

# Synthèse d'inhibiteurs de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ, PSD-95 et le récepteur de la sérotoninte 5-HT2A pour le traitement des douleurs neuropathiques

Gary Vallon

#### ► To cite this version:

Gary Vallon. Synthèse d'inhibiteurs de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ, PSD-95 et le récepteur de la sérotoninte 5-HT2A pour le traitement des douleurs neuropathiques. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT: 2016CLF22664 . tel-03270860

#### HAL Id: tel-03270860 https://theses.hal.science/tel-03270860

Submitted on 25 Jun 2021

**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.

#### **UNIVERSITE BLAISE PASCAL** (U.F.R. Recherche Scientifique et Technique)

#### ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

#### N° 857

#### THESE

présentée pour obtenir le grade de

#### **DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : Chimie Médicinale)

par

#### **Gary Vallon**

Ingénieur diplômé de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand

Synthèse d'inhibiteurs de l'interaction entre la protéine à domaines PDZ, PSD-95, et le récepteur de la sérotonine, 5-HT<sub>2A</sub>, pour le traitement des douleurs neuropathiques

Soutenance prévue publiquement le 15 janvier 2016, devant la Commission d'Examen :

Président :	
Claude Taillefumier	Professeur
	Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	
David Aitken	Professeur
	Université Paris Sud
Ahcène Boumendjel	Professeur
	Université Joseph Fourier de Grenoble
Examinateurs :	
Sylvie Ducki	Professeur
	ENS de Chimie de Clermont-Ferrand
Lu-Yun Lian	Professeur
	Université de Liverpool
Isabelle Ripoche	Maître de conférences
_	ENS de Chimie de Clermont-Ferrand

#### Remerciements

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'équipe Conception Evaluation et Synthèse de Molécules Antalgiques (CESMA) de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, sous la direction du Professeur Sylvie Ducki et du Docteur Isabelle Ripoche.

Je remercie sincèrement le Professeur Sylvie Ducki, responsable de l'équipe, de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet de recherche, de m'avoir initié à la chimie médicinale et pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée lors de la rédaction du manuscrit et de la préparation à l'oral. J'exprime également toute ma gratitude au Docteur Isabelle Ripoche dit Mme Chupin pour m'avoir soutenu et encadrer lors de cette thèse. Son expérience en recherche et ses connaissances en chimie organique ont été un réel atout au cours de ses trois ans. Je la remercie également de m'avoir hébergé dans son bureau pendant plus de la moitié de ma thèse et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Je remercie également Shyam Radhe, Geoffrey Bourdier, Mathilda Mesnard et Solenne Rivière qui m'ont aidé dans l'avancement de ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur David Aitken, Professeur de l'Université Paris Sud d'Orsay et Monsieur Ahcène Boumendjel, Professeur de l'Université Joseph Fourier de Grenoble qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ces travaux, et qui m'ont donné de précieux conseils pour l'amélioration de ce manuscrit. Je remercie également Monsieur Claude Taillefumier, Professeur de l'université Blaise Pascal d'avoir accepté d'examiner ses travaux et de présider le jury de cette thèse. Mes plus sincères remerciements vont également à Madame Lu-Yun Lian, Professeur de l'Université de Liverpool pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon passage à Liverpool et pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse en tant qu'examinateur. Je remercie également Lionel Nauton du service de modélisation moléculaire de l'ICCF, pour la réalisation des études de modélisation et dynamique moléculaire, pour l'aide à la compréhension des résultats, sa disponibilité. Je tiens également à remercier Madame Christine Courteix, Professeur de l'Université d'Auvergne et Monsieur Philippe Marin, Directeur de Recherche à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier pour la réalisation des tests pharmacologiques et leur aide à la compréhension des résultats. Je tiens à remercier également Madame Aurélie Job, Technicienne de l'ICCF pour m'avoir permis d'obtenir des composés d'une grande pureté après purification par HPLC permettant ainsi leurs évaluations biologiques.

J'adresse également mes remerciements aux membres permanents de l'équipe CESMA, Messieurs Yves Troin, Pierre Chalard et Khalil Bennis pour leur soutien et leur bonne humeur lors de ces trois ans. Je remercie également Madame Isabelle Thomas, pour ses précieux conseils en synthèse organique et ses conseils dans le rangement de mon laboratoire et pour les repas animés passés au laboratoire ou ailleurs. Je remercie également les personnels du service de chimie organique de l'Ecole de Chimie, Madame Gaëlle Frammery sur laquelle on peut toujours compter quand on a besoin de produit ou alors de passer un tube RMN rapidement et Madame Safia Laïd sur qui on peut toujours compter lorsqu'on manque de matériel, je la remercie également pour nos longues discussions lors des pauses repas ou des pauses cafés dans son bureau, ainsi que pour son soutien lors de la rédaction de ce manuscrit. Je remercie aussi Messieurs Jean-Philippe Roblin et Jean-Louis Canet, Maître de Conférences à l'ENSCCF pour les discussions que nous avons pu avoir lors de l'encadrement de TP. Je remercie également Madame Alexandra Pruneyras, Professeur Agrégé de l'ENSCCF pour m'avoir initié à l'enseignement des travaux pratiques, tous les fous rires que nous avons pu avoir et avec qui je suis devenu ami. Je remercie Romain, le kéké FG DJ radio du 42, supporter indéfectible de l'ASSE avec qui j'ai partagé mon laboratoire et notre rangement bien à nous ainsi que pour toutes ses soirées passées ensemble, Nishanth pour ses trois ans de rigolade, de soirées et d'apprentissage du français et de l'anglais. Je remercie également Delphine pour toutes les aventures que nous avons passées ensemble que ce soit dans les centres commerciaux, au stade Marcel Michelin (Allez l'ASM), dans d'autres pays et en soirée ou encore lors de craquages intempestifs lorsque nous pensions être seuls au laboratoire.

Je remercie également ma mère, mon beau-père, mes frères, ma sœur, ma belle-sœur et mon beau-frère qui m'ont permis de faire ces longues études, m'ont soutenu et eu confiance en moi. Je remercie le reste de ma famille et mes amis d'avoir fait le déplacement pour me soutenir le jour de la soutenance.

<u> </u>
σ
( )
$\mathbf{U}$
Ð
$\mathbf{\overline{\mathbf{D}}}$
U
S
H
Ð
C
Ð
5
2
5
ž
F
<u>–</u>
Ľ
S
Ð
σ
_
σ
Ð
-
σ
Ļ
<b>(</b> )
<u> </u>

s ٿ	ou		ur	amin		ie R
A <b>m</b> ii ENSCC	10 <b>Ca</b> rli	18 <b>Li</b> sa	36 3 <b>Ar</b> thi	54 <b>Be</b> nj	<sup>86</sup> <b>Ch</b> a (	118 <b>Ma</b> ri
	9 <b>Pa</b> uline R	17 <b>Ma</b> rtin	35 <b>An</b> thony E	53 <b>Da</b> mien	85 <b>Ch</b> a v	117 <b>Ya</b> ël
	8 <b>Na</b> dège	16 <b>Et</b> ienne	34 <b>La</b> ura C	52 Lu	84 Mélanie	116 <b>Pa</b> uline B
	7 Gu	15 <b>Bo</b> ui	33 Céline	51 <b>So</b> lène	83 <b>Jé</b> rôme G	115 <b>De</b> nis
	<b>e</b> nnis	4 Alexandra	2 Ves P		2 Vadj	14 Buigui
	lara <b>1</b>	3 1 Driane /	1 andice	9 5 acky C	1 <b>a</b> cqueline <b>N</b>	13 1 1 Innette
	C a	0	) ierre-Yves <mark>C</mark>	3 4: Buriane <b>J</b>	avid B	12 1. lodie <b>P</b>
			isson <b>P</b>	as Li	han <b>D</b>	1 11 ffany <b>E</b> l
			s 29 Mis Thèse	6 ha J N	s 79 <b>a</b> rbara <b>Jc</b>	.0 11 <b>a</b> ura P <b>T</b> i
			evin A	46 <b>U</b> illaume	78 inest <b>B</b>	) 11 mone <b>L</b>
			alil K	45 Ivie D <b>G</b>	77 Iillaume <b>Er</b>	10 lentin <b>Si</b>
			nin Kh	44 Sy	re C <b>Gu</b>	sT <b>Q</b> U
			25 Cosr	43 LÍvia	75 P <b>i</b> err	107 <b>Yv</b> es
			24 <b>Ja</b> ydene	42 <b>St</b> even	74 Geoffrey	106 Li
			23 <b>Om</b> beline	41 Melissa	73 <b>Ca</b> mille M	105 <b>IS</b> а Т
			22 RJ	40 <b>Ni</b> shanth	72 <b>Ma</b> rie H	104 <b>IS</b> a R
			21 CESMA	39 <b>De</b> lphine	57-71 <b>Fa</b> mille Amis	89-103 <b>Am</b> is SEESIB
	4 <b>Je</b> an- Philippe	12 <b>Fl</b> orence	20 <b>Je</b> an-Pierre	38 <b>S</b> a M	56 Laure B	88 <b>JO</b> celyne
1 ENsccF	s Safia	11 Gaëlle	19 Alexis	37 Cécile	55 Y <b>a</b> nn	87 <b> e</b> an-Louis

re	wenn
71	103
Pier	<b>No</b> i
70	102
<b>Da</b> vid M	<b>Lo</b> ïc
69	101
<b>Ju</b> lie	Carlos
58	loo
<b>Ma</b> nu	<b>Ma</b> gali
57	99
l <b>e</b> an-Luc	S <b>h</b> yam
56	98
<b>Fa</b> ta Sylvie	Audrey
65 Pé <sub>père</sub>	97 9 HOussein
64	96
Mếmère	Michela
63	95
<b>An</b> thony V	<b>Sk</b> ippy
62	94
<b>So</b> phie	<b>Pi</b> erre A
61	93
<b>Jé</b> rôme V	<b>Pi</b> erre J
60	92
<b>Ké</b> vin	<b>Mu</b> riel
59	91
V <b>a</b> nessa	<b>An</b> tho
58	90
<b>Sy</b> lvain	<b>Na</b> dia
57	89
<b>Ma</b> man	<b>Cl</b> em

# Sommaire

Tab	le des Il	llustrations	10
Abb	réviatio	ons et acronymes	19
Préf	ace		23
Cha	pitre 1:	Introduction	27
1	La d	louleur	27
	1.1	Introduction	27
	1.2	La douleur neuropathique	
2	Les	interactions protéine-protéine et les protéines à domaine PDZ	37
	2.1	Les interactions protéine-protéine	37
	2.2	Les protéines à domaine PDZ	
	2.3	Les protéines PDZ et pathologies	46
	2.4	Les inhibiteurs de protéines PDZ	49
3	Le p	projet	60
	3.1	Partenaires du projet	60
	3.2	Travaux antérieurs	61
	3.3	Objectifs	67
Cha	pitre 2 :	Evaluation pharmacologique in vivo	73
1	Intro	oduction	73
2	Synt	thèse de l'indole 24	74
3	Eval	luation pharmacologique de l'indole 24	75
	3.1	Induction de la neuropathie	76
	3.2	Sélectivité par rapport à l'inhibition	78
	3.3	Sélectivité par rapport à un autre ligand	79
	3.4	Conclusion	81
4	Effe	et de l'indole 24 sur l'effet antalgique de la fluoxétine	81
	4.1	Induction de la neuropathie	81
	4.2	Résultats	83
	4.3	Conclusion	84
Cha	pitre 3 :	Optimisation	89

Intr	oduction
Inte	raction entre la protéine PSD-95 PDZ1 et le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> 89
3 Op	timisation de l'indole 24. Influence des substituants méthyles en position 3 (3-Me)
t de l'ac	eide carboxylique en position 6 (6-COOH)
3.1	Modélisation moléculaire95
3.2	Approche rétrosynthétique
3.3	Synthèse
3.4	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N
. Opt	imisation de l'indole 24. Rôle du Benzyloxy en postion 5 (5-OBn)102
4.1	Synthèse104
4.2	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N
Opt	imisation de l'indole 43107
5.1	Conception
5.2	Approche rétrosynthètique
5.3	Synthèse des indoles 48 et 49
5.4	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N
5.5	Evaluation <i>in vitro</i>
5.6	Conclusion
apitre 4:	Déconstruction/Reconstruction
Intr	oduction
1.1	Fragment-based drug design (FBDD)
1.2	Quelques exemples de la littérature128
1.3	FBDD et Interaction Protéine- Protéine (IPP) – Stratégie de Déconstruction131
Déc	construction de l'indole 24 et synthèse des fragments
2.1	Déconstruction
2.2	Synthèse des fragments
Crit	blage des fragments 87-93 par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N
3.1	Evaluation des fragments seuls
3.2	Evaluation des couples de fragments
3.3	Conclusion
Mo	délisation Moléculaire154
4.1	Molécules virtuellement conçues154
4.2	Procédure de modélisation155
	Intro Intro Inte Opt de l'ac 3.1 3.2 3.3 3.4 Opt 4.1 4.2 5.3 5.4 5.5 5.6 optre 4: Intro <i>I.1</i> 1.2 1.3 2.1 2.2 3.3 4 Mod 4.1 4.2

	4.3	Exploitation des résultats	
5	Synt	thèse des molécules 108 et 109	158
	5.1	Bibliographie	158
	5.2	Approche retrosynthètique	
	5.3	Synthèse des molecules 108 et 109	170
6	Eva	luation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N	
7	Con	nlusion	
Cha	pitre 5 :	: Tripeptides	
1	Intro	oduction	
2	Ana	alyse des tripeptides	
	2.1	Analyse par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N	194
	2.2	Simulation par Modélisation moléculaire	197
	2.3	Analyse par ITC	199
3	Con	nclusion	
3 Cha	Con pitre 6:	Les peptoïdes	202
3 Cha 1	Con pitre 6: Intro	nclusion Les peptoïdes oduction	
3 Cha 1 2	Con pitre 6: Intro Moo	nclusion Les peptoïdes oduction délisation	
3 Cha 1 2 3	Con pitre 6: Intro Moo Sym	nclusion Les peptoïdes oduction délisation	
3 Cha 1 2 3 4	Con pitre 6: Intro Moo Synt Eva	nclusion Les peptoïdes oduction délisation thèse luation biologique du pentapeptoïde 224	
3 Cha 1 2 3 4	Con pitre 6: Intro Moo Synt Eval 4.1	nclusion. Les peptoïdes oduction délisation thèse luation biologique du pentapeptoïde 224 Evaluation par RMN	
3 Cha 1 2 3 4	Con pitre 6: Intro Mod Synt Eval 4.1 4.2	Les peptoïdes	
3 Cha 1 2 3 4 5	Con pitre 6: Intro Mod Synt Eval 4.1 4.2 Con	Les peptoïdes oduction délisation thèse luation biologique du pentapeptoïde 224 Evaluation par RMN Evaluation in vitro	202 207 207 207 209 219 213
3 Cha 1 2 3 4 5 Con	Con pitre 6: Intro Mod Synt Eva 4.1 4.2 Con clusion	Inclusion         Les peptoïdes         oduction         délisation         délisation         ithèse         iluation biologique du pentapeptoïde 224         Evaluation par RMN         Evaluation in vitro         inclusion         inclusion	
3 Cha 1 2 3 4 5 Con Exp	Con pitre 6: Intro Mod Synt Eval 4.1 4.2 Con clusion eriment	Les peptoïdes oduction délisation thèse lluation biologique du pentapeptoïde 224 Evaluation par RMN Evaluation <i>in vitro</i> nclusion tet Perspectives	202 207 207 207 209 219 216 218 219 219 222 230
3 Cha 1 2 3 4 5 Con Exp ANI	Con pitre 6: Intro Mod Synt Eva 4.1 4.2 Con clusion eriment NEXES	Les peptoïdes Les peptoïdes oduction délisation thèse luation biologique du pentapeptoïde 224 Evaluation par RMN Evaluation in vitro neclusion et Perspectives tal Part	202 207 207 207 209 219 216 216 218 219 222 230 286

# **Table des Illustrations**

Figure 1: Structures chimiques et nomenclature des acides aminés	24
Figure 2: Principaux symptômes douloureux neuropathiques <sup>11</sup>	
Figure 3: Outil diagnostic DN4 <sup>18</sup>	
Figure 4: Exemples des principes actifs des traitements de première intention	
Figure 5: Principe actifs des traitements de deuxième intention	
Figure 6: Exemple de principes actifs de traitements de troisième intention	
Figure 7: Homo-oligomère : Sperm Lysin (PDB : 1LYN) et Hétéro-oligomère :	: RhoA et
RhoGAP signalling complex (PDB : 10W3)	
Figure 8: Réseau des interactions protéine-protéines du génome humain <sup>31</sup>	
Figure 9: Famille des protéines PDZ en fonction de leur composition <sup>41</sup>	40
Figure 10: Structure du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 (PDB 3GSL). Les feu	uillets sont
représentés en jaunes, les hélices en bleues, les boucles en beiges et le motif GLGF	<sup>7</sup> en rouge. 41
Figure 11:A : Représentation en 3D de la poche d'interaction S0 (noir) de PSD	-95 PDZ1
(PDB : 3GSL) délimitée par la boucle GLGF (rouge), le feuillet $\beta_2$ (jaune), la boucl	e S1 (vert)
et l'hélice $\alpha_2$ (bleue) B: Représentation en 3D de PSD-95 PDZ1 en fo	nction de
l'hydrophobie des résidus	42
Figure 12: Répresentation 2D (B) et 3D (A) des interactions entre PSD-95 PDZ3 et	le peptide
$OTSV^{53}$	43
Figure 13: Représentation 2D des interactions du peptide ErbB2 (TLGLDVP)	7) avec la
protéine PDZ Erbin <sup>49</sup>	
Figure 14: Alignement FASTA des domaines PDZ et représentation en 3D des dom	aines PDZ
Figure 15: Les trois classes de domaines PDZ	45
Figure 16: Stratégie peptidomimétique montrant l'inhibition de l'interaction entre	PSD-95 et
$5-\text{HT}_{2A}^{63}$	
Figure 17: Inhibition directe	
Figure 18: Inhibition indirecte	
Figure 19: Structure chimique des vecteurs, le TAT, l'antennapedia, le R11 et	de l'acide
mvristique	
Figure 20: Structure chimique inhibiteurs issus de l'utilisation de mime de peptides.	
Figure 21: structure chimique inhibiteurs peptidiques cycliques	
Figure 22: Inhibiteurs d'IPP de synthèse	
Figure 23: Organigramme fonctionnel	61
Figure 24: résumé des travaux antérieurs	
Figure 25: Spectre HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95. <sup>52</sup>	
Figure 26: Spectre HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95.	
Figure 27:Spectre HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N de PSD-95 PDZ1 seul (noir)/en présence (bleu) d	e 10 éq de
24	

