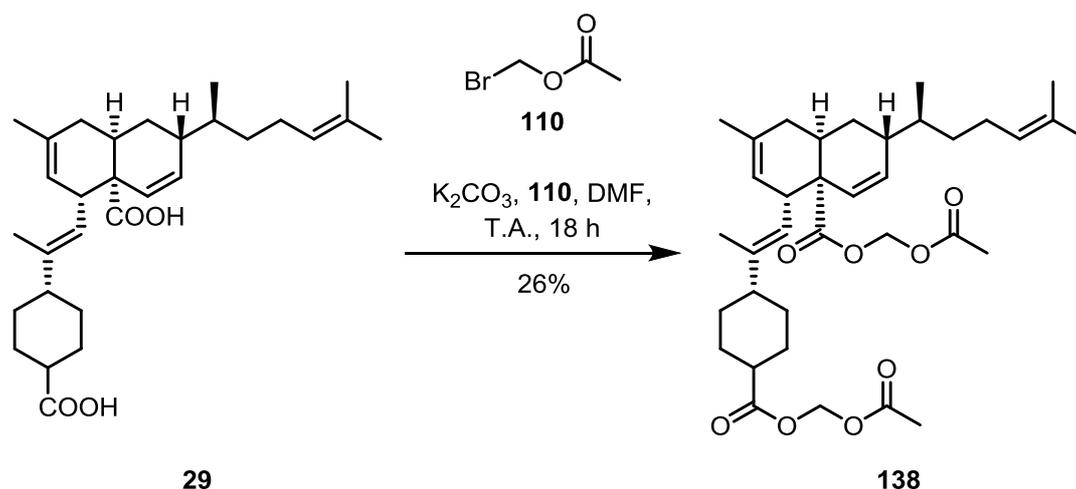


Schéma 42 Protection des fonctions acides carboxyliques de la meioygnine A **29** sous forme d'esters acyloxyméthyles

VI-Conclusion

Nous avons élaboré des analogues de 3^{ème} génération de la meioygnine A **29**, un triterpène dimère naturel qui possède une activité inhibitrice des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Dans un premier temps, plusieurs étapes de la synthèse d'un intermédiaire commun à ces analogues ont dû être optimisées pour permettre l'élaboration de 2,5 g de ce précurseur diacide alcool **37**.

Dans un second temps, plusieurs pharmacomodulations ont été effectuées sur la chaîne latérale afin de substituer la fonction ester des analogues de 2^{ème} génération par un groupement plus stable et plus résistant *in cellulo*.

En série amide, 12 composés fonctionnalisés **115** ont été préparés par couplage peptidique à partir du précurseur commun. Parmi ces amides, le composé **108-6** est un inhibiteur sélectif de Mcl-1 dont l'affinité est de l'ordre de sub-micromolaire. Par ailleurs, le composé **109-1** est un inhibiteur multiple des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les carbamates, quant à eux, se sont montrés plus actifs sur les trois protéines cibles que les amides. Afin de faciliter la pénétration membranaire lors de l'étude de cytotoxicité, le carbamate le plus actif **131-3** a été transformé en prodrogue plus lipophile **132**. Cependant, cet analogue ne s'est pas révélé cytotoxique sur les lignées testées dans les conditions expérimentales utilisées.

En série triazole, le composé **140-1** est un inhibiteur multiple des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-2 dont l'affinité est sub-micromolaire pour la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Une étude de cytotoxicité effectuée sur sa prodrogue **139-1** a montré qu'elle a une activité cytotoxique de l'ordre du 10 μM sur les lignées BL2 (Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante), H929 (Mcl-21-dépendante) et RS4;11 (Bcl-2-dépendante). Vu les affinités de sa forme libre **139-1** pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1, ce composé semble *in cellulo* être un inhibiteur dual de ces protéines. De plus, ses propriétés cytotoxiques sur la

lignée BL2 est comparable à celles des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 l'ABT-737 **01** et l'ABT-199 **03**.

Enfin, nous avons montré l'importance du groupe acyloxyméthyle non seulement d'un point de vu biologique mais aussi chimique. En effet, ce groupement volumineux rend la molécule plus hydrophobe avec une charge globale neutre ; lui donnant plus de chance pour pénétrer la membrane cytoplasmique de la cellule cible. De plus, la formation d'esters d'acyloxyméthyle a permis de résoudre les problèmes liés à la déprotection des fonctions acides carboxyliques, du fait d'une meilleure accessibilité *vis à vis* des bases.

Conclusion Générale

VII- Conclusion générale

Le dérèglement de l'apoptose dans de nombreux cancers fait de cette voie et des protéines de la famille Bcl-2 des cibles prometteuses pour la thérapie anti-cancéreuse. Le développement de petites molécules ciblant les protéines de la famille Bcl-2 s'est révélé être un grand défi. Cependant, depuis une quinzaine d'année, grâce à des approches variées et souvent innovantes, des composés très actifs ont été développés. Plusieurs composés sont actuellement en essais cliniques et une molécule, le venetoclax, a obtenu la première autorisation de mise sur le marché en avril 2016. Ce succès thérapeutique démontre que les protéines de la famille de Bcl-2 sont des cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse.

La majorité des inhibiteurs en cours de développement sont sélectifs d'une protéine anti-apoptotique de cette famille et de nombreux cas de résistance liés à la surexpression de protéines anti-apoptotiques non ciblées ont été rapportés dans la littérature. C'est pourquoi, il semble prometteur de trouver des inhibiteurs multiples possédant une très bonne affinité sur plusieurs protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, notamment, Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 ou d'envisager d'associer deux inhibiteurs sélectifs dans un même traitement.

Les substances naturelles sont une source importante de nouvelles molécules à structures originales, et de nombreuses petites molécules utilisées actuellement en chimiothérapie sont d'origine naturelle. La meiogynine A **29** est un inhibiteur dual des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 qui a été isolé et synthétisé dans notre équipe. Des analogues de première et de deuxième génération ont été élaborés par la suite. Certains d'entre eux présentent une activité duale sub-micromolaire. Contrairement aux analogues de première génération, ces composés ne sont cependant pas cytotoxiques, probablement en raison de la présence d'une fonction ester sur la chaîne latérale qui peut s'hydrolyser en un métabolite inactif.

Ainsi, mon projet de thèse a visé à développer des inhibiteurs multiples, duals ou sélectifs des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 et cytotoxiques sur des lignées cellulaires sur exprimant ces mêmes protéines.

Deux essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1 sont déjà mis en place et robotisés à l'ICSN. La protéine Bcl-2 est considérée comme une cible potentielle pour le développement de nouveaux anticancéreux étant donné qu'elle est surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses et impliquée dans la résistance à la chimiothérapie. De ce fait, nous avons mis en place dans l'institut un troisième test d'inhibition par polarisation de fluorescence sur cette nouvelle cible.

A l'aide de ce nouveau test, nous avons déterminé avec précision et une bonne reproductibilité les affinités des produits issus de l'extraction de plantes (les dérivés du drimane et les kingianines), ainsi que celles des petites molécules issues de la synthèse organique (les analogues de la fissionine et ceux de la meiogynine A **29**). La meiogynine A **29**

ainsi que ses analogues testés sont des inhibiteurs multiples des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. De plus, la majorité des analogues de deuxième génération présentent une meilleure affinité pour les trois protéines anti-apoptotiques que la meiogynine A **29**.

Nous avons entrepris ensuite l'élaboration d'analogues de troisième génération de la meiogynine A **29**. Pour cela, certaines étapes dans la voie de synthèse des analogues de deuxième génération ont été optimisées pour permettre l'accès à un précurseur commun **39** à l'échelle de plusieurs grammes par une synthèse asymétrique convergente, multi-étape et bioinspirée. Ce précurseur a été isolé avec un rendement global de 47 % sur 9 étapes linéaires.

Plusieurs pharmacomodulations ont été envisagées sur la chaîne latérale afin de substituer la fonction ester des analogues de deuxième génération par un groupement plus stables et plus résistants *in cellulo*. Parmi celles-ci, nous avons réussi à élaborer des amines, des amides, des carbamates et des triazoles. En outre, nous avons montré l'intérêt du groupe acyloxyméthyle comme groupement protecteur des deux fonctions acides à la fois en synthèse mais aussi *in cellulo*.

Ainsi, une étude de cytotoxicité a montré que le composé triazole diester **136-1** est cytotoxique à 10 μ M pour les lignées BL2 (Mcl-1-dépendante), H929 (Bcl-2-dépendante) et RS4;11 (Bcl-xL- et Mcl-1-dépendante). Ce composé est une prodrogue de l'analogue diacide **137-1** (non cytotoxique) mais inhibiteur dual de Bcl-2 et Mcl-1. La cytotoxicité de cette molécule est comparable à celle des inhibiteurs connus des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Des pharmacomodulations sont envisagées sur la chaîne latérale du triazole **136-1** afin d'ajouter un troisième cycle aromatique qui pourrait être lié à la molécule par un lien carbamate, amide, sulfonamide, ... etc, comme illustré dans la Figure 94.

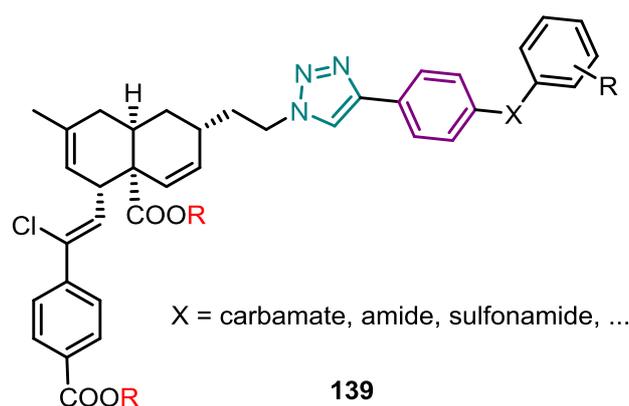


Figure 94 Les différentes possibilités de fonctionnalisation du triazole **136-1**

L'évaluation biologique des synthétisés par une deuxième technique telle que la SPA est également envisageable afin de confirmer les activités obtenues par polarisation de fluorescence. En outre, une étude de l'interaction ligand-protéine par RMN est en cours pour le triazole **137-1** et la protéine Mcl-1. Celle-ci permettra de déterminer les acides aminés de

la protéine cible impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur pour éventuellement affiner notre analyse des relations structure-activité. Par ailleurs, la réalisation de la réaction de click avec des ligands fluorescents est envisagée (Figure 95) afin d'étudier la localisation précise de ces inhibiteurs *in cellulo*.

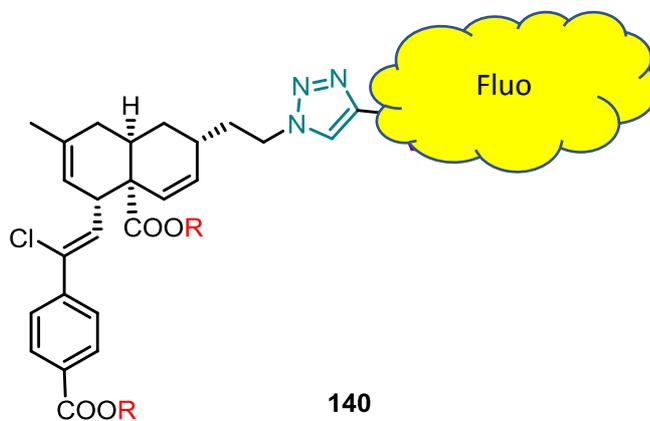


Figure 95 Structure du ligand triazole fluorescent

Partie Expérimentale

VIII- Partie Expérimentale

Protocole du test biologique

On détermine la CI_{50} en quadruplicate (c'est-à-dire, la concentration à laquelle 50 % de l'efficacité de la protéine est inhibée) qui permettra de calculer la constante d'inhibition (K_i).



Précautions

- Travailler en conditions le plus stérilement possible (*i.e.* laver la paillasse, les propipettes, les contenants à l'éthanol, utiliser des gants) en faisant attention aux contaminations externes telles que la salive.
- Les pesées doivent être réalisées sur une balance très précise pour minimiser les erreurs.
- Vérifier que les protéines ne précipitent pas en décongelant.
- Calculer le nombre précis d'aliquotes nécessaires à la manipulation.
- Inscrire sur la fiche d'état des stocks le nombre d'aliquotes restants.
- Indiquer à l'aide d'une étiquette sur chacune des plaques utilisées la date, vos initiales, votre référence, criblage ou IC_{50} et Bcl-xL, Mcl-1 ou Bcl2.

Présentation du matériel et des solutions

Produits et matériels	Localisation
<ul style="list-style-type: none"> • Na₂HPO₄ (Sigma, S0876-500g) • NaCl (Sigma, S9625-1Kg) 	Placard de la Ciblothèque
<ul style="list-style-type: none"> • EDTA 1 mM (Sigma, E7889-100 mL) préparée le 21/04/11 par Vincent Dumontet • HCl 1 N préparée le 21/04/11 par Vincent Dumontet • Acide pluronique F-68 à 10 % (Sigma, P5556) • Eppendorf 0,5 et 1,5 mL • Feuilles adhésifs en aluminium • Filtre millipore 0,2 µM • Ruban adhésif pour autoclavage 	Placard de la Ciblothèque
<ul style="list-style-type: none"> • Plaques 384 puits à fond noir (= plaque test) • Plaques 96 puits transparentes (= plaque transfert) • Tube Falcon 15 et 50 mL transparents • Robot X96 (Beckman-Coulter) 	Ciblothèque Réserver les robots à l'avance sur http://resa.icsn.cnrs-gif.fr/
<ul style="list-style-type: none"> • Propipettes (que pour les tests biologiques et ne pas les laisser à trainer) 	Ciblothèque
<ul style="list-style-type: none"> • DMSO pur • Cônes • Eau autoclavée • Bouteille Schott 1 L • Bouteilles Schott 250 mL • Tube Falcon 50 mL opaque/transparent 	Ciblothèque
<p>Ligands de référence :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL → Bak-WT H-G-16-R-OH (GenePep) • Mcl-1 → Bid-WT H-E-20-R-OH (GenePep) • Bcl-2 → Bim-WT H-Ahx-D-25-R-OH (GenePep) <p>Ligands fluorescents :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL → Bak-CF FITC-Ahx-G-16-R-OH (GenePep) • Mcl-1 → Bid-CF 5-FAM-M-20-A-OH (PolyPeptide Group) • Bcl-2 → Bim-CF FITC-Ahx-D-25-R-OH (GenePep) 	Congélateur – 20 °C, labo de chimie 215, tiroir du bas

Protéines à X μM x 100 μL <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL 2012 production et purification par Nicolas Birlirakis (Eq. Guittet, ICSN) \rightarrow 13,8 μM • Mcl-1 2012 production et purification par Nicolas Birlirakis (Eq Guittet., ICSN) \rightarrow 15 μM • Bcl-2 2015 production et purification par Eric Jacquet \rightarrow 75 μM 	Congélateur - 80 °C, tiroir du milieu
<ul style="list-style-type: none"> • Lecteur de plaques en polarisation de fluorescence (SpectraMax® Paradigm®) 	Bât 27 Réserver le lecteur à l'avance sur http://resa.icsn.cnrs-gif.fr/

Méthodes

Préparation du tampon

- Préparer le tampon dans une bouteille (celles réservées pour les tests).
- Ajouter les produits dans l'ordre indiqué et bien solubiliser l'ensemble.
- Pour ajuster le pH, utiliser un agitateur magnétique, la mesure du pH est réalisée dans l'équipe Dubois, suivre le mode opératoire pour utiliser le pH-mètre.
- Le tampon peut être préparé à l'avance s'il n'a pas été acidifié. Il doit être stocké à 4 °C et au maximum 3 mois (bien indiquer la date de préparation sur la bouteille).

	1 L de tampon	500 mL de tampon	250 mL de tampon
Na₂HPO₄	2,84 g	1,42 g	0,71 g
NaCl	2,92 g	1,46 g	0,73 g
Eau autoclavée	qsp 1L	qsp 500 mL	qsp 250 mL
EDTA 1 mM	2 mL	1 mL	0,5 mL
HCl 1N	qsp pH 7,4	qsp pH 7,4	qsp pH 7,4
Filtrer sur filtre millipore (réutilisation du même filtre, quand trop friper le changer).			
Le tampon doit être acidifié à 0,05 % juste avant son utilisation.			
Acide pluronique F-68 à 10 %	500 μL	250 μL	125 μL

Protéines et peptides



Sortir les aliquotes de protéines, les réchauffer entre ses mains, les diluer puis les conserver dans la glace avec les ligands fluo et ligands de référence. Ne décongeler que la quantité nécessaire pour le test et ne pas utiliser le bain à ultrasons ou le vortex. Ci-dessous est la procédure de dilution pour une plaque de 384 puis :

Protéine ou peptide	Concentration de stockage	Facteur de dilution	Concentration de départ pour le test	Comment établir cette dilution
Bcl-xL	13,8 µM	1/52	267 nM	96,2 µL de la solution stock + 4903,8 µL du tampon
Mcl-1	15 µM	1/56	267 nM	89,3 µL de la solution stock + 4910,7 µL du tampon
Bcl-2	75 µM	1/281,25	267 nM	17,78 µL de la solution stock + 4982,22 µL du tampon
Bak-CF	100 µM	1/2500	40 nM	2 µL de la solution stock + 4998 µL du tampon
Bid-CF	100 µM	1/2500	40 nM	2 µL de la solution stock + 4998 µL du tampon
Bim-CF	100 µM	1/12500	8 nM	1 µL de la solution stock + 12 499 µL du tampon

Peptide	Concentration de stockage	Facteur de dilution	Concentration de départ pour le test	Comment établir cette dilution
Bak-WT	14,2 mM	1/35,5	400 µM	11,27 µL de la solution à 14,2 mM + 388,73 µL du DMSO 12 %
	400 µM	1/10	40 µM	40 µL de la solution à 400 µM + 360 µL du DMSO 14 %
	40 µM	1/2	20 µM	200 µL de la solution à 40 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	20 µM	1/5	4 µM	80 µL de la solution à 20 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	4 µM	1/2	2 µM	200 µL de la solution à 4 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	2 µM	1/5	0,4 µM	80 µL de la solution à 2 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	0,4 µM	1/10	0,04 µM	40 µL de la solution à 0,4 µM + 360 µL du DMSO 14 %

Peptide	Concentration de stockage	Facteur de dilution	Concentration de départ pour le test	Comment établir cette dilution
Bid-WT	10 mM	1/25	400 µM	16 µL de la solution à 10 mM + 384 µL du DMSO 12 %
	400 µM	1/10	40 µM	40 µL de la solution à 400 µM + 360 µL du DMSO 14 %
	40 µM	1/2	20 µM	200 µL de la solution à 40 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	20 µM	1/5	4 µM	80 µL de la solution à 20 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	4 µM	1/2	2 µM	200 µL de la solution à 4 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	2 µM	1/5	0,4 µM	80 µL de la solution à 2 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	0,4 µM	1/10	0,04 µM	40 µL de la solution à 0,4 µM + 360 µL du DMSO 14 %

Peptide	Concentration de stockage	Facteur de dilution	Concentration de départ pour le test	Comment établir cette dilution
Bim-WT	3,1 mM	1/77,5	40 µM	5,2 µL de la solution à 3,1 mM + 394,8 µL du DMSO 12 %
	40 µM	1/10	4 µM	40 µL de la solution à 40 µM + 360 µL du DMSO 14 %
	4 µM	1/2	2 µM	200 µL de la solution à 4 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	2 µM	1/5	0,4 µM	80 µL de la solution à 2 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	0,4 µM	1/2	0,2 µM	200 µL de la solution à 0,4 µM + 200 µL du DMSO 14 %
	0,2 µM	1/5	0,04 µM	80 µL de la solution à 0,2 µM + 320 µL du DMSO 14 %
	0,04 µM	1/10	0,004 µM	40 µL de la solution à 0,04 µM + 360 µL du DMSO 14 %

Produits à tester

Dans la mesure où l'on ne connaît pas la solubilité des produits dans le DMSO 10 % dans le tampon acide, il est préférable de diluer les produits dans le maximum de DMSO puis d'ajouter le tampon. Ne pas oublier d'ajouter la référence Meigynine A (Mdl-17-3) dans chacune des plaques.

	Concentration de départ	Facteur de dilution	Concentration de départ pour le test	Comment établir cette dilution
Molécules à tester	10 mM	1/25	400 µM	10 µL de la solution à 10 mM + 12 µL du DMSO pur + 106 µL du tampon

Mise en route des robots

Réserver les robots à l'avance sur le site de réservation des appareils (appareils en commun).

X 96 → *Beckman-Coulter*

1. Allumer l'appareil → côté droit au fond
2. Allumer le compresseur → tourner le bouton noir sur I
2. Ouvrir le logiciel → Biomek Software
3. Ouvrir le projet → Project → open → Bcl-2
4. Calibrer l'appareil → Instrument → Home all axes

Le robot est prêt.

Pour chaque méthode utilisée : Mettre les bons éléments (plaques, boîtes de cônes, réservoirs) comme indiqué sur le « dock » (= plan).

Plan de plaque 384 puits criblage Bcl-2

Protocole Criblage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	Ligand-WT $10^{-9}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
C	Ligand-WT $10^{-8}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
E	Ligand-WT $5 \cdot 10^{-8}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
G	Ligand-WT $10^{-7}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
I	Ligand-WT $5 \cdot 10^{-7}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
K	Ligand-WT $10^{-5}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
M	BLigand-WT $10^{-5}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
O	BLigand-WT $10^{-5}M$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
A	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
C	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
E	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
G	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
I	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
K	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
M	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							
O	Blanc	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
		extrait 10µg/ml final																							

Tampon
 Ligand-CF 8nM
 Ligand-WT gamme
 Protéine 267 nM
 DMSO 14% dans tampon
 Extrait (40 µg/ml)
 Volume réactionnel par puits = 20 µL

Plan de plaque 384 puits Cl₅₀ Bcl-xL & Mcl-1

Protocole IC50		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	B	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc								
		10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁹ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
C	D	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc								
		10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
E	F	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO								
		5.10 ⁻⁷ M	5.10 ⁻⁷ M	5.10 ⁻⁷ M	5.10 ⁻⁷ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
G	H	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO								
		10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
I	J	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO								
		5.10 ⁻⁶ M	5.10 ⁻⁶ M	5.10 ⁻⁶ M	5.10 ⁻⁶ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
K	L	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	Ligand-WT	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO								
		10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
M	N	BI Ligand-	BI Ligand-	BI Ligand-	BI Ligand-	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc								
		WT 10 ⁻⁴ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75			
O	P	BI Ligand-	BI Ligand-	BI Ligand-	BI Ligand-	100µM	33,3µM	11,1µM	3,70µM	1,23µM	410nM	137nM	46nM	Ligand-CF	Ligand-CF	Ligand-CF	Ligand-CF								
		WT 10 ⁻⁴ M	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75			

Tampon
 Ligand-CF 8nM
 Ligand-WT gemme
 Protéine 267 nM
 DMSO 1,4% dans tampon
 Product (10 mM)
 Volume réactionnel par puits = 20 µL

Plan de plaque 384 puits CI₅₀ Bcl-2

Protocole IC50		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	B	Ligand-WT	10 ⁻⁹ M	Ligand-WT	10 ⁻⁹ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
C	D	Ligand-WT	10 ⁻⁸ M	Ligand-WT	10 ⁻⁸ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
E	F	Ligand-WT	5.10 ⁻⁸ M	Ligand-WT	5.10 ⁻⁸ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
G	H	Ligand-WT	10 ⁻⁷ M	Ligand-WT	10 ⁻⁷ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
I	J	Ligand-WT	5.10 ⁻⁷ M	Ligand-WT	5.10 ⁻⁷ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
K	L	Ligand-WT	10 ⁻⁶ M	Ligand-WT	10 ⁻⁶ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO	BIDMSO
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
M	N	BLigand-	WT 10 ⁻⁵ M	BLigand-	WT 10 ⁻⁵ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5
O	P	BLigand-	WT 10 ⁻⁵ M	BLigand-	WT 10 ⁻⁵ M	100µM	100µM	33,3µM	33,3µM	11,1µM	11,1µM	3,70µM	3,70µM	1,23µM	1,23µM	410nM	410nM	137nM	137nM	46nM	46nM	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc
		7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5	7,5	5,0	7,5

Tampon
 Ligand-CF 8nM
 Ligand-WT gamme
 Protéine 267 nM
 DMSO 14% dans tampon
 Produit (10 nM)
 Volume réactionnel par puits = 20 µL

- **Fermer la plaque** hermétiquement à l'aide d'un feuillet adhésif en aluminium

Lecture des résultats :

- Centrifuger avant lecture
- Faire attention en retirant le film aluminium afin qu'aucune goutte ne sorte des puits
- Exporter les données *via* les transferts publics, run → [\icsn](#)

Traitement des résultats :

- Les résultats sont récupérés sous format Excel
- Traitement des données → Cf. fichier Excel
- Valider le bon déroulement du test et détecter les molécules ou extraits qui interfèrent avec le test

General experimental procedures

Reactions were magnetically stirred. They were monitored by thin layer chromatography (TLC), with SDS 0.25 mm silica gel 60 F254, and by ^1H NMR. TLC plates were visualised by exposure to UV light ($\lambda = 254$ nm) and stained with potassium permanganate.

Solvents and chemicals

All reagents and solvents were used as purchased from commercial suppliers or were purified/dried according to W. L. F. Armarego and C. L. L. Chai (Purification of Laboratory Chemicals, 6th edition, Elsevier).

Purification

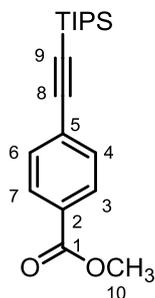
Purifications by column chromatography on silica gel were performed using Merck Silica Gel 60 (70-230 mesh) or Grace Silica Gel on Combiflash (Companion[®]) and purifications by preparative thin layer chromatography on silica gel using Merck Silica Gel 60 PF₂₅₄.