Figure 29: Evaluation de l'effet antihyperalgique sur des rats neuropathiques après administration du peptide TAT-2ASCV (0.04 nmol/rat i.t.), des composés 19, 21 et 24 (0.1 et 0.5 nmol/rat i.t.) ou du DMSO (10  $\mu$ L/rat i.t.) (n = 7-28 rats par composés). Les données sont Figure 32 : Schématisation des nerfs sciatique et saphène, leurs branches terminales et leurs Analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®) utilisé pour l'appréciation de Figure 33: Figure 34: Structure chimique du M100907, antagoniste spécifique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.....78 Figure 35: Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution des seuils de vocalisation après coadministration intrathécale de l'indole 24 en présence ou non de M100907. Les valeurs sont Figure 36: Effet de l'indole 24 sur l'hypersensibilité mécanique induite par le NMDA chez des rats sains. Les valeurs sont exprimées en A.U. x minutes +/- ES......80 Figure 37: Evolution des seuils de réponse 50% après administration répétée de fluoxétine (5x10 mg/kg, i.p.) ou NaCl 0.9% (5 x 5 mL/Kg) et suivie d'une administration aiguë de 24 (50 µmol/rat, i.t.) ou de DMSO 20 % (10 µl/rat, i.t.) chez le rat SNL allodynique. Les valeurs Figure 38: Mécanisme d'action hypothétique de l'indole 24 et de la fluoxétine sur la Figure 39: Principe de la titration calorimétrique isotherme (ITC), (A) Schéma de l'appareil utilisé en ITC. (B) Présentation des résultats obtenus par ITC avec en haut les différences de Figure 40: Docking de 5-HT2A (Lys-Val-Ser-Cys-Val) dans PSD-95 PDZ1 (PDB: 3GSL) ..93 Figure 41: Structure 3D du complexe PSD-95 PDZ1/24 déterminé par RMN ......94 Figure 43: Modélisation moléculaire des indoles 30, 31 et 32 ......96 Figure 44: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence de l'indole 30 (vert), (B) seul (bleu)/en présence de l'indole 31 (vert), (C) seul (bleu)/en présence de l'indole 32 (vert) et (D) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert).100 Figure 45: Représentation en 3D des acides aminés de PDZ1 PSD-95 (PDB : 3GSL) perturbés par les indoles 24 et 30, les couleurs indiquent le degré de perturbation des acides aminés Figure 47: Docking de l'indole 43 sans le méthyle ......103 Figure 48: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence de l'indole 43 (rouge) et (B) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert) .....105

Figure 49: Représentation 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les indoles
24, 30 et 43106
Figure 50: Structure chimique des indoles 48 et 49107
Figure 51: <i>Docking</i> des indoles 48 et 49 avec PSD-95 PDZ1 (PDB: 3GSL)108
Figure 52: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (noir)/en
présence de l'indole 48 (rouge), (B) seul (noir)/en présence de l'indole 49 (rouge) et (C) seul
(noir)/en présence de l'indole 24 (vert)115
Figure 53: Représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les indoles
24, 43 et 49116
Figure 54: Gels de chromatographie d'affinité à différentes concentrations de 49118
Figure 55: Pourcentage de PSD-95 PDZ1 recruté par 5-HT <sub>2A</sub> en l'abscence de l'indole 49.118
Figure 56: Etapes clés de l'appoche FBDD124
Figure 57: Principe du FBDD
Figure 58: Amélioration d'un inhibiteur de kinases129
Figure 59: Molécules issues du fragment based inhibitrices de Hsp90130
Figure 60: Déconstruction de la molécule 76132
Figure 61: Formule chimique de l'indole 24
Figure 62: Structure de 24 avec PDZ1/PSD-95 déterminé par RMN noesy134
Figure 63: Déconstruction indole 24135
Figure 64: Superposition des spectres RMN de 24, 88, 91 et 92 avec celui de PSD-95 PDZ1 :
(A) seul (bleu)/en présence du fragment 92 (rouge), (B) seul (bleu)/en présence du fragment
88 (rouge), (C) seul (bleu)/en présence du fragment 91 (rouge) et (D) seul (noir)/en présence
de l'indole 24 (vert)
Figure 65: Représentation 3D du domaine PDZ de PSD-95 avec les acides aminés perturbés
par les fragments, (A) 87, (B) 88, (C) 89, (D) 90, (E) 91, (F) 93142
Figure 66: Structure 3D de PDZ1 de PSD-95 avec quelques acides aminés important143
Figure 67: Superposition des spectres RMN de 24, 88/93, 87/89, 87/92 avec celui de PSD-95
PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence du couple 88/93 (rouge), (B) seul (bleu)/en présence du
couple 87/89 (rouge), (C) seul (bleu)/en présence du couple 87/92 (rouge) et (D) seul (noir)/en
présence de l'indole 24 (vert)145
Figure 68: Représentation 3D du domaine PDZ1 de PSD-95 indiquant les acides aminés
perturbés par les fragments A et B seuls (à gauche) et par le couple de fragments A/B
correspondant, (A) Fragments 87, 92 et couple 87/92, (B) Fragments 87, 93 et couple 87/93,
(C) Fragments 87, 88 et couple 87/88, (D) Fragments 88, 89 et couple 88/89, (E) Fragments
88, 90 et couple 88/90, (F) Fragments 88, 91 et couple 88/91, (G) Fragments 88, 93 et couple
88/93
Figure 69: Histogramme de la somme des perturbations pour les fragments et les couples de
fragments, en noir ( $\Sigma\Delta\delta < 2$ ppm), en bleu ( $2 < \Sigma\Delta\delta < 2.5$ ppm) et en orange ( $\Sigma\Delta\delta > 2.5$ ppm).
Figure 70: Représentation 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les couples
de fragment 87/88, 88/91, 88/93 et l'indole 24153
Figure 71: Meilleurs couples de fragments154
Figure 72: Molécules virtuelles

Figure 73: Estimation de l'énergie libre de liaison par AutoDock Vina <sup>152</sup> 1	155
Figure 74: Molécules possédant les meilleurs scores	156
Figure 75: Représentation en 3D de la modélisation moléculaire	157
Figure 76: Molécules issues de la modélisation moléculaire à synthétiser	158
Figure 77: Exemples de pyrroles	159
Figure 78: Structure chimique du produit supposé après dégradation en solution	183
Figure 79: Superposition des spectres RMN de 24, 108, 109 et 175 avec celui de PSD-	-95
PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence du couple 175 (rouge). (B) seul (bleu)/en présence	du
couple 109 (rouge). (C) seul (noir)/en présence du couple 108 (bleu) et (D) seul (noir)	)/en
présence de l'indole 24 (vert)	184
Figure 80: Représentation 3D du domaine PDZ de PSD-95 avec les acides aminés pertur	bés
par les fragments, (A) 108, (B) 109, (C) 175	185
Figure 81: Structure chimique des tripeptides 215, 216, 217 et 2181	194
Figure 82: Superposition des spectres RMN de 215, 216, 217 et 218 avec celui de PSD	-95
PDZ1 : (A) seul (noir)/en présence du tripeptide 215 (rouge), (B) seul (noir)/en présence	du
tripeptide 216 (rouge) (rouge), (C) seul (noir)/en présence du tripeptide 217 (rouge) et (	(D)
seul (noir)/en présence du tripeptide 218 (rouge)	195
Figure 83: Placement supposé du tripeptide TXV dans le poche1	196
Figure 84: Energie d'interaction issue de la dynamique moléculaire entre le domaines P PD	DZ1
de PSD-95 et les différents tripeptides, (A) SCV 1, (B) SSV 2, (C) TQA 3, (D) TQV 4,	(E)
TSV 51	197
Figure 85: alignement des séquences de PSD-95 PDZ1 (PDB: 11U2) et SAP-97 PDZ1 (PD	OB:
1ZOK)	199
Figure 86: Courbes d'interaction ITC du domaine PDZ1 de SAP-97 (100 µM) avec différe	ents
peptides (750 µM), (A) SCV 215, (B) SSV 216, (C) TQV 218, (D) RETQV 220,	(E)
LQRRETQV 221	201
Figure 87: Peptide et peptoïde2	207
Figure 88: Tripeptoïdes se liant au récepteurs opioïdes <sup>185</sup>	208
Figure 89: Représentation en 3D des interactions entre 5-HT2a et PSD-95 PDZ12	209
Figure 90: interactions entre l'Ile 20 de PSD-95 PDZ1et la Ser (-2) de 5-HT2a2	210
Figure 91: Distance entre l'Ile 20 et la Ser (-2), en rouge la distance A et en bleu la distance	B.
	210
Figure 92: Différence entre un peptide, un peptoide et un retropeptoide2	211
Figure 93: Représentation 3D des interactions entre PSD-95 PDZ1 et le peptoïde 2242	212
Figure 94: Différence des interactions entre le peptide de 5-HT2A et la protéine PSD-94	5 e
PDZ et le retropeptoïde et la protéine PSD-95 PDZ12	213
Figure 95: Distance entre le NH de l'Ile 20 et le C=O du mime de la Val du retropeptoïde 2	224
	213
Figure 96: Amines primaires utilisées dans la synthèse du pentapeptoïde2	214
Figure 97: RMN HSQC de 224 avec PDZ1 de PSD-952	216
Figure 98: Réprésentation 3D PSD-95 avec 2242	217
Eigura 00: Cal da chromatographia d'affinité à différentes concentrations de 224	218

Figure 100: Pourcentage de PSD-95 PDZ1 recruté par 5-HT2A en l'abscence de l'indole 49 et
du peptoïde 224
Figure 101: Interaction entre la protéine PDZ PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT2a,
(A): Représentation schématique de l'interaction entre les deux protéines, (B) Représentation
en 3D du domaine PDZ1 de PSD-95 en interaction avec l'extrémité C-terminale du récepteur
5-HT <sub>2A</sub> (KVSCV)
Figure 102: Indoles 24, 48 et 49
Figure 103: Structure chimique des molécules issues du fragment based224
Figure 104: Molécules possible à synthétiser pour la suite du fragment based
Figure 105: Peptoïde 224
Figure 106: Motif des molécules possiblezs lors de la combinaison des différentes stratégies

Schéma 1: Synthèse de l'indole 24	75
Schéma 2: Retrosynthèse des indoles 30, 31 et 32	97
Schéma 3: Synthèse des indoles 30, 31 et 32	98
Schéma 4: Retrosynthèse de l'indole 43	104
Schéma 5: Synthèse de l'indole 43	104
Schéma 6: Retrosynthèse des indoles 48 et 49	109
Schéma 7: Stratégie de synthèse des indoles 48 et 49	110
Schéma 8: Synthèse de l'éthanolamine protégée	111
Schéma 9 : Synthèse de l'amine 60	112
Schéma 10: synthèse des indoles 48 et 49	114
Schéma 11: Synthèse du fragment 87	136
Schéma 12: synthèse du pyrrole 89	136
Schéma 13: Synthèse du pyrrole 91 à partir du pyrrole 99	137
Schéma 14: synthèse du fragment 92	137
Schéma 15: Synthèse de pyrroles tétrasubstitués par des groupements ester <sup>160,161</sup>	160
Schéma 16: Synthèse de pyrroles disubstitués par des fonctions ester	160
Schéma 17: synthèse de pyrrole à partir d'alcynes	161
Schéma 18: synthèse de pyrroles par chimie click	162
Schéma 19: synthèse de pyrroles à partir de composés dicarbonylée	162
Schéma 20: acylation de Friedel Crafts	163
Schéma 21: Régiosélectivité de l'acylation de Friedel <sup>168</sup>	164
Schéma 22: Réaction de Friedel Crafts catalysé par de l'yterbium	165
Schéma 23: couplage thio	165
Schéma 24: Benzylation d'un pyrrole à l'aide d'un dérivé bromé	165
Schéma 25: Mécanisme de benzylation avec ZrCl <sub>4</sub>	166
Schéma 26: Schéma rétrosynthétique	166
Schéma 27: Retrosynthèse des acides benzoïques	167
Schéma 28: Protection des fonctions présente sur le cycle benzénique	167
Schéma 29: Oxydation directe des methyles en acide carboxylique	168
Schéma 30: Synthèse de l'acide carboxylique par le dérivé bromé	169
Schéma 31: Analyse rétrosynthètique des molécules 108, 109, 110 et 175	170
Schéma 32: Synthèse envisagée pour former les acides 180 et 181	171
Schéma 33: Protection de l'acide 4-methylsalicylique	171
Schéma 34: Différentes techniques d'oxydation trouvées dans la littérature	171
Schéma 35: Retrosynthèse de l'acide 180 à partir du composé 183	172
Schéma 36: Formation de l'aldéhyde 186 à partir du composé méthylé 183	172
Schéma 37: Formation de l'acide 180 par une oxydation de Jones de l'aldéhyde 186	173
Schéma 38: Synthèse de l'acide 180 à partir du composé bromé 187	173
Schéma 39: Synthèse de l'acide 181	174
Schéma 40: Tests de substitution de CCl <sub>4</sub>	175
Schéma 41: Formation de l'alcool avec le brut issu de la bromation	175
Schéma 42: Retrosynthèse des pyrroles 156 et 157	176
Schéma 43: Synthèse du chlorure d'acide 192	177

177
178
178
179
214
215
215

Tableau 1: Valeur d'IC50
Tableau 2: Constantes de dissociation (mesurées par anisotropie de fluorescence) de différents
ligands endogènes vis à vis des trois domaines de PSD-9590
Tableau 3: Résultats de la détermination des K <sub>d</sub> à partir des analyses ITC92
Tableau 4: Acides aminés perturbés par différents ligands    100
Tableau 5: Acides aminés perturbés par différents ligands dont l'indole 43105
Tableau 6: acides aminés perturbés pas les indoles 48 et 49    116
Tableau 7: Résultat déconstruction nutlin 76
Tableau 8: Résultats de l'analyse des spectres HSQC pour chaque fragment
Tableau 9: Capacité des couples de fragments à perturber les acides aminés du domaine PDZ1
de PSD-95145
Tableau 10: Récapitulatif des perturbations causées par les couples de fragments, en blanc
$(\Sigma\Delta\delta < 2 \text{ ppm})$ , en bleu $(2 < \Sigma\Delta\delta < 2.5 \text{ ppm})$ et en orange $(\Sigma\Delta\delta > 2.5 \text{ ppm})$ 146
Tableau 11: Résultat du docking    156
Tableau 12: Acides aminés perturbés par les biligands    185
Tableau 13: protéine d'origine des tripeptides
Tableau 14: Comparaison des volumes et des lipophilies des acides aminés Ala et Val196
Tableau 15: Récapitulatif des Kd déterminés à partir des analyses ITC    202

### Abbréviations et acronymes

5-HT : 5-HydroxyTryptamine (sérotonine) 5-HT<sub>2A</sub> : Récepteur de la sérotonine 2a 5-HT<sub>2C</sub> : Récepteur de la sérotonine 2c Å : Angström **ADMET** : Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicité AIBN : Azobisisobutyronitrile AINS ; Anti-inflammatoire non stéroïdien AMPA :  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazolepropionic acid receptor ASIC : Acid-sensing ion channels AUC : Area under the curve Bn : Benzyl Boc : *tert*-Butoxycarbonyl CAL: CFTR associated ligand CAN: Ceric ammonium nitrate Calcd: calculated CCI : Chronic construction injury CCM : chromatographie sur couche mince CDI: carbonyldiimidazole CESMA : Conception Et Synthèse de Molécules Antalgiques **CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane** Conductance regulator CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill **CRIPT** : Cysteine-rich PDZ-binding protein

CSK : C-Src kinase Cyc: Cyclohexane Da : Dalton DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène DCE : Dichloroéthane DCM: Dichlorométhane DCC : *N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimide DIPEA : N,N-Diisopropylethylamine Dlg : Drosophila disc large tumor suppressor DMAP : 4-(*N*,*N*-diméthylamino)pyridine DMF : N,N-diméthylformamide DMSO : Diméthylsulfoxide DRX : Diffraction des Rayons X Dvl : Dishevelled protein EDC: 1-Ethyl-3-(3-N,Ndiméthylaminopropyl) carbodiimide éq ou equiv: equivalent EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique ErbB2 (EGFR) : Epidermal growth factor receptor 2 Et : Ethyle FBDD : Fragment-based drug design FC : Flash chromatography

FDA: Food and drugs administration

FGFR1: Fibroblast growth factor receptor 1

Fmoc: Fluorenylmethyloxycarbonyl

Fz: frizzled

g : gramme

GAIP: G alpha interacting protein

GIPC: GAIP interacting protein C-terminus

GK: Guanylate kinase

GluA2: Glutamate receptor 2

GluR6: Glutamate receptor 6

GRIP: Glutamate receptor-interacting protein

GTP: Guanosine triphosphate

h: heure

HBA: Hydrogen bond acceptor

HBD: Hydrogen bond donor

HOBt: hydroxybenzotriazole

HSQC: Heteronuclear single quantum correlation

Hsp90: Heat shock protein 90

Hz : Hertz

IASP: International association for the study of pain

IC<sub>50</sub>: concentration inhibitrice médiane

ICCF : Institut de chimie de Clermont-Ferrand

IGF : Institut de génomique fonctionnelle

i-Pr : iso-Propyle

IPP: Interaction proteine-protéine

ITC : Isothermal titration calorimetry

ISRS : Inhibiteur séléctif de la recapture de la sérotonine

*J* : constante de couplage

Ki : Constante d'inhibition

Kd : Constante de dissociation

Kv : Potassium channel voltage dependent

logP : Coefficient de partage octanol-eau (perméabilité)

MAGI3 : Membrane associated guanylate kinase 3

MAGUK : Membrane associated guanylate kinase

Me : Methyle

min : Minute

mg : Milligramme

mL : Millilitre

mmol : Millimole

Mp : Melting point

MS: Spectroscopie de masse

MUPP1 : Multi-PDZ domain protein 1

MVK : Methyl vinyl ketone

MW: Molecular weight

Nav: Sodium channel voltage dependent

NBS : N-Bromosuccinimide

nBu : *n*-Butyle

nM : nanomolaire

NHERF1 :  $Na^+/H^+$  exchanger regulatory factor-1

NMDA :N-Methyl-D-aspartate

NMDAR: N-Methyl-D-aspartate receptor

nNOS : Nitric oxide synthase

Noesy: Nuclear overhauser effect spectroscopy

NR: Glutamate [NMDA] Receptor subunit

ns : nanoseconde

NS1: Influenza protein

p38 : P38 mitogen-activated protein kinases

p53: transformation-related protein 53

PDB : Protein Data Bank

PDZ: Postsynaptic density protein 95 (PSD-95)/Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)/Zonula occludens-1 protein (zo-1)

Pdzd2: PDZ domain containing protein 2

Ph: Phényle

PICK1: Protein interacting with C kinase 1

Pim-1: Proto-oncogene serine/threonine protein kinase Pim-1

PSD: Post-synaptic density protein

SAR : Structure-activity relationship

RhoA : Ras homolog gene family, member A

RhoGap: Ras homolg GTP-ase activating protein

R<sub>f</sub>: Rapport frontal

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

SAP : Synapse-associated protein

SFETD : Société Française d'Etude et du Traitement de la Douleur

SH3 : SRC Homology 3 domaine

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SPR : Surface Plasmon Resonance

STD : Saturation Transfer Difference

TA : température ambiante

TAT : Trans-activator of transcription

Tf : Triflate

TFA : Acide trifluroacétique

THF : tétrahydrofurane

Ts : Tosyl

TS : Fluorescence-based Thermal Shift

UA : Unité Arbitraire

VDW : Van Der Waals

WaterLOGSY : Water Ligand Observed via Gradient SpectroscopY

ZO : Zonula Occludens

## Préface

Dans ce manuscrit, nous réalisons la conception d'inhibiteurs de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>.

Les dénominations suivantes seront utilisées pour faire référence à la protéine à domaine PDZ PSD-95 ou au domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 :

- la protéine PDZ,
- PSD-95,
- le domaine PDZ1 de PSD-95.
- PSD-95 PDZ1

Les appelations suivantes feront référence au récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> :

- le ligand PDZ
- 5-HT<sub>2A</sub>

Dans ce manuscrit, nous allons régulièrement parler du groupement acide carboxylique que nous nommerons simplement acide.