Characterization data

- Melting points were measured with a Büchi Melting Point B-540 apparatus.
- Optical rotation, $[\alpha]_D^{20}$ values, were measured using an Anton Paar MCP 300 instrument and are expressed in $\text{deg.cm}^3.\text{g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$ for a concentration of compound in g.cm^{-1} .
- Chiral HPLC was performed using a Daicel Chiralpak[®] IB column (5 μm , 4.6 x 250 mm) on a Waters Alliance 2695 apparatus.
- ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 and 600 instruments using CDCl_3 , acetone- d_6 , or CD_3OD as internal references. Chemical shifts (δ values) for ^1H and ^{13}C NMR spectra are reported in parts per million (ppm) relative to CDCl_3 (^1H NMR ($\delta = 7.24$ ppm) and ^{13}C NMR ($\delta = 77.26$ ppm)) acetone- d_6 (^1H NMR ($\delta = 2.05$ ppm) and ^{13}C NMR ($\delta = 29.92$ ppm)), or CD_3OD (^1H NMR ($\delta = 3.31$ ppm) and ^{13}C NMR ($\delta = 49.15$ ppm)) resonances. Data for ^1H NMR are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity of signals (s: singlet, brs: broad singlet, d: doublet, t: triplet, q: quadruplet, dd: doublet of doublets, m: multiplet), coupling constants (J values, given in Hertz (Hz)), integration, attribution. Data for ^{13}C NMR are reported in terms of chemical shift (δ in ppm). Molecules are numbered as in the theoretical part.
- High-resolution mass spectra HRMS analyses were obtained using a Waters LCT Premier instrument by ElectroSpray Ionization (ESI) or by Atmospheric Pressure Photo-Ionization (APPI).

Analytical data

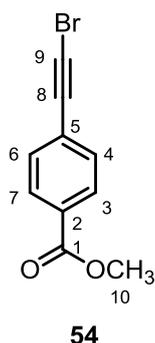
Methyl 4-((triisopropylsilyl)ethynyl)benzoate (AAS177):



Preparation: To a mixture of methyl 4-iodobenzoate **53** (10 g, 38.2 mmol, 1 eq), copper iodide (1.5 g, 7.6 mmol, 0.2 eq), and bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (1.3 g, 1.9 mmol, 0.05 eq) in Et₃N (100 mL) under Ar atm. was added dropwise (triisopropylsilyl)acetylene (9 mL, 40 mmol, 1.05 eq). After 18 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl and the product was extracted with MTBE (3 times). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using heptane to obtain a colorless oil (11.8 g, 37.2 mmol, **97%**).

Analysis: *R_f* = 0.6 (heptane/EtOAc 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-3, H-7), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-4, H-6), 3.93 (s, 3 H, H-10), 1.15 (s, 21 H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 166.5 (C-1), 131.9 (2 C, C-4, C-6), 129.5 (C-2), 129.4 (2 C, C-3, C-7), 128.2 (C-5), 106.1 (C-9), 94.3 (C-8), 52.2 (C-10), 18.6 (6 C), 11.3 (3 C) ppm; HRMS (APPI): *m/z* calcd. for C₁₉H₂₉O₂Si⁺ [M+H]⁺ 317.1931; found 317.1926.

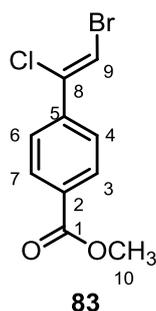
Methyl 4-(bromoethynyl)benzoate 54 (AAS184):



Preparation: To a solution of methyl 4-((triisopropylsilyl)ethynyl)benzoate **53** (7.3 g, 23 mmol, 1 eq) in MeCN (120 mL) were added NBS (4.5 g, 25 mmol, 1.1 eq) and AgF (3.2 g, 25 mmol, 1.1 eq) in the dark. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h and then filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 9:1 to obtain a white solid (4.7 g, 20 mmol, **87%**).

Analysis: R_f = 0.55 (heptane/EtOAc 9:1); Mp = 97 °C, ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-3, H-7), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-4, H-6), 3.93 (s, 3 H, H-10) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 166.4 (C-1), 131.9 (2 C, C-4, C-6), 130.0 (C-2), 129.5 (2 C, C-3, C-7), 127.3 (C-5), 79.4 (C-9), 53.3 (C-8), 52.2 (C-10) ppm; HRMS (APPI): m/z calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}_2^{+\bullet}$ $[\text{M}]^{+\bullet}$ 237.9624; found 237.9620.

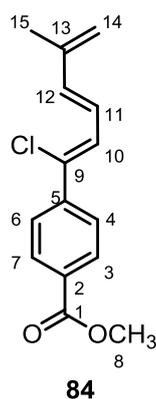
Methyl (Z)-4-(2-bromo-1-chlorovinyl)benzoate 83 (AAS188):



Preparation: To a solution of methyl 4-(bromoethynyl)benzoate **54** (7.7 g, 32 mmol, 1 eq), LiCl (2.7 g, 64.6 mmol, 2 eq) in AcOH (80 mL) were added allylpalladium (II) chloride dimer (591 mg, 1.6 mmol, 0.05 eq) and *cis,cis*-1,5-cyclooctadiene (396 μ L, 3.2 mmol, 0.1 eq). After 18 h at 80 $^{\circ}$ C, the reaction mixture was cooled down and water was added. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases were washed with a saturated solution of NaHCO₃, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 95:5 to obtain a yellow solid (7.1 g, 26 mmol, **80%**).

Analysis: R_f = 0.3 (heptane/EtOAc 95:5); Mp = 78 $^{\circ}$ C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-3, H-7), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-4, H-6), 7.00 (s, 1 H, H-9), 3.91 (s, 3 H, H-10) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 166.1 (C-1), 140.2 (C-2), 137.4 (C-5), 131.7 (C-8), 129.8 (2 C, C-4, C-6), 126.4 (2 C, C-3, C-7), 107.4 (C-9), 52.2 (C-10) ppm; HRMS (APPI): m/z calcd. for C₁₀H₈BrClO₂ [M]⁺• 273.9396; found 273.9381.

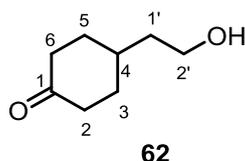
Methyl 4-[(1Z,3E)-1-chloro-5-methylhexa-1,3,5-trien-1-yl]benzoate **84 (AAS231):**



Preparation: To a solution of methyl (Z)-4-(2-bromo-1-chlorovinyl)benzoate **83** (716 mg, 2.6 mmol, 1 eq) and boronic ester **58** (1.5 g, 7.8 mmol, 3 eq) in THF/water 2:1 (35 mL) were added tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (150 mg, 0.13 mmol, 0.05 eq) and K_3PO_4 (2.6 g, 13 mmol, 5 eq) in the dark. The mixture was stirred 6 h at 50 °C and a saturated solution of NH_4Cl was added. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was then purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 8:2 to obtain a light yellow solid (480 mg, 1.83 mmol, **70%**).

Analysis: R_f = 0.28 (heptane/EtOAc 7:3); 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-3, H-7), 7.71 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-4, H-6), 6.94 (d, J = 10.2 Hz, 1 H, H-10), 6.74 (dd, J = 15.6, 10.2 Hz, 1 H, H-11), 6.62 (d, J = 15.6 Hz, 1 H, H-12), 5.15 (s, 2 H, H-14), 3.92 (s, 3 H, H-8), 1.97 (s, 3 H, H-15) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6): δ 166.9 (C-1), 142.5 (C-2), 142.1 (C-9), 140.4 (C-12), 131.7 (C-5), 130.1 (C-13), 130.0 (2 C, C-4, C-6), 128.1 (C-10), 126.3 (2 C, C-3, C-7), 125.2 (C-11), 119.8 (C-14), 52.5 (C-8), 18.7 (C-15) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{15}H_{16}ClO_2^+$ [M+H] $^+$ 262.0761; found 262.0769.

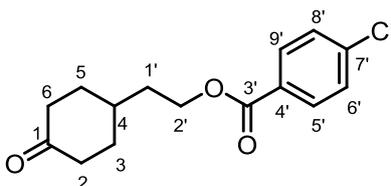
4-(2-Hydroxyethyl)cyclohexan-1-one **62**:



Preparation: To a solution of *p*-methoxyphenethyl alcohol **59** (10 g, 65.7 mmol, 1 eq) and *tert*-butanol (20 mL) in liquid NH₃ at -78 °C was added Li (2.8 g, 394 mmol, 6 eq) portionwise. After 5 h at this temperature, the reaction mixture was slowly quenched with NH₄Cl (28 g, 526 mmol, 8 eq) and the cooling bath removed. The mixture was stirred overnight at room temperature with a flow of N₂ to evaporate the residual NH₃ and water was added. The product was then extracted with MTBE (3 times). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain a yellow oil. To a solution of this crude product in THF (50 mL) was added conc. H₂SO₄ (2 mL). The reaction mixture was stirred 2 h at room temperature and water was added. The compound was then extracted with CH₂Cl₂ (6 times) and the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The above product was then dissolved in EtOAc and Pd-C (500 mg) was added. The suspension was stirred under H₂ atm. at room temperature for 18 h. After filtration through Celite, followed by concentration under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 6:4 to obtain a colorless oil (8.0 g, 56 mmol, **87%**).

Analysis: *R_f* = 0.05 (heptane/EtOAc 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.75 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, H-2'), 2.43-2.30 (m, 4 H, H-2, H-6), 2.13-2.04 (m, 2 H, H-5), 1.99-1.88 (m, 1 H, H-4), 1.60 (q, *J* = 6.5 Hz, 2 H, H-3), 1.45 (qd, *J* = 12.3, 5.0 Hz, 2 H, H-1') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 212.2 (C-1), 60.5 (C-2'), 40.7 (2 C, C-2, C-6), 38.2 (C-1'), 32.6 (2 C, C-3, C-5), 32.5 (C-4) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₀H₁₈NO₂⁺ [M+MeCN+H]⁺ 184.1332; found 184.1330.

2-(4-Oxocyclohexyl)ethyl 4-chlorobenzoate **63**:

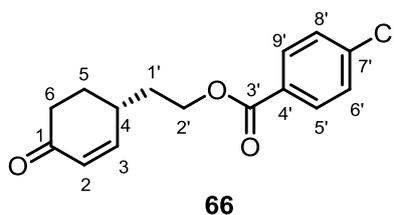


63

Preparation: To a solution of 4-(2-hydroxyethyl)cyclohexan-1-one **62** (8.0 g, 56 mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (100 mL) at 0 °C under Ar atm. was added Et₃N (23.5 mL, 169 mmol, 3 eq) and 4-chlorobenzoyl chloride (7.6 mL, 59 mmol, 1.05 eq). The mixture was allowed to warm to room temperature overnight and quenched with a saturated solution of NH₄Cl. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 8:2 to obtain the ester as a white solid (15.3 g, 55 mmol, **97%**).

Analysis: *R*_f = 0.2 (heptane/EtOAc 8:2); Mp = 58 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-6', H-8'), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-9'), 4.39 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, H-2'), 2.42-2.29 (m, 4 HH-3, H-5), 2.15-2.08 (m, 2 H, H-2'), 1.97-1.88 (m, 1 H, H-4), 1.79 (q, *J* = 6.7 Hz, 2 H, H-2), 1.48 (dq, *J* = 5.0, 12.3 Hz, 2 H, H-6) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 211.3 (C-1), 165.6 (C-3'), 139.4 (C-7'), 130.9 (2 C, C-5', C-9'), 128.7 (2 C, C-6', C-8'), 128.6 (C-4'), 63.2 (C-2'), 40.6 (2 C, C-2, C-6), 34.3 (C-1'), 33.1 (C-4), 32.5 (2 C, C-3, C-5) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₇H₂₁ClNO₃⁺ [M+MeCN+H]⁺ 322.1204; found 322.1202.

(R)-2-(4-Oxocyclohex-2-en-1-yl)ethyl 4-chlorobenzoate 66:

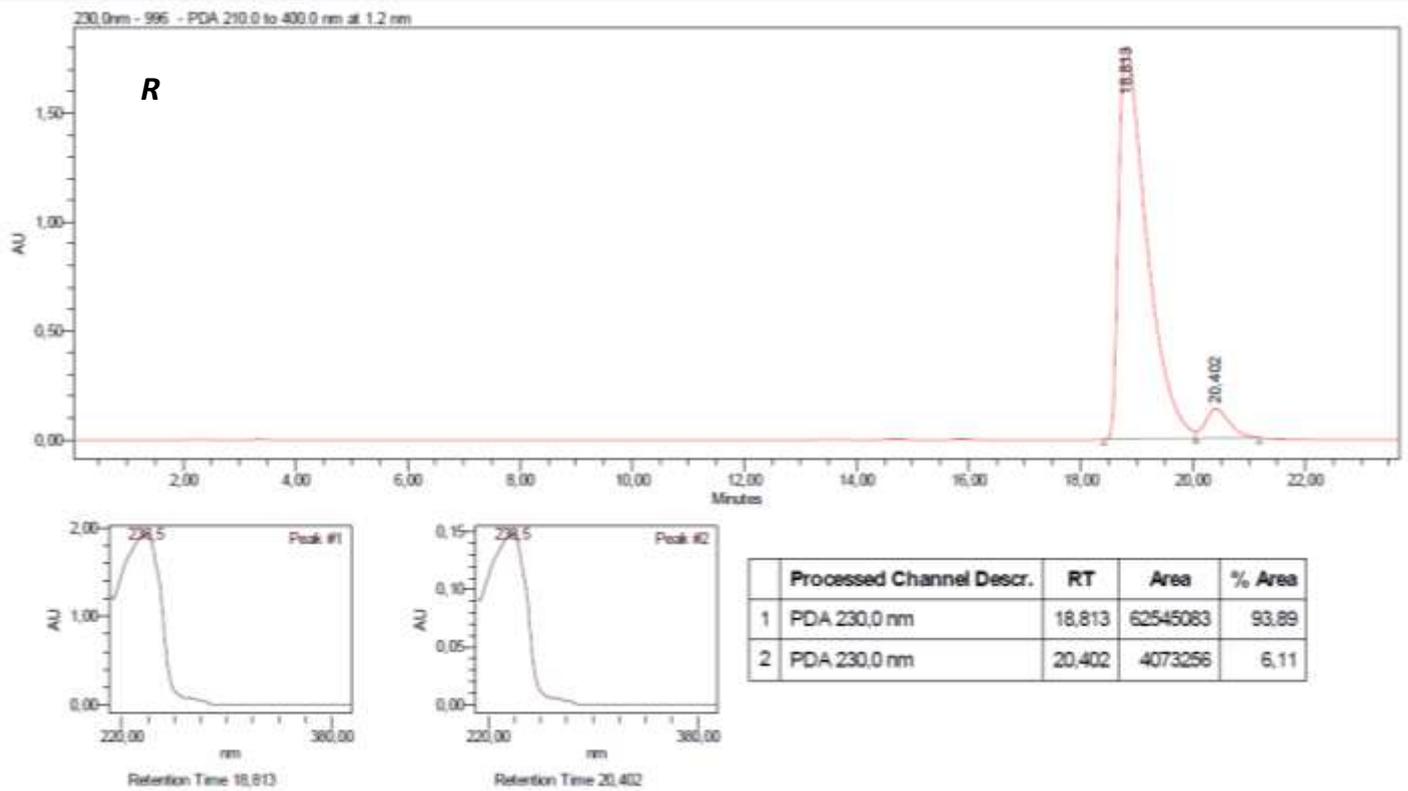
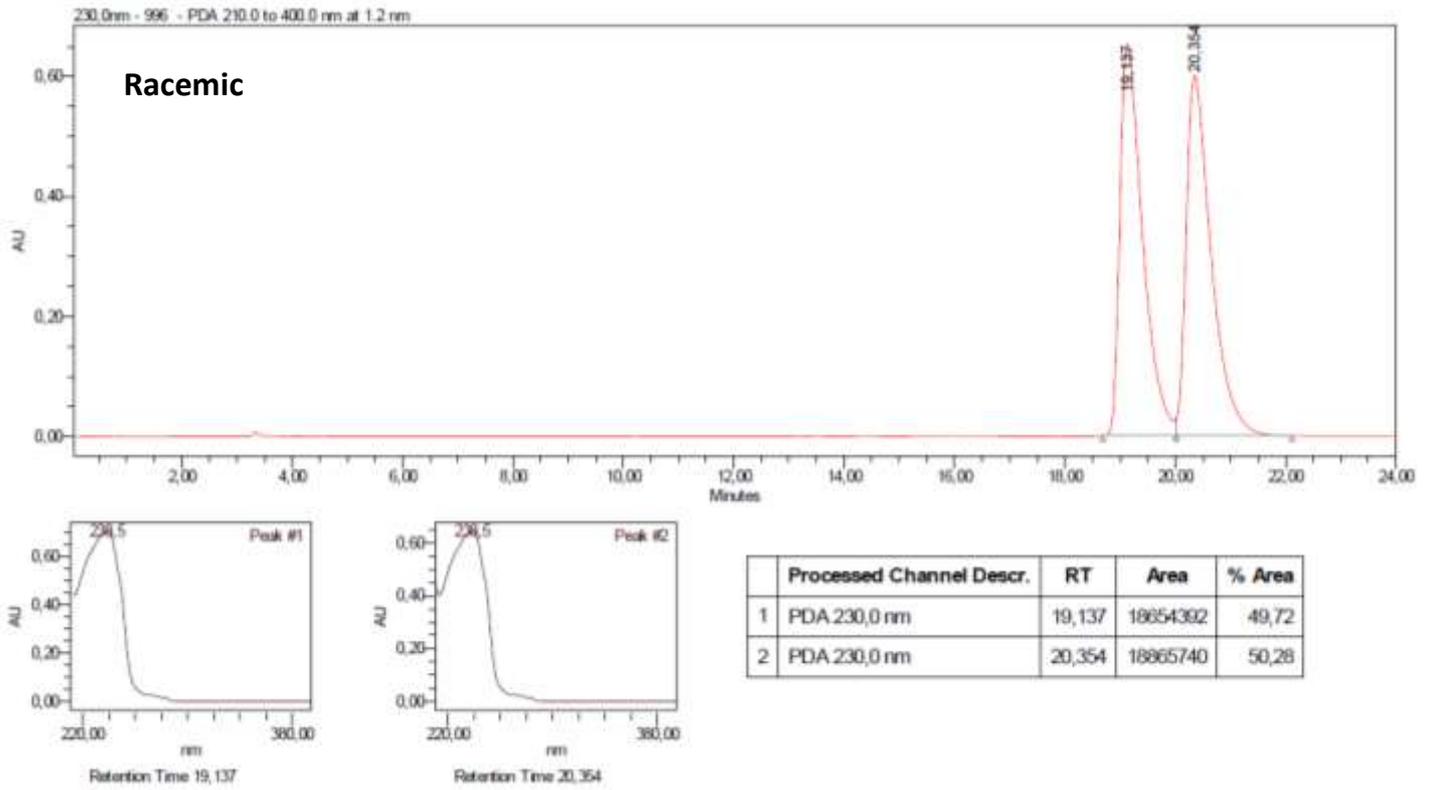


Preparation: A 1.5 M solution of *n*-BuLi in hexanes (14.2 mL, 21.4 mmol, 1.2 eq) was added dropwise to a solution of bis[(*R*)-1-phenylethyl]amine **64** (4.48 mL, 19.6 mmol, 1.1 eq) in THF (150 mL) at -78 °C under Ar atm. After 30 min, TMSCl (11 mL, 89 mmol, 5 eq) was added, followed by a solution of the cyclohexanone **63** (5.0 g, 17.8 mmol, 1 eq) in THF (30 mL) over a period of 1 h. After the addition was complete, the mixture was stirred for an additional 1 h at -78 °C and quenched with Et₃N (20 mL). A saturated solution of NaHCO₃ (20 mL) was then added and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After addition of water, the mixture was extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases were dried over MgSO₄. The solvent was then partially evaporated under reduced pressure and the residue was washed with a 0.5 M citric acid solution to remove the amine. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the silyl enol ether as a yellow oil. Pd(OAc)₂ (200 mg, 0.89 mmol, 0.05 eq) was then added to a solution of the crude product in dry DMSO (50 mL). O₂ was bubbled through for 5 min and the resulting black mixture was stirred at room temperature under O₂ atm. overnight. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl and the product was extracted with MTBE (3 times). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was then purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 8:2 to give the cyclohexenone as a white solid (4.56 g, 16.4 mmol, **92%**) with an *e.r.* of 94:6.

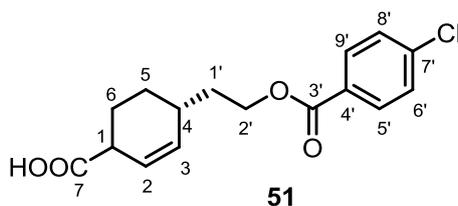
Analysis: *R_f* = 0.2 (heptane/EtOAc 7:3); *Mp* = 44 °C; [α]_D²⁰ = -45.0 ° (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-5', H-9'), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-6', H-8'), 6.88 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, H-3), 6.01 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, H-2), 4.49-4.40 (m, 2 H, H-2'), 2.68-2.59 (m, 1 H, H-6), 2.56-2.48 (m, 1 H, H-4), 2.43-2.33 (m, 1 H, H-1'), 2.24-2.16 (m, 1 H, H-1'), 2.06-1.97 (m, 1 H, H-6), 1.93-1.85 (m, 1 H, H-5), 1.83-1.73 (m, 1 H, H-5) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 199.1 (C-1), 165.5 (C-3'), 153.3 (C-3), 139.5 (C-7'), 130.9 (2 C, C-5', C-9'), 129.5 (C-4'), 128.8 (2 C, C-6', C-8'), 128.4 (C-2), 62.5 (C-2'), 36.7 (C-6), 33.4 (C-1'), 33.2 (C-4), 28.5 (C-5) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₅H₁₆ClO₃⁺ [M+H]⁺ 279.0782; found 279.0790.

Chiral HPLC:

The *e.r.* of the cyclohexenone was measured using a Daicel Chiralpak® IB column (5 μ m, 4.6 x 250 mm) with a U.V. detection at 230 nm and at 25 °C. Flow = 1 mL/min with heptane/isopropanol 95:5.



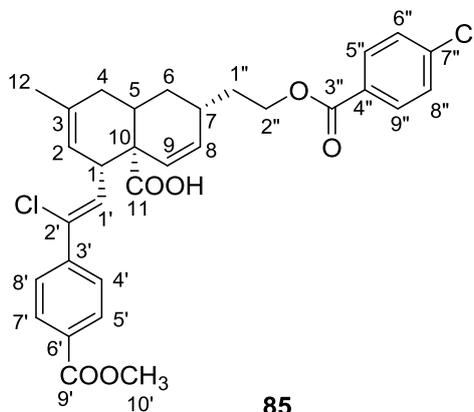
(R)-4-[2-(4-chlorobenzoyloxy)ethyl]cyclohexa-1,5-diene-1-carboxylic acid 51:



Preparation: To a solution of the cyclohexenone **66** (6.46 g, 23.2 mmol, 1 eq) in dry THF (150 mL) at -78 °C was added a 1 M solution of NaHMDS in THF (47 mL, 46.3 mmol, 2 eq). After 30 min, the Comins' reagent **67** (27.3 mL, 69.5 mmol, 3 eq) was added and the reaction mixture stirred for 3 h at -78 °C. A 10% solution of NaOH (50 mL) was then added and the mixture was allowed to warm to room temperature. After addition of water, the mixture was extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was then purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 95:5 to obtain a light yellow oil (9.44 g, 23.0 mmol, **99%**). To a solution of the triflate obtained **68** (5.10 g, 12.4 mmol, 1 eq) in dry DMF (150 mL) at room temperature was added AcOK (4.90 g, 50.0 mmol, 4 eq), Pd(OAc)₂ (140 mg, 0.6 mmol, 0.05 eq) and PPh₃ (330 mg, 1.2 mmol, 0.1 eq). The reaction mixture was stirred for 7 h under CO atm. before being degassed by bubbling Ar in the solution for 20 min. After addition of a 1 M solution of HCl, the product was extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was then purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc/AcOH 90:9:1 to obtain the carboxylic acid as a white solid (3.58 g, 11.7 mmol, **94%**).

Analysis: R_f = 0.4 (heptane/EtOAc/AcOH 70:29:1); Mp = 123 °C; $[\alpha]_D^{20}$ = -47.8° (c 2.0, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 13.00-9.00 (brs, 1 H, H-7), 7.98 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-9'), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-6', H-8'), 7.12-7.07 (m, 1 H, H-6), 6.43 (d, J = 10.1 Hz, 1 H, H-2), 5.93 (dd, J = 10.1, 3.3 Hz, 1 H, H-3), 4.41 (d, J = 6.5 Hz, 2 H, H-2'), 2.66-2.53 (m, 2 H, H-1'), 2.37-2.26 (m, 1 H, H-4), 2.01-1.92 (m, 1 H, H-5), 1.89-1.81 (m, 1 H, H-5) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 171.4 (C-3'), 165.7 (C-7), 139.5 (C-7'), 138.7 (C-4'), 131.1 (C-3), 130.9 (2 C, C-5', C-9'), 128.7 (2 C, C-6', C-8'), 128.6 (C-6), 127.9 (C-1), 121.5 (C-2), 62.7 (C-2'), 33.1 (C-1'), 29.2 (C-5), 28.9 (C-4) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₆H₁₄ClO₄⁻ [M-H]⁻ 305.0586; found 305.0583.

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-((4-chlorobenzoyl)oxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **85 (AAS224-F1):**



Preparation: A solution of dienophile **51** (535.1 mg, 1.39 mmol, 1 eq) and 2-bromophenylboronic acid **69** (140 mg, 0.7 mmol, 0.5 eq) in 1,2-dichloroethane was heated at reflux for 20 min before adding the triene **84** (549 mg, 2.08 mmol, 1.5 eq). The reaction mixture was heated at reflux overnight, then concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc/AcOH 60:39:1 to obtain the decalin as a light yellow solid (763.5 mg, 1.34 mmol, **96%**).