Dans ce manuscrit, nous allons faire référence de nombreuses fois aux acides aminés (Figure 1) du domaine PDZ1 de PSD-95. Afin d'éviter les confusions entre les différentes appelations, nous avons pris la décision d'utiliser :

- La notation 3 lettres pour faire référence aux acides aminés lorsque nous évoquerons les acides aminés impliqués dans des interactions protéine-protéine.
- La notation 1 lettre lorsque nous ferons référence aux acides aminés perturbés par les différents ligands PDZ testés, ou pour faire référence à la séquence d'un peptide.

Les acides aminés de la protéine PDZ sont numérotés par des valeurs positives (1, 2, 3, ..., 100) de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale alors que les acides aminés du ligand PDZ sont numérotés à partir de l'extrémité C-terminale qui porte le numéro 0 à l'extrémité N-terminale par des valeurs négatives (-1, -2, -3, -4,...)



Figure 1: Structures chimiques et nomenclature des acides aminés

# CHAPITRE 1

1	La douleur		
	1.1 In	troduction	27
	1.2 La	a douleur neuropathique	
	1.2.1 1.2.2 1.2.3	Définition L'origine de la douleur neuropathique Diagnostic des douleurs neuropathiques	
	1.2.3 1.2.3 1.2.3	<ul> <li>3.1 L'interrogatoire</li> <li>3.2 L'examen clinique</li> <li>3.3 Les outils du diagnostic</li> </ul>	
	1.2.4	Traitements de la douleur neuropathique	
2	Les int	eractions protéine-protéine et les protéines à domaine PDZ	
	2.1 Le	es interactions protéine-protéine	
	2.2 Le	es protéines à domaine PDZ	
	2.2.1 2.2.2 2.2.3	Présentation Le site d'interaction La classification des ligands PDZ	
	2.3 Le	es protéines PDZ et pathologies	46
	2.3.1 2.3.2 2.3.3 2.3.4	Le cancer La muscoviscidose L'attaque ischémique La douleur	46 46 47 47
	2.4 Le	es inhibiteurs de protéines PDZ	49
	2.4.1 2.4.1 2.4.1	<ul> <li>1.1 L'utilisation de peptides</li> <li>1.2 L'uilisation de mimes de peptides</li> <li>1.3 La synthèse de molécules organiques</li> </ul>	
3	Le proj	jet	60
	3.1 Pa	artenaires du projet	60
	3.2 Ti	ravaux antérieurs	61
	3.3 O	bjectifs	67
	3.3.1 3.3.2 3.3.3	Optimisation Fragment-based drug design Utilisation de mime de peptides	68 68 68

#### SOMMAIRE

# **Chapitre 1: Introduction**

#### 1 La douleur

#### 1.1 Introduction

La douleur est définie selon l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion »<sup>1</sup>. La douleur peut être classée selon un facteur temps, la douleur aiguë et la douleur chronique, ou selon le mécanisme physiopathologique, la douleur par excès de nociception, la douleur dysfonctionelle et la douleur neuropathique.<sup>2,3</sup>

La douleur aigüe est une douleur immédiate causée par une douleur « ordinaire » c'est-à-dire une stimulation nociceptive de l'organisme, qui peut prendre la forme d'un stimulus mécanique (piqûre lors de la prise de sang) ou thermique (contact de la peau avec une source froide ou chaude). C'est une douleur temporaire qui peut durer de quelques secondes à quelques semaines, qui s'atténue d'elle-même si la cause de celle-ci est supprimée.

La douleur aigüe est utile car elle joue un rôle d'alarme pour l'être humain en le prévenant d'un danger immédiat ou imminent. Par exemple, si nous posons notre main sur une plaque chaude, un message douloureux sera envoyé au cerveau pour que nous enlevions notre main de cette plaque. En clair, cette douleur nous permet de nous protéger contre des situations nocives.

La douleur chronique est une douleur qui persiste pendant au moins trois mois. Celleci n'a pas de rôle utile pour le malade, au contraire elle peut avoir un effet néfaste sur la qualité de vie du patient. En effet, le fait de souffrir en permanence peut entraîner des comportements dépressifs ou agressifs, entrainant un repli social et des répercussions sociales et professionnelles (perte emploi, mi-temps,...), voire même économiques (coût traitement, ...).

Les maladies douloureuses chroniques les plus fréquentes sont les lombalgies, les douleurs neuropathiques, les céphalées chroniques ou encore les douleurs liés au cancer.<sup>4</sup>

Les douleurs nociceptives, appelée également douleur par excès de nociception, résultent d'une stimulation mécanique, thermique ou chimique des tissus périphériques (peau, muscles, ...) qui provoque un influx douloureux qui est transmis par le système nerveux intact. Ce sont généralement des douleurs aigües comme les brûlures, les entorses, ou encore les fractures. Cependant, elles peuvent devenir des douleurs chroniques comme les douleurs rhumatismales ou le cancer.

Les traitements de ces douleurs diffèrent en fonction des causes et de l'intensité de la douleur, d'où un traitement possible par les antalgiques non opioïdes (paracétamol ou AINS) ou opioïdes faibles (codéine) pour des douleurs de faible ou moyenne intensité et par des antalgiques opioïdes forts (morphine) pour des douleurs intenses ou chroniques<sup>4</sup>.

Les douleurs dysfonctionnelles (par exemple la fybromialgie) sont des douleurs sans lésion apparente, sans cause identifiable, mais réellement ressenties par le malade. Elles sont liées au psychisme de celui-ci, c'est-à-dire à son émotivité, son affectivité. Ces douleurs peuvent être traitées en s'occupant des problèmes socio-psychologiques du malade. Ces maladies sont insensibles aux antalgiques classiques mais les médicaments psychotropes (antidépresseur et antiépileptique) et la psychothérapie peuvent être utiles.

Il existe un dernier type de douleur, la douleur neuropathique qui sera détaillé dans le chapitre suivant puisque ce mémoire s'intéresse plus particulièrement à ce type de douleur.

#### 1.2 La douleur neuropathique

#### 1.2.1 Définition

La douleur neuropathique est définie comme « une douleur liée à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel », par l'IASP.<sup>5,6,7</sup> En effet, la douleur neuropathique est une douleur causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux. Celle-ci peut être due à une lésion du système nerveux périphériques (nerfs) ou du système nerveux central (moelle épinière, cerveau) aussi appelée douleur centrale dans ce dernier cas. Elle prend une place importante dans la douleur chronique. Elle est souvent due à un dysfonctionnement au niveau des voies de la douleur. La douleur est localisée le plus

souvent dans la zone d'innervation de la lésion et est parfois associé à une perte de sensibilité aux stimuli mécaniques ou thermiques.

Les douleurs neuropathiques peuvent être des douleurs spontanées ou des douleurs provoquées.<sup>7,8,9</sup> Les douleurs spontanées sont de deux types, elles sont soit continues superficielles (brûlure) ou profondes (compression ou crampes), soit paroxystique (décharge électrique ou coups de poignards). Ces douleurs sont souvent associées aux douleurs provoquées qui peuvent être dues à une stimulation douloureuse ou non douloureuse. Les douleurs neuropathiques (Figure 2) peuvent apparaître sous différentes formes : il existe l'hyperalgésie, l'allodynie et l'hyperpathie.<sup>10,11</sup>



Figure 2: Principaux symptômes douloureux neuropathiques<sup>11</sup>

L'hyperalgésie correspond à une douleur anormalement élevée à une stimulation douloureuse qui ne devrait pas l'être autant, par exemple, des douleurs postopératoires. Deux types de douleurs sont distingués dans le cas des stimulations douloureuses ou nociceptives :

- L'hyperalgésie mécanique due à une stimulation mécanique normalement peu douloureuse.
- L'hyperalgésie thermique due à une stimulation chaude ou froide normalement peu douloureuse.

L'allodynie correspond à une réponse douloureuse à un stimulus non douloureux comme l'effleurement, la chaleur, ou certains mouvements. Ce type de douleur est spécifique de la douleur neuropathique. Elle peut être très gênante pour le malade dans sa vie de tous les jours, par exemple, si le malade ne peut pas supporter le frottement des vêtements sur sa peau. Dans le cas des stimulations non douloureuses ou non nociceptives, deux types d'allodynie sont distinguées :

- L'allodynie mécanique du à une stimulation mécanique dynamique du type frottement ou statique du type pression légère ou simple toucher.
- L'allodynie thermique due à une stimulation thermique chaude ou froide qui n'est normalement pas douloureuse.

L'hyperpathie correspond à une douleur très intense, qui ne s'arrête pas avec l'arrêt du stimulus douloureux et qui s'étend au-delà de la zone où a eu lieu le stimulus. Par exemple, un stimulus douloureux au niveau de la main qui va s'étendre au bras tout entier.

Dans la zone douloureuse, il est observé dans la quasi-totalité des cas des paresthésies. Ce sont des sensations anormales non douloureuses du type picotement, fourmillement, engourdissement ou démangeaisons. Elles sont appelées dysesthésie lorsqu'elles sont désagréables pour les patients.

#### *1.2.2 L'origine de la douleur neuropathique*

Il existe plusieurs origines pour la douleur neuropathique.<sup>10</sup> Elle peut provenir d'une atteinte du système nerveux périphérique :

- Origine traumatique : plaie des nerfs, étirement du plexus brachiale ;
- Pathologies chroniques : diabètes, SIDA, cancers [maladie ou traitement (oxaliplatine)<sup>12</sup>], ... ;
- Amputation : symptôme du membre fantôme ;
- Zona.

La douleur neuropathique peut provenir d'une atteinte du système nerveux central :

• Traumatisme de la moelle épinière : paraplégie, tétraplégie,... Ceci conduit plutôt à des douleurs types hyperalgésie ou allodynie ;

• Lésions cérébrales : traumatisme crânien, accident vasculaire cérébrale, tumeurs, ... Ceci conduit plutôt à des douleurs hyperpathiques

Les atteintes peuvent venir d'un contexte non évocateur, c'est-à-dire sans origine évidente. Par exemple, elles peuvent arriver après une intervention chirurgicale ou des gestes médicaux. Dans ce cas, le diagnostic est très important car il peut éviter des interventions inutiles qui risquent d'augmenter la douleur du malade comme la sciatique neuropathique qui peut aussi être inflammatoire (mal de dos).

#### 1.2.3 Diagnostic des douleurs neuropathiques

Dans le cas des douleurs neuropathiques, le diagnostic est un élément indispensable pour fournir un traitement adapté aux malades. Le diagnostic est plus simple dans un contexte évocateur d'une douleur neuropathique, c'est-à-dire dans le cas où une lésion nerveuse est identifiée ou supposée. Dans le cas contraire, le diagnostic sera beaucoup plus compliqué car la douleur neuropathique peut coexister avec d'autres types de douleurs.

#### 1.2.3.1 L'interrogatoire

Le diagnostic repose avant tout sur la consultation médicale, dans la reconnaissance des signes et des symptômes décrits par le patient lors de l'interrogatoire. Aujourd'hui les diagnostics sont plus simples car des outils ont été validés par les pairs et sont facilement applicables par les médecins.<sup>13</sup> Le diagnostic est évoqué dès l'interrogatoire du patient car parfois le vocabulaire utilisé par les patients est caractéristique des douleurs neuropathiques. Parmi tous les qualificatifs utilisés par les patients atteints de douleurs chroniques seuls quelques uns permettent de différencier les douleurs neuropathiques des autres types de douleurs, comme l'utilisation de « brûlures », « décharges électriques » ou encore « froid douloureux ».<sup>13,14,15</sup> De plus, la présence de paresthésie ou de dysesthésie dans la zone atteinte possède une bonne valeur diagnostic. Toutefois, tous les termes utilisés pour la description de la douleur ne sont pas spécifiques de la douleur neuropathique, comme « crampe » ou « déchirure », même si leurs utilisations dans d'autres types de douleurs est moindre.<sup>13,16</sup>

La confirmation du diagnostic de douleur neuropathique sera complétée par l'addition des résultats de l'interrogatoire et de l'examen clinique.

#### 1.2.3.2 L'examen clinique

L'examen clinique permet l'identification de la zone douloureuse, qui est en générale une zone dans laquelle un déficit existe.<sup>13</sup> Le plus souvent il est observé un déficit sensoriel, par exemple sensibilité thermique, mais il peut également exister un déficit moteur associé au déficit sensoriel.

La présence d'une allodynie de frottement ou de contact avec un objet froid dans la zone atteinte présente une bonne valeur diagnostic contrairement aux autres types de douleurs comme l'allodynie ou l'hyperalgésie mécanique car ce sont des symptômes qui correspondent également à des atteintes somatiques.<sup>11</sup>

L'examen clinique est aussi l'occasion d'étudier les causes et les facteurs de la maladie afin de trouver l'origine neurologique de la douleur, car il est important de diagnostiquer à la fois le type de douleur et l'origine de celle-ci. Cette étude sera facilitée si le contexte est présent, c'est-à-dire dans le cas où le patient souffre d'une maladie ou lésion neurologique connue (lésion du nerf facial par exemple). Dans le cas contraire, l'étude sera plus compliquée puisque la douleur peut correspondre à l'apparition d'un problème neurologique et par conséquent en être un symptôme à part entière. C'est pourquoi il est important pendant l'examen clinique que tous les tests soient réalisés afin de trouver l'origine de la douleur, mais ceci ne doit pas retarder la mise en place d'un traitement afin de soulager le patient douloureux.

#### 1.2.3.3 Les outils du diagnostic

Les outils d'aide au diagnostic des douleurs neuropathiques sont principalement des questionnaires. Il y a d'abord eu des questionnaires non spécifiques.<sup>17</sup> Ce sont de « vieux » questionnaires de qualificatifs développés chez les patients atteints de douleurs chroniques.<sup>16</sup> Ces tests ont permis d'isoler des qualificatifs qui étaient prépondérants dans la cadre des douleurs neuropathiques comme « brûlure » ou « décharge électrique ». Cependant ces tests sont beaucoup trop longs avec énormément de qualificatifs, ce qui ne le rend pas spécifique du diagnostic des douleurs neuropathiques.<sup>18</sup>

Grâce à ces études de patients, il a été possible de rédiger des questionnaires plus courts et plus pertinents, utilisant des termes discriminants des douleurs neuropathiques. Un des questionnaires spécifiques qui est le plus couramment utilisé en France est le DN4 (Douleur Neuropathique en 4 questions).<sup>13</sup>

Le DN4<sup>18</sup> (Figure 3) est un questionnaire qui a été mis en place à partir d'une étude clinique de 160 patients dont 89 présentant une douleur neuropathique. Ce questionnaire est un instrument du médecin qui comporte à la fois une partie interrogatoire et une partie clinique puisqu'il possède deux questions qui sont orientés sur la recherche de la douleur de la zone atteinte (7 symptômes) et deux questions sur le type de douleur ressenti dans la zone atteinte.

#### QUESTIONNAIRE DN4 : un outil simple pour rechercher les douleurs neuropathiques

Pour estimer la probabilité d'une douleur neuropathique, le patient doit répondre à chaque item des 4 questions ci-dessous par « oui » ou « non ».

QUESTION 1 : la douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ?

1		Oui	Non	
1.	Brûlure			
2.	Sensation de froid douloureuse			
3.	Décharges électriques			

QUESTION 2 : la douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ?

	Oui	Non	
4. Fourmillements		0	
5. Picotements			
6. Engourdissements			
7. Démangeaisons			

 QUESTION 3 : la douleur est-elle localisée dans un territoire où l'examen met en évidence :

 Oui
 Non

 8. Hypoesthésie au tact
 □

 9. Hypoesthésie à la piqûre
 □

QUESTION 4 : la douleur est-elle provoquée ou augmentée par :

	Oui	Non	
10. Le frottement	0	0	
OUI = 1 point	NON = 0 point	Score du Patient :	/10

#### Figure 3: Outil diagnostic DN4<sup>18</sup>

L'exploitation de ce questionnaire est simple car chaque « oui » correspond à 1 point et chaque « non » à 0 point. Si le score du questionnaire est supérieur ou égale à 4/10, il est considéré que la douleur est neuropathique de manière spécifique à 89.9% et sensible à 82.9%. De plus, il a été montré que si le score de la partie interrogatoire (questions 1 et 2) est d'au moins 3/7 la douleur est également considérée neuropathique avec, là aussi, une bonne spécificité et sensibilité, ce qui en fait un outil de diagnostic à part entière. Le questionnaire DN4 est un outil adapté à la clinique car il est facile d'utilisation par les praticiens, cependant il possède quelques limites car il n'est applicable que si la douleur est présente et pas dans les cas des dysesthésies. Les réponses fournies par le patient à ce test doivent correspondre à la même zone douloureuse, s'il y a plusieurs zones douloureuses, il faudra qu'un test soit réalisé pour chaque zone ou alors qu'un seul test soit fait pour la zone la plus douloureuse.

Il existe d'autres outils mais ceux-ci ne sont pas encore complètement prouvés et sont moins spécifiques et moins sensibles.<sup>14,19,20</sup>

Ces outils présentent des intérêts car ils peuvent être utilisés par des non-spécialistes et sont utiles lorsqu'il n'y a pas de contexte neurologique évident. Ces outils se sont aussi révélés utiles dans l'étude des maladies qui conduisent à des douleurs neuropathiques comme le diabète. Cependant, ils possèdent quelques limites car la spécificité et la sensibilité n'est pas absolue, certains facteurs peuvent correspondre à d'autres types de douleurs, et il existe aussi des résultats faux-positifs dans les cas de présence d'allodynie de pression ou si la composante dysesthésique est faible ou absente.

En aucun cas, ces outils ne doivent remplacer l'interrogatoire et l'examen clinique qui sont des étapes clés du diagnostic.

#### 1.2.4 Traitements de la douleur neuropathique

Les douleurs neuropathiques sont réfractaires aux antalgiques classiques comme le paracétamol ou les opioïdes. Le plus souvent, il y a une atténuation de la douleur mais pas une disparation de celle-ci avec ces antalgiques. Les douleurs neuropathiques sont aujourd'hui traitées grâce à des produits qui sont initialement prescrits dans d'autres indications comme les antidépresseurs ou les antiépileptiques.<sup>21</sup> En effet, il a été prouvé par Paoli<sup>22</sup> en 1960 que l'administration d'un antidépresseur tricyclique (imipramine) à des patients déprimés souffrant de sclérose en plaque réduisait leurs douleurs neuropathiques en plus d'avoir un effet bénéfique sur leur dépression.

Il est aujourd'hui établi que les antidépresseurs tricycliques sont efficaces dans la prise en charge de différents types de douleurs neuropathiques comme la neuropathie douloureuse du diabète. Ils restent encore considérés, avec certains antiépileptiques, comme traitements de référence pour les patients atteints de douleurs neuropathiques. Cependant, ces traitements possèdent de nombreux effets indésirables, il est donc important que chaque traitement soit adapté au patient afin d'obtenir un ratio bénéfice/risque (effet antalgique/effets secondaires) optimal.

La prise en charge de la douleur neuropathique a fait l'objet de plusieurs revues qui ont été réalisées à partir d'études cliniques<sup>23</sup> et qui ont été validées par différents organes institutionnels comme le IASP<sup>21</sup> ou la Société Française d'Etude et du Traitement de la Douleur (SFETD).<sup>24</sup> Ainsi, les différents traitements étudiés dans ces revues ont été classés entre trois catégories selon les preuves de leur efficacité.

Les traitements recommandés en première intention (Figure 4) ont fait leur preuve et sont issus de différentes études cliniques. Ces traitements comprennent les antidépresseurs tricycliques (l'amitryptiline, l'imipramine, la clomipramine), les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la serotonine et de la noradrénaline (la duloxétine) et les antiépileptiques gabapentinoïdes (la gabapentine, la pregabaline ou l'enacarbil gabapentine). Ils ont tous été approuvés et ont montré leur efficacité dans différents types de douleurs neuropathiques.<sup>24</sup> En France, les antiépileptiques constituent le traitement de première intention le plus prescrit par les praticiens après le diagnostic de la douleur neuropathique et la duloxétine est prescrite dans 23% des cas de douleur neuropathique.<sup>25</sup> Dans le cadre d'une association de douleur neuropathique et de la noradrénaline et agoniste des récepteurs opioïdes, peut être utilisé comme traitement de première intention.



Figure 4: Exemples des principes actifs des traitements de première intention
Les traitements de deuxième intention (Figure 5) comprennent le tramadol, ainsi que les patches de lidocaïne et les patches de capscaicine à haute concentration (8%) dans le cadre des douleurs neuropathiques périphériques.



Figure 5: Principe actifs des traitements de deuxième intention

En dernière intention, les traitements qui peuvent être utilisés sont les opioïdes forts comme la morphine ou l'oxycodone (Figure 6), ainsi que la toxine botulique de type A dont l'utilisation doit être faite par un spécialiste dans le cadre de douleur neuropathique périphérique.



Figure 6: Exemple de principes actifs de traitements de troisième intention

Dans le cadre d'un programme de recherche cherchant à développer des antalgiques spécifiques aux douleurs neuropathiques, nous nous sommes intéressés aux protéines à domaines PDZ impliquées dans des interactions protéine-protéine.

# 2 Les interactions protéine-protéine et les protéines à domaine PDZ

## 2.1 Les interactions protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine (IPP) ont un rôle crucial dans les mécanismes cellulaires. Elles sont impliquées à tous les niveaux du fonctionnement des cellules : organisation du cytosquelette, contrôle du cycle cellulaire (prolifération, développement et différenciation), régulation de l'expression des gênes (réplication, transcription, traduction,...), transduction des signaux.<sup>26–29</sup>

Il existe plusieurs classifications des différents types d'IPP, soit selon les surfaces en contact pendant l'interaction, soit selon la durée de vie de l'interaction.<sup>30</sup>

Dans le premier cas, si la surface de contact est identique, il s'agit d'une association isologue et formation d'homo-oligomères ; dans le cas contraire, il s'agit d'hétéro-oligomères c'est-à-dire une association de deux surfaces différentes et donc d'une association hétérologue (Figure 7).

Dans le deuxième cas, il s'agit d'interactions permanentes lorsqu'elles sont très stables, ce type d'interactions n'existe que lorsque les protéines sont sous leurs formes associées. Il s'agit d'interactions transitoires lorsque les protéines s'associent et se dissocient *in vivo*. Parmi ces interactions transitoires, il existe les interactions transitoires faibles où les oligomères s'associent et se dissocient continuellement, il existe un équilibre entre les oligomères associés et dissociés, comme le complexe RhoA-RhoGAP qui est impliqué dans les voies de la signalisation cellulaire. Il existe également les interactions transitoires fortes qui nécessitent la présence d'une autre entité pour venir dissocier les protéines associées. C'est le cas des protéines G hétérodimériques qui sont dissociées en sous-unités (G $\alpha$  et G $\beta$ ) sous l'action de la guanosine triphosphate (GTP) et qui sont à nouveau associées avec la guanosine diphosphate (GDP).<sup>30</sup>



Figure 7: Homo-oligomère : Sperm Lysin (PDB : 1LYN) et Hétéro-oligomère : RhoA et RhoGAP signalling complex (PDB : 1OW3)

Les IPP existent le plus souvent dans le milieu intracellulaire (cytoplasme). La quasitotalité des protéines du génome humain présente des interactions avec d'autres protéines. La complexité de ce système est représentée par la Figure 8, où les protéines sont représentées par des points et leurs interactions par des traits.<sup>31</sup>



Figure 8: Réseau des interactions protéine-protéines du génome humain<sup>31</sup>

Les IPP peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies, et se présentent comme des cibles thérapeutiques intéressantes.<sup>32</sup> De plus, la haute spécificité de ces interactions rend les IPP encore plus intéressantes. L'interruption des interactions entre protéines demeure complexe de par la grande surface d'interaction (environ 6  $nm^2$ )<sup>33</sup> et les propriétés

physicochimiques (polarité, hydrophobie et charges ioniques) qui régissent la force d'interaction entre les deux protéines concernées.<sup>27,33</sup> Même si l'utilisation comme antagoniste de fragments de protéines ou d'anticorps a été validée dans la littérature, le besoin en inhibiteurs moléculaires est important au vu des propriétés physicochimiques des protéines qui limitent leur utilisation en tant que médicaments (ces biomolécules sont très peu perméables et stables au milieu cellulaire et peu biodisponibles par voie orale).<sup>27</sup>

Malgré tout, la conception d'inhibiteurs reste complexe car elle doit tenir compte des facteurs restrictifs (taille de la poche, hydrophobie,...) qui peut conduire à obtenir de grosses molécules hydrophobes (MW > 500 Da). Il faudra alors réaliser un travail d'optimisation autour de ses molécules pour leur permettre d'acquérir des propriétés qui en feront des candidats-médicaments : la solubilité, la perméabilité, la disponibilité par voie orale et la sélectivité.

## 2.2 Les protéines à domaine PDZ

## 2.2.1 Présentation

Les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans des interactions protéinesprotéines, elles ont donc un rôle clé dans les mécanismes biologiques.<sup>34,35</sup> Elles portent ce nom en référence aux trois premières protéines décrites possédant ce domaine homologue :<sup>36</sup>

- Post Synaptic Density-95 (PSD-95)
- Drosophila discs large tumor suppressors (Dlg1)
- Zonula occludens-1 (Zo-1)

Dans le génome humain, 270 domaines PDZ sont dénombrés dans 150 protéines à domaines PDZ.<sup>37,38</sup> Une protéine PDZ peut ainsi contenir un ou plusieurs domaines PDZ, ainsi que d'autres domaines d'interactions entre protéines,<sup>34</sup> ce qui a conduit à la classification en trois familles de protéines à domaines PDZ (Figure 9). La première famille est composée de protéines ne possédant que des domaines PDZ, comme la protéine MUPP1 (Multi-PDZ domain protein 1) qui en possède 13 et constitue à ce jour le record de domaines PDZ pour une seule protéine.<sup>39,40</sup> Une autre famille de protéines PDZ est celle connue sous le nom de MAGUK (membrane-associated guanylate kinases) dans laquelle les protéines sont

composées d'un ou plusieurs domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine « guanylate kinase » (GK). Dans cette famille se trouve les trois protéines à l'origine de la dénomination PDZ : PSD-95, Dlg1 et Zo-1. La dernière famille est, quant à elle, composée de protéines comportant des domaines PDZ et d'autres domaines d'interaction mais qui ne font pas partie de la famille MAGUK comme la protéine Scribble.<sup>37,41</sup>



Protéines avec des domaines PDZ et d'autres domaines



Figure 9: Famille des protéines PDZ en fonction de leur composition<sup>41</sup>

Les domaines PDZ sont des motifs qui apparaissent sur de nombreuses protéines. Ils sont constitués d'environ 90 acides aminés<sup>34,35,42</sup> formant une structure 3D très conservée qui possèdent 2 hélices  $\alpha$  et 5 ou 6 feuillets  $\beta$  avec l'alignement suivant  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_1$ , $\beta_4$ ,  $\beta_5$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_6$  (Figure 10),<sup>34,42</sup> avec le motif GLGF qui se situe entre  $\beta_1$  et  $\beta_2$  et qui est commun à toutes les protéines à domaine PDZ.

La structure 3D des domaines PDZ peut être obtenue soit par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN), soit par diffraction des rayons-X.<sup>43–45</sup> Toutes ces structures sont regroupées dans la *Protein Data Bank* (PDB),<sup>46</sup> ce qui permet d'avoir accès à de nombreux informations sur la structure 3D et la séquence FASTA de la protéine PDZ avec ou sans ligand PDZ.



Figure 10: Structure du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 (PDB 3GSL). Les feuillets sont représentés en jaunes, les hélices en bleues, les boucles en beiges et le motif GLGF en rouge.

#### 2.2.2 Le site d'interaction

Les protéines à domaines PDZ ou protéines PDZ interagissent, le plus souvent, avec l'extrémité C-terminal des protéines partenaires appelées ligands PDZ. Le site d'interaction des protéines PDZ est délimité par une boucle constituée de 4 acides aminés (GLGF), le feuillet  $\beta_2$  et l'hélice  $\alpha_2$  (Figure 11, A), que nous nommerons S0.<sup>37,45,47</sup> Les protéines appelées ligand PDZ qui interagissent avec ce domaine se lient avec le carboxylate du C-terminal à la boucle GLGF qui est un motif très conservé dans la structure des protéines à domaine PDZ.<sup>48</sup> La boucle entre les feuillets  $\beta_2$  et  $\beta_3$  (site S1) constitue également un point d'ancrage pour les ligands PDZ.

Chapitre 1 : Introduction



Figure 11:A : Représentation en 3D de la poche d'interaction S0 (noir) de PSD-95 PDZ1 (PDB : 3GSL) délimitée par la boucle GLGF (rouge), le feuillet  $\beta_2$  (jaune), la boucle S1 (vert) et .l'hélice  $\alpha_2$  (bleue). B : Représentation en 3D de PSD-95 PDZ1 en fonction de l'hydrophobie des résidus.

De nombreuses études portant sur l'interaction entre le ligand PDZ et la protéine PDZ ont montré que les quatre derniers résidus du ligand PDZ (nommés (-3), (-2), (-1), (0) pour ne pas les confondre avec les acides aminés de la protéine) interagissent avec le site S0.<sup>49–51</sup> Le carboxylate du résidu (0) interagit avec la boucle GLGF<sup>43,47,52</sup> alors que les chaînes latérales des résidus (0) et (-2) interagissent avec une poche hydrophobe (en rouge sur la Figure 11, B) formée entre le feuillet  $\beta_2$  et l'hélice  $\alpha_2$ .

Ceci peut être illustré par les travaux de Doyle et al.<sup>53</sup> qui montrent les interactions entre le domaine PDZ3 de PSD-95 et le tétrapeptide QTSV (Figure 12). La représentation en 3D du domaine d'interaction de la protéine permet de mettre en évidence que le tétrapeptide va effectivement se fixer dans la poche S0. En effet, la Val (0) interagit avec la boucle GLGF (Gly 322 et Phe 325) et la Thr (-2) interagit avec le feuillet  $\beta_2$  (Ile 327) et l'hélice  $\alpha_2$  (His 372).



Figure 12: Répresentation 2D (B) et 3D (A) des interactions entre PSD-95 PDZ3 et le peptide QTSV<sup>53</sup>

La représentation en 2D permet de mieux visualiser les interactions entre le domaine PDZ et le ligand, et donne également des informations sur les distances d'interaction entre le domaine PDZ3 de PSD-95 et le tétrapeptide QTSV. Nous remarquons que le principal réseau d'interactions consiste en la formation de liaisons hydrogène entre le domaine PDZ et son ligand, même s'il existe d'autre types d'interactions comme les interactions hydrophobes. C'est le cas pour la Val (0) qui présente des liaisons hydrogène avec le squelette peptidique de la boucle GLGF *via* sa fonction acide carboxylique terminale et son azote de la fonction amide. La Val (0) interagit aussi avec la boucle GLGF par une interaction hydrophobe, de type Van des Waals, entre sa chaîne latérale (isobutyle) et le phényle de la chaîne latérale de la Phe 325 du feuillet  $\beta_2$ . La Thr (-2) interagit également avec le domaine PDZ par des liaisons hydrogène, en effet le carbonyle et l'azote de l'amide du Thr (-2) interagissent avec l'azote de l'amide et le carbonyle de l'Ile 327 présente sur l'hélice  $\alpha_2$  par liaison hydrogène entre la fonction alcool de Thr (-2) et l'azote (imidazole) de l'His 372. Nous venons de mettre en évidence que le site S0 du domaine PDZ interagit avec les quatre derniers résidus de l'extrémité C-terminal du ligand PDZ. Il a été montré que les résidus du ligand PDZ en amont de ces amines aminés interagissaient également avec le domaine PDZ comme le montre la représentation en 2D de l'interaction entre le peptide ErbB2 (Tyr(-7)-Leu(-6)-Gly(-5)-Leu(-4)-Asp(-3)-Val(-2)-Pro(-1)-Val(0)) et la protéine Erbin (Figure 13).<sup>49</sup>



Figure 13: Représentation 2D des interactions du peptide ErbB2 (TLGLDVPV) avec la protéine PDZ Erbin<sup>49</sup>

La représentation en 2D montre la présence de liaisons hydrogène entre la Val (0) du ligand et la boucle GLGF du domaine, notamment entre la Val (-2) et l'Ile (1295) de l'hélice  $\alpha_2$ . L'Asp (-3) favorise aussi la stabilisation de l'interaction en faisant une liaison hydrogène avec la Thr 1316. Les résidus suivants la Leu (-4), la Gly (-5) et la Leu (-6) ne semblent pas interagir avec le domaine PDZ, contrairement à la chaîne latérale de la Tyr (-7) qui présente des interactions avec une poche hydrophobe (VdW) formée par la Ser (1296) du feuillet  $\beta_2$  et les résidus Gly (1303), Asn (1304) et Pro (1305) de la boucle entre les feuillets  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Cette zone, qui correspond à la boucle S1, présente une grande variabilité d'un domaine PDZ à un autre. En effet, des différences de longueur de cette boucle mais également de nature des acides aminés qui la constituent ont été identifiés (Figure 14).



Figure 14: Alignement FASTA des domaines PDZ et représentation en 3D des domaines PDZ

#### 2.2.3 La classification des ligands PDZ

La classification la plus commune des protéines à domaines PDZ est le classement de celles-ci en fonction de la nature du ligand PDZ et notamment en fonction du résidu (-2) qui est important dans la sélectivité des interactions entre le domaine et le ligand endogène.<sup>51</sup> Ce critère a permis de classer les protéines en trois classes en fonction des interactions entre la protéine à domaine PDZ et le tripeptide.



Figure 15: Les trois classes de domaines PDZ

Les protéines à domaine PDZ qui appartiennent à la classe I vont se lier à des ligands PDZ qui ont un motif Ser/Thr (-2) – X (-1) –  $\Phi$  (0). Ces ligands possèdent un acide aminé hydrophobe ( $\Phi$ ) en position (0) et un acide aminé polaire en position (-2) qui va interagir avec une His présente sur l'hélice  $\alpha_2$  (Figure 15, Jaune).

Les protéines à domaine PDZ qui appartiennent à la classe II interagissent avec des ligands qui ont comme motif  $\Phi$  (-2) – X (-1) –  $\Phi$  (0). Les acides aminés en position 0 et -2 sont des acides aminés hydrophobes. L'acide aminé en -2 va interagir avec des résidus hydrophobes sur l'hélice  $\alpha_2$  (Figure 15Figure 13, Vert).

Les domaines PDZ qui constituent la classe III se lient avec des ligands PDZ possédant un acide aminé chargé négativement en position (-2) et vont se lier selon un motif Asp/Glu (-2) – X (-1) –  $\Phi$  (0). L'acide aminé en position (-2) va aller se lier avec une Tyr (HBD) présente sur l'hélice  $\alpha_2$  (Figure 15Figure 13, Orange).

## 2.3 Les protéines PDZ et pathologies

Les interactions protéines-protéines, dont les protéines à domaine PDZ font parties, sont essentielles au fonctionnement physiologiques mais peuvent être à l'origine d'un grand nombre de pathologies<sup>34,47</sup> comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la mucoviscidose, les attaques ischémiques ou encore la douleur. Quelques exemples vont être présentés dans cette section, pour montrer qu'il est important d'en comprendre les implications afin de cibler ces domaines PDZ comme de nouvelles opportunités de combattre ces pathologies.

## 2.3.1 Le cancer

De nombreux cancers existent de nos jours, et ils possèdent tous une origine et un fonctionnement différents. Il a été démontré que des protéines à domaine PDZ étaient impliquées dans ces pathologies.

La protéine PDZ GIPC est une protéine qui est surexprimée dans les cancers du pancréas et du sein, ce qui engendre une activité anormale de cette protéine.<sup>54</sup> En effet, la liaison de la protéine GIPC avec le C-terminal du ligand GAIP joue un rôle dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses.<sup>55,56</sup>

## 2.3.2 La muscoviscidose

Le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) code pour la protéine CFTR qui est responsable du flux d'ions chlorure dont la fonction est essentielle dans

le fonctionnement de l'organisme. Les mutations de ce gène ont pour cause la mucoviscidose, et la mutation la plus fréquente est la mutation  $\Delta$ F508 qui consiste en la disparition d'un acide aminé lors du codage de la protéine.<sup>57</sup> Cette mutation modifie la structure de la protéine, donc sa conformation, ce qui entraine une perte de fonctionnalité de cette protéine ainsi qu'une dégradation plus rapide de celle-ci. Il est possible de contourner les problèmes de mauvaise conformation ou de perte de fonctions à l'aide d'outils pharmacologiques.<sup>58,59</sup> La protéine mutée  $\Delta$ F508-CFTR est rapidement dégradée par l'organisme par un mécanisme mettant en jeu l'interaction entre la protéine PDZ CAL (CFTR associated ligand) et le ligand CFTR, qui peut être inhibée afin de permettre à la protéine CFTR d'être dégradé moins rapidement.