Analysis: $R_f = 0.67$ (heptane/EtOAc/AcOH 60:39:1); $[\alpha]_D^{20} = -97.50^\circ$ (c 0.5, MeOH); IR: ν 2925, 1718, 1595, 1435, 1271, 1172, 1091, 1014, 963, 898, 849, 758, 685 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6): δ 13.00-9.00 (brs, 2 H, H-11, H-10'), 8.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 8.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.33 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, H-1'), 5.77 (dd, $J = 10.2, 2.7$ Hz, 1 H, H-8), 5.70 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, H-9), 5.30-5.27 (m, 1 H, H-2), 4.44-4.38 (m, 2 H, H-2''), 3.89 (s, 3 H, H-10'), 3.75-3.69 (m, 1 H, H-1), 2.76-2.69 (m, 1 H, H-5), 2.63-2.56 (m, 1 H, H-7), 2.10 (dd, $J = 18.1, 8.9$ Hz, 1 H, H-1''), 1.95-1.83 (m, 4 H, H-4, H-6), 1.78-1.70 (m, 1 H, H-1''), 1.65 (s, 3 H, H-12) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ 175.6 (C-11), 166.7 (C-4''), 165.9 (C-3''), 143.0 (C-7''), 139.6 (C-9'), 136.5 (C-3'), 133.1 (C-8), 132.0 (2 C, C-5'', C-9''), 131.6 (C-9), 131.5 (C-1'), 131.1 (C-10), 130.8 (C-2'), 130.3 (2 C, C-6'', C-8''), 130.2 (C-6'), 129.7 (2 C, C-5', C-7'), 127.3 (2 C, C-4', C-8'), 117.9 (C-2), 63.8 (C-3), 52.5 (C-10'), 48.6 (C-2''), 45.8 (C-1), 35.7 (C-6), 32.4 (C-1''), 31.6, (C-5), 30.0 (C-7), 30.1 (C-4), 23.5 (C-12) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{O}_6^-$ [M-H] $^-$ 567.1341; found 567.1389.

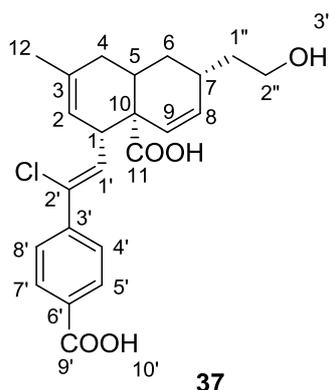
Biological activity:

$K_i \pm \text{SD Bcl-xL/Bak} = 5.62 \pm 0.60 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Mcl-1/Bid} = 0.52 \pm 0.03 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Bcl-2/Bim} > 23 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-hydroxyethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **37 (AAS228-F3):**



Preparation: To a solution of decaline **85** (730 mg, 1.28 mmol, 1 eq) in MeOH/THF/H₂O 1:1:1 (12 mL) was added LiOH·H₂O (270 mg, 6.41 mmol, 5 eq). The mixture was stirred for 6 h at room temperature and water was added. The aqueous phase was acidified with a 2 M solution of HCl. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on silica gel using CH₂Cl₂:MeOH:AcOH (94:5:1) to obtain a light yellow solid (497.5 mg, 1.19 mmol, **93%**).

Analysis: $R_f = 0.20$ (heptane/EtOAc/AcOH 50:49:1); $[\alpha]_D^{20} = -25.1^\circ$ (c 1, MeOH); IR: ν 3358, 2876, 2572, 1689, 1607, 1507, 1457, 1409, 1375, 1243, 1116, 1016, 951, 846, 776, 673 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 7.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.19 (d, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H-1'), 5.69 (dd, $J = 10.1, 2.7$ Hz, 1 H, H-8), 5.61 (d, $J = 10.1, 1$ H, H-9), 5.27-5.24 (m, 1 H, H-2), 3.70-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.65-3.58 (m, 2 H, H-2''), 2.67-2.60 (m, 1 H, H-5), 2.52-2.44 (m, 1 H, H-7), 2.08 (dd, $J = 18.3, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.94 (dd, $J = 18.3, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.87-1.81 (m, 1 H, H-4), 1.75-1.69 (m, 1 H, H-4), 1.67 (s, 3 H, H-12), 1.64-1.58 (m, 1 H, H-6), 1.51-1.42 (m, 1 H, H-6) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 178.1 (C-11), 169.2 (C-9'), 143.8 (C-3'), 136.8 (C-8), 133.9 (C-2'), 132.3 (C-3), 131.8 (C-9), 130.9 (C-6'), 130.8 (C-1'), 130.8 (2 C, C-5', C-7'), 127.5 (2 C, C-4', C-8'), 118.3 (C-2), 60.5 (C-2''), 48.6 (C-10), 46.3 (C-1), 40.0 (C-1''), 32.9 (C-6), 32.2 (C-5), 30.1 (C-7), 29.8 (C-4), 23.6 (C-12) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₃H₂₄ClO₅⁻ [M-H]⁻ 415.1318; found 415.1313.

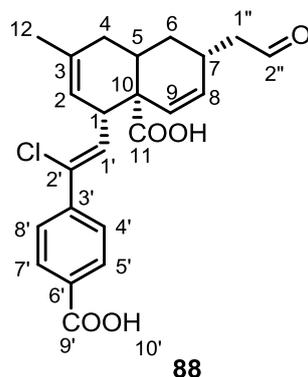
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 8.44 \pm 0.88 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

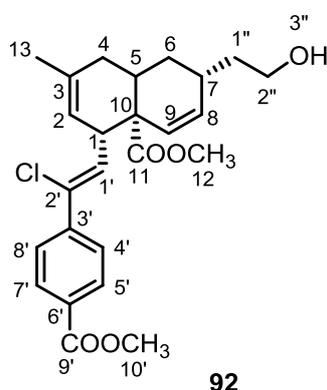
(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-oxoethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **88 (AAS235-F3):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (30 mg, 0.07 mmol, 1 eq) in a 1:1 mixture of anhydrous dioxane/CH₂Cl₂ (2.5 mL) was added Dess-Martin periodinane **90** (89.1 mg, 0.21 mmol, 3 eq). The reaction mixture is stirred at 40 °C for 3h. Saturated NH₄Cl was then added. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 times). The combined organic solvents were dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the crude product was purified on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH (94:5:1) to afford the aldehyde as a transparent oil (18 mg, 0.04 mmol, **57%**).

Analysis: $R_f = 0.8$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 95:4:1); ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 9.75 (t, 1 H, H-2''), 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.19 (dd, $J = 12.8, 3.2$ Hz, 1 H, H-1'), 5.69 (dd, $J = 9.4, 2.7$ Hz, 1 H, H-8), 5.61 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, H-9), 5.28-5.24 (m, 1 H, H-2), 3.71-3.64 (m, 1 H, H-1), 2.67-2.59 (m, 1 H, H-5), 2.52-2.44 (m, 1 H, H-7), 2.08 (dd, $J = 18.5, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.92 (dd, $J = 18.5, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.88-1.82 (m, 1 H, H-4), 1.73-1.70 (m, 1 H, H-4), 1.66 (s, 3 H, H-12), 1.64-1.59 (m, 1 H, H-6), 1.51-1.46 (m, 1 H, H-6) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₃H₂₂ClO₅⁻ [M-H]⁻ 413.1156; found 413.1154.

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-hydroxyethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **92 (AAS257-P):**



Preparation: To a solution of the alcohol **37** (300 mg, 0.72 mmol, 1 eq) in a 1:1 mixture of methanol/toluene (6 mL) at 0 °C was added a 2 M solution of trimethylsilyldiazomethane **91** in Et₂O (1.16 mL, 2.32 mmol, 3.2 eq). The reaction was allowed to room temperature and stirred for 6 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 10:0 → 5:5 to obtain a yellow oil (316 mg, 0.71 mmol, **99%**).

Analysis: $R_f = 0.45$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -172.0^\circ$ (c 0.05, MeOH); IR: ν 2924, 1720, 1606, 1434, 1276, 1228, 1108, 1016, 964, 849, 770, 701 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.00 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.10 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-1'), 5.70 (dd, $J = 9.8, 2.9$ Hz, 1 H, H-8), 5.58 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.20 (m, 1 H, H-2), 3.90 (s, 3 H, H-10'), 3.68-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.63-3.57 (m, 2 H, H-2''), 3.56 (s, 3 H, H-12), 2.70-2.63 (m, 1 H, H-5), 2.51-2.45 (m, 1 H, H-7), 2.06 (dd, $J = 18.2, 7.0$ Hz, 1 H, H-1''), 1.95 (dd, $J = 18.2, 7.0$ Hz, 1 H, H-1''), 1.86-1.81 (m, 1 H, H-4), 1.84-1.76 (m, 1 H, H-4), 1.67 (s, 3 H, H-13), 1.63-1.57 (m, 1 H, H-6), 1.45-1.39 (m, 1 H, H-6) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.6 (C-11), 167.9 (C-9'), 143.8 (C-3'), 137.1 (C-8), 134.4 (C-2'), 132.3 (C-3), 131.3 (C-9), 130.9 (C-6'), 130.7 (2 C, C-5', C-7'), 130.2 (C-1'), 127.6 (2 C, C-4', C-8'), 118.1 (C-2), 60.4 (C-2''), 52.7 (C-10'), 52.2 (C-12), 49.8 (C-10), 46.6 (C-1), 39.9 (C-1''), 32.7 (C-6), 32.1 (C-5), 30.1 (C-7), 29.7 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₅H₃₀ClO₅⁺ [M+H]⁺ 445.1782; found 445.1792.

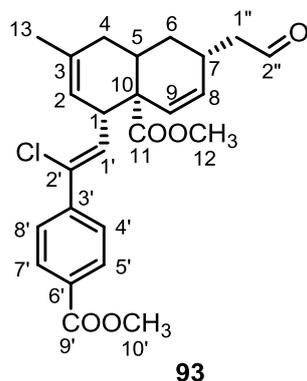
Biological activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid > 23 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-7-methyl-2-(2-oxoethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **93 (AAS249-P):**



Preparation: To a solution of alcohol **92** (100 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) was added Dess-Martin periodinane **90** (280 mg, 0.66 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 6 h. Water and MTBE were added, and the organic phase was washed with a saturated solution of Na₂CO₃ (2 times). The organic solvents were dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the crude product was purified on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 80:20 → 50:50 to afford the aldehyde as a yellow solid (94.7 mg, 0.21 mmol, **95%**).

Analysis: $R_f = 0.71$ (heptane/EtOAc 50:50); $[\alpha]_D^{20} = -85.0^\circ$ (c 0.5, MeOH); IR: ν 2925, 1720, 1607, 1434, 1277, 1229, 1108, 1017, 851, 770, 702 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*): δ 9.75 (t, 1 H, H-2''), 7.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 5.99 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, H-1'), 5.66 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, H-8), 5.63 (dd, $J = 1.9, 10.1$, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.89 (s, 3 H, H-10'), 3.67-3.64 (m, 1 H, H-1), 3.56 (s, 3 H, H-12), 2.93-2.85 (m, 1 H, H-5), 2.66-2.60 (m, 1 H, H-7), 2.45 (dd, $J = 17.4, 6.6$ Hz, 1 H, H-6), 2.40 (dd, $J = 17.7, 7.4$ Hz, 1 H, H-6), 2.03 (dd, $J = 18.5, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.92 (dd, $J = 18.5, 7.3$ Hz, 1 H, H-1''), 1.89-1.85 (m, 1 H, H-4), 1.72-1.68 (m, 1 H, H-4), 1.65 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, chloroform-*d*): δ 201.6 (C-2''), 174.8 (C-11), 166.7 (C-9'), 142.4 (C-3'), 135.6 (C-8), 131.8 (C-2'), 131.7 (C-3), 130.5 (C-9), 130.1 (C-6'), 129.7 (2 C, C-5', C-7'), 129.2 (C-1'), 126.7 (2 C, C-4', C-8'), 117.5 (C-2), 52.3 (C-10'), 52.0 (C-12), 49.8 (C-1''), 48.4 (C-10), 45.1 (C-1), 31.6 (C-6), 31.0 (C-5), 28.8 (C-7), 27.0 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₅H₂₈ClO₅⁺ [M+H]⁺ 443.1625; found 443.1631.

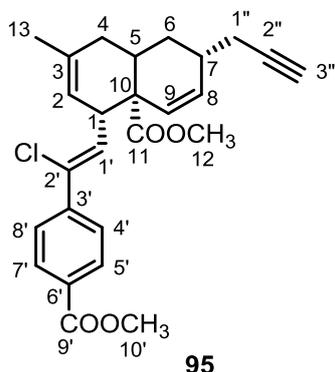
Biological activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 7.63 \pm 0.77 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-7-methyl-2-(prop-2-yn-1-yl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **95 (AAS247-B):**



Preparation: To a mixture of aldehyde **93** (10 mg, 0.02 mmol, 1 eq) and K_2CO_3 (11 mg, 0.08 mmol, 4 eq) in dry MeOH (0.1 mL) was added Ohira-Bestmann reagent **94** (8 mg, 0.04 mmol, 2 eq) in dry MeOH (0.2 mL) in one portion at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. Water was added to the reaction mixture, and the alkyne was extracted by MTBE (3 times). The organic phases were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using heptane/EtOAc 10:0 \rightarrow 5:5 to afford the alkyne as a yellow oil (5 mg, 0.01 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.55$ (Hep/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -67.5^\circ$ (c 0.04, MeOH); IR: ν 3358, 2974, 2926, 1650, 1381, 1277, 1088, 879 cm^{-1} ; not detected by HRMS or APPI.

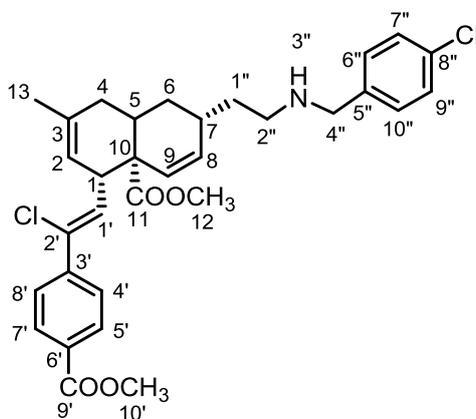
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $7.92 \pm 0.33 \mu M$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Methyl (2R,4aR,5S)-5-((Z)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)amino)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8a-tetrahydronaphthalene-4a(2H)-carboxylate 97 (AAS254-F2):



97

Preparation: A mixture of the aldehyde **93** (20 mg, 0.05 mmol, 1 eq), the amine **96** (7.3 μ L, 0.06 mmol, 1.2 eq) and $\text{Ti}(i\text{-PrO})_4$ (29.6 μ L, 0.1 mmol, 2 eq) in anhydrous THF (0.14 mL) was allowed to stir for 8 h at room temperature under Ar atm. NaBH_4 (5.7 mg, 0.15 mmol, 3 eq) and absolute EtOH (0.05 mL) were then added, and the resulting mixture was stirred for additional 7 h at room temperature. The reaction mixture was then quenched. The mixture was then poured into aq. NaOH (2 M, 0.18 mL), the resulting inorganic precipitate was filtered and washed with MTBE (0.45 mL). The organic layer was separated and the remaining aqueous layer was extracted with MTBE (0.27 mL). The combined organic extracts were washed with brine, dried (MgSO_4) and concentrated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel to afford the secondary amine as a light yellow oil (10 mg, 0.02 mmol, **40%**).

Analysis: $R_f = 0.23$ (Hep/EtOAc 1:1).

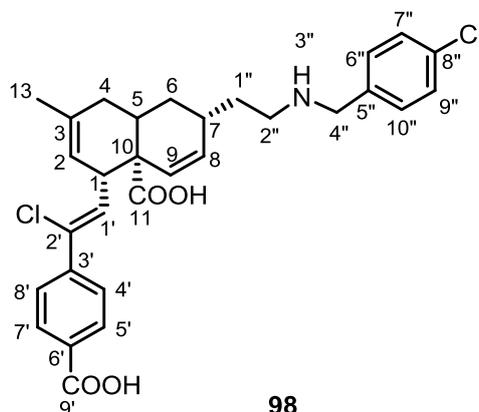
Biological activity:

$K_i \pm \text{SD Bcl-xL/Bak} > 23 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Mcl-1/Bid} > 23 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Bcl-2/Bim} > 23 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)amino)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **98 (AAS260-F2):**



98

Preparation: To a solution of the amine **97** (8.3 mg, 0.015 mmol, 1 eq) in MeOH/THF/water 1:1:1 (0.15 mL) was added LiOH.H₂O (3.15 mg, 0.075 mmol, 5 eq). The mixture was stirred 6 h at room temperature and water was added. The aqueous phase was acidified with a 2 M solution of HCl. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The amine was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc/AcOH 80:19:1 → 50:19:1 to obtain a yellow oil.

Analysis: $R_f = 0.42$ (Hep/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -60.0^\circ$ (c 0.01, MeOH).

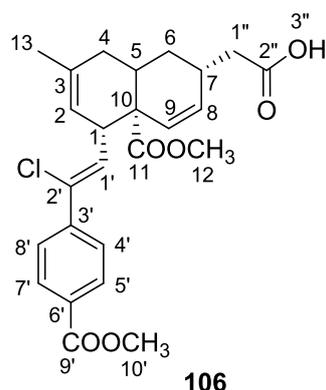
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 16.0 \pm 5.0 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

2-((2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-4*a*-(methoxycarbonyl)-7-methyl-1,2,4*a*,5,8,8*a*-hexahydronaphthalen-2-yl)acetic acid **106 (AAS261-F1):**



Preparation: A fresh solution of sodium phosphate buffer (40 mL, pH ~ 6.5) consisting of a 1:1 solution of NaH₂PO₄ (20 mL, 0.67 M, 1.608 g) and Na₂HPO₄ (20 mL, 0.67 M, 1.902 g) was prepared. A mixture of the alcohol **92** (200 mg, 0.45 mmol, 1 eq), TEMPO **105** (5 mg, 0.032 mmol, 0.07 eq), and sodium phosphate buffer (1.68 mL, 0.67 M, 2.5 eq) in ACN (1.56 mL) was heated to 35 °C. Solutions of NaClO₂ (162.8 mg, 1.8 mmol, 4 eq) in H₂O (0.26 mL) and bleach (0.6 mL, 2.6% wt) were added simultaneously. The reaction was monitored by TLC. Upon completion, the reaction mixture was quenched by the slow addition of solution of sodium sulphite (284.6 mg, 2.25 mmol, 5 eq) in H₂O (4.75 mL) at 0 °C. After addition of HCl 1 M, the product was extracted with MTBE (3 X 2 mL). The organic phases were combined, washed with H₂O (0.65 mL), brine (0.65 mL), dried (MgSO₄), and concentrated to provide the product. The product was purified on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 → 5:5 to afford the carboxylic acid as a white solid (191mg, 0.42 mmol, **93%**).

Analysis: $R_f = 0.53$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -27.0^\circ$ (c 0.2, MeOH); IR: ν 2943, 1720, 1607, 1432, 1276, 1212, 1109, 1016, 958, 848, 770, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 13.00-9.00 (brs, 1 H), 8.00 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.64 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.10 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H), 5.69 (dd, $J = 10.1, 2.8$ Hz, 1 H), 5.63 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H), 5.23 (d, $J = 4.6$ Hz, 1 H), 3.91 (s, 3 H), 3.71-3.66 (m, 1 H), 3.58 (s, 3 H), 2.80-2.72 (m, 1 H), 2.71-2.64 (m, 1 H), 2.27 (dd, $J = 15.2, 6.9$ Hz, 1 H), 2.18 (dd, $J = 15.8, 7.6$ Hz, 1 H), 2.10 (dd, $J = 18.8, 6.7$ Hz, 1 H), 2.00-1.93 (m, 1 H), 1.93-1.87 (m, 1 H), 1.74-1.70 (m, 1 H), 1.67 (s, 3 H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.3 (C-2''), 174.7 (C-11), 166.1 (C-9'), 143.8 (C-3'), 137.2 (C-8), 133.2 (C-2'), 132.5 (C-3), 131.4 (C-1'), 131.3 (C-9), 130.9 (C-6'), 130.7 (2 C, C-5', C-7'), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 118.2 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.8 (C-10), 46.6 (C-1), 41.4 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.9 (C-5), 30.5 (C-7), 30.1 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₅H₂₈ClO₆⁺ [M+H]⁺ 459.1574; found 459.1558.

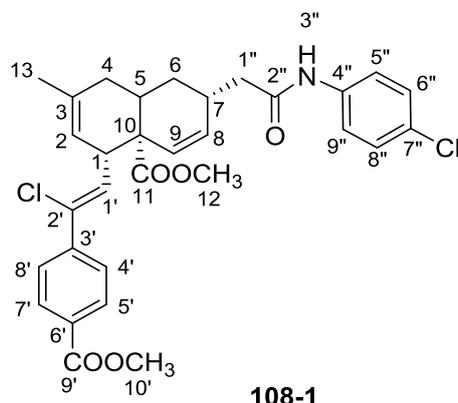
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-((4-chlorophenyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **108-1 (AAS269-F2):**



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq), amine (8.2 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (24.3 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.4 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (21 μ L, 0.12 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a transparent oil (12 mg, 0.02 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.66$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -45.5^\circ$ (c 0.02, MeOH); IR: ν 3283, 2921, 1724, 1642, 1537, 1436, 1259, 1089, 798, 660 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.10 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-1'), 5.72 (dd, $J = 9.9, 2.3$ Hz, 1 H, H-8), 5.66 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.57 (s, 1 H, H-3''), 3.91 (s, 3 H, H-10'), 3.71-3.67 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.90-2.87 (m, 1 H, H-5), 2.71-2.68 (m, 1 H, H-7), 2.36 (dd, $J = 13.8, 6.7$ Hz, 1 H, H-1''), 2.27 (dd, $J = 13.8, 6.7$ Hz, 1 H, H-1''), 2.10 (dd, $J = 17.6, 7.1$ Hz, 1 H, H-4), 1.97 (dd, $J = 17.6, 7.1$ Hz, 1 H, H-4), 1.91-1.86 (m, 1 H, H-6), 1.80-1.75 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 176.5 (C-2''), 174.5 (C-11), 169.1 (C-9'), 143.8 (C-3'), 137.2 (C-8), 135.6 (C-2'), 133.2 (C-3), 132.5 (C-1'), 131.4 (C-9), 130.8 (C-6'), 130.7 (2 C, C-5', C-7'), 129.8 (2 C, C-6'', C-8''), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 127.5 (C-4''), 125.1 (C-7''), 122.7 (2 C, C-5'', C-9''), 118.2 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 44.1 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.1 (C-7), 30.1 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{31}H_{32}Cl_2NO_5^+$ $[M+H]^+$ 568.1689; found 568.1699.

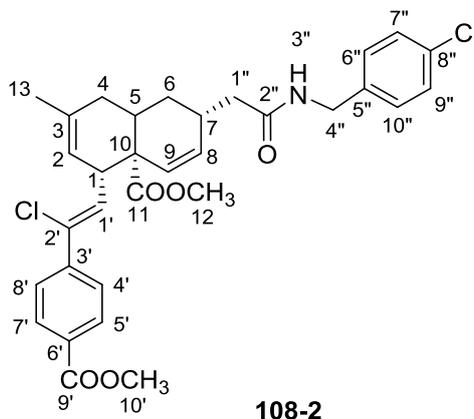
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate 108-2 (AAS286-F2):



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (40 mg, 0.09 mmol, 1 eq), amine **96** (34 μ L, 0.28 mmol, 3.2 eq) and HAUT **107** (106.4 mg, 0.28 mmol, 3.2 eq) in dry DMF (0.7 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (94 μ L, 0.54 mmol, 6 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a yellow solid (44 mg, 0.08 mmol, **89%**).

Analysis: R_f = 0.32 (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -114.6° (*c* 1, MeOH); IR: ν 2918, 1722, 1646, 1536, 1434, 1277, 1231, 1107, 1016, 847, 771, 702 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.10 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H, H-1'), 5.66 (dd, *J* = 9.6, 1.9 Hz, 1 H, H-8), 5.63 (dd, *J* = 9.6, 1.9 Hz, 1 H, H-9), 5.24-5.21 (m, 1 H, H-2), 4.34 (d, *J* = 3.9 Hz, 2 H, H-4''), 3.91 (s, 3 H, H-10'), 3.69-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.84-2.77 (m, 1 H, H-5), 2.70-2.65 (m, 1 H, H-7), 2.23 (dd, *J* = 14.6, 6.7 Hz, 1 H, H-1''), 2.12 (dd, *J* = 14.6, 6.7 Hz, 1 H, H-1''), 2.08 (dd, *J* = 18.8, 9.0 Hz, 1 H, H-4), 1.94 (dd, *J* = 18.8, 9.0 Hz, 1 H, H-4), 1.84-1.79 (m, 1 H, H-6), 1.72-1.69 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 174.4 (C-11), 168.0 (C-9'), 143.8 (C-3'), 139.1 (C-8''), 137.2 (C-8), 135.3 (C-2'), 133.4 (C-3), 132.5 (C-1'), 131.4 (C-9), 131.3 (C-6'), 130.9 (C-5''), 130.8 (2 C, C-5', C-7'), 130.4 (2 C, C-6'', C-10''), 129.7 (2 C, C-7'', C-9''), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 118.3 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 43.5 (C-4''), 43.3 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.1 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₂H₃₄Cl₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 582.1814; found 582.1808.

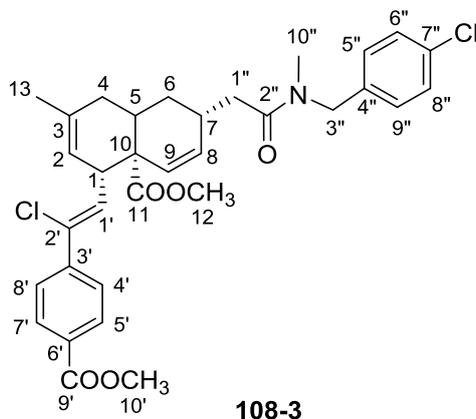
Biological activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)(methyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **108-3 (AAS287-2-F1):**



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (40 mg, 0.08 mmol, 1 eq), amine (20 mg, 0.128 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (48.7 mg, 0.128 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.8 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (42 μ L, 0.24 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a white solid (16 mg, 0.03 mmol, **38%**).