## 2.3.3 L'attaque ischémique

L'attaque ischémique est une excitotoxicité au niveau des cellules nerveuses. Cette toxicité est due à la formation d'un complexe d'interaction mettant en jeu la protéine PDZ PSD-95, le récepteur NMDA et la protéine nNOS. Les C-terminaux de ces deux dernières protéines se lient aux domaines PDZ de PSD-95 ce qui engendre une libération d'oxyde nitrique (NO) dans le milieu synaptique qui conduit à l'excitotoxicité et donc à l'attaque ischémique.<sup>60,61</sup>

## 2.3.4 La douleur

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de protéines à domaines PDZ, comme PSD-95, dans les régions du système nerveux central impliquées dans la douleur.<sup>62</sup>

Il a été montré à l'aide de modèles animaux de douleur que les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans le développement de la douleur inflammatoire et neuropathique ainsi que son évolution en douleur chronique.<sup>63</sup>

Une des interactions qui est impliquée dans la douleur est celle entre les protéines PDZ et le récepteur NMDA. Plusieurs études ont en effet confirmé l'implication de ce récepteur dans la douleur inflammatoire ou neuropathique. Il a été montré que l'inhibition partielle de la synthèse de la protéine PDZ PSD-95 permettait de réduire l'hypersensibilité thermique induite par un agoniste du récepteur NMDA.<sup>64</sup> Une autre étude a montré, qu'avec la même stratégie il était possible de retarder l'allodynie tactile statique ainsi que l'hyperalgie thermique sur un modèle de rat souffrant de neuropathie d'origine traumatique (ligature du nerf spinal).<sup>65</sup> Il a aussi été démontré une absence de réponse aux stimuli douloureux d'origine thermique ou

mécanique chez les souris invalidées pour la protéine PSD-95.<sup>66</sup> D'autres protéines ont également été découvertes comme ayant un rôle dans les phénomènes douloureux au même titre que PSD-95. Il a été montré que l'inhibition partielle de la protéine PDZ PSD-93 inhibe l'hyperalgie mécanique et thermique chez le rat.<sup>67</sup> Une autre étude a prouvé que chez le rat invalidé pour la protéine PSD-93, les hypersensibilités thermiques et mécaniques étaient réduites.<sup>68</sup> La protéine PICK1 est aussi impliquée dans les mécanismes douloureux puisque lorsque la synthèse de celle-ci est partiellement inhibée, l'hypersensibilité mécanique et thermique est atténuées chez le rat.<sup>69</sup>

L'interaction de la protéine nNOS avec la protéine PSD-95 et le récepteur NMDA est également impliquée dans la douleur. En effet c'est l'association de nNOS avec NMDA par l'intermédiaire de PSD-95 qui engendre la douleur. Des études ont montré que l'interruption de cette interaction permettait de réduire l'hyperalgie thermique induite par un agoniste de NMDA, mais également d'inhiber l'allodynie thermique induite par la ligature du nerf sciatique chez le rat.<sup>70</sup>

Des études ont montré que les canaux ASIC et les canaux sodiques voltage dépendants pouvaient être modulés par les protéines à domaines PDZ. En effet, l'activité de  $Na_{v1.8}$  est modulée par la protéine PDZ à domaine multiple Pdzd2, et la sous-expression de cette protéine permettait d'inhiber le courant endogène de  $Na_{v1.8}$  dans les neurones sensitifs et donc de diminuer la douleur induite par cette modulation.<sup>71</sup>

L'interaction entre le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> et la protéine à domaines PDZ PSD-95 joue un rôle important dans l'adressage du récepteur, en particulier au niveau apical des dendrites des neurones pyramidaux. Dans le cortex préfrontal, PSD-95, en s'associant directement au récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, régule sa signalisation et son trafic, et entraîne une baisse de l'internalisation du récepteur.<sup>72</sup> Les travaux <sup>73</sup> ont mis en évidence qu'un dysfonctionnement de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> au niveau spinal était responsable, au moins en partie, d'une altération de la sensibilité à la sérotonine (résistance) de la douleur neuropathique diabétique. Ainsi, en utilisant une stratégie peptidomimétique qui consiste à introduire, par voie spinale, un peptide présentant la séquence du ligand PDZ entrant en compétition avec l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, et permettant d'interrompre l'interaction, ils ont pu restaurer la sensibilité à la sérotonine endogène et révéler l'effet antinociceptif de la fluoxétine, quasi inefficace lorsque administrée seule dans ce contexte douloureux (Figure 16). Il a également été montré que l'interruption de cette interaction avait un effet anti-hyperalgique mécanique induite par la neuropathie diabétique chez le rat.



Figure 16: Stratégie peptidomimétique montrant l'inhibition de l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub><sup>63</sup>

## 2.4 Les inhibiteurs de protéines PDZ

Au vu de leur implication dans de nombreuses pathologies, de leur rôle central dans la biologie humaine, ainsi que la conservation de leur site de liaison, les interactions impliquant les protéines à domaine PDZ sont des cibles intéressantes pour le développement d'inhibiteurs. Ces derniers pouvant être utilisés soit comme potentiels agents thérapeutiques, soit comme outils dans le but de mieux comprendre leur implication dans la biologie humaine.

Il est possible de mettre en place plusieurs méthodes pour concevoir des inhibiteurs des interactions protéine-protéine<sup>74</sup> :

- Inhibiteur compétitif : conception d'un inhibiteur qui ira directement concurrencer l'interaction entre la protéine et son ligand naturel (Figure 17) ;



Figure 17: Inhibition directe

- Inhibiteur allostérique : conception d'un inhibiteur qui, en se fixant sur un autre site de la protéine, modifiera la conformation (structure 3D) tertiaire de la protéine empêchant ainsi l'interaction entre la protéine et son ligand naturel. (Figure 18)



Figure 18: Inhibition indirecte

Dans le cas des protéines à domaine PDZ, la méthode directe semble la meilleure au vu de la conservation de la poche d'interaction entre la protéine et le ligand et l'absence de poche allostérique.

Pour créer ses inhibiteurs, il est possible soit de concevoir une molécule qui ira se lier dans le site d'interaction et empêcher l'interaction « pathologique » de se faire, soit d'utiliser une partie des protéines partenaires (peptides) pour les mettre en compétition avec l'interaction principale.

La conception des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (IPP) doit être faite en prenant en compte plusieurs contraintes :<sup>75</sup>

- les IPP se font dans le milieu intracellulaire, l'inhibiteur doit donc traverser la membrane cellulaire ;
- les forces d'interaction sont de l'ordre du micromolaire ( $\mu M$ );
- au vu de la conservation des sites d'interactions, la proximité entre deux IPP,
  l'inhibiteur doit donc être sélectif de l'interaction à inhiber ;
- une protéine PDZ pouvant se lier à plusieurs ligands avec différentes affinités,
  l'inhibiteur doit inhiber l'interaction pathologique de façon spécifique. Par exemple, la protéine PSD-95 possède plus de 20 ligands naturels qui peuvent se lier avec à un ou à plusieurs de ses trois domaines PDZ.<sup>76</sup>

Ces données nous permettent de dire que pour inhiber une interaction protéineprotéine impliquant un domaine PDZ, il serait plus pertinent de concevoir un inhibiteur spécifique de l'interaction entre la protéine et son ligand. En effet, la conception d'un inhibiteur très fort pourrait inhiber d'autres interactions entre la protéine PDZ et ses ligands endogènes. De plus l'inhibiteur doit être métaboliquement stable.

Plusieurs stratégies ont été adoptées dans la conception d'inhibiteurs PDZ :

- L'utilisation de peptides
- L'utilisation de mime de peptides
- La synthèse de petites molécules organiques

#### 2.4.1.1 L'utilisation de peptides

L'étude des IPP impliquant les protéines PDZ a été facilitée par l'utilisation de peptides, ligands PDZ tronqués. En effet, il a été démontré que des fragments peptidiques, incluant le C-term d'un ligand PDZ aussi court que 4 résidus pouvaient se lier au domaine PDZ et inhiber l'interaction avec le ligand endogène correspondant.

La conception des ligands peptidiques repose en générale sur la conception d'un motif, pouvant aller du tétrapeptide jusqu'au dodécapeptide, motif peptidique sur lequel sera additionné un vecteur qui le rendra perméable aux différentes barrières cellulaires. Le motif le plus répandu est le TAT qui est un peptide issu du VIH (Figure 19, 2)<sup>60,61,77</sup> mais il est également possible de trouver des motifs comme l'antennapedia (Figure 19, 3)<sup>78</sup>, le R11 (Figure 19, 4)<sup>79</sup> ou encore l'acide myristique (Figure 19, 1) qui est un acide gras.<sup>56</sup>



Figure 19: Structure chimique des vecteurs, le TAT, l'antennapedia, le R11 et de l'acide myristique

Il existe différentes stratégies pour concevoir des inhibiteurs peptidiques. Une des possibilités est l'utilisation directe des derniers résidus de l'extrémité C-terminale du ligand PDZ.<sup>56,60,61,80</sup> Cette méthode a été utilisée pour concevoir un inhibiteur de l'interaction entre la protéine PDZ PSD-95 et le récepteur NMDA. En effet, les neufs derniers résidus de GluN2B (KLSSIESDV), sous-unité de NMDA, ont été liés au TAT (YGRKKRRQRRR) pour former un peptide à 20 acides aminés qui a permis l'inhibition de cette interaction.<sup>60,61</sup> L'interruption de l'interaction entre ces deux protéines a pour but d'empêcher la formation du complexe entre les trois protéines PSD-95, Nitric oxide synthase (NOS) et NMDA qui est à

l'origine des attaques cérébrales. Ce peptide réduit bien l'effet nociceptif dû à la protéine à ce complexe tout en conservant une activité normale pour le récepteur NMDA.

Il est également possible de créer des inhibiteurs par la conception assistée par ordinateur. Dans cette méthode, la découverte des peptides inhibiteurs potentiels d'interactions protéine-protéine se fera à l'aide d'un algorithme. Ce dernier va virtuellement créer des peptides de substitution de l'extrémité C-terminal en mutant les différents acides aminés de la séquence. L'algorithme va ensuite attribuer des scores de Ki pour les complexes entre la protéine cible et les différents peptides. Cette méthode a été appliquée pour la synthèse d'inhibiteurs peptidiques contre la mucoviscidose.<sup>57</sup> Plus de 6000 peptides ont été testés et ont conduit à la découverte d'un inhibiteur (Ac-WQVTRV) de l'interaction entre la protéine PDZ CAL (CFTR associated ligand) et le ligand PDZ CFTR (Cystic Fibrosis Transmenbrane conductance Regulator) avec une affinité 170 fois plus importante que le C-terminal de CFTR.

Une autre méthode est le criblage de bibliothèques de peptides. Cette stratégie a été appliquée par l'équipe de Vouilleme <sup>81,82</sup> qui a réalisé une étude sur cinq domaines PDZ (CAL PDZ, NHERF1 PDZ1 et PDZ2 et NHERF2 PDZ1 et PDZ2) connus pour interagir avec la protéine CFTR dans le but d'inhiber l'interaction CAL/CFTR sans inhiber les interactions NHERF1/CFTR et NHERF2/CFTR. Dans cette étude environ 6000 peptides ont été testés par polarisation de fluorescence pour découvrir quels peptides possédaient une bonne affinité pour CAL, mais par pour les deux autres protéines. Ils ont réussi à obtenir un peptide (ANSRWPTSII) possèdant une bonne affinité pour CAL (Ki = 17.3  $\mu$ M) mais pas avec les autres domaines PDZ (Ki > 5000  $\mu$ M)

#### 2.4.1.2 L'uilisation de mimes de peptides

L'approche peptidique est une approche qui est efficace mais qui peut avoir ses limites comme l'instabilité métabolique des peptides et la faible perméabilité dans le milieu cellulaire ou encore la longueur des chaines peptidiques qui ne sont parfois par suffisantes pour remplir les conditions d'inhibition de l'interaction. Des stratégies de modifications de ces peptides pour les rendre plus drug-like ont été mises en place.

Une première stratégie implique le changement des chaînes latérales des résidus pour obtenir des résidus non naturels qui permettraient d'obtenir une inhibition plus spécifique. Les résidus en position (0) et (-2) sont ceux qui ont des rôles cruciaux dans l'interaction entre la protéine et son ligand, il n'est donc pas pertinent de les modifier sous peine de perdre en

affinité d'interaction.<sup>83</sup> C'est pourquoi les principaux résidus qui peuvent être modifiés sont ceux en position (-1) et (-3), car les chaines latérales sur ces positions n'interagissent pas avec le domaine PDZ.<sup>55,83-85</sup> Il est également possible d'ajouter un motif sur le N-terminal (Figure 20, **6**).<sup>85</sup> Patra a montré que la modification des chaînes latérales en (-1) et (-3) du peptide **5** (Figure 20) améliorait l'efficacité de celui-ci dans le traitement du cancer du pancréas et du sein.<sup>55</sup>



Figure 20: Structure chimique inhibiteurs issus de l'utilisation de mime de peptides

Une autre stratégie est la cyclisation de peptides<sup>86–89</sup> dans le but de contraindre la conformation du peptide et de stabiliser celui-ci pour améliorer sa capacité d'inhibition. Dans la majorité des cas, les peptides sont cyclisés par les chaines latérales des résidus entre (-1) et en (-3) (Figure 21, **9**).<sup>88</sup> Cet inhibiteur est lié par un pont disulfure avec le R7 (équivalent du R11 composé de 7 arginine) qui permet le passage des membranes. L'équipe de Barlett<sup>90</sup> a montré que la cyclisation d'un peptide avec des groupes pyrazinone et pyridinone (Figure 21, **7**) permettait à celui-ci d'adopter une conformation plus stable qui a mené à l'amélioration de l'interaction avec le domaine PDZ de l' $\alpha$ 1-syntrophin.

Des modifications du squelette amide (Figure 21, 8)<sup>91</sup> peuvent être réalisées dans le but de rendre le peptide plus stable vis-à-vis de la dégradation enzymatique et également de le rendre plus perméable aux barrières cellulaires. Ceci devrait permettre de concevoir des médicaments potentiels administrables par différentes voies.



Figure 21: structure chimique inhibiteurs peptidiques cycliques

#### 2.4.1.3 La synthèse de molécules organiques

La conception et la synthèse de molécules organiques comme inhibiteurs d'IPP est une stratégie qui est couramment utilisée dans la recherche pharmacologique. De plus, au vu de la nature très conservée (accepteur ou donneur de liaisons hydrogène et poche hydrophobe) des interactions entre les deux protéines, concevoir des molécules organiques semble être une stratégie adaptée.

Le criblage à haut débit permet de cribler des chimiothèques de molécules soit virtuellement (*in silico*), soit par tests *in vitro*.<sup>92–95</sup> Le criblage *in silico* de base de données par modélisation moléculaire permet d'identifier de potentiels ligands, comme cela a été le cas pour la découverte d'un inhibiteur (Figure 22, **10**) de l'interaction entre la protéine PDZ Dischevelled (Dvl) et les glycoprotéines Wnt.<sup>92</sup> Le criblage *in vitro* consiste à identifier des molécules qui pourraient interagir avec la protéine à domaine PDZ, voire inhiber sont

interaction avec le ligand PDZ. Thorsen a synthétisé un inhibiteur (Figure 22, **14**) de l'interaction entre GluA2, sous unité d'AMPA, et la protéine PDZ PICK1 après avoir réalisé un criblage haut débit d'environ 44000 molécules par polarisation de fluorescence.<sup>93,95</sup>

Le *rational design*<sup>96</sup> correspond à la conception d'inhibiteurs virtuels possédant les fonctions chimiques (pharmacophores) nécessaires pour interagir avec la protéine à domaine PDZ, comme des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes et ainsi inhiber l'interaction protéine-protéine.

Il convient lors du *design* d'inhibiteurs d'interaction de développer un inhibiteur optimal. C'est pourquoi la stratégie la plus souvent mise en œuvre se fait en deux temps, d'abord la recherche de molécules chefs de file par la technique du criblage à haut débit puis l'optimisation de ce chef de file en un inhibiteur optimal avec le rational design.<sup>97</sup> En effet, en réalisant une étude de relation structure-activité, les fonctions chimiques importantes sont mises en évidence et les modifications structurales successives permettent d'obtenir de nouvelles molécules, inhibiteurs des interactions entre la protéine à domaine PDZ et un ligand donné.

La plupart des inhibiteurs ainsi conçus sont des molécules de synthèse possédant une fonction acide dans le but de mimer le C-terminal du ligand PDZ, ainsi qu'une partie hydrophobe dans le but d'entretenir les interactions hydrophobes avec le site d'interaction (Figure 22, **11**).<sup>94</sup> Ces molécules vont majoritairement se positionner dans la poche en prenant la position des résidus (0) et (-1) du ligand endogène, même s'il a été montré que certaines molécules faisaient des interactions en lieu et place des résidus (-2) et (-3) (Figure 22, **10**).<sup>92</sup>

Toutes les molécules synthétisées sont des inhibiteurs compétitifs de l'interaction à inhiber, c'est-à-dire que leur interaction avec la protéine PDZ est réversible. Cependant Fujii a montré qu'il était possible de créer des inhibiteurs qui se lient de façon covalente avec la protéine, en ajoutant un hydroxyle ionisable pouvant réagir de façon irréversible avec l'histidine conservée du domaine PDZ2 de la protéine MAGI3, mais aussi avec toutes les protéines PDZ de la classe 1 (Figure 22, **13**).<sup>96</sup>



Figure 22: Inhibiteurs d'IPP de synthèse

Un des plus gros problèmes pour le développement de ces inhibiteurs est la sélectivité, car la majorité des inhibiteurs qui ont été synthétisés ont pour cible la poche d'interaction PDZ, qui a une structure tertiaire mais également des acides aminés très conservés d'une protéine à domaine PDZ à une autre. En effet, il est possible qu'un inhibiteur interagisse avec plusieurs domaines PDZ. C'est pourquoi il est plus intéressant dans ce contexte de développer des inhibiteurs compétitifs qui forment des interactions réversibles avec les protéines plutôt que des interactions covalentes avec la protéine. Par exemple l'équipe de Zhou a appliqué

cette stratégie pour concevoir des inhibiteurs de l'interaction entre la protéine PSD-95 et son ligand nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) (Figure 22, **12**).<sup>98</sup>

Voici quelques exemples d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine mettant en jeu les protéines à domaine PDZ :

Les molécules 15 et 16 ont été développées par rational design puis ont été testés par Titration Calorimétrique Isotherme (ITC) pour déterminer les IC<sub>50</sub> de ces composés (Tableau 1). L'IC<sub>50</sub> est déterminé par compétition entre les ligands PDZ (peptides) et la molécule organique pour se lier à la protéine à domaine PDZ.99 Les essais de compétition ont été réalisés pour la protéine Magil d1 avec le peptide GRWTGRSMSSWKPTRRETEV, pour PSD-95 PDZ1, PDZ2 et PDZ3 avec le peptide YGRKKRRQRRTKNYKQTSV, pour Shank YGRKKRRORRRYIPEAOTRL 1 peptide peptide avec le et avec le **QISPGGLEPPSEKHFRETEV** pour Tip1.

Inhibiteur	Magil d1	PSD-95 PDZ1	PSD-95 PDZ2	PSD-95 PDZ3	Shank 1	Tip 1
15	236.97 µM	2.7 μΜ	14.88 μM	8.19 μΜ	48.61 μM	$>250 \ \mu M$
16	60.76 µM	2.5 µM	4.98 μM	3.47 μM	7.59 μM	>250 µM

Tableau	1:	Valeur	d'IC50

Au vu des résultats présentés dans le Tableau 1, les molécules **15** et **16** sont des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine impliquant les protéines PDZ. Nous constatons que l'inhibiteur **15** présente une meilleure affinité pour les domaines PDZ de la protéine PSD-95 que pour les domaines PDZ des protéines Magil d1 et Tip1. L'inhibiteur **16** présente encore une fois une meilleure affinité pour les domaines PDZ de PSD-95, cependant il semble moins spécifique au vu de son affinité pour les autres protéines.

Deux études ont montré qu'il est possible de développer des inhibiteurs sélectifs d'une interaction en particulier. L'équipe de Thorsen a développé un inhibiteur sélectif de l'interaction entre la protéine PDZ PICK1 et GluA2, sous unité d'AMPA. En effet, l'inhibiteur **14** (Figure 22) interrompt l'interaction avec un Ki de 10.1  $\mu$ M.<sup>93</sup> Il a également été démontré que cette molécule n'interagissait pas avec les 3 domaines PDZ de PSD-95 et les domaines PDZ 4 et 5 de GRIP1. L'équipe de Grandy a elle-aussi développé un inhibiteur spécifique, le sulindac (Figure 22, **17**). En effet, cette molécule interagit avec le domaine PDZ

de la protéine Dishevelled pour interrompre l'interaction avec les glycoprotéines Wnt.<sup>92</sup> Toutefois celle-ci n'interagit pas avec les domaines PDZ1 et PDZ2 de PSD-95 et le domaine PDZ7 de GRIP1. Ils supposent que cette sélectivité est due à la présence d'un résidu Arg qui n'est présent que sur le domaine PDZ de Dishevelled.