Analysis: R_f = 0.7 (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -63.0° (c 0.2, MeOH); IR: ν 2923, 1721, 1614, 1436, 1282, 1111, 828, 703, 558 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.00 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.64 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 7.26 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.11 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.70 (dd, J = 10.0, 2.8 Hz, 1 H, H-8), 5.63 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-9), 5.24-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.24 (s, 2 H, H-3''), 3.91 (s, 3 H, H-10'), 3.70-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.57 (s, 3 H, H-12), 3.04 (s, 3 H, H-10''), 2.84-2.77 (m, 1 H, H-5), 2.70-2.63 (m, 1 H, H-7), 2.33 (dd, J = 13.9, 7.0 Hz, 1 H, H-1''), 2.25 (dd, J = 13.9, 7.0 Hz, 1 H, H-1''), 2.11 (dd, J = 19.2, 7.7 Hz, 1 H, H-4), 1.97 (dd, J = 19.2, 7.7 Hz, 1 H, H-4), 1.92-1.87 (m, 1 H, H-6), 1.72-1.68 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 174.1 (C-11), 168.0 (C-9'), 143.9 (C-3'), 140.4 (C-7''), 137.2 (C-8), 134.1 (C-2'), 133.7 (C-3), 132.5 (C-1'), 131.5 (C-9), 131.1 (C-6'), 130.9 (C-4''), 130.8 (2 C, C-5', C-7'), 129.9 (2 C, C-5'', C-9''), 129.6 (2 C, C-6'', C-8''), 127.8 (2 C, C-4', C-8'), 118.3 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 46.6 (C-10), 44.2 (C-10''), 40.1 (C-1), 38.1 (C-3''), 35.9 (C-1''), 32.7 (C-6), 32.2 (C-5), 30.6 (C-7), 30.2 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. For hydrodechlorination product C₃₃H₃₈ClNO₅⁺ [M+H]⁺ 564.2517; found 564.2511.

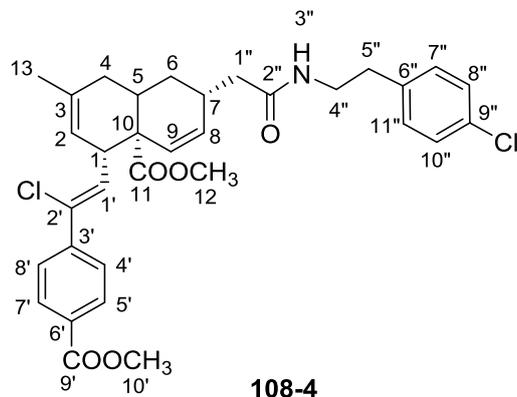
Biological Activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 17.55 \pm 1.52 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-2-(2-((4-chlorophenethyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate 108-4 (AAS270-F1):



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq), amine (9 μ L, 0.064 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (24.3 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.4 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (21 μ L, 0.12 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a transparent oil (3.3 mg, 0.006 mmol, **15%**).

Analysis: $R_f = 0.3$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -39.0^\circ$ (*c* 0.1, MeOH); IR: ν 2919, 1723, 1644, 1492, 1435, 1259, 1091, 1016, 798, 702 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-7'', H-11''), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-8'', H-10''), 6.09 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, H-1'), 5.60 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, H-8), 5.55 (dd, *J* = 10.1, 2.7 Hz, 1 H, H-9), 5.24-5.21 (m, 1 H), 3.90 (s, 3 H, H-10'), 3.69-3.64 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 3.48-3.37 (m, 2 H, H-5''), 2.79 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H-4''), 2.73-2.67 (m, 1 H, H-5), 2.66-2.62 (m, 1 H, H-7), 2.12 (dd, *J* = 14.3, 6.9 Hz, 1 H, H-1''), 2.06 (dd, *J* = 18.3, 6.9 Hz, 1 H, H-4), 1.99 (dd, *J* = 14.3, 6.9 Hz, 1 H, H-1''), 1.89 (dd, *J* = 18.3, 6.9 Hz, 1 H, H-4), 1.67 (s, 3 H), 1.60 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1 H, H-6), 1.57 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1 H, H-6) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 174.5 (C-11), 168.1 (C-9'), 143.8 (C-3'), 139.4 (C-9''), 137.2 (C-8), 134.1 (C-2'), 133.3 (C-3), 132.5 (C-1'), 131.6 (2 C, C-7'', C-11''), 131.5 (C-9), 131.2 (C-6'), 130.9 (C-6''), 130.8 (2 C, C-5', C-7'), 129.7 (2 C, C-9'', C-10''), 127.8 (2 C, C-4', C-8'), 118.2 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.5 (C-1), 43.4 (C-1''), 41.5 (C-4''), 35.9 (C-5''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.1 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₃H₃₆Cl₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 596.1971; found 596.2000.

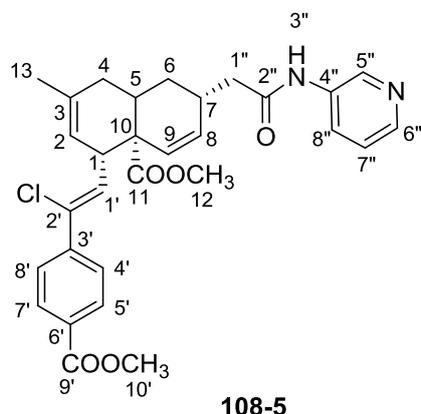
Biological Activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 8.40 \pm 0.45 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-7-methyl-2-(2-oxo-2-(pyridin-3-ylamino)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **108-5 (AAS268-F4):**



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq), amine (6 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (24.3 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.4 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (21 μ L, 0.12 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a transparent oil (11 mg, 0.02 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.52$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -94.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR: ν 3319, 2973, 2879, 1454, 1379, 1274, 1045, 879, 630 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.73 (d, $J = 2.73$ Hz, 1 H, H-6''), 8.25 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, H-5''), 8.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, H-8''), 8.0 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.39 (dd, $J = 8.3, 4.5$, 1 H, H-7''), 6.10 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, H-1'), 5.73 (dd, $J = 10.1, 2.5$ Hz, 1 H, H-8), 5.67 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, H-9), 5.26-5.20 (m, 1 H, H-2), 3.90 (s, 3 H, H-10'), 3.70-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.94-2.88 (s, 1 H, H-5), 2.74-2.68 (m, 1 H, H-7), 2.41 (dd, $J = 14.2, 7.9$ Hz, 1 H, H-1''), 2.32 (dd, $J = 14.2, 7.9$ Hz, 1 H, H-1''), 2.11 (dd, $J = 18.3, 7.4$ Hz, 1 H, H-4), 1.98 (dd, $J = 18.3, 7.4$ Hz, 1 H, H-4), 1.93-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.83-1.77 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 173.4 (C-11), 168.0 (C-9'), 145.3 (C-5''), 143.8 (C-3'), 142.6 (C-6''), 142.0 (C-4''), 137.5 (C-2'), 137.2 (C-8), 133.2 (C-3), 132.5 (C-1'), 131.5 (C-9), 130.8 (C-6'), 130.7 (2 C, C-5', C-7'), 129.1 (C-7''), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 125.4 (C-8''), 118.2 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 43.9 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.1 (C-7), 30.1 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₃₂ClN₂O₅⁺ [M+H]⁺ 535.2000; found 535.2025.

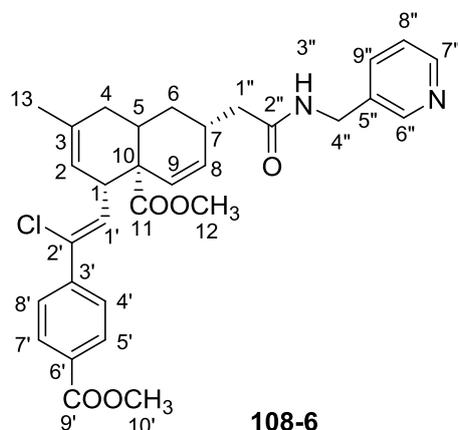
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-7-methyl-2-(2-oxo-2-((pyridin-3-ylmethyl)amino)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate 108-6 (AAS263-F1):



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq), amine (6.6 μ L, 0.064 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (24.3 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.4 mL) was added *N,N*,diisopropylethylamine (21 μ L, 0.12 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a yellow oil (12 mg, 0.02 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.52$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -114.0^\circ$ (*c* 0.2, MeOH); IR: ν 2929, 1722, 1607, 1432, 1279, 1104, 1017, 901, 770, 701 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.50 (s, 1 H, H-6''), 8.44 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H, H-7''), 8.00 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, H-9''), 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.42 (q, 1 H, H-8''), 6.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-1'), 5.70 (dd, $J = 10.0, 3.1$ Hz, 1 H, H-8), 5.64 (s, 1 H, H-3''), 5.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, H-9), 5.26-5.21 (m, 1 H, H-2), 4.41 (d, $J = 4.2$ Hz, 2 H, H-4''), 3.90 (s, 3 H, H-10'), 3.70-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.85-2.77 (m, 1 H, H-5), 2.71-2.64 (m, 1 H, H-7), 2.24 (dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, 1 H, H-1''), 2.12 (dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, 1 H, H-1''), 2.08 (dd, $J = 18.5, 8.8$ Hz, 1 H, H-4), 1.93 (dd, $J = 18.5, 8.8$ Hz, 1 H, H-4), 1.85-1.78 (m, 1 H, H-6), 1.74-1.69 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 176.4 (C-2''), 174.6 (C-11), 168.0 (C-9'), 149.6 (C-6''), 148.9 (C-7''), 143.8 (C-3'), 137.8 (C-5''), 137.1 (C-8), 136.9 (C-2'), 133.4 (C-3), 133.2 (C-8''), 132.5 (C-1'), 131.3 (C-9), 131.1 (C-6'), 130.7 (2 C, C-5', C-7'), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 125.4 (C-9''), 118.2 (C-2), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.5 (C-1), 43.2 (C-1''), 41.7 (C-4''), 32.6 (C-6), 31.9 (C-5), 31.1 (C-7), 30.1 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{31}H_{34}ClN_2O_5^+$ $[M+H]^+$ 549.2156; found 549.2181.

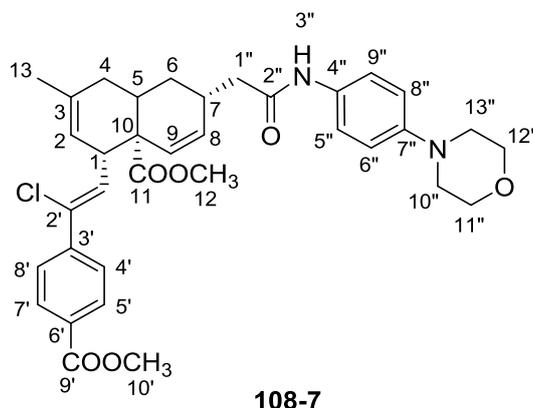
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 0.74 ± 0.06 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Methyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-chloro-2-(4-(methoxycarbonyl)phenyl)vinyl)-7-methyl-2-(2-((4-morpholinophenyl)amino)-2-oxoethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate 108-7 (AAS264-F1):



Preparation: To a solution of carboxylic acid **106** (20 mg, 0.04 mmol, 1 eq), amine (11.4 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) and HAUT **107** (24.3 mg, 0.064 mmol, 1.6 eq) in dry DMF (0.4 mL) was added *N,N*-diisopropylethylamine (21 μ L, 0.12 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then washed with a saturated solution of HCl 1 N. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain a yellow oil (23.3 mg, 0.04 mmol, **99%**).

Analysis: $R_f = 0.64$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -95.4^\circ$ (c 0.35, MeOH); IR: ν 3372, 2919, 1709, 1678, 1596, 1515, 1437, 1377, 1236, 1112, 1018, 927, 820, 770, 697 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.00 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.10 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-1'), 5.72 (dd, $J = 10.1, 2.5$ Hz, 1 H, H-8), 5.66 (d, $J = 10.4$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.90 (s, 3 H, H-10'), 3.82 (t, $J = 4.8$ Hz, 4 H, H-11'', H-12''), 3.72-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 3.10 (t, $J = 4.8$ Hz, 4 H, H-10'', H-13''), 2.92-2.83 (m, 1 H, H-5), 2.74-2.67 (m, 1 H, H-7), 2.33 (dd, $J = 13.7, 7.2$ Hz, 1 H, H-1''), 2.24 (dd, $J = 13.7, 7.2$ Hz, 1 H, H-1''), 2.11 (dd, $J = 18.5, 7.2$ Hz, 1 H, H-4), 1.98 (dd, $J = 18.5, 7.2$ Hz, 1 H, H-4), 1.92-1.86 (m, 1 H, H-6), 1.81-1.75 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 176.5 (C-2''), 172.7 (C-11), 168.0 (C-9'), 149.9 (C-4''), 143.9 (C-3'), 137.3 (C-8), 133.4 (C-3), 132.7 (C-1'), 132.5 (C-2'), 131.5 (C-9), 131.4 (C-7''), 130.9 (C-6'), 130.8 (2 C, C-5', C-7'), 127.8 (2 C, C-4', C-8'), 122.8 (2 C, C-5'', C-9''), 118.2 (C-2), 117.5 (2 C, C-6'', C-8''), 68.1 (2 C, C-11'', C-12''), 52.8 (C-10'), 52.4 (C-12), 51.2 (2 C, C-10'', C-13''), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 44.1 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.3 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{35}H_{40}ClN_2O_6^+$ $[M+H]^+$ 619.2575; found 619.2592.

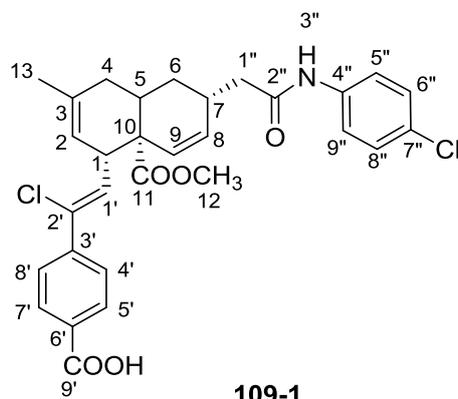
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

4-((Z)-1-chloro-2-((1S,6R,8aR)-6-(2-((4-chlorophenyl)amino)-2-oxoethyl)-8a-(methoxycarbonyl)-3-methyl-1,4,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)vinyl)benzoic acid 109-1 (AAS276-F1):



Preparation: A solution of the amide **108-1** (5 mg, 0.009 mmol, 1 eq) in THF/water/MeOH 1:1:1 (2 mL) was added NaOH (3.6 mg, 0.09 mmol, 10 eq) underwent microwaves at 120 °C for 10 min (pressure = 5 bar, heating time: 3 min, cooling temperature: 40 °C). The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure. At pH = 6, the crude product was extracted using MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The monoester was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc/AcOH 80:19:1 → 50:49:1 to obtain a transparent oil (1.3 mg, 0.002 mmol, **22%**).

Analysis: R_f = 0.5 (heptane/EtOAc/AcOH 50:49:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -74.0 ° (*c* 0.1, MeOH); IR: ν 3401, 2922, 1723, 1606, 1539, 1403, 1314, 1245, 951, 775, 667 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.54 (d, *J* = 9 Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.03 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.72 (dd, *J* = 10.0, 2.7 Hz, 1 H, H-8), 5.67 (d, *J* = 10.3 Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.70-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.92-2.85 (m, 1 H, H-5), 2.72-2.68 (m, 1 H, H-7), 2.36 (dd, *J* = 13.8, 6.6 Hz, 1 H, H-1''), 2.27 (dd, *J* = 13.8, 6.6 Hz, 1 H, H-1''), 2.36 (dd, *J* = 16.6, 7.2 Hz, 1 H, H-4), 2.11 (dd, *J* = 16.6, 7.2 Hz, 1 H, H-4), 1.91-1.86 (m, 1 H, H-6), 1.80-1.75 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 173.0 (C-11), 171.3 (C-9'), 143.0 (C-3'), 136.9 (C-7''), 136.0 (C-8), 134.3 (C-2'), 133.2 (C-3), 132.7 (C-1'), 131.6 (C-9), 130.6 (2 C, C-5', C-7'), 130.1 (C-6'), 129.9 (2 C, C-5'', C-9''), 129.6 (C-4'') 127.3 (2 C, C-6'', C-8''), 122.7 (2 C, C-4', C-8'), 118.5 (C-2), 52.4 (C-12), 49.6 (C-10), 46.6 (C-1), 44.2 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.9 (C-5), 31.2 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₃₀Cl₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 554.1501; found 554.1514.

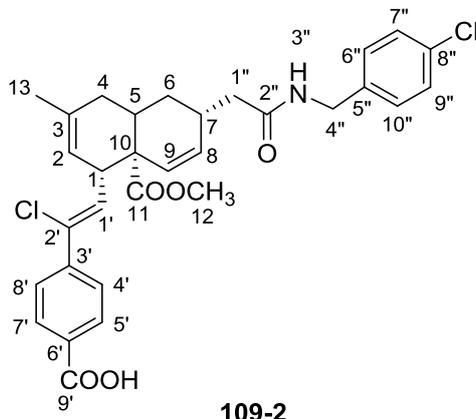
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = 2.74 ± 0.17 μM

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 1.00 ± 0.17 μM

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = 0.70 ± 0.03 μM

4-((Z)-1-chloro-2-((1S,6R,8aR)-6-(2-((4-chlorobenzyl)amino)-2-oxoethyl)-8a-(methoxycarbonyl)-3-methyl-1,4,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)vinyl)benzoic acid
109-2 (AAS262-P):



Preparation: To a solution of the amide **108-2** (13 mg, 0.02 mmol, 1 eq) in MeOH/THF/water 1:1:1 (0.2 mL) was added LiOH.H₂O (8.4 mg, 0.2 mmol: 10 eq). The mixture was stirred 6 h at room temperature and water was added. The aqueous phase was acidified with a 2 M solution of HCl. The product was then extracted with MTBE (3 times) and the combined organic phases dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The product has been purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc/AcOH 99:0:1 → 50:49:1 to afford a transparent oil (5.2 mg, 0.01 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.48$ (heptane/EtOAc/AcOH 80:19:1); $[\alpha]_D^{20} = -14.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR: ν 2917, 1716, 1648, 1434, 1260, 1014, 951, 798, 699 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.49 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H, H-3''), 8.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.09 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, H-1'), 5.66 (dd, $J = 9.6, 1.9$ Hz, 1 H, H-8), 5.63 (dd, $J = 9.6, 1.9$ Hz, 1 H, H-9), 5.24-5.21 (m, 1 H, H-2), 4.34 (t, 2 H, H-4''), 3.71-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 2.88-2.78 (m, 1 H, H-5), 2.72-2.65 (m, 1 H, H-7), 2.30-2.20 (m, 1 H, H-1''), 2.15-2.10 (m, 1 H, H-1''), 2.10-2.04 (m, 1 H, H-4), 1.99-1.90 (m, 1 H, H-4), 1.86-1.79 (m, 1 H, H-6), 1.74-1.69 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 174.5 (C-11), 169.4 (C-9'), 143.6 (C-3'), 139.1 (C-8''), 137.2 (C-8), 134.1 (C-2'), 133.3 (C-3), 132.7 (C-1'), 132.3 (C-9), 131.4 (C-6'), 131.0 (2 C, C-5', C-7'), 130.6, (C-5'') 130.4 (2 C, C-6'', C-10''), 129.7 (2 C, C-7'', C-9''), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 118.3 (C-2), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 43.5 (C-4''), 43.3 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.9 (C-5), 31.2 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₁H₃₂Cl₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 568.1658; found 568.1677.

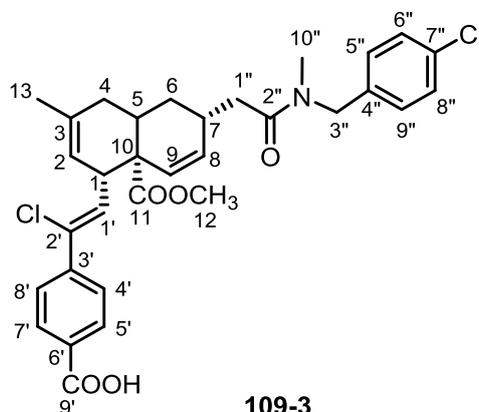
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = 2.73 ± 0.40 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 4.45 ± 1.43 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = 0.62 ± 0.02 μ M

**4-((Z)-1-chloro-2-((1S,6R,8aR)-6-(2-((4-chlorobenzyl)(methyl)amino)-2-oxoethyl)-8a-(methoxycarbonyl)-3-methyl-1,4,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)vinyl)benzoic acid
109-3 (AAS272-F1):**



Preparation: A solution of the amide **108-3** (4.8 mg, 0.008 mmol, 1 eq) in THF/water/MeOH 1:1:1 (2 mL) was added LiOH.H₂O (3.2 mg, 0.08 mmol, 10 eq) underwent microwaves at 120 °C for 10 min (pressure = 5 bar, heating time: 3 min, cooling temperature: 40 °C). The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure. At pH = 6, the crude product was extracted using MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The monoester was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc/AcOH 80:19:1 → 50:49:1 to obtain a transparent oil (1.5 mg, 0.003 mmol, **38%**).

Analysis: $R_f = 0.5$ (heptane/EtOAc/AcOH 50:49:1); $[\alpha]_D^{20} = -21.0^\circ$ (c 0.2, MeOH); IR: ν 2921, 1722, 1538, 1463, 1379, 1259, 1092, 1015, 798, 702 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 7.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 7.26 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.05 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-1'), 5.69 (dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz, 1 H, H-8), 5.63 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.21 (m, 1 H, H-2), 4.25 (s, 2 H, H-3''), 3.70-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.64 (s, 3 H, H-10''), 3.57 (s, 3 H, H-12), 2.84-2.77 (m, 1 H, H-5), 2.70-2.66 (m, 1 H, H-7), 2.34-2.30 (m, 1 H, H-1''), 2.28-2.24 (m, 1 H, H-1''), 2.13-2.08 (m, 1 H, H-4), 1.99-1.95 (m, 1 H, H-4), 1.92-1.87 (m, 1 H, H-6), 1.72-1.68 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, C-13) ppm; not detected by HRMS or APPI.

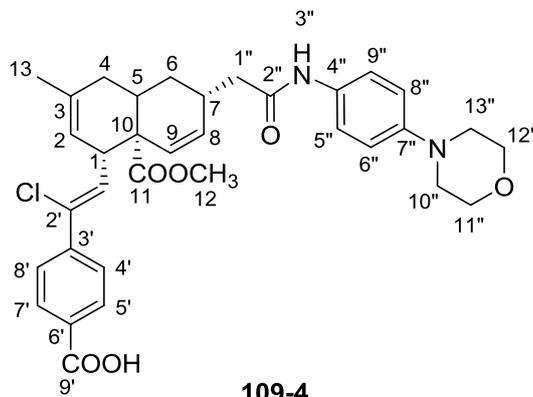
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = 1.90 ± 0.15 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μM

4-((Z)-1-chloro-2-((1S,6R,8aR)-8a-(methoxycarbonyl)-3-methyl-6-(2-((4-morpholinophenyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)vinyl)benzoic acid 109-4 (AAS271-prelev 1):



Preparation: A solution of the amide **108-7** (5 mg, 0.01 mmol, 1 eq) in THF/water 1:1 (2 mL) was added LiOH.H₂O (4 mg, 0.1 mmol, 10 eq) underwent microwaves at 120 °C for 10 min (pressure = 5 bar, heating time: 3 min, cooling temperature: 40 °C). The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure. At pH = 6, the crude product was extracted using MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure.

Analysis: $R_f = 0.24$ (heptane/EtOAc/AcOH 50:49:1); $[\alpha]_D^{20} = -100.0^\circ$ (*c* 0.006, MeOH); IR: ν 3358, 2977, 1652, 1384, 1087, 879, 669 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H, H-5'', H-9''), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H, H-6'', H-8''), 6.08 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, H-1'), 5.73 (dd, *J* = 10.1, 2.6 Hz, 1 H, H-8), 5.67 (d, *J* = 10.4 Hz, 1 H, H-9), 5.26-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.82 (t, *J* = 4.8 Hz, 4 H, H-11'', H-12''), 3.72-3.66 (m, 1 H, H-1), 3.55 (s, 3 H, H-12), 3.10 (t, *J* = 4.8 Hz, 4 H, H-10'', H-13''), 2.92-2.83 (m, 1 H, H-5), 2.74-2.67 (m, 1 H, H-7), 2.33 (dd, *J* = 13.7, 7.2 Hz, 1 H, H-1''), 2.26 (dd, *J* = 13.7, 7.2 Hz, 1 H, H-1''), 2.11 (dd, *J* = 18.5, 7.2 Hz, 1 H, H-4), 1.98 (dd, *J* = 18.5, 7.2 Hz, 1 H, H-4), 1.92-1.86 (m, 1 H, H-6), 1.81-1.75 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.5 (C-2''), 173.0 (C-11), 169.2 (C-9'), 148.6 (C-4''), 143.7 (C-3'), 137.2 (C-8), 133.3 (C-3), 132.7 (C-1'), 132.2 (C-2'), 131.5 (C-9), 131.4 (C-7''), 131.0 (2C, C-5', C-7'), 130.7 (C-6'), 127.7 (2C, C-4', C-8'), 122.6 (2C, C-5'', C-9''), 120.5 (C-2), 118.3 (2C, C-6'', C-8''), 66.8 (2C, C-11'', C-12''), 54.2 (2C, C-10'', C-13''), 52.4 (C-12), 49.9 (C-10), 46.6 (C-1), 44.1 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.8 (C-5), 31.2 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₄H₃₈ClN₂O₆⁺ [M+H]⁺ 605.2413; found 605.2477.