## 3 Le projet

## **3.1** Partenaires du projet

L'objectif de ce projet est de concevoir, synthétiser et évaluer de nouveaux composés inhibiteurs de l'interaction entre la protéine à domaines PDZ, PSD-95, et un de ces ligands, le récepteur de la sérotonine 5– $HT_{2A}$ . En effet, il a été démontré que l'interruption de l'interaction entre ces deux protéines par un peptide avait un effet anti-hyperalgique sur un modèle animal souffrant de douleur neuropathique.<sup>73</sup>

Ce projet pluridisciplinaire s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre quatre laboratoires de recherche :

- l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand (ICCF),
- l'Institute of Integrative Biology à l'University of Liverpool, Angleterre
- l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) de Montpellier
- Le laboratoire Neurodol à Clermont Ferrand.

Des molécules seront conçues et synthétisées par l'équipe CESMA de l'ICCF, puis la capacité d'interactions de ces molécules avec la protéine sera évaluée par RMN (HSQC  ${}^{1}\text{H}/{}^{15}\text{N}$ ) en collaboration avec l'équipe du Pr. Lu-Yun Lian de l'Université de Liverpool. Pour les composés présentant les meilleures interactions, leur capacité à inhiber l'interaction entre PSD-95 et 5–HT<sub>2A</sub> sera déterminée par chromatographie d'affinité par l'équipe du Pr. Philippe Marin de l'IGF. Enfin, les propriétés antalgiques des meilleurs inhibiteurs seront évaluées *in vivo* par l'équipe du Pr. Courteix de l'Institut NeuroDol.



Figure 23: Organigramme fonctionnel

## 3.2 Travaux antérieurs

L'équipe CESMA (Conception Et Synthèse de Molécules Antalgiques) s'intéresse à la synthèse d'inhibiteurs potentiels de l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>, avec l'aide du service de modélisation moléculaire de l'ICCF (Dr Vincent Thery et de Lionel Nauton). La modélisation moléculaire permet de simuler et visualiser l'interaction des molécules avec la protéine cible. Cette simulation génère un score qui permet de sélectionner les structures les plus probables d'interagir avec la protéine PDZ.

Les travaux antérieurs réalisés au sein du CESMA<sup>100</sup> ont permis d'identifier des inhibiteurs prometteurs. L'indole **18** (Figure 24) provient d'un criblage virtuel<sup>101</sup> et des travaux de Fujii<sup>96</sup> mais ne présente que de faible interaction avec le domaine PDZ1 de PSD-95. Une étude de relation structure/activité a conduit en la variation des fonctions

présentes sur l'indole afin de mimer au mieux l'extrémité C-terminale de 5-HT<sub>2A</sub> et ses interactions avec le site S0 du domaine PDZ1 de PSD-95. Les indoles **19, 20, 21** (Figure 24) ont alors été synthétisés et présentent des interactions plus fortes avec PSD-95 mais inhibent faiblement l'interaction avec 5-HT<sub>2A</sub> après leur évaluation par RMN et *in vitro*. Enfin, pour augmenter les propriétés d'interaction des molécules, les indoles **22, 23** et **24** ont été synthétisés dans le but de créer des interactions avec l'histidine 71 présente sur le feuillet  $\beta_2$ . Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'indole **24** qui interagit avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (Figure 22)<sup>100</sup> et inhibe son interaction avec 5-HT<sub>2A</sub>.



Figure 24: résumé des travaux antérieurs

Afin d'évaluer les interactions des différents indoles synthétisés avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95, les spectres HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N ont été enregistrés (composé/protéine 10/1). Ces analyses sont réalisées par l'équipe du Professeur Lu-Yun Lian à l'université de Liverpool qui est experte dans le domaine de la biologie structurale des protéines. Elle possède également la protéine marquée à l'azote 15 (<sup>15</sup>N) qui nous intéresse, le domaine PDZ-1 de PSD-95. La cartographie de la protéine PSD-95 PDZ1 est disponible dans la littérature et a été réalisée par Piserchio (Figure 25).<sup>52</sup> Chaque tâche de corrélation qui apparait sur ces spectres correspond au couplage entre un azote (N) et l'hydrogène (H) qui lui est directement lié. Ainsi chaque acide aminé est représenté par au moins une tâche (sauf la Pro) ; les acides aminés portant un ou plusieurs azotes sur leurs chaines latérales posséderont une ou plusieurs tâches de corrélation supplémentaires. Un spectre de référence est enregistré pour chaque étude (Figure 26) afin d'attribuer les tâches de corrélation à leur acide aminé grâce à la référence de la littérature.



Figure 25: Spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95.<sup>52</sup>



Figure 26: Spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95.

Enfin le spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N du mélange protéine/composé (1/10 ou 1/20) est enregistré, et superposé au spectre de la protéine seule (Figure 27). Si les deux spectres se superposent parfaitement, il n'y a aucune interaction entre le ligand et le domaine PDZ ; par contre si les spectres ne se superposent pas parfaitement, cela signifie que l'environnement de la protéine est modifié par le composé, et nous pouvons ainsi identifier les acides aminés qui sont perturbés pas l'interaction du composé avec la protéine.

Nous constatons pour l'indole **24**, que le spectre du mélange (noir) ne se superpose pas parfaitement avec le spectre de la protéine seule (bleu) (Figure 27). Il a donc modification de l'environnement du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95, nous avons identifié quelques acides aminés (boucle GLGF) qui sont perturbés par l'indole **24**.



Figure 27:Spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de PSD-95 PDZ1 seul (noir)/en présence (bleu) de 10 éq de 24.

Les indoles présentant les interactions les plus intéressantes ont été envoyés à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier pour réaliser les tests *in vitro* (pull-down) afin de déterminer la capacité des molécules à inhiber l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>. Les composés seront évalués en utilisant une technique de chromatographie d'affinité suivie d'une analyse par Western Blot (Figure 28). Nous observons un début d'inhibition de l'interaction entre PSD-95 PDZ1 et 5-HT<sub>2A</sub> à partir d'une concentration en logarithme de -4.5 pour l'indole **24**. L'inhibition est concentration-dépendante, en effet plus la concentration en indole **24** augmente plus l'inhibition est élevée, ce qui a permis d'obtenir la valeur d'inhibition à 50% de cette interaction par l'indole **24**, IC<sub>50</sub> = 190  $\pm$  32  $\mu$ M.



Figure 28: Capacité d'inhibition de l'interaction entre 5-HT<sub>2A</sub> et PSD-95 par l'indole 24. (A) Gel de chromatographie d'affinité de 24. (B) Les données, correspondant au pourcentage de PSD-95 PDZ1 lié avec 5-HT2a, sont les moyennes issues de la répétition de l'expérience par trois fois.

Enfin, les molécules sont envoyées au laboratoire Neurodol à Clermont Ferrand pour réaliser les tests *in vivo* afin de voir la capacité des molécules à réduire l'hyperalgie sur un modèle animal expérimental.

L'activité anti-hyperalgique des indoles **19, 21, 24** a été évaluée sur un symptôme d'hypersensibilité mécanique (test de pression de la patte) chez des rats neuropathiques (ligature du nerf sciatique) CCI. Comme le montre la Figure 29, les indoles **19** et **21** possèdent un effet antihyperalgique mais inférieur à celui du TAT-2A, peptide de référence. Par contre l'indole **24** présente une activité antihyperalgique supérieure au TAT-2A.



Figure 29: Evaluation de l'effet antihyperalgique sur des rats neuropathiques après administration du peptide TAT-2ASCV (0.04 nmol/rat i.t.), des composés 19, 21 et 24 (0.1 et 0.5 nmol/rat i.t.) ou du DMSO (10 μL/rat i.t.) (n = 7-28 rats par composés). Les données sont exprimées en AUC, \*\*P < 0.01 ; \*\*\*P < 0.001</p>

#### Chapitre 1 : Introduction

Compte tenu de ces résultats prometteurs, l'équipe du Pr. Lian a déterminé la structure du complexe PSD-95 PDZ1/indole **24** grâce à des expériences RMN NOESY inter et intramoléculaire. (Figure 30) Nous pouvons constater que le benzyle de l'indole se positionne dans la poche hydrophobe formée par la Phe 18 et la Val 75. Cependant la chaîne alkyle ne s'oriente pas vers l'histidine du domaine S1 mais vers le haut de la poche.



Figure 30: Structure 3D du complexe PSD-95 PDZ1/indole 24 déterminé par Noesy.

## 3.3 Objectifs

Comme nous venons de le voir, les activités anti-hyperlagique de l'indole **24** sont prometteuses. Nous avons décidé d'utiliser cet indole comme point de départ à nos études. Le but étant d'améliorer son interaction avec la protéine PDZ PSD-95 mais aussi de s'affranchir du noyau indolique, dont la propriété industrielle est bien protégée<sup>102,103</sup> et de proposer de nouveaux inhibiteurs innovants en tant qu'antalgiques originaux. Trois approches ont été développées :

- Optimisation de l'indole **24** (*drug design*)
- Fragment based drug design (FBDD)
- Utilisation de mimes de peptides

#### 3.3.1 Optimisation

Une modulation des différents groupements (méthyle, acide, benzyloxy) présents sur le noyau indolique sera d'abord réalisée afin de déterminer le pharmacophore minimal de l'indole **24**. Puis une étude de modélisation moléculaire permettra de concevoir de nouveaux ligands potentiels sélectifs.

#### 3.3.2 Fragment-based drug design

Le fragment-based drug design (FBDD)<sup>104</sup> consiste en le criblage de bibliothèques de fragments (petites molécules avec une masse molaire : MW < 300 g/mol) par différentes techniques comme la modélisation moléculaire (criblage virtuel), la RMN de protéines, et autres tests afin d'identifier des fragments chef de file puis de les optimiser afin d'obtenir des ligands potentiels.

## 3.3.3 Utilisation de mime de peptides

Bien que des peptides soient souvent utilisés dans l'étude des protéines PDZ, ces études se limitent souvent à des tétrapeptides. Les résidus (0) et (-2) étant essentiels dans les différentes interactions protéine-protéine, notamment pour les protéines à domaines PDZ, nous nous sommes intéressés à des tripeptides. Une étude de dynamique moléculaire, suivie d'une étude par RMN et ITC, sera réalisée à partir de tripeptides terminaux des ligands PDZ endogènes de la protéine PSD–95 dans le but de déterminer les interactions et les affinités entre les peptides et la protéine.

Parmi les stratégies adoptées en peptidomimétiques figurent les pepoïdes. Au lieu d'être liées au carbone alpha des acides aminés, les chaines latérales substituent l'atome d'azote. Ces peptoïdes présentes plusieurs avantages comme une stabilité et une perméabilité accrue comparés aux peptides.<sup>105</sup>

## CHAPITRE 2
# SOMMAIRE

1	Introduction73				
2	Synthèse de l'indole 2474				
3	Evaluation pharmacologique de l'indole 2475				
3.1 Induction de la neuropathie			76		
	3.2	Sélectivité par rapport à l'inhibition	78		
3.3		Sélectivité par rapport à un autre ligand	.79		
	3.4	Conclusion	81		
4	Effe	t de l'indole 24 sur l'effet antalgique de la fluoxétine	81		
	4.1	Induction de la neuropathie	81		
	4.2	Résultats	83		
	4.3	Conclusion	84		

# Chapitre 2 : Evaluation pharmacologique *in vivo*

# **1** Introduction

L'équipe Neuro-Dol a montré que l'interruption de l'interaction entre les protéines à domaine PDZ et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>, par un peptide composé du peptide TAT et des neuf résidus terminaux du récepteur 5HT<sub>2A</sub> (GVNEKVSCV), s'accompagne d'un effet anti-hyperalgique chez des rats souffrant de douleur neuropathique d'origine métabolique (diabète).<sup>73</sup> Il a également été montré sur ce même modèle animal que l'activité antalgique de la fluoxétine (antidépresseur inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine) était potentialisée par ce même peptide.<sup>73</sup>

En collaboration avec Neuro-Dol, il a été décidé, au vu des propriétés antihyperalgiques intéressantes obtenues avec l'indole **24** (Figure 31) (cf introduction) synthétisé par le Dr Alexandre Vogrig,<sup>100</sup> de poursuivre les études biologiques. Il a notamment été envisagé de réaliser des tests de sélectivité, et d'étudier l'effet de l'indole **24** sur l'activité antalgique de la fluoxétine. En effet, il a été montré que la molécule **24** inhibait bien l'interaction entre le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5- $HT_{2A}$  et que celle-ci avait un effet anti-hyperalgique sur un modèle de neuropathie traumatique. Afin de réaliser ces tests, il a été nécessaire de synthétiser l'indole **24**.



Figure 31: Indole 24

# 2 Synthèse de l'indole 24

La synthèse de l'indole **24** ayant déjà été réalisée et publiée<sup>100</sup> (Schéma 1), nous avons utilisé le même schéma de synthèse en partant du 4-iodosalicylate de méthyle **25**. La première étape correspond à la nitration du 4-iodosalicylate de méthyle **25** en présence d'un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique, avec un rendement de 30%. Ce faible rendement peut s'expliquer par la formation de produits secondaires dont l'isomère 3-nitro avec un rapport 50/50. Ensuite l'alcool **26** est protégé par une réaction de Williamson en présence de bromure de benzyle pour obtenir le dérivé nitré **27** avec un rendement quantitatif. Ce dernier est réduit à l'aide de dithionite de sodium pour obtenir l'amine **28** avec un rendement quantitatif. Ensuite une cyclisation de Heck à été réalisée à partir de l'amine iodé **28** en présence d'acide oxobutyrique et catalysée par de l'acétate de palladium pour obtenir l'indole **29** avec un rendement de 70%. L'alkylation en présence du 4-bromobutyrate d'éthyle est ensuite réalisée suivi directement de la saponification pour obtenir l'indole **24** avec un rendement de 40% sur 2 étapes.

La synthèse de l'indole **24** s'est déroulée comme décrite, il a été obtenu avec un rendement global de 8% sur 6 étapes, en quantité suffisante (150 mg) pour la suite des études envisagées.

#### Chapitre 2 : Evaluation pharmacologique in vivo



Schéma 1: Synthèse de l'indole 24

## 3 Evaluation pharmacologique de l'indole 24

Ces travaux ont été réalisés par le Dr. Anne-Sophie Wattiez de l'équipe du Professeur Christine Courteix.

Nous avons vu précédemment que l'indole **24** inhibe l'interaction entre PSD-95 et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et qu'il réduit l'hyperalgie mécanique chez des rats rendus neuropathiques par ligature du nerf sciatique (CCI) (cf chapitre 1).<sup>100</sup> Suite à ces résultats, il a été décidé de réaliser des tests complémentaires afin de vérifier si l'activité anti-hyperalgique de l'indole **24** est bien due à l'inhibition de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, et non pas due à l'interaction avec autre ligand endogène de PSD-95, comme le récepteur NMDA.<sup>97</sup>

### 3.1 Induction de la neuropathie

La sélectivité de l'indole **24** a été testée sur un symptôme d'hypersensibilité mécanique (test de pression de la patte) chez des rats neuropathiques CCI.



Figure 32 : Schématisation des nerfs sciatique et saphène, leurs branches terminales et leurs origines spinales.<sup>106</sup>

La mononeuropathie unilatérale périphérique est induite selon la méthode décrite par Bennett et Xie.<sup>107</sup> Les rats (200-225 g) sont anesthésiés à l'aide de xylazine (2%, 10 mg/kg, i.p.) et de kétamine (10%, 75 mg/kg, i.p.). La patte postérieure gauche du rat est tondue puis désinfectée avec de la povidone iodée 10% (Bétadine®). Après incision de la peau, les muscles de la cuisse sont séparés, le nerf sciatique gauche est exposé et quatre ligatures (Monocryl® 5-0, Ethicon®, Johnson-Johnson) espacées de 1 mm sont posées autour du tronc commun du nerf, de façon à ralentir la vascularisation sans l'interrompre totalement (Figure 2). Le nerf est remis en place entre les muscles, et la peau est suturée (Mersuture® 3.0, Ethicon®, Johnson-Johnson). La zone opérée est alors de nouveau désinfectée et les animaux sont isolés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

Les rats sont soumis au test de pression de la patte décrit par Randall et Selitto<sup>108</sup> afin de détecter la survenue d'une hyperalgie mécanique. Le seuil de nociception, objectivé par la vocalisation ou la réaction de lutte (« *struggle* ») est mesuré à l'aide d'un analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®).<sup>108</sup> Comme ce test nécessite la préhension de l'animal, l'expérimentateur habitue les rats : 3 jours avant le début de l'expérience les rats sont maintenus par

l'expérimentateur pendant 20 secondes sans qu'ils ne s'échappent, ne se débattent ou n'émettent de cris. Le jour de l'expérience, les rats sont de nouveau maintenus par l'expérimentateur à plusieurs reprises, tout en faisant fonctionner l'analgésimètre afin que les animaux s'habituent au bruit de l'appareil.

La patte postérieure (gauche) du rat est alors placée sous un cône et une force mécanique croissante et linéaire est appliquée grâce à un poids se déplaçant sur une échelle graduée (Figure 33), ceci jusqu'à l'obtention d'une vocalisation ou d'un struggle de la part du rat. Le seuil de vocalisation peut alors être lu sur l'échelle graduée (grammes). Trois à quatre mesures sont réalisées à des intervalles de 10 minutes afin d'obtenir deux valeurs consécutives qui ne diffèrent pas de plus de 10%. Le seuil de vocalisation est défini comme la moyenne de ces deux valeurs et est exprimé en unités arbitraires (AU).



Figure 33: Analgésimètre Ugo Basile (Bioseb®) utilisé pour l'appréciation de l'hypersensibilité mécanique des rats

Les seuils de vocalisation sont mesurés avant l'induction de la neuropathie. Quatorze jours après la ligature du nerf sciatique, les rats mononeuropathiques hyperalgiques (c'est-àdire présentant une diminution du seuil de vocalisation de plus de 15 % par rapport au seuil obtenu avant neuropathie) sont soumis au test de pression de la patte (détermination des seuils de vocalisation), puis reçoivent un des traitements par voie intrathécale. Les seuils de vocalisation sont alors mesurés toutes les 15 minutes après l'injection intrathécale, pendant 120 min. Les résultats sont exprimés en aire sous la courbe (A.U.C.) des variations des seuils de vocalisation entre 0 et 120 minutes après les injections.

## 3.2 Sélectivité par rapport à l'inhibition

Le M100907 est un antagoniste spécifique du récepteur 5- $HT_{2A}$  (Figure 34). Afin de vérifier que l'activité anti-hyperalgique de l'indole **24** est bien due à l'inhibition de l'interaction entre PSD-95 et 5- $HT_{2A}$ , nous avons décidé de comparer les effets de l'indole **24** co-administré avec le M100907 ou avec le DMSO 20%.