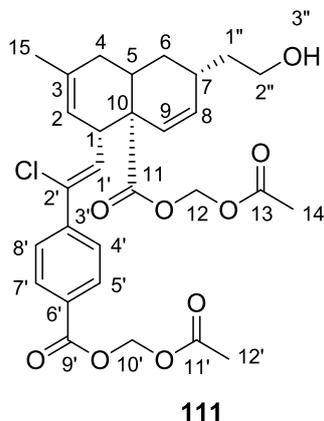
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $9.91 \pm 0.96 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $6.80 \pm 1.35 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-hydroxyethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **111 (AAS338-F3):**



Preparation: The alcohol **37** (80 mg, 0.19 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF. Potassium carbonate (53 mg, 0.38 mmol, 2 eq) was added to the solution and the suspension was stirred during 2-3 min after which bromomethyl acetate **110** (37 μ L, 0.38 mmol, 2 eq) was added. After stirring at room temperature during 18 h, dichloromethane was added to the mixture and the resulting organic phase was successively washed with water (3 times) and brine (3 times). Organic solvent was eliminated and the residue was submitted to flash chromatography (heptane/ethyl acetate) to yield the corresponding diester as a yellow oil (73 mg, 0.13 mmol, **68%**).

Analysis: $R_f = 0.3$ (heptane/EtOAc 4:6); $[\alpha]_D^{20} = 117.5^\circ$ (c 1, MeOH); IR: ν 3452, 2926, 1736, 1606, 1408, 1368, 1212, 1009, 846, 769, 699, 606 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.18 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.74 (dd, $J = 9.9, 3.1$ Hz, 1 H, H-8), 5.65 (dd, $J = 19.5, 5.8$ Hz, 2 H, H-12), 5.57 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.70-3.65 (m, 1 H, H-1), 3.63-3.58 (m, 2 H, H-2''), 2.72-2.66 (m, 1 H, H-5), 2.53-2.46 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.08 (dd, $J = 17.9, 6.6$ Hz, 1 H, H-1''), 1.95 (dd, $J = 17.9, 6.6$ Hz, 1 H, H-1''), 1.88-1.83 (m, 1 H, H-4), 1.80 (s, 3 H, H-14), 1.74-1.69 (m, 1 H, H-4), 1.67 (s, 3 H, H-15), 1.63-1.58 (m, 1 H, H-6), 1.53-1.47 (m, 1 H, H-6) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 174.7 (C-11), 171.3 (C-13), 171.0 (C-11'), 165.9 (C-9'), 144.3 (C-3'), 137.5 (C-8), 135.2 (C-2'), 132.6 (C-3), 131.1 (2 C, C-5', C-7'), 130.7 (C-9), 130.5 (C-6'), 129.6 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.3 (C-10'), 60.5 (C-2''), 49.8 (C-10), 46.2 (C-1), 39.9 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.9 (C-5), 30.1 (C-7), 29.8 (C-4), 29.2 (C-14), 23.5 (C-15), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{ClNaO}_9^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 583.1711; found 583.1736.

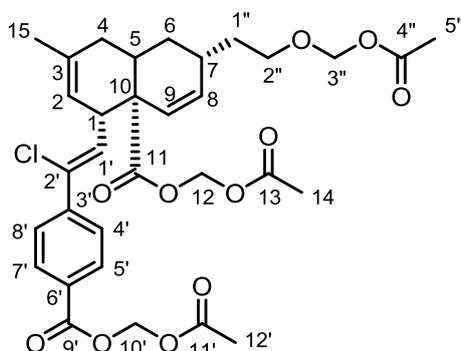
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = 4.75 \pm 0.48 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(acetoxymethoxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **112 (AAS307-F2):**



112

Preparation: The alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF. Potassium carbonate (53 mg, 0.384 mmol, 3.2 eq) was added to the solution and the suspension was stirred during 2-3 min after which bromomethyl acetate **110** (38 μ L, 0.384 mmol, 3.2 eq) was added. After stirring at room temperature during 48 h, dichloromethane was added to the mixture and the resulting organic phase was successively washed with water (3 times) and brine (3 times). Organic solvent was eliminated and the residue was submitted to flash chromatography (heptane/EtOAc) to yield the corresponding trimer as a yellow oil (7 mg, 0.01 mmol, **8%**).

Analysis: R_f = 0.6 (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -94.9° (c 0.08, MeOH); IR: ν 3348, 2973, 1742, 1605, 1451, 1372, 1274, 1231, 1155, 1089, 1013, 880, 771, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.04 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.18 (d, J = 9.8 Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.73 (dd, J = 10.5, 3.3 Hz, 1 H, H-8), 5.66 (dd, J = 17.9, 5.8 Hz, 2 H, H-12), 5.58 (d, J = 10.3 Hz, 1 H, H-9), 5.25 (s, 2 H, H-3''), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.71-3.69 (m, 1 H, H-1), 3.69-3.61 (m, 2 H, H-2''), 2.73-2.66 (m, 1 H, H-5), 2.52-2.45 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.07 (s, 3 H, H-5''), 2.02 (dd, J = 14.0, 5.7 Hz, 1 H, H-1''), 1.94 (dd, J = 14.0, 5.7 Hz, 1 H, H-1''), 1.86-1.82 (m, 1 H, H-4), 1.86-1.81 (m, 1 H, H-4), 1.80 (s, 3 H, H-14), 1.75-1.70 (m, 1 H, 1.67 (s, 3 H, H-15), 1.63-1.58 (m, 1 H, H-6), 1.53-1.47 (m, 1 H, H-6) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{ClNaO}_{11}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 655.1922; found 655.1912.

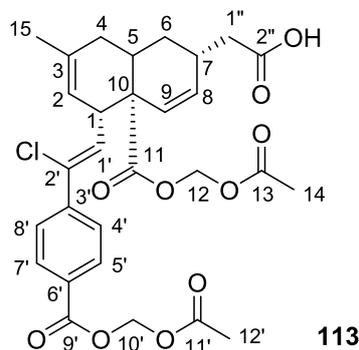
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak = $5.90 \pm 0.13 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = $1.67 \pm 0.46 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim = $1.59 \pm 0.27 \mu\text{M}$

2-((2*R*,4*aR*,5*S*)-4a-((acetoxymethoxy)carbonyl)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-1,2,4a,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl)acetic acid **113 (AAS311-F1):**



Preparation: A fresh solution of sodium phosphate buffer (40 mL, pH ~6.5) consisting of a 1:1 solution of NaH₂PO₄ (20 mL, 0.67 M, 1.608 g) and Na₂HPO₄ (20 mL, 0.67 M, 1.902 g) was prepared. A mixture of the alcohol **111** (60 mg, 0.1 mmol, 1 eq), TEMPO **105** (1.25 mg, 0.008 mmol, 0.07 eq), and sodium phosphate buffer (0.4 mL, 0.67 M, 2.5 eq) in ACN (0.4 mL) was heated to 35 °C. Solutions of NaClO₂ (36 mg, 0.4 mmol, 4 eq) in H₂O (0.06 mL) and bleach (0.12 mL, 2.6% wt) were added simultaneously. The reaction was monitored by TLC. Upon completion, the reaction mixture was quenched by the slow addition of solution of sodium sulphite (69 mg, 0.5 mmol, 5 eq) in H₂O (1 mL) at 0 °C. After addition of HCl 1 M, the product was extracted with MTBE (3 X 2 mL). The organic phases were combined, washed with H₂O, brine, dried (MgSO₄), and concentrated to provide the product. The product was purified on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 → 5:5 to afford the carboxylic acid as a white oil (41.3 mg, 0.072 mmol, **70%**).

Analysis: $R_f = 0.52$ (heptane/EtOAc/AcOH 40:59:1); $[\alpha]_D^{20} = -91.6^\circ$ (c 1, MeOH); IR: ν 2919, 1735, 1606, 1408, 1211, 1095, 1010, 847, 768, 606 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.18 (d, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.73 (dd, $J = 10.1, 2.8$ Hz, 1 H, H-8), 5.67 (dd, $J = 19.5, 5.5$ Hz, 2 H, H-12), 5.62 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H, H-9), 5.25-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.70-3.65 (m, 1 H, H-1), 2.80-2.74 (m, 1 H, H-5), 2.73-2.64 (m, 1 H, H-7), 2.29 (dd, $J = 16.2, 6.9$ Hz, 1 H, H-1''), 2.20 (dd, $J = 16.2, 6.9$ Hz, 1 H, H-1''), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.10-2.07 (m, 1 H, H-4), 1.98-1.94 (m, 1 H, H-4), 1.92-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.80 (s, 3 H, H-14), 1.77-1.70 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (150 MHz, methanol-*d*₄): δ 176.6 (C-2''), 174.5 (C-11), 171.3 (C-13), 171.0 (C-11'), 165.9 (C-9'), 144.2 (C-3'), 137.2 (C-8), 134.0 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.2 (2 C, C-5', C-7'), 130.6 (C-9), 130.5 (C-6'), 130.4 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 117.9 (C-2), 81.1 (C-12), 80.4 (C-10'), 49.4 (C-10), 46.1 (C-1), 41.5 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.7 (C-5), 30.9 (C-7), 30.5 (C-4), 30.5 (C-14), 23.6 (C-15), 20.7 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₂₉H₃₁ClNaO₉⁺ [M+Na]⁺ 597.1503; found 597.1512.

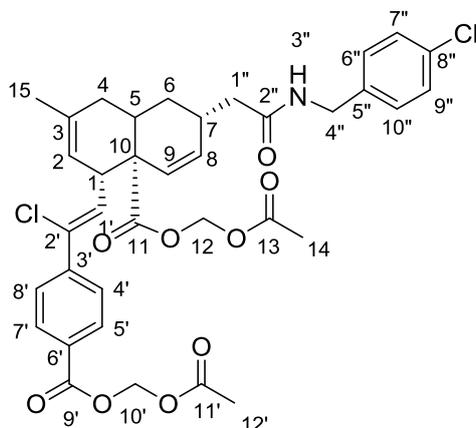
Biological Activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak = 15.63 ± 1.71 μM

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 3.55 ± 0.94 μM

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim = 1.82 ± 0.92 μM

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate (AAS322-F1):



Preparation: To a solution of carboxylic acid **113** (12 mg, 0.02 mmol, 1 eq), amine **96** (4 μ L, 0.032 mmol, 1.6 eq), and HAUT **107** (12.2 mg, 0.032 mmol, 1.6 eq) in dry DCM was added N,N-diisopropylethylamine (7 μ L, 0.04 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. The amide was then extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 8:2 \rightarrow 5:5 to obtain the amide (6.4 mg, 0.01 mmol, **50%**).

Analysis: $R_f = 0.39$ (heptane/EtOAc 4:6); $[\alpha]_D^{20} = -102.3^\circ$ (c 0.4, MeOH); IR: ν 3293, 2925, 1738, 1646, 1534, 1408, 1273, 1186, 1093, 979, 843, 769, 701 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.04 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.19 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.70 (dd, $J = 9.4, 2.7$ Hz, 1 H, H-8), 5.64 (dd, $J = 35.1, 5.8$ Hz, 2 H, H-12), 5.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, H-9), 5.26-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.35 (d, $J = 3.6$ Hz, 2 H, H-4''), 3.72-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.86-2.79 (m, 1 H, H-5), 2.73-2.68 (m, 1 H, H-7), 2.29-2.23 (m, 1 H, H-1''), 2.16-2.11 (m, 1 H, H-1'), 2.10-2.07 (m, 1 H, H-4), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 1.96-1.93 (m, 1 H, H-4), 1.87-1.82 (m, 1 H, H-6), 1.78 (s, 3 H, H-14), 1.75-1.70 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 174.5 (C-2''), 174.4 (C-11), 171.3 (C-13), 169.8 (C-11'), 167.3 (C-9'), 144.3 (C-3'), 139.1 (C-8''), 137.2 (C-8), 134.0 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.2 (2 C, C-5', C-7'), 130.6 (C-6'), 130.5, (C-5''), 130.4 (2 C, C-6'', C-10''), 129.7 (2 C, C-7'', C-9''), 128.1 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 127.8 (C-9), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.4 (C-10'), 49.9 (C-10), 46.1 (C-1), 43.6 (C-4''), 43.2 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.6 (C-5), 31.2 (C-7), 30.0 (C-4), 23.7 (C-14), 23.6 (C-15), 20.7 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₆H₃₈Cl₂NO₉⁺ [M+H]⁺ 698.1924; found 698.1954.

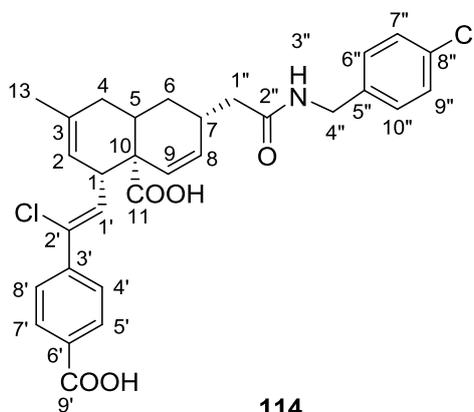
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD Bcl-xL/Bak} = 20.73 \pm 0.55 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Mcl-1/Bid} = 6.83 \pm 0.41 \mu\text{M}$

$K_i \pm \text{SD Bcl-2/Bim} > 23 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-((4-chlorobenzyl)amino)-2-oxoethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid 114 (AAS306-F3):



Preparation: To a solution of the disubstituted amide (50 mg, 0.086 mmol, 1 eq) in THF was added KOTMS (55 mg, 0.43 mmol, 5 eq). The reaction was stirred at reflux and monitored by TLC. Upon completion, MTBE was added, and the mixture was washed with HCl 1 N, the crude product was then extracted using MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The diacid was purified by column chromatography on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc/Et₃N 80:19:1 → 50:49:1 to obtain a white solid (6.6 mg, 0.019 mmol, **22%**).

Analysis: $R_f = 0.41$ (heptane/EtOAc/AcOH 30:69:1); $[\alpha]_D^{20} = -80.8^\circ$ (c 0.5, MeOH); IR: ν 2922, 1694, 1539, 1408, 1231, 1178, 1093, 1015, 798, 681 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.20 (d, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H-1'), 5.65 (dd, $J = 18.5, 10.4$ Hz, 2 H, H-8, H9), 5.27-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.35 (d, $J = 5.8$ Hz, 2 H, H-4''), 3.72-3.65 (m, 1 H, H-1), 2.86-2.77 (m, 1 H, H-5), 2.68-2.61 (m, 1 H, H-7), 2.30-2.22 (m, 1 H, H-1''), 2.18-2.12 (m, 1 H, H-1''), 2.13-2.06 (m, 1 H, H-4), 1.96-1.88 (m, 1 H, H-4), 1.86-1.79 (m, 1 H, H-6), 1.76-1.70 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 178.1 (C-2''), 174.6 (C-11), 169.7 (C-9'), 143.6 (C-3'), 139.0 (C-8''), 136.7 (C-8), 134.0 (C-2'), 132.7 (C-3), 132.5 (C-1'), 132.1 (C-9), 130.9 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-6'), 130.6, (C-5''), 130.4 (2 C, C-6'', C-10''), 129.7 (2 C, C-7'', C-9''), 127.6 (2 C, C-4', C-8'), 118.4 (C-2), 49.9 (C-10), 46.4 (C-1), 43.5 (C-4''), 43.4 (C-1''), 32.9 (C-6), 32.0 (C-5), 31.3 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₂₈Cl₂NO₅⁻ [M-H]⁻ 552.1345; found 552.1366.

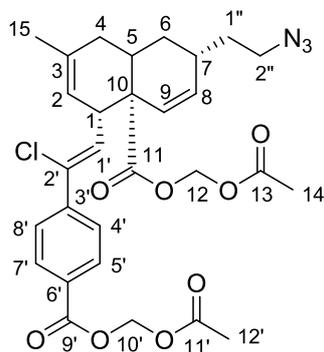
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = 14.1 ± 0.4 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 3.6 ± 1.1 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Acetoxymethyl (2R,4aR,5S)-5-((Z)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-azidoethyl)-7-methyl-1,5,8,8a-tetrahydronaphthalene-4a(2H)-carboxylate **122 (AAS310-F2):**



122

Preparation: A solution of the alcohol **111** (20 mg, 0.036 mmol, 1 eq), triphenylphosphine (19 mg, 0.072 mmol, 2 eq), diisopropylazidocarboxylate (DIAD) **120** (14.2 μ L, 0.072 mmol, 2 eq), and diphenylphosphoryl azide (DPPA) **121** (16 μ L, 0.072 mmol, 2 eq) in THF was stirred at room temperature for 48 h. The solvent was removed by rotary evaporation under reduced pressure, and the residue was purified by flash column chromatography (heptane/EtOAc 100:0 \rightarrow 4:6) to afford the corresponding azide product as a transparent oil (15.4 mg, 0.026 mmol, **72%**).

Analysis: R_f = 0.33 (heptane/EtOAc 6:4); $[\alpha]_D^{20}$ = -93.5 $^\circ$ (c 0.2, MeOH); IR: ν 3452, 3334, 2973, 2885, 2099, 1744, 1379, 1274, 1045, 879, 636 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.03 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.68 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.17 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.72 (dd, J = 9.9, 2.9 Hz, 1 H, H-8), 5.65 (dd, J = 10.1, 5.7 Hz, 2 H, H-12), 5.61 (d, J = 10.1 Hz, 1 H, H-9), 5.27-5.23 (m, 1 H, H-2), 3.71-3.63 (m, 1 H, H-1), 3.37-3.32 (m, 2 H, H-2''), 2.74-2.63 (m, 1 H, H-5), 2.51-2.43 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.08 (dd, J = 17.9, 6.6 Hz, 1 H, H-1''), 1.95 (dd, J = 17.9, 6.6 Hz, 1 H, H-1''), 1.88-1.83 (m, 1 H, H-4), 1.80 (s, 3 H, H-14), 1.74-1.69 (m, 1 H, H-4), 1.67 (s, 3 H, H-15), 1.66-1.61 (m, 1 H, H-6), 1.55-1.48 (m, 1 H, H-6) ppm; ^{13}C NMR (125

MHz, methanol- d_4): δ 174.6 (C-11), 171.3 (C-13), 171.0 (C-11'), 165.9 (C-9'), 144.3 (C-3'), 137.3 (C-8), 134.4 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.2 (2 C, C-5', C-7'), 130.6 (C-9), 130.5 (C-6'), 130.3 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.4 (C-10'), 70.8 (C-2''), 50.0 (C-10), 46.2 (C-1), 35.9 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.5 (C-5), 30.7 (C-7), 30.1 (C-4), 23.6 (C-15), 22.1 (C-14), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{ClNaN}_3\text{O}_8^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 608.1776; found 608.1803.

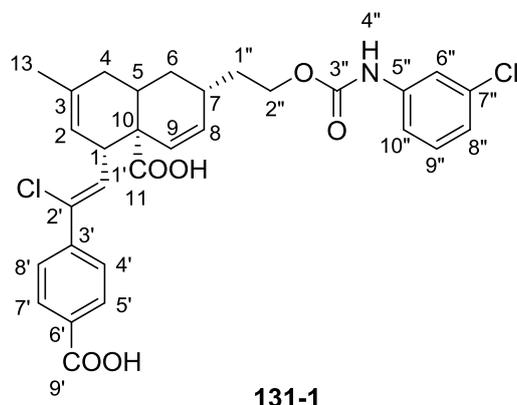
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak = 5.31 ± 0.07 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = 2.25 ± 1.42 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim = 1.45 ± 0.26 μM

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(((3-chlorophenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-1 (SD434):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (113 mg, 0.20 mmol, **83%**).

Analysis: $R_f = 0.3$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -203.6^\circ$ (c 0.5, acetone); IR: ν 3306, 2926, 1693, 1531, 1405, 1307, 1217, 1092, 826, 771, 681 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-d₆): δ 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 8.69 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.64 (s, 1 H, H-6''), 7.36 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-10''), 7.28 (t, J = 8.4 Hz, 1 H, H-9''), 7.05 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H-8''), 6.25 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.77 (dd, J = 10.0, 2.5 Hz, 1 H, H-8), 5.72 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, H-9), 5.34-5.29 (m, 1 H, H-2), 4.33-4.21 (m, 2 H, H-2''), 3.77-3.71 (m, 1 H, H-1), 2.74-2.67 (m, 1 H, H-5), 2.60-2.53 (m, 1 H, H-7), 2.13 (dd, J = 19.3, 8.4 Hz, 1 H, H-1''), 2.02-1.90 (m, 2 H, H-6), 1.87-1.78 (m, 2 H, H-4), 1.72 (s, 3 H, H-13), 1.70-1.63 (m, 1 H, H-1'') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₃₀Cl₂NO₆⁺ [M+H]⁺ 570.1445; found 570.1450.

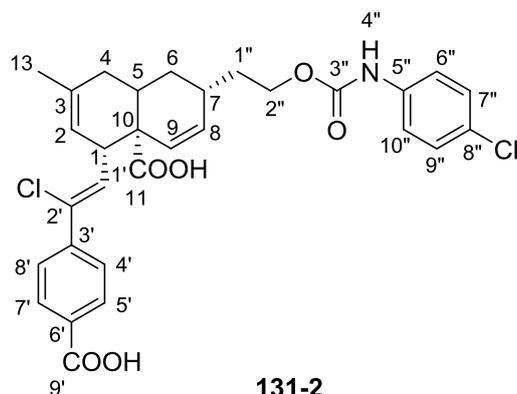
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $3.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(((4-chlorophenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-2 (SD433):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (118 mg, 0.21 mmol, **86%**).

Analysis: $R_f = 0.3$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -217.8^\circ$ (c 0.5, acetone); IR: ν 3300, 2926, 2647, 1692, 1529, 1404, 1280, 1201, 1091, 825, 771, 681 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ 8.80-8.72 (brs, 1 H, H-4''), 8.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.31 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.32 (d, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H-1), 5.74 (dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, 1 H, H-8), 5.68 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-9), 5.31-5.26 (m, 1 H, H-2), 4.29-4.16 (m, 2 H, H-2''), 3.75-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.75-2.68 (m, 1 H, H-5), 2.55-2.46 (m, 1 H), 2.13-2.03 (m, 1 H, H-7), 1.97-1.88 (m, 2 H, H-1''), 1.87-1.80 (m, 2 H, H-4), 1.78-1.71 (m, 1 H, H-6), 1.65 (s, 3 H, H-13), 1.64-1.57 (m, 1 H, H-6) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆): δ 175.7 (C-11), 167.1 (C-9'), 154.4 (C-3''), 142.9 (C-3'), 139.2 (C-8''), 136.4 (C-8), 133.1 (C-2'), 131.6 (C-3), 131.3 (C-6'), 131.1 (C-5''), 130.9 (C-1''), 130.6 (C-9), 130.5 (2C, C-7'', C-9''), 129.5 (2C, C-5', C-7'), 127.3 (2C, C-4', C-8'), 120.6 (2C, C-6'', C-10''), 117.9 (C-2), 63.5 (C-2''), 48.6 (C-10), 45.8 (C-1), 36.0 (C-1''), 32.4 (C-6), 31.6 (C-5), 29.8 (C-7), 29.5 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₃₀Cl₂NO₆⁺ [M+H]⁺ 570.1445; found 570.1450.

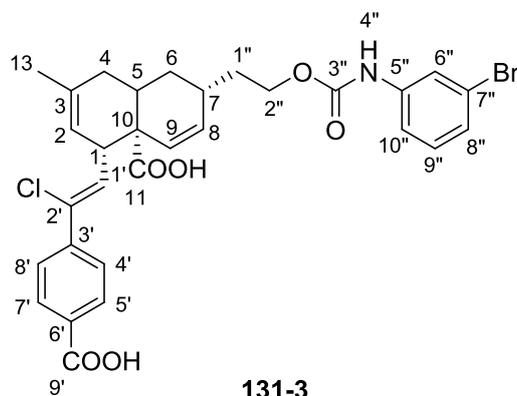
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $4.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = $1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-2-(2-(((3-bromophenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-3 (SD438):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (68 mg, 0.11 mmol, **92%**).

Analysis: $R_f = 0.25$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -108.8^\circ$ (c 0.5, acetone); IR: ν 3177, 2928, 1742, 1712, 1521, 1206, 1174, 1057, 754, 672 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, acetone-d₆): δ 8.84-8.76 (brs, 1 H, H-4''), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.90 (s, 1 H, H-6''), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H-10''), 7.24 (t, J = 8.1 Hz, 1 H, H-9''), 7.18 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H-8''), 6.32 (d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1'), 5.74 (dd, J = 10.0, 2.5 Hz, 1H, H-8), 5.68 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-9), 5.32-5.25 (m, 1 H, H-2), 4.29-4.16 (m, 2 H, H-2''), 3.79-3.66 (m, 1 H, H-1), 2.75-2.68 (m, 1 H, H-5), 2.55-2.46 (m, 1 H, H-7), 2.13-2.06 (m, 1 H, H-1''), 1.97-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.89-1.81 (m, 2 H, H-4), 1.80-1.71 (m, 1 H, H-6), 1.65 (s, 3 H, H-13), 1.64-1.57 (m, 1 H, H-1'') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, acetone-d₆): δ 175.7 (C-11), 167.1 (C-9'), 154.3 (C-3''), 142.9 (C-3'), 142.0 (C-8), 136.4 (C-2'), 133.1 (C-3), 131.6 (C-7''), 131.4 (C-6''), 131.3 (C-6'), 131.0 (C-5''), 130.7 (C-1'), 130.5 (2C, C-5', C-7'), 127.3 (2C, C-4', C-8'), 126.1 (C-9), 122.9 (C-8''), 121.7 (C-9''), 117.9 (C-10''), 117.8 (C-2), 63.6 (C-2''), 48.6 (C-10), 45.8 (C-1), 35.9 (C-1''), 32.4 (C-6), 31.6 (C-5), 29.8 (C-4), 29.5 (C-7), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₃₀ClBrNO₆⁺ [M+H]⁺ 614.0940; found 614.0936.

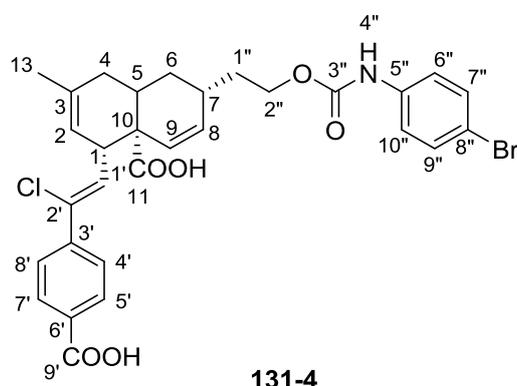
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $0.8 \pm 0.02 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $0.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-2-(2-(((4-bromophenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-4 (SD437):**



131-4

Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (58 mg, 0.09 mmol, **79%**).

Analysis: $R_f = 0.25$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -71.1^\circ$ (c 0.5, acetone); IR: ν 3163, 2924, 1701, 1667, 1520, 1399, 1199, 1074, 788, 739 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ 8.79-8.73 (brs, 1 H, H-4''), 8.03 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.32 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.73 (dd, J = 10.0, 2.5 Hz, 1 H, H-8), 5.68 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, H-9), 5.31-5.26 (m, 1 H, H-2), 4.29-4.15 (m, 2 H, H-2''), 3.77-3.71 (m, 1 H, H-1), 2.75-2.67 (m, 1 H, H-5), 2.55-2.46 (m, 1 H, H-7), 2.13-2.07 (m, 1 H, H-1''), 1.97-1.89 (m, 1 H, H-6), 1.88-1.80 (m, 2 H, H-4), 1.78-1.71 (m, 1 H, H-6), 1.65 (s, 3 H, H-13), 1.63-1.57 (m, 1 H, H-1'') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆): δ 175.6 (C-11), 167.1 (C-9'), 154.4 (C-3''), 143.0 (C-3'), 139.7 (C-8''), 136.4 (C-8), 133.1 (C-2'), 132.5 (2C, C-7'', C-9''), 131.6 (C-3), 131.4 (C-6'), 131.0 (C-5''), 130.6 (C-1'), 130.5 (2C, C-5', C-7'), 127.3 (2C, C-4', C-8'), 120.9 (2C, C-6'', C-10''), 117.9 (C-9), 115.2 (C-2), 63.5 (C-2''), 48.6 (C-10), 45.8 (C-1), 36.0 (C-1''), 32.4 (C-6), 31.6 (C-5), 29.8 (C-7), 29.5 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₀H₃₀ClBrNO₆⁺ [M+H]⁺ 614.0940; found 614.0938.

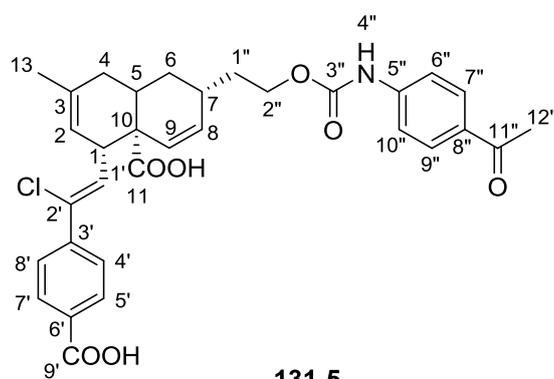
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $2.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $0.5 \pm 0.03 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = $0.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-2-(2-(((4-acetylphenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-5 (SD435):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (63 mg, 0.11 mmol, **91%**).

Analysis: $R_f = 0.1$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -154.0^\circ$ (c 0.5, acetone); IR: ν 3307, 2922, 1710, 1531, 1407, 1269, 1221, 1048, 828, 769 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ 9.05-8.98 (brs, 1 H, H-4''), 8.05 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.96 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.74-7.69 (m, 4 H, H-6'', H-7'', H-9'', H-10''), 6.34 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.76 (dd, J = 10.0, 2.5 Hz, 1 H, H-8), 5.70 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, H-9), 5.33-5.28 (m, 1 H, H-2), 4.33-4.21 (m, 2 H, H-2''), 3.78-3.71 (m, 1 H, H-1), 2.77-2.70 (m, 1 H, H-5), 2.55 (s, 3 H, H-12''), 2.54-2.46 (m, 1 H, H-7), 2.16-2.08 (m, 1 H, H-1''), 1.98-1.91 (m, 1 H, H-6), 1.90-1.82 (m, 2 H, H-4), 1.81-1.77 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-13), 1.66-1.61 (m, 1 H, H-1'') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆): δ 196.5 (C-11''), 175.6 (C-11), 167.1 (C-9'), 154.3 (C-3''), 144.6 (C-3'), 142.9 (C-8''), 136.4 (C-8), 133.1 (C-2'), 132.6 (C-3), 131.6 (C-6'), 131.1 (C-5''), 130.7 (C-1'), 130.6 (2C, C-7'', C-9''), 130.4 (2C, C-5', C-7'), 127.3 (2C, C-4', C-8'), 118.5 (C-9), 118.3 (2C, C-6'', C-10''), 117.9 (C-2), 63.7 (C-2''), 48.6 (C-10), 45.8 (C-1), 35.9 (C-1'), 32.5 (C-6), 31.7 (C-5), 29.8 (C-12''), 29.5 (C-7), 26.4 (C-4), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₂H₃₃ClO₇N⁺ [M+H]⁺ 578.1946; found 578.1951.

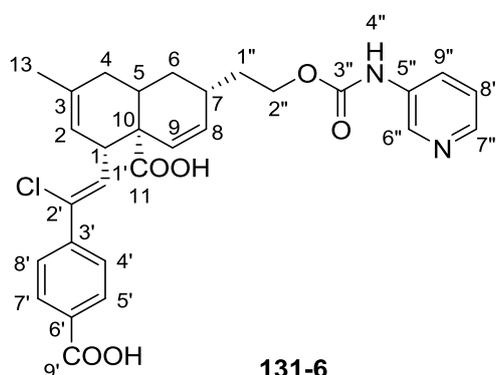
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = 1.91 ± 0.03 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 1.52 ± 2.10 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = 2.93 ± 0.40 μ M

(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-((pyridin-3-ylcarbamoyl)oxy)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **131-6 (SD439):**



Preparation: To a solution of alcohol **37** (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in dichloromethane at 0 °C was added triethylamine (50 mL, 0.36 mmol, 3 eq) followed by the isocyanate **130** (23 mg, 0.14 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was allowed to room temperature overnight. It was then acidified using HCl 1 N, and the product was extracted using MTBE (3 times). The organic phase was dried over MgSO₄, concentrated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1 to afford the carbamate as a white solid (58 mg, 0.11 mmol, **90%**).

Analysis: $R_f = 0.25$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 97:2:1); $[\alpha]_D^{20} = -172.7^\circ$ (*c* 0.5, acetone); IR: ν 3256, 2922, 2514, 1697, 1543, 1315, 1222, 1039, 770, 699 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₆): δ 8.64-8.58 (brs, 1 H, H-6''), 8.18 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H, H-7''), 8.02-7.96 (m, 3 H, H-4', H-8', H-9''), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.36 (dd, *J* = 9.1, 4.5 Hz, 1 H, H-8''), 6.19 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, H-1'), 5.72 (dd, *J* = 10.1, 2.5 Hz, 1 H, H-8), 5.66 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, H-9), 5.29-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.31-4.17 (m, 2 H, H-2''), 3.74-3.65 (m, 1 H, H-1), 2.71-2.62 (m, 1 H, H-5), 2.57-2.44 (m, 1 H, H-7), 2.09 (dd, *J* = 17.9, 8.9 Hz, 1 H, H-1''), 1.98-1.85 (m, 2 H, H-4), 1.83-1.74 (m, 2 H, H-6), 1.66 (s, 3 H, H-13), 1.65-1.59 (m, 1 H, H-1'') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆): δ 178.1 (C-11), 169.4 (C-9'), 155.7 (C-3''), 143.9 (C-3'), 143.6 (C-8), 140.6 (C-2'), 138.0 (C-3), 136.7 (C-7''), 133.2 (C-6''), 132.4 (C-6'), 132.1 (C-5''), 131.5 (C-1'), 130.8 (2C, C-5', C-7'), 130.7 (C-9), 127.6 (C-8''), 127.5 (2C, C-4', C-8'), 125.3 (C-9''), 118.3 (C-2), 64.3 (C-2''), 46.3 (C-10), 36.2 (C-1), 32.8 (C-1''), 32.0 (C-6), 30.3 (C-5), 30.1 (C-4), 27.2 (C-7), 23.5 (C-13) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₉H₃₀ClN₂O₆⁺ [M+H]⁺ 537.1787; found 537.1794.

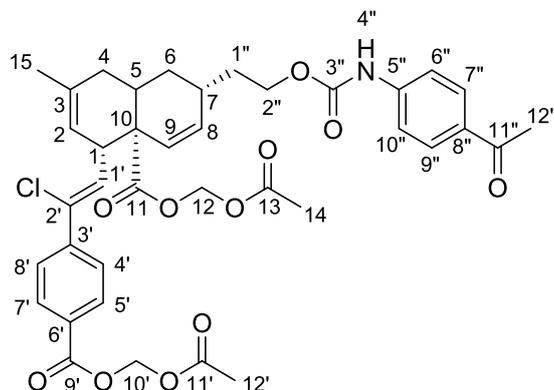
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = $8.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = $5.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Acetoxymethyl(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(((4-acetylphenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate (AAS324):



Preparation: The carbamate diacid **131-5** (5 mg, 0.008 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF. Potassium carbonate (1.92 mg, 0.019 mmol, 2.2 eq) was added to the solution and the suspension was stirred during 2-3 min after which bromomethyl acetate (1.86 μ L, 0.019 mmol, 2.2 eq) was added. After stirring at room temperature during 24 h, dichloromethane was added to the mixture and the resulting organic phase was acidified using HCl 1 N. The organic phase was dried over MgSO₄ and the residue was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 10:0 \rightarrow 5:5 to obtain the diester as a yellow solid (5.3 mg, 0.007 mmol, **92%**).

Analysis: R_f = 0.52 (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -11.3° (*c* 0.08, MeOH); IR: ν 3355, 2975, 2924, 1643, 1536, 1453, 1411, 1381, 1274, 1086, 878 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 6.18 (d, *J* = 9.8 Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.78 (dd, *J* = 9.8, 2.9 Hz, 1 H, H-8), 5.66 (dd, *J* = 24.3, 6.6 Hz, 2 H, H-12), 5.62-5.60 (m, 1 H, H-9), 5.27-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.27-4.17 (m, 2 H, H-2''), 3.71-3.66 (m, 1 H, H-1), 2.99 (s, 3 H, H-12''), 2.75-2.69 (m, 1 H, H-5), 2.56 (s, 3 H, H-12'), 2.11 (s, 3 H, H-14), 1.98-1.92 (m, 1 H, H-7), 1.91-1.89 (m, 1 H, H-1''), 1.82-1.78 (m, 4 H, H-4, H-6), 1.78-1.74 (m, 1 H, H-1''), 1.66 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 182.8 (C-11''), 174.7 (C-11), 171.4 (C-13), 169.4 (C-11'), 168.2 (C-9'), 164.2 (C-3''), 144.3 (C-3'), 139.4 (C-8''), 137.3 (C-8), 133.1 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.2 (2 C, C-7'', C-9''), 131.0 (2 C, C-5', C-7'), 130.6 (C-6'), 130.2, (C-5''), 128.1 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 126.5 (C-9), 118.8 (2 C, C-6'', C-10''), 117.8 (C-2), 81.2 (C-12), 80.4 (C-10'), 64.1 (C-2''), 49.8 (C-10), 46.2 (C-1), 36.1 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.7 (C-5), 30.9 (C-12''), 30.4 (C-14), 30.1 (C-7), 26.6 (C-4), 23.6 (C-15), 20.7 (C-12') ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₈H₄₁ClO₁₁N⁺ [M+H]⁺ 722.2368; found 722.2402.

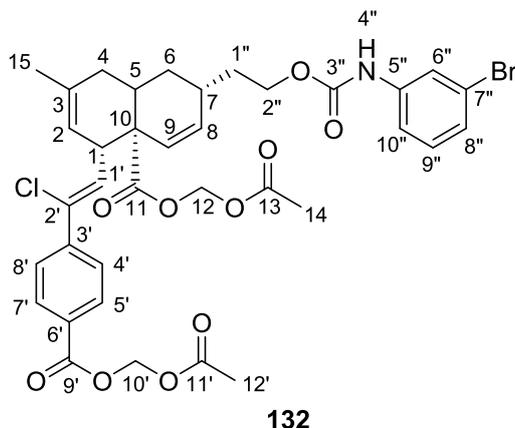
Biological activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak = 14.85 \pm 1.38 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 6.58 \pm 0.41 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim = 1.74 \pm 0.71 μ M

Acetoxymethyl(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(((3-bromophenyl)carbamoyl)oxy)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **132 (AAS325-B):**



Preparation: The carbamate diacid **131-3** (5 mg, 0.008 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF. Potassium carbonate (1.78 mg, 0.017 mmol, 2.2 eq) was added to the solution and the suspension was stirred during 2-3 min after which bromomethyl acetate (1.66 μ L, 0.017 mmol, 2.2 eq) was added. After stirring at room temperature during 24 h, dichloromethane was added to the mixture and the resulting organic phase was acidified using HCl 1 N. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and the residue was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 10:1 \rightarrow 5:5 to obtain the diester as a transparent oil (5.3 mg, 0.007 mmol, **87%**).

Analysis: $R_f = 0.71$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -11.9^\circ$ (c 0.7, MeOH); IR: ν 3344, 2974, 2897, 1736, 1646, 1533, 1422, 1378, 1275, 1218, 1087, 1013, 879, 769 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ 8.69-8.64 (brs, 1 H, H-4''), 8.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.91 (s, 1 H, H-6''), 7.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, H-10''), 7.25 (t, 1 H, H-9''), 7.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, H-8''), 6.29 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, H-1'), 5.98 (s, 2 H, H-10'), 5.77 (dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, 1 H, H-8), 5.68 (dd, $J = 20.5, 5.7$ Hz, 2 H, H-12), 5.62 (dt, $J = 10.3, 1$ Hz, H-9), 5.28-5.25 (m, 1 H, H-2), 4.25-4.15 (m, 2 H, H-2''), 3.71-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.78-2.71 (m, 1 H, H-5), 2.56-2.48 (m, 1 H, H-7), 2.10 (s, 3 H, H-12'), 1.97-1.92 (m, 1 H, H-1''), 1.92-1.83 (m, 2 H, H-4), 1.82 (s, 3 H, H-14), 1.79-1.72 (m, 2 H, H-6), 1.65 (s, 3 H, H-15), 1.62-1.53 (m, 1 H, H-1'') ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 174.7 (C-11), 171.1 (C-13), 166.5 (C-11'), 165.9 (C-9'), 162.3 (C-3''), 144.3 (C-3'), 142.1 (C-8), 137.3 (C-2'), 134.6 (C-3), 132.7 (C-7''), 131.5 (C-6''), 131.2 (2 C, C-5', C-7'), 130.6 (C-6'), 130.5 (C-5''), 130.2, (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 126.8 (C-9), 123.6 (C-8''), 122.5 (C-9''), 118.3 (C-10''), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.4 (C-10'), 64.0 (C-2''), 49.8 (C-10), 46.2 (C-1), 36.2 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.7 (C-5), 30.4 (C-14), 30.1 (C-4), 23.6 (C-7), 23.1 (C-15), 20.7 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $C_{36}H_{37}ClO_{10}NNaBr^+$ $[M+Na]^+$ 780.1187; found 780.1213.

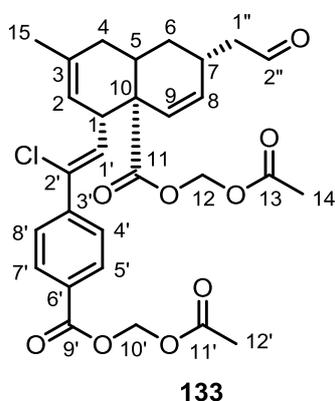
Biological activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 7.41 \pm 1.32 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

Acetoxymethyl (2R,4aR,5S)-5-((Z)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-oxoethyl)-1,5,8,8a-tetrahydronaphthalene-4a(2H)-carboxylate 133 (AAS315-B):



Preparation: To a solution of alcohol **111** (30 mg, 0.05 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 was added Dess-Martin periodinane **90** (63.6 mg, 0.15 mmol, 3 eq). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 6 h. Water and MTBE were added, and the organic phase was washed with a saturated solution of Na_2CO_3 (2 times). The organic solvents were dried over MgSO_4 , concentrated under reduced pressure, and the crude product was purified on silica gel using a gradient of heptane/EtOAc 80:20 \rightarrow 50:50 to afford the aldehyde as a yellow solid (32 mg, 0.5 mmol, **99%**).

Analysis: $R_f = 0.64$ (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20} = -200.0^\circ$ (c 0.002, MeOH); IR: ν 3324, 2973, 2882, 1455, 1379, 1274, 1087, 1045, 880, 630 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 9.68 (t, $J = 1.7$ Hz, 1 H, H-2''), 8.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.18 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.71 (dd, $J = 9.7, 2.9$ Hz, 1 H, H-8), 5.68-5.64 (m, 2 H, H-12), 5.64-5.61 (m, 1 H, H-9), 5.27-5.22 (m, 1 H, H-2), 3.72-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.95-2.87 (m, 1 H, H-5), 2.73-2.66 (m, 1 H, H-7), 2.50-2.38 (m, 2 H, H-1''), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.01-1.95 (m, 1 H, H-4), 1.95-1.91 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.87 (m, 1 H, H-6), 1.82 (s, 3 H, H-14), 1.75-1.70 (m, 1 H, H-6), 1.67 (s, 3 H, H-15) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 174.7 (C-11), 171.3 (C-13), 171.1 (C-11'), 165.9 (C-9'), 144.3 (C-3'), 137.5 (C-8), 135.1 (C-2'), 132.6 (C-3), 131.1 (2 C, C-5', C-7'), 130.7 (C-9), 130.5 (C-6'), 129.6 (C-1'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 117.8 (C-2), 98.1 (C-2''), 81.1 (C-12), 80.3 (C-10'), 46.2 (C-10), 44.3 (C-1), 32.2 (C-1''), 32.7 (C-6), 32.2 (C-14), 30.9 (C-5), 30.1 (C-7), 29.8 (C-4), 23.6 (C-15), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{ClNaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 581.1554; found 583.1556.

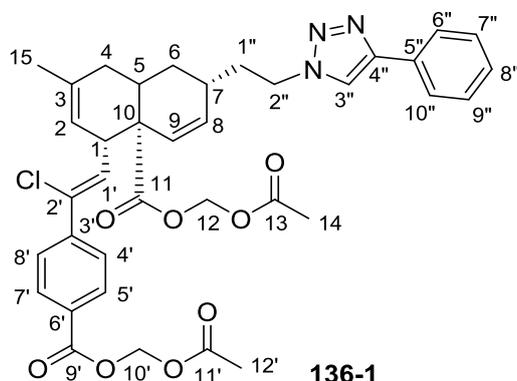
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = 2.99 ± 0.60 μM

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μM

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **136-1 (AAS312-F1):**



Preparation: Copper(II) sulfate (0.05 mg, 0.0002 mmol, 0.01 eq) was added to a solution of the azide **122** (10 mg, 0.02 mmol, 1 eq), and the alkyne **135** (9.9 μ L, 0.09 mmol, 4.5 eq) in a mixture of *tert*-butanol/water (2:1), and a fivefold excess of benzoic acid (0.12 mg, 0.001 mmol, 0.05 eq). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. Upon completion, water was added and the triazole was extracted with MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the final product, which was then purified by flash chromatography using a gradient of heptane/EtOAc 100:0 \rightarrow 6:4 to give the pure triazole (7 mg, 0.01 mmol, **50%**).

Analysis: R_f = 0.38 (heptane/EtOAc 6:4); $[\alpha]_D^{20}$ = -40.0 ° (*c* 0.05, MeOH); IR: ν 2923, 2098, 1737, 1606, 1450, 1368, 1274, 1168, 1010, 766, 694, 605 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.35 (s, 1 H, H-3''), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.82 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H-8''), 6.19 (d, *J* = 10.1 Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.77 (dd, *J* = 10.1, 3.0 Hz, 1 H, H-8), 5.68 (s, 2 H, H-12), 5.65 (d, *J* = 9.9 Hz, 1 H, H-9), 5.27-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, H-2''), 3.73-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.77-2.70 (m, 1 H, H-5), 2.44-2.37 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.08-2.06 (m, 1 H, H-1''), 2.05-2.02 (m, 1 H, H-1''), 1.97-1.94 (m, 1 H, H-4), 1.93-1.92 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.85-1.81 (m, 1 H, H-6), 1.79 (s, 3 H, H-14), 1.65 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 174.5 (C-11), 171.3 (C-13), 171.0 (C-11'), 165.9 (C-9'), 149.1 (C-4''), 144.2 (C-3'), 137.3 (C-8), 133.9 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.8 (C-5''), 131.1 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-9), 130.5 (C-6'), 130.1 (2 C, C-4', C-8'), 129.5 (C-1'), 127.9 (2 C, C-7'', C-9''), 127.2 (C-8''), 126.8 (2 C, C-6'', C-10''), 122.3 (C-3''), 117.8 (C-2), 82.7 (C-2''), 81.1 (C-12), 80.5 (C-10'), 49.2 (C-10), 46.2 (C-1), 37.5 (C-1''), 32.7 (C-6), 31.4 (C-5), 30.1 (C-7), 29.3 (C-4), 29.2 (C-14), 23.9 (C-15), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₇H₃₉ClN₃O₈⁺ [M+H]⁺ 688.2354; found 688.2385.

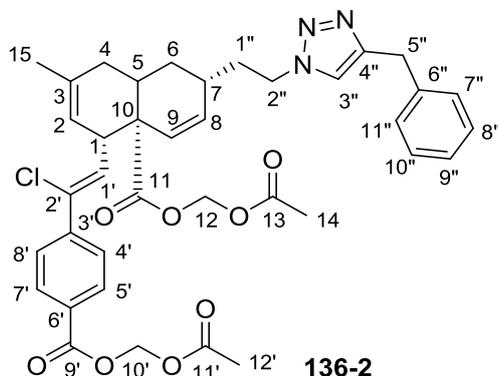
Biological Activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak = 16.46 \pm 1.92 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 13.67 \pm 5.02 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim = 2.58 \pm 0.01 μ M

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-2-(2-(4-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **136-2 (AAS343-P):**



Preparation: Copper(II) sulfate (0.04 mg, 0.00017 mmol, 0.01 eq) was added to a solution of the azide **122** (10 mg, 0.017 mmol, 1 eq), and the alkyne **135** (9.6 μ L, 0.08 mmol, 4.5 eq) in a mixture of *tert*-butanol/water (2:1), and a fivefold excess of benzoic acid (0.1 mg, 0.0009 mmol, 0.05 eq). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. Upon completion, water was added and the triazole was extracted with MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the final product, which was then purified by flash chromatography using a gradient of heptane/EtOAc 100:0 \rightarrow 6:4 to give the pure triazole as a light yellow oil (4.5 mg, 0.006 mmol, **38%**).

Analysis: R_f = 0.45 (heptane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -38.9 ° (c 0.8, MeOH); IR: ν 3329, 2974, 2883, 1654, 1454, 1380, 1327, 1274, 1087, 879, 803 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.67 (s, 1 H, H-3''), 8.24 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-7'', H-11''), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.67 (t, J = 3.9 Hz, 1 H, H-9''), 7.56 (t, J = 4.2 Hz, 2 H, H-8'', H-10''), 6.19 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.75 (dd, J = 9.8, 3.0 Hz, 1 H, H-8), 5.68 (s, 2 H, H-12), 5.65 (d, J = 10.5 Hz, 1 H, H-9), 5.27-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.56 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-2''), 3.73-3.67 (m, 1 H, H-1), 3.30 (s, 2 H, H-5''), 2.77-2.70 (m, 1 H, H-5), 2.47-2.38 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.08-2.06 (m, 1 H, H-1''), 2.05-2.02 (m, 1 H, H-1''), 1.97-1.94 (m, 1 H, H-4), 1.93-1.92 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.85-1.81 (m, 1 H, H-6), 1.79 (s, 3 H, H-14), 1.65 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 174.5 (C-11), 171.3 (C-13), 171.1 (C-11'), 165.9 (C-9'), 148.3 (C-4''), 144.3 (C-3'), 138.4 (C-6''), 137.3 (C-8), 134.6 (C-9''), 133.8 (C-2'), 132.8 (C-3), 131.4 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-9), 130.5 (C-6'), 131.2 (2 C, C-4', C-8'), 130.6 (C-3''), 130.3 (C-1'), 129.7 (2 C, C-8'', C-10''), 127.9 (2 C, C-7'', C-11''), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.5 (C-10'), 71.3 (C-2''), 66.6 (C-5''), 49.2 (C-10), 46.2 (C-1), 37.3 (C-1''), 32.6 (C-6), 31.3 (C-5), 30.9 (C-7), 30.7 (C-4), 30.1 (C-14), 23.6 (C-15), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for benzylic oxidation product C₃₈H₃₉ClN₃O₉⁺ [M+H]⁺ 716.2369; found 716.2358.