Figure 34: Structure chimique du M100907, antagoniste spécifique du récepteur 5- $\mathrm{HT}_{2\mathrm{A}}$ 

Pour cette expérience quatre groupes de rats neuropathiques (n= 7 - 8 rats par groupe) ont été constitués et ont reçu les traitements suivants (Figure 35) :

- a) DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.) + DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.)
- b) 24 (0.5 nmol/rat, i.t.) + DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.)
- c) 24 (0.5 nmol/rat, i.t.) + M100907 (0.4 nmol/rat, i.t.)
- d) DMSO 20% (10  $\mu$ L/rat, i.t.) + M100907 (0.4 nmol/rat, i.t.)



Figure 35: Aires sous la courbe (A.U.C.) de l'évolution des seuils de vocalisation après co-administration intrathécale de l'indole 24 en présence ou non de M100907. Les valeurs sont exprimées en A.U. x minutes +/- ES.

Le véhicule (DMSO 20%, Figure 35 a) coadministré avec le DMSO ou avec l'antagoniste M100907 (Figure 35 d) n'ont aucun effet chez les rats neuropathiques. L'effet anti-hyperalgique de l'indole **24** co-administré avec le DMSO (Figure 35, b) est retrouvé. Cet effet est totalement inhibé par la co-administration de l'indole **24** avec le M100907 (Figure 35, c).

Nous pouvons donc conclure que l'effet anti-hyperalgique de l'indole **24** implique le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>.

#### 3.3 Sélectivité par rapport à un autre ligand

Nous avons ensuite vérifié si l'indole **24** était spécifique de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur 5-HT2A et non d'une interaction de PSD-95 avec d'autres ligands endogènes connus pour moduler la transmission du message nociceptif.<sup>109</sup> En effet, il a été montré que l'interaction entre PSD-95 et le récepteur NMDA est impliqué dans la douleur.<sup>63</sup> Par conséquent, l'effet de l'indole **24** a été testé sur l'hypersensibilité mécanique induite par l'acide *N*-méthyle-D-aspartique (NMDA).

Pour cette expérience quatre groupes de rats neuropathiques (n= 8 à 27 rats par groupe) ont reçu les traitements suivants (Figure 36)

- a) DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.) + DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.)
- b) NMDA (2 nmol/rat, i.t.) + DMSO 20% (10 µL/rat, i.t.)
- c) NMDA (2 nmol/rat, i.t.) + MK801 (1 nmol/rat, i.t.)
- d) NMDA (2 nmol/rat, i.t.) + 24 (0.5 nmol/rat, i.t.)



Figure 36: Effet de l'indole 24 sur l'hypersensibilité mécanique induite par le NMDA chez des rats sains. Les valeurs sont exprimées en A.U. x minutes +/- ES.

La co-administration de NMDA + DMSO 20 % (Figure 36, b) induit une hypersensibilité mécanique ; la co-administration du MK801, antagoniste de NMDA (Figure 36, c), avec le NMDA réduit l'hypersensibilité mécanique, alors que la co-administration de l'indole **24** avec le NMDA (Figure 36, d) n'induit aucune variation significative par rapport au groupe NMDA + DMSO 20 %.

Nous pouvons donc conclure que l'indole **24** n'a pas d'effet sur l'hypersensibilité mécanique induite par le NMDA suggérant que son effet anti-hyperalgique n'implique pas l'interaction PSD-95-récepteur NMDA.

### 3.4 Conclusion

L'ensemble de ces tests nous permet de conclure que l'effet anti-hyperalgique de l'indole **1** est dû à l'inhibition sélective de l'interaction entre les deux protéines cibles, la protéine PSD-95 et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

L'interruption de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur 5- $HT_{2A}$  par l'indole 24 conduisant à un effet anti-hyperalgique sous-tendu par l'activation du récepteur 5- $HT_{2A}$ , il était intéressant d'évaluer l'effet de la même stratégie sur un inhibiteur sélectif de la recapture de la 5-HT, la fluoxétine.

# 4 Effet de l'indole 24 sur l'effet antalgique de la fluoxétine

Ces travaux ont été réalisés par le Dr. Amandine Dupuis de l'équipe du Professeur Christine Courteix.

### 4.1 Induction de la neuropathie

L'effet de l'indole **24** sur l'effet antalgique de la fluoxétine a été évalué sur un symptôme d'allodynie tactile (test de Von Frey<sup>110,111</sup>) chez des rats neuropathiques qui ont subi une ligature du nerf spinal L5 (rat SNL « Spinal Nerve Ligation »).

La mononeuropathie est induite selon la méthode décrite par Kim et Chung.<sup>112</sup> Les rats (200 - 275 g) sont anesthésiés à l'aide de xylazine (2%, 10 mg/kg, i.p.) et de kétamine (10%, 75 mg/kg, i.p.). La région lombaire dorsale du rat est ensuite tondue puis désinfectée avec de la povidone iodée 10% (Bétadine®). Après incision de la peau de l'aponévrose et du muscle paraspinal, le nerf spinal L5 est dégagé et positionné sur une pipette Pasteur puis la ligature est réalisée avec un fil de soie (fil Mersilk® 4.0, Ethicon®, Johnson-Johnson) serré autour du nerf L5. La ligature effectuée, le muscle est recousu (fil monocryl® 4.0, Ethicon®, Johnson-Johnson) et la peau suturée à l'aide d'agrafes Michel (A75 Perfect, Ets Bruneau, Bretigny-Sur-Orge, France). La zone opérée est alors de nouveau désinfectée (Bétadine® et solution d'antibiotique (Négérol®), les animaux sont réhydratés (solution NaCl 0.9%, 5 mL/kg, s.c.),

reçoivent un antalgique AINS (Meloxicam, 2 mg/kg, s.c.) et sont isolés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

Les rats sont soumis au test de von Frey afin d'évaluer la présence d'une allodynie tactile. Les rats sont placés dans des compartiments individuels en plexiglas® (25x20x25 cm), sur une surface grillagée pendant 15 à 20 minutes pour habituation. Le test de von Frey est réalisé à l'aide d'une gamme de 8 filaments en nylon qui permettent d'appliquer une force croissante (de 1,4 g à 26 g) afin de déterminer le seuil de réponse à 50% par la méthode « updown ».<sup>113</sup>

Les filaments sont appliqués entre les coussinets de la surface plantaire de la patte ipsilatérale à la ligature, en commençant par le filament de 6 g qui est le filament intermédiaire de la gamme. Le filament qui est appliqué ensuite est choisi en fonction de la réaction du rat au filament de 6 g, si le rat a une réaction (retrait, léchage ou tressaillement de la patte) lors de l'application, le filament suivant sera celui de force immédiatement inférieure dans la gamme. Si le rat n'a aucune réaction, ce sera le filament de force directement supérieure dans la gamme. Chaque application de filament doit se faire toujours au même endroit pour obtenir la même sensibilité pour chaque application de filament. L'application du filament dure 6 secondes et doit être exercée avec une force telle que celui-ci se fléchisse. Le test se poursuit jusqu'à ce que 4 filaments soient appliqués après le premier changement de comportement du rat.

Le test est réalisé avant et 14 jours après la ligature du nerf spinal, afin d'évaluer la présence d'allodynie. Les rats reçoivent ensuite le traitement chronique (2 injections /j, 5 injections de fluoxétine 10 mg/kg ou l'éthanol 10 %, 5 mL/kg) par voie intrapéritonéale puis, 6 h après la dernière injection, une injection de l'Indole **24** ou de DMSO 20 % par voie intrathécale. Le test de von Frey est alors réaliséaprè30 et 60 minutes après le traitement aigu.

Quatre groupes de rats neuropathiques (n= 6-7 rats par groupe) ont reçu les traitements suivants (Figure 37) :

- a) NaCl 0.9% (5 x 5 mL/kg, i.p) + DMSO 20 % (10 µL/rat, i.t.);
- b) NaCl 0.9% (5 x 5 mL/kg, i.p) + 24 (50 µmol/rat, i.t.);
- c) Fluoxétine (5 x 10 mL/kg, i.p) + DMSO 20 % (10  $\mu$ L/rat, i.t.);
- d) Fluoxétine (5 x 10 mL/kg, i.p) + 24 (50 µmol/rat, i.t.).

## 4.2 Résultats



Figure 37: Evolution des seuils de réponse 50% après administration répétée de fluoxétine (5x10 mg/kg, i.p.) ou NaCl
0.9% (5 x 5 mL/Kg) et suivie d'une administration aiguë de 24 (50 μmol/rat, i.t.) ou de DMSO 20 % (10 μl/rat, i.t.)
chez le rat SNL allodynique. Les valeurs sont exprimées en grammes (g) +/- ES (n=6-7).

Les véhicules respectifs (NaCl 0.9% pour l'injection chronique et le DMSO 20% pour l'injection aiguë) ne font pas varier le seuil de réponse à 50% chez les rats allodyniques.

L'injection répétée de fluoxétine (Figure 37, c) réduit légèrement l'allodynie chez le rat et cela de façon stable. Cet effet est cependant légèrement moins important que celui de l'indole **24** (Figure 37, b). Par contre, l'association des deux traitements (Figure 37, d) permet l'obtention d'un effet anti-allodynique très important et plus important que celui de la fluoxétine seule ou de l'indole **24** seul. De plus, cet effet semble stable dans le temps au vu des résultats à 60 minutes. Enfin, l'effet anti-allodynique obtenu par cette association permet de soulager l'allodynie tactile puisque le seuil de réponse 50% est proche de celui des rats avant l'induction de la neuropathie.

### 4.3 Conclusion

Ce dernier test nous permet de conclure que l'indole **24** potentialise l'effet antalgique de la fluoxétine sur un modèle d'allodynie tactile, permettant de supprimer l'allodynie tactile de façon durable. Ce résultat est très encourageant pour envisager des traitements combinatoires entre la fluoxétine et produits de synthèses avec un pouvoir antalgique.



Figure 38: Mécanisme d'action hypothétique de l'indole 24 et de la fluoxétine sur la neurotransmission sérotoninergique

Nous pouvons ainsi proposer un mécanisme (Figure 38) selon lequel l'interruption des interactions entre le récepteur 5- $HT_{2A}$  et les protéines associées par l'indole **24** restaure la fonctionnalité du récepteur 5- $HT_{2A}$  de la sérotonine. L'activation de ce récepteur par la sérotonine endogène dont le taux peut être accru par les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), s'oppose à la transmission du message douloureux.

Ainsi, l'interruption des interactions entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et les protéines associées pourrait constituer une stratégie originale pour la prise en charge des douleurs neuropathiques et l'amélioration de l'activité antalgique des antidépresseurs ISRS.

# CHAPITRE 3

# SOMMAIRE

1	Introduction				
2	Interaction entre la protéine PSD-95 PDZ1 et le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> 89				
3 et	Opt de l'ac	timisation de l'indole 24. Influence des substituants méthyles en positide carboxylique en position 6 (6-COOH)	ition 3 (3-Me)		
	3.1	Modélisation moléculaire	95		
	3.2	Approche rétrosynthétique	97		
	3.3	Synthèse	97		
	3.4	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N			
4	Opti	imisation de l'indole 24. Rôle du Benzyloxy en postion 5 (5-OBn)			
	4.1	Synthèse			
	4.2	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N			
5 Optimisation de l'indole 43					
	5.1	Conception			
5.2 Approche rétrosynthètique					
5.3 Synthèse des indoles 4		Synthèse des indoles 48 et 49	110		
	<ul> <li>5.3.1 Stratégie de synthèse (voie A)</li> <li>5.3.2 Synthèse de l'amine protégée pour le couplage peptidique.</li> <li>5.3.3 Synthèse des indoles 48 et 49</li> </ul>		110 111 112		
	5.4	Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N	114		
	5.5	Evaluation <i>in vitro</i>	117		
	5.6	Conclusion			

# **1** Introduction

Comme nous l'avons présenté précédemment, l'objectif de ce projet est de concevoir et de synthétiser des inhibiteurs spécifiques de l'interaction entre le domaine PDZ 1 de PSD-95 et l'un de ses ligands naturels, le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>.

Les travaux antérieurs ont permis de développer un inhibiteur de l'interaction PSD-95/5-HT<sub>2A</sub>, il s'agit de l'indole **24**. Cet indole se lie au site S0 du domaine PDZ délimité notamment par la boucle GLGF. Ce site étant très conservé au sein des protéines à domaines PDZ, nous avons envisagé de cibler également le site S1, plus spécifique. En effet, la boucle comprise entre les feuillets  $\beta_2$  et  $\beta_3$  est différente d'une protéine à une autre, notamment sa longueur, mais également la nature des acides aminés (hydrophobe, plaire, ionique...) qui la composent (Figure 14). Les premiers travaux du laboratoire ont consisté à préparer des « biligands »,<sup>114</sup> composés possédant un indole pouvant se lier au site S0 sur lequel il a été greffé un bras espaceur substitué par un acide aminé susceptible d'atteindre le site S1. Malheureusement cette stratégie n'a pas permis de générer des composés capables de se lier suffisamment fortement à la protéine, ceci étant probablement dû au fait que l'indole utilisé se liait très faiblement au site S0. L'équipe a par la suite développé un ligand se liant à PSD-95, l'indole **24**, ce qui nous permet de poursuivre la stratégie initiale.

# 2 Interaction entre la protéine PSD-95 PDZ1 et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>

Afin de déterminer « quels types » d'interactions sont nécessaires pour interagir spécifiquement avec le domaine PDZ1 de PSD-95, nous avons comparé les constantes de dissociation de PSD-95 avec ses ligands endogènes (Tableau 2). Nous constatons que, concernant le domaine PDZ1 de PSD-95, les valeurs varient de 1,5  $\mu$ M pour Kv1.4 à 160  $\mu$ M pour GluR6, ce qui montre que cette protéine présente des interactions à la fois « faibles » et relativement « fortes » en fonction du ligand. De façon générale, pour les mêmes ligands, les constantes de dissociation sont plus faibles pour le domaine PDZ1 de PSD-95 que pour le domaine PDZ2, les ligands présentent donc de plus faibles interactions avec ce dernier.

Domaine PSD 95	Ligand	$\mathbf{K}_{\mathbf{d}}$	ref
	C-term GluR6 (RLPGKETMA)	$K_d = 160 \ \mu M$	52
	C-term Kv1.1 (SVNKSKLLTDV)	$K_d = 20,79 \ \mu M$	115
	C-term CRIPT (LDTKNYKQTSV)	$K_d = 15 \ \mu M$	52
PDZ 1	C-term NR2a (YKKMPSIESDV)	$K_{d} = 5,25 \ \mu M$	
	C-term NR2c (WRRISSLESEV)	$K_d = 2,87 \ \mu M$	115
	C-term NR2b (YEKLSSIESDV)	$K_{d} = 2,30 \ \mu M$	
	C-term Kv1.4 (SSNAKAVETDV)	$K_d = 1,5 \ \mu M$	52
	C-term Kv1.1 (SVNKSKLLTDV)	$K_{d} = 6,70 \ \mu M$	
	C-term CRIPT (LDTKNYKQTSV)	$K_d = 1,2 \ \mu M$	
PDZ 2	C-term NR2b (YEKLSSIESDV)	$K_{d} = 0,91 \ \mu M$	115
	C-term NR2a (YKKMPSIESDV)	$K_d = 0,75 \ \mu M$	
	C-term NR2c (WRRISSLESEV)	$K_{d} = 0,60 \ \mu M$	
	C-term Neurologin (PHPHSHSTTRV)	$K_{d} = 27,91 \ \mu M$	
PDZ 3	C-term NR2c (WRRISSLESEV)	$K_{d} = 25,03 \ \mu M$	2
	C-term CRIPT (LDTKNYKQTSV)	$K_{d} = 3,39 \ \mu M$	

Tableau 2: Constantes de dissociation (mesurées par anisotropie de fluorescence) de différents ligands endogènes vis à vis des trois domaines de PSD-95

Au moment de l'étude, nous n'avions pas trouvé dans la littérature de données concernant l'interaction de PSD-95 avec 5- $HT_{2A}$ . Les constantes de dissociation ont alors été déterminées par Titration Calorimétrique Isotherme (ITC) en collaboration avec le Pr. Lu-Yun Lian (Liverpool).

L'ITC est une technique d'analyse qui permet d'étudier les interactions entre biomolécules. Cette technique permet la mesure de diverses données comme la constante de liaison, la stœchiométrie, l'entropie et l'enthalpie de réaction sans avoir besoin de réaliser de marquage. En effet, la chaleur qui est absorbée ou libérée lors de la liaison entre les protéines

est mesurée à l'aide d'un calorimètre pendant la titration progressive du ligand avec la protéine étudiée.<sup>116</sup>

Le calorimètre (Figure 39, A) est composé de deux cellules à température constante, une cellule de référence contenant de l'eau, l'autre contenant la solution de la protéine étudiée et d'une seringue qui contient le ligand qui servira à la titration de celui-ci dans la cellule contenant la protéine. Un système de mesure relie les deux cellules pour pouvoir mesurer la chaleur absorbée ou dégagée, la quantité de chaleur mesurée est proportionnelle au nombre de liaisons créées entre la protéine et le ligand.<sup>116</sup>

L'analyse débute par l'installation de la seringue contenant le ligand dans la cellule contenant l'échantillon de protéine, des petites quantités de ligand sont injectées dans la cellule contenant la protéine. Si le ligand se lie avec la protéine, la différence de chaleur entre les deux cellules sera mesurée par le calorimètre, avant que celui-ci ne fasse revenir la température de la cellule avec la protéine à la même température que la cellule de référence pour revenir à une différence de température de 0°C (Figure 39, B).



Figure 39: Principe de la titration calorimétrique isotherme (ITC), (A) Schéma de l'appareil utilisé en ITC. (B) Présentation des résultats obtenus par ITC avec en haut les différences de température et en bas la courbe en fonction du ratio molaire.

Sur l'analyse ITC, chaque pic correspond à un ajout de ligand, c'est-à-dire que chaque pic correspond à une augmentation du ratio molaire entre la protéine et le ligand. Ce ratio augmente jusqu'à l'obtention de la saturation en ligand dans la cellule avec la protéine. L'augmentation du ratio s'accompagne d'une diminution de la variation de chaleur entre les deux cellules, ce qui correspond à une diminution du nombre de liaisons entre la protéine et le ligand. La saturation une fois atteinte, les pics sont intégrés afin de tracer une isotherme en fonction du ratio molaire, qui nous servira à la détermination des différentes constantes comme la constante de dissociation ou encore la stœchiométrie.

C'est grâce à cette technique que les constantes de dissociation ( $K_d$ ) entre la protéine PSD-95 PDZ1 et PDZ2 avec les ligands 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub> (Tableau 3) ont été mesurées par l'équipe du Pr Lian à Liverpool.

Domaine PSD 95	Ligand	K <sub>d</sub>
PDZ1	5-HT <sub>2A</sub>	$K_d = 76,34 \ \mu M$
	5-HT <sub>2C</sub>	$K_d = 22,70 \ \mu M$
DD 71	5-HT <sub>2A</sub>	$K_{d} = 25,00 \ \mu M$
PDZ2	5-HT <sub>2C</sub>	$K_{d} = 6,04 \ \mu M$

Tableau 3: Résultats de la détermination des  $K_d$  à partir des analyses ITC

Comme nous pouvons le constater, les valeurs obtenues (Tableau 3) montrent que l'interaction entre PSD-95 PDZ1 et 5- $HT_{2A}$  est faible par rapport à la majorité des ligands rapportés (Tableau 2).