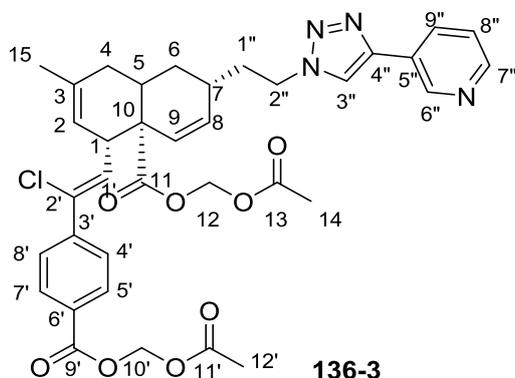
Biological Activity:

$K_i \pm$ SD Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm$ SD Mcl-1/Bid = 22.40 \pm 2.27 μ M

$K_i \pm$ SD Bcl-2/Bim > 23 μ M

Acetoxymethyl (2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)phenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-(4-(pyridin-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **136-3 (AAS344-P):**



Preparation: Copper(II) sulfate (0.04 mg, 0.00017 mmol, 0.01 eq) was added to a solution of the azide **122** (10 mg, 0.017 mmol, 1 eq), and the alkyne **135** (9.6 μ L, 0.077 mmol, 4.5 eq) in a mixture of *tert*-butanol/water (2:1), and a fivefold excess of benzoic acid (0.1 mg, 0.00085 mmol, 0.05 eq). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. Upon completion, water was added and the triazole was extracted with MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the final product, which was then purified by flash chromatography using a gradient of heptane/EtOAc/Et₃N 99:0:1 \rightarrow 60:39:1 to give the pure triazole as a yellow oil (3.5 mg, 0.0051 mmol, **30%**).

Analysis: $R_f = 0.52$ (heptane/EtOAc/Et₃N 20:79:1); $[\alpha]_D^{20} = -181.7^\circ$ (c 0.3, MeOH); IR: ν 3338, 2974, 2885, 1923, 1655, 1455, 1417, 1380, 1325, 1274, 1087, 879, cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.58 (s, 1 H, H-6''), 8.46 (s, 1 H, H-3''), 8.08 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, H-7''), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.92 (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-8''), 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H, H-9''), 6.19 (d, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H-1'), 5.97 (s, 2 H, H-10'), 5.76 (dd, $J = 10.1, 2.8$ Hz, 1 H, H-8), 5.68 (s, 2 H, H-12), 5.65 (d, $J = 10.6$ Hz, 1 H, H-9), 5.27-5.23 (m, 1 H, H-2), 4.54 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, H-2''), 3.73-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.77-2.70 (m, 1 H, H-5), 2.44-2.37 (m, 1 H, H-7), 2.11 (s, 3 H, H-12'), 2.08-2.06 (m, 1 H, H-1'), 2.05-2.02 (m, 1 H, H-1'), 1.97-1.94 (m, 1 H, H-4), 1.93-1.92 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.85-1.81 (m, 1 H, H-6), 1.79 (s, 3 H, H-14), 1.65 (s, 3 H, H-15) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 174.5 (C-11), 171.1 (C-13), 169.7 (C-11'), 165.9 (C-9'), 151.2 (C-5''), 150.6 (C-6''), 148.9 (C-6''), 144.2 (C-3'), 139.1 (C-7''), 137.3 (C-8), 133.9 (C-2'), 132.7 (C-3), 131.2 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-9), 130.5 (C-6'), 127.9 (2 C, C-4', C-8'), 127.4 (C-1'), 124.7 (C-9''), 124.3 (C-8''), 121.7 (C-3''), 117.8 (C-2), 81.1 (C-12), 80.5 (C-10'), 71.7 (C-2''), 49.2 (C-10), 46.2 (C-1), 37.5 (C-1'), 32.7 (C-6), 31.4 (C-5), 30.9 (C-7), 30.7 (C-4), 30.1 (C-14), 23.5 (C-15), 20.6 (C-12') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₆H₃₈ClN₄O₈⁺ [M+H]⁺ 689.2378; found 689.2396.

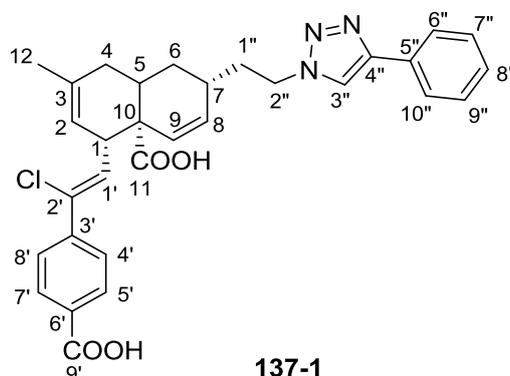
Biological Activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid > 23 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim > 23 μ M

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **137-1 (AAS323-B):**



Preparation: The ester **136-1** (2.4 mg, 0.003 mmol, 1 eq) was dissolved in dry MeOH and K₂CO₃ (2.41 mg, 0.017 mmol, 5 eq) was added. The reaction was monitored by TLC. Upon completion, HCl 1*N* was added and the product was extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford the diacid (1.7 mg, 0.003 mmol, **99%**).

Analysis: $R_f = 0.32$ (heptane/EtOAc/AcOH 40:59:1); $[\alpha]_D^{20} = -77.3^\circ$ (c 0.26, MeOH); IR: ν 3313, 2973, 2881, 1454, 1379, 1087, 879, 803 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.36 (s, 1 H, H-3''), 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.82 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H-6'', H-10''), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.44 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, H-7'', H-9''), 7.35 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, H-8''), 6.20 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, H-1'), 5.71 (dd, $J = 18.4, 8.7$ Hz, 2 H, H-8, H-9), 5.28-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H-2''), 3.73-3.67 (m, 1 H, H-1), 2.72-2.63 (m, 1 H, H-5), 2.43-2.36 (m, 1 H, H-7), 2.08-2.06 (m, 1 H, H-1''), 2.05-2.02 (m, 1 H, H-1''), 1.97-1.94 (m, 1 H, H-4), 1.93-1.92 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.85-1.81 (m, 1 H, H-6), 1.65 (s, 3 H, H-12) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 177.4 (C-11), 169.3 (C-9'), 148.4 (C-4''), 144.2 (C-3'), 137.5 (C-8), 134.2 (C-2'), 132.4 (C-3), 131.8 (C-5''), 131.1 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-9), 130.5 (C-6'), 130.1 (2 C, C-4', C-8'), 129.5 (C-1'), 127.9 (2 C, C-7'', C-9''), 127.5 (C-8''), 126.8 (2 C, C-6'', C-10''), 122.3 (C-3''), 118.5 (C-2), 82.9 (C-2''), 49.2 (C-10), 46.5 (C-1), 37.7 (C-1''), 32.8 (C-6), 30.9 (C-5), 30.4 (C-7), 29.5 (C-4), 23.6 (C-12) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₁H₂₉ClN₃O₄⁻ [M-H]⁻ 542.1847; found 542.1831.

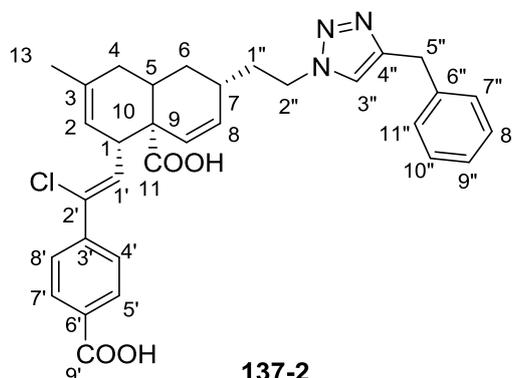
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak = 2.44 ± 0.02 μ M

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 0.56 ± 0.04 μ M

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = 1.54 ± 0.44 μ M

(2*R*,4*aR*,5*S*)-2-(2-(4-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **137-2 (AAS345):**



Preparation: The ester **136-2** (2.3 mg, 0.003 mmol, 1 eq) was dissolved in dry MeOH and K_2CO_3 (2.1 mg, 0.015 mmol, 5 eq) was added. The reaction was monitored by TLC. Upon completion, HCl 1N was added and the product was extracted by MTBE (3 times), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure to afford the diacid as a yellow oil (1.6 mg, 0.0028 mmol, **95%**).

Analysis: $R_f = 0.53$ (heptane/EtOAc/AcOH 30:69:1); $[\alpha]_D^{20} = -12.7^\circ$ (c 0.56, MeOH); IR: ν 3355, 2924, 2853, 1694, 1647, 1606, 1524, 1447, 1377, 1235, 1181, 1111, 1017, 904, 848, 773, 727 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): δ 8.67 (s, 1 H, H-3''), 8.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-7'', H-11''), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.99 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-4', H-8'), 7.67 (t, $J = 5.5$ Hz, 1 H, H-9''), 7.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, H-8'', H-10''), 6.20 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, H-1'), 5.71 (dd, $J = 16.0, 10.2$ Hz, 2 H, H-8, H-9), 5.28-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H-2''), 3.73-3.67 (m, 1 H, H-1), 3.21 (s, 2 H, H-5''), 2.71-2.65 (m, 1 H, H-5), 2.43-2.36 (m, 1 H, H-7), 2.08-2.06 (m, 1 H, H-1''), 2.05-2.02 (m, 1 H, H-1''), 1.95-1.93 (m, 1 H, H-4), 1.93-1.90 (m, 1 H, H-4), 1.89-1.85 (m, 1 H, H-6), 1.86-1.80 (m, 1 H, H-6), 1.66 (s, 3 H, H-12) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): δ 178.0 (C-11), 169.3 (C-9'), 148.3 (C-4''), 143.9 (C-3'), 138.4 (C-6''), 137.0 (C-8), 134.5 (C-9''), 132.6 (C-2'), 132.3 (C-3), 132.0 (C-9), 131.3 (2 C, C-5', C-7'), 130.9 (2 C, C-4', C-8'), 130.8 (C-6'), 130.6 (C-3''), 130.1 (C-1'), 129.7 (2 C, C-8'', C-10''), 127.7 (2 C, C-7'', C-11''), 118.4 (C-2), 54.3 (C-2''), 52.8 (C-5''), 49.2 (C-10), 46.4 (C-1), 37.6 (C-1''), 32.9 (C-6), 31.7 (C-5), 30.9 (C-7), 30.2 (C-4), 23.6 (C-13) ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. For benzylic oxidation product $C_{32}H_{29}ClN_3O_5^-$ $[M-H]^-$ 570.1801; found 570.1823.

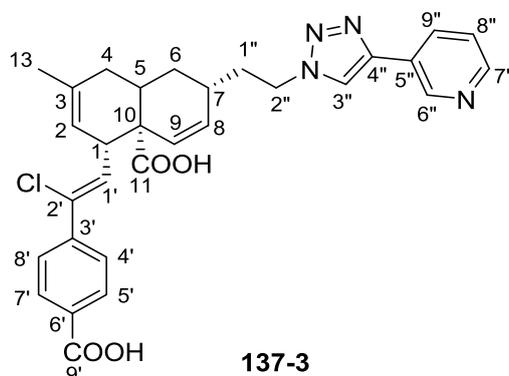
Biological Activity:

$K_i \pm SD$ Bcl-xL/Bak > 23 μM

$K_i \pm SD$ Mcl-1/Bid = 2.07 \pm 0.32 μM

$K_i \pm SD$ Bcl-2/Bim = 2.22 \pm 1.12 μM

(2*R*,4*aR*,5*S*)-5-((*Z*)-2-(4-carboxyphenyl)-2-chlorovinyl)-7-methyl-2-(2-(4-(pyridin-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylic acid **137-3 (AAS346):**



Preparation: The ester **136-3** (1.9 mg, 0.003 mmol, 1 eq) was dissolved in dry MeOH and K₂CO₃ (2.1 mg, 0.015 mmol, 5 eq) was added. The reaction was monitored by TLC. Upon completion, HCl 1N was added and the product was extracted by MTBE (3 times), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford the diacid as a white oil (1.2 mg, 0.002 mmol, **73%**).

Analysis: *R_f* = 0.5 (EtOAc/AcOH 99:1); [α]_D²⁰ = -50.0 ° (c 0.3, MeOH); IR: ν 3326, 2973, 2927, 2881, 1924, 1655, 1454, 1417, 1327, 1274, 1087, 879, 803 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): δ 8.97 (s, 1 H, H-3''), 8.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H-6''), 8.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-8''), 8.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H-7''), 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-5', H-7'), 7.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H-9''), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-4', H-8'), 6.22 (d, *J* = 9.9 Hz, 1 H, H-1'), 5.71 (dd, *J* = 14.2, 11.2 Hz, 2 H, H-8, H-9), 5.28-5.22 (m, 1 H, H-2), 4.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H, H-2''), 3.75-3.70 (m, 1 H, H-1), 2.74-2.68 (m, 1 H, H-5), 2.47-2.41 (m, 1 H, H-7), 2.15-2.12 (m, 1 H, H-1''), 2.11-2.09 (m, 1 H, H-1'), 1.99-1.96 (m, 1 H, H-4), 1.95-1.93 (m, 1 H, H-4), 1.91-1.88 (m, 1 H, H-6), 1.87-1.84 (m, 1 H, H-6), 1.68 (s, 3 H, H-12) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): δ 177.3 (C-11), 169.3 (C-9'), 151.2 (C-5''), 149.2 (C-6''), 146.2 (C-4''), 144.2 (C-3'), 139.1 (C-7''), 136.9 (C-8), 134.0 (C-2'), 132.4 (C-3), 130.9 (2 C, C-5', C-7'), 130.8 (C-9), 130.4 (C-6'), 127.7 (2 C, C-4', C-8'), 127.1 (C-1'), 124.9 (C-9''), 124.1 (C-8''), 121.7 (C-3''), 118.4 (C-2), 68.3 (C-2''), 49.7 (C-10), 46.4 (C-1), 37.5 (C-1''), 32.9 (C-6), 31.8 (C-5), 30.9 (C-7), 30.2 (C-4), 23.6 (C-12) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₃₀ClN₄O₄⁺ [M+H]⁺ 545.1956; found 545.1945.

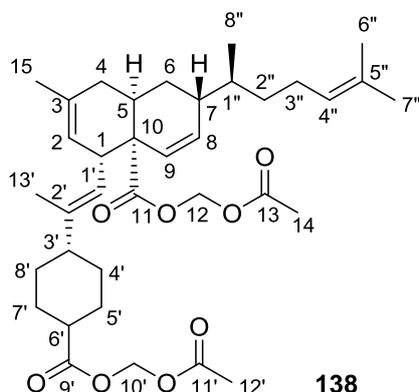
Biological Activity:

K_i ± SD Bcl-xL/Bak > 23 μM

K_i ± SD Mcl-1/Bid > 23 μM

K_i ± SD Bcl-2/Bim > 23 μM

Acetoxymethyl(2*R*,4*aR*,5*S*,8*aR*)-5-((*E*)-2-(4-((acetoxymethoxy)carbonyl)cyclohexyl)prop-1-en-1-yl)-7-methyl-2-((*S*)-6-methylhept-5-en-2-yl)-1,5,8,8*a*-tetrahydronaphthalene-4*a*(2*H*)-carboxylate **138 (AAS332):**



Preparation: ¹⁰⁶ Meiogynine A **29** (50 mg, 0.106 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF. Potassium carbonate (45.5 mg, 0.45 mmol, 4.2 eq) was added to the solution and the suspension was stirred during 2-3 min after which bromomethyl acetate (40 μ L, 0.41 mmol, 3.8 eq) was added. After stirring at room temperature during 48 h, dichloromethane was added to the mixture and the resulting organic phase was acidified using HCl 1 N. The organic phase was dried over MgSO₄ and the residue was purified by column chromatography on silica gel using heptane/EtOAc 8:2 to obtain the diester as a yellow solid (17 mg, 0.028 mmol, **26%**).

Analysis: $R_f = 0.4$ (heptane/EtOAc 8:2; $[\alpha]_D^{20} = -164.6^\circ$ (c 0.9, MeOH); IR: ν 2926, 2858, 1775, 1451, 1369, 1221, 1191, 1008, 986, 834, 762, 700, 659 cm^{-1} ; ¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*): δ 5.71 (s, 2 H, H-10'), 5.60 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H, H-8), 5.55 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H, H-9), 5.50 (d, $J = 7.1$ Hz, 2 H, H-12), 5.11-5.08 (m, 1 H, H-2), 5.08-5.04 (m, 1 H, H-4''), 4.89 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H, H-1'), 3.13-3.06 (m, 1 H, H-1), 2.58-2.50 (m, 1 H, H-5), 2.36-2.29 (m, 1 H, H-7), 2.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H, H-6'), 2.09 (s, 3 H, H-12'), 2.01 (s, 3 H, H-14), 2.00-1.95 (m, 2 H, H-3''), 1.93-1.88 (m, 1 H, H-7'), 1.86-1.82 (m, 2 H, H-4), 1.80-1.77 (m, 1 H, H-5'), 1.75-1.70 (m, 1 H, H-3'), 1.70-1.67 (m, 1 H, H-6), 1.66 (s, 3 H, H-15), 1.60 (s, 3 H, H-13'), 1.57 (s, 6 H, H-6'', H-7''), 1.56-1.54 (m, 1 H, H-4'), 1.54-1.50 (m, 1 H, H-8'), 1.48-1.44 (m, 1 H, H-2''), 1.43-1.40 (m, 1 H, H-6), 1.40-1.33 (m, 1 H, H-5'), 1.31-1.26 (m, 1 H, H-7'), 1.26-1.22 (m, 1 H, H-2''), 1.20-1.17 (m, 1 H, H-8'), 1.17-1.14 (m, 1 H, H-2''), 1.14-1.09 (m, 1 H, H-4'), 0.68 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H, H-8'') ppm; ¹³C NMR (125 MHz, chloroform-*d*): δ 174.9 (C-9'), 173.3 (C-11), 169.9 (C-13), 169.8 (C-11'), 139.8 (C-2'), 134.3 (C-8), 133.6 (C-3), 131.5 (C-5''), 129.7 (C-9), 124.8 (C-4''), 123.5 (C-1'), 120.1 (C-2), 79.4 (C-12), 79.3 (C-10'), 48.6 (C-10), 46.5 (C-3'), 43.1 (C-1), 42.9 (C-6'), 36.4 (C-1''), 36.1 (C-7), 34.2 (C-2''), 31.8 (C-4), 30.8 (C-8'), 30.6 (C-4'), 28.9 (C-7'), 28.9 (C-5'), 28.4 (C-5), 26.2 (C-4''), 25.9 (C-6''), 24.6 (C-6), 23.6 (C-15), 20.9 (C-12'), 20.8 (C-14), 17.8 (C-7''), 15.0 (C-8''), 14.5 (C-13') ppm; HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₆H₅₂O₈Na⁺ [M+Na]⁺ 635.3560; found 635.3591.

Biological activity:

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-xL/Bak > 23 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Mcl-1/Bid = 6.17 \pm 0.45 μ M

$K_i \pm \text{SD}$ Bcl-2/Bim = 1.85 \pm 0.21 μ M

Cell lines

BL2 and Remb1 cell lines were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon). NCI-H929 and RS4;11 cells were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany). All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and supplemented with 7% heat-inactivated fetal calf serum (complete RPMI medium). 2-β-mercapto-ethanol (0.05 mM) was also added to the complete medium for H929.

MTT assays

Cell viability was measured by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 6×10^4 cells were incubated for 24 h at 37 °C in duplicate with 2.5, 5, 10 or 20 µM of each compound in 100 µL of complete RPMI medium. Then, 10 µL of MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL) was added and plates were incubated 2 extra hours. Finally, 100 µL of lysis buffer (20% SDS, 45% dimethylformamide, pH = 4.7) was added and absorbance was recorded at 570 nm after 2 h of incubation.

Quantification of apoptosis

Apoptosis was assessed by labelling cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). 1×10^6 cells were incubated for 24 h at 37 °C with 10 µM of each compound in 1 mL of complete RPMI medium. Cells were then washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH = 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) containing 2.5 µg/mL annexin V-FITC (eBioscience) and incubated for 5–10 min. After washing, cells were resuspended in annexin buffer supplemented with PI (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) and analyzed (n = 10 000) by flow cytometry (Accuri C6 cytometer, Becton-Dickinson). Annexin V-positive cells (PI negative and positive) were considered as apoptotic cells.

Bibliographie

IX-Liste des références

1. Desrat, S.; Pujals, A.; Colas, C.; Dardenne, J.; Geny, C.; Favre, L.; Dumontet, V.; Iorga, B.; Litaudon, M.; Raphael, M.; Wiels, J.; Roussi, F., Pro-Apoptotic Meigynin A Derivatives that Target Bcl-xL and Mcl-1. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24* (21), 5086-5088.
2. Czabotar, P. E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J. M., Control of Apoptosis by the Bcl-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (1), 49-63.
3. Petros, A. M.; Medek, A.; Nettesheim, D. G.; Kim, D. H.; Yoon, H. S.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Oltersdorf, T.; Fesik, S. W., Solution Structure of the Antiapoptotic Protein Bcl-2. *PNAS* **2001**, *98* (6), 3012-3017.
4. Walensky, L. D., From Mitochondrial Biology to Magic Bullet: Navitoclax Disarms BCL-2 in Chronic Lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 554-557.
5. Roy, M. J.; Vom, A.; Czabotar, P. E.; Lessene, G., Cell Death and the Mitochondria: Therapeutic targeting of the Bcl-2 Family-Driven Pathway. *Brit J Pharmacol* **2014**, *171* (8), 1973-1987.
6. Elkholi, R.; Floros, K. V.; Chipuk, J. E., The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer* **2011**, *2* (5), 523-537.
7. Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G. L.; Gong, J.-N.; Moujalled, D. M.; Bruno, A.; Csekei, M.; Paczal, A.; Szabo, Z. B.; Sipos, S.; Radics, G.; Proszenyak, A.; Balint, B.; Ondi, L.; Blasko, G.; Robertson, A.; Surgenor, A.; Dokurno, P.; Chen, I.; Matassova, N.; Smith, J.; Pedder, C.; Graham, C.; Studeny, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A.-M.; Gravé, F.; Segal, D.; Riffkin, C. D.; Pomilio, G.; Galbraith, L. C. A.; Aubrey, B. J.; Brennan, M. S.; Herold, M. J.; Chang, C.; Guasconi, G.; Cauquil, N.; Melchiorre, F.; Guigal-Stephan, N.; Lockhart, B.; Colland, F.; Hickman, J. A.; Roberts, A. W.; Huang, D. C. S.; Wei, A. H.; Strasser, A.; Lessene, G.; Geneste, O., The Mcl-1 Inhibitor S63845 is Tolerable and Effective in Diverse Cancer Models. *Nature* **2016**, *538* (7626), 477-482.
8. Birkinshaw, R. W.; Czabotar, P. E., The Bcl-2 Family of Proteins and Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation. *Semin Cell Dev Biol* **2017**.
9. Ashkenazi, A.; Fairbrother, W. J.; Levenson, J. D.; Souers, A. J., From Basic Apoptosis Discoveries to Advanced Selective Bcl-2 Family Inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (4), 273-284.
10. Perez, A., *Les Révolutions de la Recherche sur le Cancer : 15 Années de Progrès, 12 Défis pour l'Avenir*. © Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ed.; France, 2014.
11. Données Globales d'Epidémiologie des Cancers. <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales> (accessed 10 Jul 2017).
12. Le Cancer en Chiffres. <https://www.fondation-arc.org/le-cancer-en-chiffres> (accessed 10 Jul 2017).
13. Deng, J., How to Unleash Mitochondrial Apoptotic Blockades to Kill Cancers? *Acta Pharm Sinic B* **2017**, *7* (1), 18-26.
14. Saadatpour, Z.; Bjorklund, G.; Chirumbolo, S.; Alimohammadi, M.; Ehsani, H.; Ebrahiminejad, H.; Pourghadamyari, H.; Baghaei, B.; Mirzaei, H. R.; Sahebkar, A.; Mirzaei, H.; Keshavarzi, M., Molecular Imaging and Cancer Gene Therapy. *Cancer Gene Ther* **2016**.
15. Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J., Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J Control Release* **2015**, *200*, 138-157.

16. Lessene, G.; Czabotar, P. E.; Colman, P. M., Bcl-2 Family Antagonists for Cancer Therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (12), 989-1000.
17. Igney, F. H.; Krammer, P. H., Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 277-288.
18. Delbridge, A. R. D.; Strasser, A., The Bcl-2 Protein Family, BH3-Mimetics and Cancer Therapy. *Cell Death Differ* **2015**, *22*, 1071-1080.
19. Juin, P.; Geneste, O.; Raimbaud, E.; Hickman, J. A., Shooting at Survivors: Bcl-2 Family Members as Drug Targets for Cancer. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* **2004**, *1644*, 251-260.
20. D'Orsi, B.; Mateyka, J.; Prehn, J. H., Control of Mitochondrial Physiology and Cell Death by the Bcl-2 Family Proteins Bax and Bok. *Neurochem Int* **2017**.
21. Rautureau, G. J.; Day, C. L.; Hinds, M., Intrinsically Disordered Proteins in Bcl-2-Regulated Apoptosis. *Int J mol Sci* **2010**, *11*, 1808-1818.
22. Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A., Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing Towards the Reality. *Chem Biol* **2015**, *21* (8), 1102-1114.
23. Gloaguen, C.; Voisin-Chiret, A.-S.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Fogha, J.; Gautier, F.; De Giorgi, M.; Burzicki, G.; Perato, S.; Pétigny-Lechartier, C.; Simonin-Le Jeune, K.; Brotin, E.; Goux, D.; N'Diaye, M.; Lambert, B.; Louis, M. H.; Ligat, L.; Lopez, F.; Juin, P.; Bureau, R.; Rault, S.; Poulain, L., First Evidence that Oligopyridines, α -Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-xL-Targeting Strategies. *J Med Chem* **2015**, *58*, 1644-1668.
24. Iyer, V. V., A Review of Stapled Peptides and Small Molecules to Inhibit Protein-Protein Interactions in Cancer. *Curr Med Chem* **2016**, *23* (27), 3025-3043.
25. Pandey, M. K.; Prasad, S.; Tyagi, A. K.; Deb, L.; Huang, J.; Karelia, D. N.; Amin, S. G.; Aggarwal, B. B., Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. *Pharmaceuticals* **2016**, *9* (1).
26. Qian, J.; Voorbach, M. J.; Huth, J. R.; Coen, M. L.; Zhang, H.; Ng, S. C.; Comess, K. M.; Petros, A. M.; Rosenberg, S. H.; Warrior, U.; Burns, D. J., Discovery of Novel Inhibitors of Bcl-xL Using Multiple High-Throughput Screening Platforms. *Anal Biochem* **2004**, *328* (2), 131-138.
27. Moldoveanu, T.; Follis, A. V.; Kriwacki, R. W.; Green, D. R., Many Players in Bcl-2 Family Affairs. *Trends Biochem Sci* **2014**, *39* (3), 101-111.
28. Billard, C., BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments. *Mol Cancer Ther* **2013**, *12* (9), 1691-1700.
29. Letai, A. G., Diagnosing and Exploiting Cancer's Addiction to Blocks in Apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8* (2), 121-132.
30. Koss, B.; Morrison, J.; Perciavalle, R. M.; Singh, H.; Rehg, J. E.; R.T., W.; Opferman, J. T., Requirement for Antiapoptotic Mcl-1 in the Survival of BCR-ABL B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **2013**, *122*, 1587-1598.
31. Petros, A. M.; Dinges, J.; Augeri, D. J.; Baumeister, S. A.; Bures, M. G.; Elmore, S. W.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Landis, S. K.; Nettesheim, D. G.; Rosenberg, S. H.; Shen, W.; Thomas, S.; Wang, X.; Zanze, I.; Zhang, H.; Fesik, S. W., Discovery of a Potent Inhibitor of the Anti-Apoptotic Protein Bcl-xL from NMR and Parallel Synthesis. *J Med Chem* **2006**, *49*, 656-663.
32. Souers, A. J.; Levenson, J. D.; Boghaert, E. R.; Ackler, S. L.; Catron, N. D.; Chen, J.; Dayton, B. D.; Ding, H.; Enschede, S. H.; Fairbrother, W. J.; Huang, D. C.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Khaw, S. L.; Kovar, P. J.; Lam, L. T.; Lee, J.; Maecker, H. L.; Marsh, K. C.; Mason, K. D.; Mitten,

- M. J.; Nimmer, P. M.; Oleksijew, A.; Park, C. H.; Park, C. M.; Phillips, D. C.; Roberts, A. W.; Sampath, D.; Seymour, J. F.; Smith, M. L.; Sullivan, G. M.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wendt, M. D.; Xiao, Y.; Xue, J. C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R. A.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W., ABT-199, a Potent and Selective Bcl-2 Inhibitor, Achieves Antitumor Activity While Sparing Platelets. *Nat Med* **2013**, *19* (2), 202-208.
33. Zhou, H.; Chen, J.; Meagher, J. L.; Yang, C. Y.; Aguilar, A.; Liu, L.; Bai, L.; Cong, X.; Cai, Q.; Fang, X.; Stuckey, J. A.; Wang, S., Design of Bcl-2 and Bcl-xL Inhibitors with Subnanomolar Binding Affinities Based upon a New Scaffold. *J Med Chem* **2012**, *55* (10), 4664-4682.
34. Yap, J. L.; Chen, L.; Lanning, M. E.; Fletcher, S., Expanding the Cancer Arsenal with Targeted Therapies: Disarmament of the Antiapoptotic Bcl-2 Proteins by Small Molecules. *J Med Chem* **2017**, *60* (3), 821-838.
35. Manero, F.; Gautier, F.; Gallenne, T.; Cauquil, N.; Gree, D.; Cartron, P. F.; Geneste, O.; Gree, R.; Vallette, F. M.; Juin, P., The Small Organic Compound HA14-1 Prevents Bcl-2 Interaction with Bax to Sensitize Malignant Glioma Cells to Induction of Cell Death. *Cancer Res* **2006**, *66* (5), 2757-2764.
36. Wang, J.-L.; Liu, D.; Zhang, Z.-J.; Shan, S.; Han, X.; Srinivasula, S. M.; Croce, C. M.; Alnemri, E. S.; Huang, Z., Structure-Based Discovery of an Organic Compound that Binds Bcl-2 Protein and Induces Apoptosis of Tumor Cells. *PNAS* **2000**, *97* (13), 7124-7129.
37. Chen, J.; Freeman, A.; Liu, J.; Dai, Q.; Lee, R., The Apoptotic Effect of HA14-1, a Bcl-2-interacting Small Molecular Compound, Requires Bax Translocation and Is Enhanced by PK11195. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1* (12), 961-967.
38. Newman, D. J., Natural Products as Sources of New Drugs Over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **2012**, *75* (3), 311-335.
39. Beekman, A. M.; Howell, L. A., Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. *Chem Med Chem Minireviews* **2016**, *11*, 802-813.
40. Nguyen, M.; Marcellus, R. C.; Roulston, A.; Watson, M.; Serfass, L.; Murthy Madiraju, S. R.; Goulet, D.; Viallet, J.; Belec, L.; Billot, X.; Acoca, S.; Purisima, E.; Wiegmanns, A.; Cluse, L.; Johnstone, R. W.; Beauparlant, P.; Shore, G. C., Small Molecule Obatoclax (GX15-070) Antagonizes Mcl-1 and Overcomes Mcl-1-Mediated Resistance to Apoptosis. *PNAS* **2007**, *104* (49), 19512-19517.
41. Vo, D. D.; Gautier, F.; Barillé-Nion, S.; Juin, P.; Levoine, N.; Grée, R., Synthesis of New Mixed Phenol/Heterocyclic Derivatives and Studies of their Activity as Inhibitors of Bax/Bcl-xL Interaction. *Tetrahedron* **2014**, *70* (2), 301-311.
42. Wei, J.; Kitada, S.; Stebbins, J. L.; Placzek, W.; Zhai, D.; Wu, B.; Rega, M. F.; Zhang, Z.; Cellitti, J.; Yang, L.; Dahl, R.; Reed, J. C.; Pellecchia, M., Synthesis and Biological Evaluation of Apogossypolone Derivatives as PAN-Active Inhibitors of Anti-Apoptotic B-cell Lymphoma/Leukemia-2 (Bcl-2) Family Proteins. *J Med Chem* **2010**, *53* (22), 8000-8011.
43. Zhai, D.; Jin, C.; Satterthwait, A. C.; Reed, J. C., Comparison of Chemical Inhibitors of Anti-Apoptotic Bcl-2-Family Proteins. *Cell Death Differ* **2006**, *13* (8), 1419-1421.
44. Ludwig, L. M.; Nassin, M. L.; Hadji, A.; LaBelle, J. L., Killing Two Cells with One Stone: Pharmacologic BCL-2 Family Targeting for Cancer Cell Death and Immune Modulation. *Front Pediatr* **2016**, *4*, 135-147.
45. Plant metabolites and associated microorganisms: Isolation, s. a. b. Extractothèque ICSN. <http://www.icsn.cnrs-gif.fr/spip.php?article144> (accessed 24 Jul 2017).
46. Fotsop, D. F.; Roussi, F.; Le Callonec, C.; Bousserouel, H.; Litaudon, M.; Guéritte, F., Isolation and Characterization of Two New Drimanes from *Zygogynum baillonii* and Synthesis of Analogues. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2192-2197.

47. Allouche, N.; Apel, C.; Martin, M.-T.; Dumontet, V.; Guéritte, F.; Litaudon, M., Cytotoxic Sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian Rainforest. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 546-553.
48. Leverrier, A.; Tran Huu Dau, M. E.; Retailleau, P.; Awang, K.; Guéritte, F.; Litaudon, M., Kingianin A: A New Natural Pentacyclic Compound from *Endiandra kingiana*. *Org Lett* **2010**, *12* (16), 3638-3641.
49. Leverrier, A.; Awang, K.; Guéritte, F.; Litaudon, M., Pentacyclic Polyketides from *Endiandra kingiana* as Inhibitors of the Bcl-xL/Bak Interaction. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1443-1452.
50. Azmi, M. N.; Gény, C.; Leverrier, A.; Litaudon, M.; Dumontet, V.; Birlirakis, N.; Guéritte, F.; Leong, K. H.; Halim, S. N. A.; Mohamad, K.; Awang, K., Kingianic Acids A-G, Endiandric Acid Analogues from *Endiandra kingiana*. *Molecules* **2014**, *19*, 1732-1747.
51. Gény, C.; Abou Samra, A.; Retailleau, P.; Awang, K.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Dumontet, V., (-)- and (+)-Ecarlottes, Uncommon Chalconoids from *Fissistigma latifolium* with Proapoptotic Activity. *J Nat Prod* **2017**.
52. Gény, C. Recherche d'Inhibiteurs Naturels des Protéines Anti-Apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Université Paris-Sud XI, France, 2014.
53. Litaudon, M.; Bousserouel, H.; Awang, K.; Nosjean, O.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M. E.; Hadi, H. A.; Boutin, J. A.; Sévenet, T.; Guéritte, F., A Dimeric Sesquiterpenoide from a Malaysian Meiogyne as a New Inhibitor of Bcl-xL/Bak BH3 Domain Peptide Interaction. *J Nat Prod* **2009**, *72*, 480-483.
54. Fotsop, D. F.; Roussi, F.; Leverrier, A.; Breteche, A.; Guéritte, F., Biomimetic Total Synthesis of Meiogynin A, an Inhibitor of Bcl-xL and Bak Interaction. *J Org Chem* **2010**, *75* (21), 7412-7415.
55. Dardenne, J.; Desrat, S.; Guéritte, F.; Roussi, F., Asymmetric Synthesis of Two Analogues of Meiogynin A. *Eur J Org Chem* **2013**, *11*, 2116-2122.
56. Desrat, S.; Remeur, C.; Geny, C.; Riviere, G.; Colas, C.; Dumontet, V.; Birlirakis, N.; Iorga, B.; Roussi, F., From Meiogynin A to the Synthesis of Dual Inhibitors of Bcl-xL and Mcl-1 Anti-Apoptotic Proteins. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50* (62), 8593-8596.
57. Desrat, S.; Remeur, C.; Roussi, F., Development of an Efficient Route Toward Meiogynin A-Inspired Dual Inhibitors of Bcl-xL and Mcl-1 Anti-Apoptotic Proteins. *Org Biomol Chem* **2015**, *13* (19), 5520-5531.
58. Colas, C.; Roussi, F.; Iorga, B., *Focused ligand libraries as tools for in silico design of anti-apoptotic proteins inhibitors*. Medimond, Bologna, 2011; p 41-46.
59. Yasui, T.; Yamamoto, T.; Sakai, N.; Asano, K.; Takai, T.; Yoshitomi, Y.; Davis, M.; Takagi, T.; Sakamoto, K.; Sogabe, S.; Kamada, Y.; Lane, W.; Snell, G.; Iwata, M.; Goto, M.; Inooka, H.; Sakamoto, J.-i.; Nakada, Y.; Imaeda, Y., Discovery of a Novel B-Cell Lymphoma 6 (BCL6)-Corepressor Interaction Inhibitor by Utilizing Structure-Based Drug Design. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25* (17), 4876-4886.
60. Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B.; Wagner, G.; Mitchison, T.; Yuan, J., Identification of Small-Molecule Inhibitors of Interaction Between the BH3 Domain and Bcl-xL. *Nature Cell Biol* **2001**, *3*, 173-182.
61. Vo, D. D.; Gautier, F.; Juin, P.; Gree, R., Structure-Activity Relationship of Selected Polyphenol Derivatives as Inhibitors of Bax/Bcl-xL Interaction. *Eur J Med Chem* **2012**, *51*, 286-293.
62. Vartak, S. V.; Iyer, D.; Santhoshkumar, T. R.; Sharma, S.; Mishra, A.; Goldsmith, G.; Srivastava, M.; Srivastava, S.; Karki, S. S.; Surolia, A.; Choudhary, B.; Raghavan, S. C., Novel Bcl-

2 Inhibitor, Disarib Induces Apoptosis by Disruption of Bcl-2-Bak Interaction. *Biochem Pharmacol* **2017**.

63. Pisoni, C.; Cimoli, G.; Resconi, A.; Losi, D.; Lorenzetti, R.; Parodi, S.; Carrano, L., A New Assay for the Discovery of Bcl-xL Inhibitors. *Farmaco* **2005**, *60* (11-12), 938-943.

64. Agrawal, A.; Sathe, T.; Nie, S., Single-bead Immunoassays Using Magnetic Microparticles and Spectral-shifting Quantum Dots. *J Agric Food Chem* **2007**, *55* (10), 3778-3782.

65. Whitfield, J.; Harada, K.; Bardelle, C.; Staddon, J. M., High-Throughput Methods to Detect Dimerization of Bcl-2 Family Proteins. *Anal Biochem* **2003**, *322* (2), 170-178.

66. Picot, J.; Guerin, C. L.; Le Van Kim, C.; Boulanger, C. M., Flow Cytometry: Retrospective, Fundamentals and Recent Instrumentation. *Cytotechnology* **2012**, *64* (2), 109-130.

67. Surviladze, Z.; Young, S. M.; Sklar, L. A., High Throughput Flow Cytometry Bead-based Multiplex Assay for Identification of Rho GTPase Inhibitors. *Methods Mol Biol* **2012**, *827*, 253-270.

68. Curpan, R. F.; Simons, P. C.; Zhai, D.; Young, S. M.; Carter, M. B.; Bologna, C. G.; Oprea, T. I.; Satterthwait, A. C.; Reed, J. C.; Edwards, B. S.; Sklar, L. A., High-Throughput Screen for the Chemical Inhibitors of Antiapoptotic Bcl-2 Family Proteins by Multiplex Flow Cytometry. *Assay Drug Dev Techn* **2011**, *9* (5), 465-474.

69. Zhang, H.; Q., W.; Berezin, M. Y., Fluorescence Anisotropy (Polarization): from Drug Screening to Precision Medicine. *Expert Opin Drug Dis* **2015**, *10* (11), 1145-1161.

70. Jameson, D. M.; Ross, J. A., Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem Rev* **2010**, *110*, 2685-2708.

71. Hall, A. D.; Yasgar, A.; Peryea, T.; Braisted, J. C.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Coussens, N. P., Fluorescence Polarization Assays in High-throughput Screening and Drug Discovery: A review. *Methods Appl Fluoresc* **2016**, *4*, 1-20.

72. Perrin, F., Polarisation de la Lumière de Fluorescence. Vie Moyenne des Molécules dans l'Etat Excité. *J Phys Radium* **1926**, *7* (12), 390-401.

73. Dandliker, W. B.; Hsu, M.-L.; Levin, J.; Rao, B. R., Equilibrium and Kinetic Inhibition Assays Based upon Fluorescence Polarization. *Method Enzymol* **1981**, *74*, 3-28.

74. Zhang, H.; Nimmer, P.; Rosenberg, S. H.; Ng, S.-C.; Joseph, M., Development of a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay for Bcl-xL. *Anal Biochem* **2002**, *307*, 70-75.

75. Danial, N. N., Bcl-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Res* **2007**, *13* (24), 7254-63.

76. Blommel, P.; Hanson, G. T.; Vogel, K. W., Multiplexing Fluorescence Polarization Assays to Increase Information Content per Screen: Applications for Screening Steroid Hormone Receptors. *J Biomol Screen* **2004**, *9* (4), 294-302.

77. Nosjean, O.; Souchaud, S.; Deniau, C.; Geneste, O.; Cauquil, N.; Boutin, J. A., A Simple Theoretical Model for Fluorescence Polarization Binding Assay Development. *J Biomol Screen* **2006**, *11* (8), 949-958.

78. Del Gaizo Moore, V.; Brown, J. R.; Certo, M.; Love, T. M.; Novina, C. D.; Letai, A., Chronic Lymphocytic Leukemia Requires Bcl-2 to Sequester Prodeath Bim, Explaining Sensitivity to Bcl-2 Antagonist ABT-737. *J Clin Invest* **2007**, *117* (1), 112-121.

79. Adams, J. M.; Cory, S., The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **1998**, *281* (5381), 1322-1326.

80. Loomans, E. E.; van Doornmalen, A. M.; Wat, J. W.; Zaman, G. J., High-Throughput Screening with Immobilized Metal Ion Affinity-Based Fluorescence Polarization Detection, a Homogeneous Assay for Protein Kinases. *Assay Drug Dev Techn* **2003**, *1* (3), 445-453.

81. Guo, X.-Q.; Castellano, F. N.; L., L.; Lakowicz, J. R., Use of a Long-Lifetime Re(I) Complex in Fluorescence Polarization Immunoassays of High-Molecular-Weight Analytes. *Anal Chem* **1998**, *70*, 632-637.
82. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-674.
83. Nedelkina, S.; Gokce, I.; Ridley, H.; Weckerle, C.; agnin, T.; Vallette, F.; Pattus, F.; Lakey, J. H.; Bechinger, B., High-Yield Expression and Purification of Soluble Forms of the Anti-Apoptotic Bcl-xL and Bcl-2 as TolAIII-Fusion Proteins. *Protein Expr Purif* **2008**, *60* (2), 214-220.
84. Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; Wang, S., Development and Optimization of a Binding Assay for the XIAP BIR3 Domain Using Fluorescence Polarization. *Anal Biochem* **2004**, *332* (2), 261-273.
85. Zhu, G.; Chen, D.; Wang, Y.; Zheng, R., Highly Stereoselective Synthesis of (Z)-1,2-Dihaloalkenes by a Pd-Catalyzed Hydrohalogenation of Alkynyl Halides. *Chem Commun (Camb)* **2012**, *48* (46), 5796-5798.
86. Ito, Y.; Hirao, T.; Saegusa, T., Synthesis of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds by Palladium(II)-Catalyzed Dehydrosilylation of Silyl Enol Ethers. *J Org Chem* **1978**, *43* (5), 1011-1013.
87. Larock, R. C.; Hightower, T. R.; Kraus, G. A.; Hahn, P.; Zheng, D., A Simple Effective New Palladium-Catalyzed Conversion of Enol Silanes to Enones and Enals. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36*, 2423-2426.
88. Comins, D. L.; Dehghani, A., Pyridine-Derived Triflating Reagents: An Improved Preparation of Vinyl Triflates from Metallo Enolates. *Tetrahedron Lett* **1992**, *33* (42), 6299-6302.
89. Al-Zoubi, R. M.; Marion, O.; Hall, D. G., Direct and Waste-Free Amidations and Cycloadditions by Organocatalytic Activation of Carboxylic Acids at Room Temperature. *Angew Chem Int Edit* **2008**, *47* (15), 2876-2879.
90. Gandon, V.; Remeur, C., article en préparation.
91. Griffith, W. P.; Ley, S. V.; Whitcombe, G. P.; White, A. D., Preparation and Use of Tetra-n-butylammonium Per-ruthenate (TBAP reagent) and Tetra-n-propylammonium Per-ruthenate (TPAP reagent) as New Catalytic Oxidants for Alcohols. *J Chem Soc, Chem Commun* **1987**, 1625-1627.
92. Pereira, J. M.; Severino, R. P.; Vierira, P. C.; Fernandes, J. B.; de Silva, M. F. G. F.; A., Z.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G.; Correa, A. G., Anacardic Acid Derivatives as Inhibitors of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorgan Med Chem* **2008**, *16*, 8889-8895.
93. Trost, B. M.; Tang, W., Enantioselective Synthesis of (-)-Codeine and (-)-Morphine. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 14542-14543.
94. Presser, A.; Hufner, A., Diazo(trimethylsilyl)methane, a Mild and Efficient Reagent for the Methylation of Carboxylic Acids and Alcohols in Natural Products. *Chem Mon* **2004**, *135*, 1015-1022.
95. Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J., An Improved One-pot Procedure for the Synthesis of Alkynes from Aldehydes. *Synlett* **1996**, 521-522.
96. Pietruszka, J.; Witt, A., Synthesis of the Bestmann-Ohira Reagent. *Synthesis* **2006**, *2006* (24), 4266-4268.

97. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D., Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J Org Chem* **1996**, *61*, 3849-3862.
98. Kumpatya, H. J.; Bhattacharyya, S.; Rehra, E. W.; Gonzalez, A. M., Selective Access to Secondary Amines by a Highly Controlled Reductive Mono-*N*-Alkylation of Primary Amines. *Synthesis* **2003**, *14*, 2206-2210.
99. Steves, J. E.; Stahl, S. S., Copper(I)/ABNO-Catalyzed Aerobic Alcohol Oxidation: Alleviating Steric and Electronic Constraints of Cu/TEMPO Catalyst Systems. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 15742-15745.
100. Zultanski, S. L.; Zhao, J.; Stahl, S. S., Practical Synthesis of Amides via Copper/ABNO-Catalyzed Aerobic Oxidative Coupling of Alcohols and Amines. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (20), 6416-6419.
101. Hutson, L.; Krstina, J.; Moad, C. L.; Moad, G.; Morrow, G. R.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Chain Transfer Activity of ω -Unsaturated Methacrylic Oligomers in Polymerizations of Methacrylic Monomers. *Macromolecules* **2004**, *37* (12), 4441-4452.
102. Wu, X.-A.; Ying, P.; Jun-Yang, L.; Shen, H.-S.; Chen, Y.; He, L., Lithium Chloride-Assisted Selective Hydrolysis of Methyl Esters Under Microwave Irradiation. *Synthetic Commun* **2009**, *39* (19), 3459-3470.
103. Chang, F. C.; Wood, N. F., Reaction of Potassium *tert*-Butoxide in Dimethylsulfoxide. III. Hydrolysis of Hindered Carboxylic Acids. *Tetrahedron Lett* **1964**, *40*, 2969-2973.
104. Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters. *Invitrogen*: 2010.
105. Poras, H.; Bonnard, E.; Dange, E.; Fournie-Zaluski, M. C.; Roques, B. P., New Orally Active Dual Enkephalinase Inhibitors (Denkis) for Central and Peripheral Pain Treatment. *J Med Chem* **2014**, *57* (13), 5748-5763.
106. Torres, S. Y.; Ochoa, E.; Verdecia, Y.; Rebolledo, F., Chemoenzymatic Preparation of Optically Active 4-Aryl-5-carboxy-6-methyl-3,4-dihydro-2(1H)-pyridone Derivatives. *Tetrahedron* **2014**, *70* (31), 4675-4684.
107. Bures, J.; Martin, J.; Urpi, F.; Vilarrasa, J., Catalytic Staudingers-Vilarrasa Reaction for the Direct Ligation of Carboxylic Acids and Azides. *J Org Chem* **2009**, *74*, 2203-2206.
108. Pal, B.; Jaisankar, P.; Giri, V. S., Versatile Reagent for Reduction of Azides and Amines. *Synthetic Commun* **2004**, *34* (7), 1317-1323.
109. Zhong, M.; Meng, X. B.; Li, Z. J., Synthesis of Gamma-Aminobutyric Acid Analogs Based on Carbohydrate Scaffolds. *Carbohydr Res* **2010**, *345* (9), 1099-1106.
110. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A., Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective 'Ligation' of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599.
111. Loubens, A., La Chimie Click Révolutionne la Biologie. *Techniques de l'Ingénieur* 2015.
112. Worell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V., *Science* **2013**, *340*, 457-460.
113. Buckley, B. R.; Figueres, M. M. P.; Khan, A. N.; Heaney, H., A New Simplified Protocol for Copper(I) Alkyne-Azide Cycloaddition Reactions Using Low Substoichiometric Amounts of Copper (II) Precatalyst in Methanol. *Synlett* **2016**, *27*, 51-56.

Titre : Conception, Synthèse et Evaluation Biologique d'Inhibiteurs des Protéines Anti-Apoptotiques de la Famille Bcl-2

Mots clés : Apoptose, protéine anti-apoptotique, synthèse bioinspirée, pharmacomodulation, polarisation de fluorescence, cytotoxicité

Résumé : Mon projet de thèse vise à élaborer des analogues de troisième génération de la meiogynine A possédant une activité inhibitrice multiple sub-micromolaire des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 et cytotoxiques sur des lignées cellulaires surexprimant ces mêmes protéines. Pour cela, un essai biologique de mesure d'inhibition de l'interaction Bcl-2/Bim a été mis en place et robotisé afin d'évaluer l'activité biologique des composés synthétisés. De plus, la voie de synthèse bioinspirée d'un précurseur commun des nouveaux analogues a été mise au point à l'échelle de plusieurs grammes. Ce précurseur a permis d'élaborer différents analogues de troisième génération de la meiogynine A en réalisant des pharmacomodulations sur la chaîne latérale afin de remplacer la fonction ester des analogues de deuxième génération par un groupement stable et résistant *in cellulo*. Différentes séries ont été envisagées (alcènes, amines, amides, carbamates et triazoles). L'activité biologique des composés synthétisés a été évaluée sur les trois cibles *in vitro*. Finalement, des analyses de cytotoxicité pour les analogues les plus actifs ont été réalisées par nos collaborateurs à l'Institut Gustave Roussy.

Title: Conception, Synthesis and Biological Evaluation of Small Molecule Inhibitors of Anti-Apoptotic Proteins of Bcl-2 Family

Keywords: Apoptosis, anti-apoptotic protein, bioinspired synthesis, pharmacomodulation, prodrug, fluorescence polarization, cytotoxicity

Abstract: We aim to develop 3rd-generation analogues of meiogynine A exhibiting high affinity towards multiple anti-apoptotic members of Bcl-2 family as well as cytotoxicity on cancer cells that overexpress these proteins. For this, a new fluorescence polarization inhibition test for Bcl-2/Bim interaction has been implemented, and meiogynine A and its analogues have been tested against the new interaction. In addition to Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid interaction inhibition, these molecules showed an ability to inhibit Bcl-2/Bim interaction. Thus, they are considered multiple inhibitors.

3rd-generation analogues of meiogynine A were obtained by pharmacomodulation of a common precursor that was synthesized on a gram-scale through a bioinspired Diels-Alder reaction. Several functional groups that have better stability *in vivo* than the ester group were anticipated, such as the amines, amides, carbamates and triazoles. Biological activity of the synthesized analogues was evaluated, and those presenting the best inhibitory profile were evaluated *in cellulo* by our collaborators in the Institut Gustave Roussy.