Cette interaction conduit à un phénomène douloureux seulement en cas de surexpression du domaine PDZ, ce qui est le cas pour PSD-95 qui est surexprimée chez le rat neuropathique.<sup>73</sup>

Cette hiérarchie d'interactions est très importante pour la conception de futurs ligands inhibiteurs. En effet, ces derniers doivent interrompre les interactions de PSD-95 dites « pathologiques » et non les interactions physiologiques, de façon à ne pas induire d'effets indésirables. De plus cette hiérarchie devrait permettre de développer des ligands inhibiteurs spécifiques de l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>.

La structure cristalline de PSD-95 avec les 5 résidus C-terminaux du récepteur 5- $HT_{2A}$  (Lys-Val-Ser-Cys-Val) n'étant pas connue, nous avons réalisé une étude de *docking* afin de déterminer les interactions principales. Cette étude (Figure 40) montre que la Val (0) interagit *via* deux molécules d'eau avec l'Arg 11 et avec une poche hydrophobe formée par les résidus

Phe 18, Ala77 et Leu 78. Le COOH-terminal interagit également avec la Gly 15 et la Leu 16 de la boucle GLGF. La Ser (-2) montre une interaction avec l'Ile 20 et l'His 71. La Val (-3) interagit quant à elle avec l'Ile 20.



Figure 40: *Docking* de 5-HT2A (Lys-Val-Ser-Cys-Val) dans PSD-95 PDZ1 (PDB: 3GSL)

Cette étude met de nouveau en évidence l'importance des interactions des ligands potentiels notamment avec la boucle GLFG et la boucle S1.

# 3 Optimisation de l'indole 24. Influence des substituants méthyles en position 3 (3-Me) et de l'acide carboxylique en position 6 (6-COOH)

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la structure 3D du complexe PDZ/ligand (Figure 41) a été déterminée par RMN.<sup>100</sup> Nous avons pu ainsi en déduire la position et l'orientation spatiale du ligand dans le domaine PDZ de la protéine ainsi que les principales interactions.



Figure 41: Structure 3D du complexe PSD-95 PDZ1/24 déterminé par RMN

Nous constatons que le groupement benzyle de l'indole occupe une poche hydrophobe formée par les chaînes latérales des acides aminés Leu 16, Phe 18, Ile 20 et Leu 78. L'acide carboxylique en position 2 de l'indole est, quant à lui, impliqué dans une interaction avec la Gly 15 (boucle GLGF). L'acide carboxylique en position 6 interagit avec les acides aminés Arg 11 et Lys 79.

Nous avons donc démontré que ce ligand interagit fortement avec la boucle GLGF au sein du site S0, mais, compte tenu de son orientation, pas avec la boucle S1.

A partir de cette structure, nous avons envisagé d'étudier l'influence des substituants à la fois sur l'orientation du ligand dans le site de la protéine, mais également sur son affinité avec le domaine PDZ1 de PSD-95. Nous avons notamment étudié l'importance du groupement méthyle en position 3 ainsi que de l'acide en position 6.

Nous espérons ainsi identifier des molécules capables de se lier à la protéine mais avec des interactions plus faibles que l'indole **24**, Ce qui nous a amené à proposer les structures des indoles **30**, **31** et **32** (Figure 42).



Figure 42: Structure chimique des indoles 30, 31 et 32

#### 3.1 Modélisation moléculaire

Nous avons réalisé le *docking* des indoles **30**, **31** et **32** avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (Figure 43). Les résultats montrent que les trois indoles adoptent une orientation différente de l'indole **24** dans le domaine PDZ. Comme on pouvait s'y attendre, compte tenu de sa structure, l'indole **30** présente des interactions similaires à l'indole **24** et au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Figure 43, A). Il interagit notamment avec l'Arg 11, la Gly 15, l'Ile 20 et l'His 71.

Les indoles **31** et **32** présentent également des interactions avec l'Arg 11, la Gly 15 et l'Ile 20. Par contre, compte tenu de l'absence de l'acide carboxylique sur le cycle aromatique (6-COOH), ils n'interagissent pas avec l'His 71. Ces deux indoles semblent donc se positionner dans la poche délimitée par la boucle GLGF dans le domaine PDZ, par contre ils ne présentent pas d'interactions avec l'His 71.

Au vu de ces résultats, nous avons envisagé de synthétiser les indoles **30**, **31** et **32** dans le but notamment de montrer si des ligands, pour lesquels les interactions sont plus faibles, peuvent être des inhibiteurs sélectifs de l'interaction entre PSD-95 PDZ1 et le récepteur  $5-HT_{2A}$ .

Chapitre 3 : Optimisation





#### **3.2** Approche rétrosynthétique

Les trois indoles **30**, **31** et **32** seront préparés selon la méthode utilisée pour préparer l'indole **1** (Schéma 1). Ils seront obtenus respectivement à partir des indoles **33**, **34** et **35** en deux étapes. Ces derniers seront synthétisés à partir des iodophénols **36** et **37**. L'étape clé de ces synthèses est la formation de l'indole, suivant la méthode décrite dans le chapitre précédent, soit en présence d'acide oxobutyrique soit en présence d'acide pyruvique (Schéma 2).



Schéma 2: Retrosynthèse des indoles 30, 31 et 32

#### 3.3 Synthèse

L'iodoaniline **28** est obtenue en 3 étapes (Schéma 3) à partir de l'idosalicylate de méthyle **25** avec un rendement de 30%, comme décrit pour la synthèse du composé **24** (Chapitre 2). La synthèse de l'indole **33** est effectuée selon la méthode décrite dans le chapitre 2 en présence d'acide pyruvique, avec un rendement de 66%. La *N*-alkylation du composé **33** conduit à l'indole **40** qui n'est pas isolé car difficilement purifiable. Une saponification de ce dernier conduit à l'indole **30** souhaité avec un rendement de 70%. L'indole **30** est donc obtenu en 6 étapes à partir de l'iodosalicylate **25** avec un rendement global de 14%.

Les indoles **31** et **32** sont, quant à eux, obtenus à partir de l'idophénol **7** (Schéma 3). Celui-ci subit, comme précédemment, une réaction de nitration pour conduire à la nitroiodoaniline **37** avec un faible rendement de 25%.<sup>117</sup> Le composé **36** subit alors une benzylation et enfin une réduction du groupement nitro pour conduire à l'iodoaniline **39** avec

un rendement de 34% sur les deux étapes. Les indoles **31** et **32** sont obtenus dans les conditions habituelles en utilisant respectivement l'acide oxobutyrique et l'acide pyruvique avec des rendements de 45 et 49%. Une *N*-alkylation, suivie d'une saponification permet de générer les indoles attendus **31** et **32** avec un rendement de 49%.



Schéma 3: Synthèse des indoles 30, 31 et 32

Ces indoles ont été préparés en 6 étapes avec un rendement global de 14% pour l'indole **30**, 2% pour l'indole **31** et 2% pour l'indole **32**.

## 3.4 Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Les indoles **30**, **31** et **32** ayant été préparés, l'évaluation de l'interaction de ces indoles avec la protéine PSD-95 a été réalisée par HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N.

Nous allons discuter dans cette partie les données obtenues en présence des différents indoles (**30**, **31** et **32**) en les comparants aux données obtenues en présence de deux ligands naturels de PSD-95 (5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>) et de l'indole **24**. L'étude des HSQC (Annexe 1 à 4) va nous donner des informations sur la capacité d'interaction des indoles avec le domaine PDZ1 de PSD-95.

A partir de ces HSQC (Figure 44), nous avons extrait des données (Tableau 4) : les acides aminés perturbés par l'interaction du ligand, ainsi que la somme globale des perturbations pour chaque ligand ( $\Sigma\Delta\delta$ ). Les acides aminés indiqués dans le tableau cidessous possèdent une différence de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) supérieure ou égale à 0.08 ppm. Cette perturbation ( $\Delta\delta$ ) est calculée à l'aide de la formule suivante :  $\Delta\delta = \{(\Delta H)^2 + (0.15\Delta N)^2\}^{1/2}$ , où  $\Delta H$  et  $\Delta N$  sont respectivement les différences de déplacement chimique de l'hydrogène ( $\Delta H = \delta H_{Ligand} - \delta H_{Ref}$ ) et de l'azote ( $\Delta N = \delta N_{Ligand} - \delta N_{Ref}$ ) de la protéine en présence (ligand)/absence (référence) du ligand.

Nous constatons en analysant les spectres HSQC des différents indoles (Figure 44) que les acides aminés de PSD-95 PDZ1 sont perturbés par les indoles **30**, **31** et **32** (Figure 44 A, B, C,). L'indole **30** perturbe de manière significative plusieurs acides aminés de la protéine (Figure 44, A) de façon très comparable à l'indole **24**, quant aux indoles **31** et **32**, ils ne perturbent que quelques acides aminés, de façon moins significative. Nous constatons que les sommes des perturbations (Tableau 4) pour les indoles **31** ( $\Sigma\Delta\delta = 0.355$  ppm) et **32** ( $\Sigma\Delta\delta = 0.224$  ppm) sont très faibles alors que celle de l'indole **30** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.052$  ppm) est légèrement inférieure à celle de l'indole **24** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.469$  ppm).

Chapitre 3 : Optimisation



Figure 44: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence de l'indole 30 (vert), (B) seul (bleu)/en présence de l'indole 31 (vert), (C) seul (bleu)/en présence de l'indole 32 (vert) et (D) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

	Acide aminés perturbés				
Ligands	$GLGF + Feuillet \ \beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Hélice $\alpha_2$	Autres résidus nerturhés	perturbations
Liganus	résidus 15-21	résidus 22-34	résidus 71-80	Autres residus perturbes	ΣΔδ (ppm)
5-HT2a	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	NC
5-HT2c	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, V75, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	NC
24	G15, G17, F18, S19	N26	A74, V75, E76, L78	R11, G12, I40, A45, A46, G82	2.469
30	G15, F18, S19, I20	H28	V75, A77, L78	R11, G12, S14, I40, G44, A45, A46, Q48, S83, L87	2,052
31	/	/	/	/	0,355
32	/	/	/	/	0,224

Tableau 4: Acides aminés perturbés par différents ligands

La lecture détaillée du tableau nous montre que les acides aminés perturbés par l'indole **30** sont plutôt des acides aminés qui se situent dans le haut de la poche PDZ (Figure 45). En effet, nous constatons la perturbation du Gly 15 et Phe 18 sur la boucle GLGF suivi des Ser 19 et Ile 20 sur le feuillet  $\beta_2$  ainsi que les acides aminés Val 75, Ala 77, Leu 78 de l'hélice  $\alpha_2$ . Nous constatons également la perturbation d'autres acides aminés dont certains qui se situent sur la boucle  $\alpha_1$ , comme Gly 44 et Ala 45. Au vu de ces résultats et à ceux obtenus pour l'indole **24**, il semble que ces deux indoles interagissent de manière similaire avec le domaine PDZ1 de PSD-95 puisque les acides aminés perturbés par ces derniers se situent plus vers le haut de la poche PDZ. Ceci est visible sur la représentation en couleur sur la structure en 3D de PSD-95 PDZ1 (PDB : 3GSL) mettant en évidence les acides aminés perturbés pas les indoles **24** et **30** (Figure 45).



Figure 45: Représentation en 3D des acides aminés de PDZ1 PSD-95 (PDB : 3GSL) perturbés par les indoles 24 et 30, les couleurs indiquent le degré de perturbation des acides aminés selon l'échelle.

En comparant les résultats des HSQC à la modélisation moléculaire, nous constatons que les interactions identifiées lors du *docking* semblent se confirmer pour l'indole **30** au vu des acides aminés perturbés par RMN. Cependant, les spectres HSQC pour les indoles **31** et **32** montrent que très peu d'acides aminés sont perturbés par leur présence. De plus, ils ne présentent apparemment pas d'interactions avec la boucle GLFG, contrairement aux résultats obtenus par *docking*. Il semblerait que les composés ne se lient que faiblement à la protéine.

Il apparaît donc que l'acide carboxylique en position 6 (6-COOH) est essentiel pour que le ligand puisse interagir avec la protéine et se positionner dans le site délimité par la boucle GLGF. Par contre le méthyle en position 3 (3-Me) n'est pas indispensable.

Nous avons donc poursuivi l'optimisation avec cette nouvelle information.

# 4 Optimisation de l'indole 24. Rôle du Benzyloxy en postion 5 (5-OBn).

Comme nous venons de le voir, l'acide carboxylique présent sur le cycle benzénique des indoles 24 et 30 semble être indispensable pour que les molécules interagissent avec le domaine PDZ de la protéine puisque les indoles 31 et 32 testés, sans acide carboxylique, ne présentent aucune interaction avec le domaine PDZ1 de PSD-95 par RMN.

De plus, d'après le *docking* (Figure 43, A) le groupement benzyle de l'indole **30** ne semble pas être impliqué dans des interactions hydrophobes, sauf si comme dans le cas de l'indole **24**, la molécule adopte une orientation différente de celle prévue par le *docking*. Pour vérifier ces hypothèses nous avons envisagé de préparer l'indole **43** possédant un acide carboxylique en position 5 et ne possédant pas de groupement benzyle. Le *docking* (Figure 46) réalisé sur cette molécule **43** prédit que l'acide en 5 (5-COOH) pourrait bien interagir bien avec l'His 71 mais également avec l'Ile 20. Ceci pourrait permettre, si le ligand interagit bien avec la boucle GLGF d'atteindre le site S1, en introduisant un substituant sur cette acide, soit sous forme d'ester, soit sous forme d'amide.



Figure 46: *docking* indole 43



Figure 47: Docking de l'indole 43 sans le méthyle

Bien que le score de l'indole sans le méthyle soit supérieur à celui de l'indole **43**, l'absence du méthyle en position 3 de l'indole entraîne un positionnement différent dans le site d'interaction (les deux cycles sont « à plat » sur le feuillet (Figure 47), ce qui est moins favorable pour que la molécule puisse se lier à la protéine. Nous avons donc envisagé de synthétiser l'indole **43**.

### 4.1 Synthèse

L'indole **43** sera synthétisé en utilisant la méthode développée précédemment à partir de l'intermédiaire **44**, lui-même obtenu à partir de l'aniline **45** commerciale (Schéma 4).



Schéma 4: Retrosynthèse de l'indole 43

L'iodoaniline **46** (Schéma 5) est obtenu par iodation de l'aniline **45** avec un rendement de 85%. L'indole **44** est obtenu dans les conditions décrites précédemment avec un rendement de 40%. Une *N*-alkylation de l'indole **44** suivie d'une saponification conduit au composé attendu **43** avec un rendement de 70%.



Schéma 5: Synthèse de l'indole 43

L'indole **43** est obtenu en 4 étapes à partir de l'ester **45** avec un rendement global non optimisé de 24%.

## 4.2 Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Dans cette partie, nous allons discuter des résultats obtenus en RMN HSQC pour l'indole **43**, et les comparer aux résultats obtenus précédemment.

Le spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de la protéine en présence de l'indole **43** (Figure 48, A) montre que celui-ci interagit avec la protéine de manière significative puisque nous constatons que le composé **43** perturbe beaucoup d'acides aminés de la protéine (par exemple la Gly 17) comme l'indole **24**. En comparant sur le spectre HSQC quelques acides aminés, nous remarquons que les perturbations de la Gly 17 et de la Phe 18 sont plus faibles pour le ligand **43** que pour l'indole **24**, par contre celui de la l'His 71 est plus important pour l'indole **43** que pour l'indole **24**. Ces informations sont résumées dans le Tableau 5, ainsi nous constatons que la somme des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ) pour l'indole **43** ( $\Sigma\Delta\delta$  = 2.335 ppm) est proche de celle de l'indole **24** ( $\Sigma\Delta\delta$  = 2.469 ppm).



Figure 48: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence de l'indole 43 (rouge) et (B) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

	Acide aminés perturbés				Somme des
Ligande	$GLGF + Feuillet \beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Hélice α <sub>2</sub>	Autres résidus	perturbations
Liganus	résidus 15-21	résidus 22-34	résidus 71-80	perturbés	ΣΔδ (ppm)
5-HT24	G17, F18, S19, I20,	G22, G23, T24,	H71, S72, A73, A77,	A45, A46, O48	NC
2A	A21	D25, N26, H28	L78, K79	,,	
5-HT <sub>2C</sub>	G17, F18, S19, I20,	G22, G23, T24,	H71, S72, A73, V75,	A45, A46, O48	NC
20	A21	D25, N26, H28	A77, L78, K79	·····, <b>·</b> ···, <b>·</b> ···	
24	G15, G17, F18, S19 N26	N26	A74, V75, E76, L78	R11, G12, I40,	2.469
		1120		A45, A46, G82	
43	G17, S19, I20	H28, I29	H71, V75, A77, L78, K79	G12, E68, L87	2.335

Tableau 5: Acides aminés perturbés par différents ligands dont l'indole 43

Une étude approfondie du Tableau 5 montre que l'indole **43** présente des interactions avec le haut de la poche puisque qu'il perturbe les acides aminés du GLGF avec la Gly 17 et la Phe 18. Celui-ci interagit également avec le bas de la poche PDZ puisque nous constatons la perturbation des His 28 et His 71 qui appartiennent respectivement à la boucle S1 et à l'hélice  $\alpha_2$ . Ceci est plus visible avec la représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ-1 perturbés par l'indole **43** (Figure 49). Il semblerait donc que l'indole **43** se positionne plus bas dans la poche que l'indole **24**.



Figure 49: Représentation 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les indoles 24, 30 et 43

En comparant les résultats des HSQC aux résultats de la modélisation moléculaire, nous constatons que les interactions identifiées lors du *docking* semblent se confirmer en RMN pour l'indole **43** au vu des acides aminés perturbés. En effet, nous constatons des interactions avec l'Ile 20, l'His 71 comme sur le *docking* de **43** avec le domaine PDZ1 de PSD-95.

Ces résultats montrent qu'il est possible de développer des ligands qui occupent pleinement la poche PDZ en perturbant le bas de la poche PDZ tout en faisant des interactions avec la boucle GLGF. Une nouvelle optimisation a donc été réalisée dans le but d'aller encore plus bas dans la poche PDZ.

# 5 Optimisation de l'indole 43

## 5.1 Conception

Comme nous venons de le voir, l'indole **43** présente des interactions avec le haut de la poche PDZ au niveau de la boucle GLGF, mais aussi avec le bas de la protéine (boucle S1 et hélice  $\alpha_2$ ). En effet, l'acide du noyau aromatique interagit de façon siginficative avec l'His 71. Dans ce cadre, nous avons conçu les indoles **48** et **49** qui pourraient être obtenus à partir de l'indole **43** par couplage entre une amine et l'acide carboxylique en position 5 dans le but d'atteindre le bas de la poche PDZ (Figure 50).



Figure 50: Structure chimique des indoles 48 et 49

Le *docking* (Figure 51) réalisé sur les indoles **48** et **49** montre que ces indoles présentent des interactions avec la boucle GLGF mais aussi avec l'His 71 dans le bas de la poche PDZ. L'indole **49** se positionne toujours dans le site de la protéine de la même façon que l'indole **43**, la chaine latérale gréffée sur l'acide de l'aromatique *via* un lien amide, présente donc des interactions avec le bas de la poche PDZ. L'indole **48**, quant à lui, ne se positionne pas de la même façon dans le site de la protéine. Il se positionne comme l'indole **24** à savoir que le cycle aromatique présent sur la chaîne de l'amide se positionne dans la poche hydrophobe. Par contre l'acide présent sur la chaîne grefée sur l'azote de l'indole montre une interaction avec la Ser 72.
Chapitre 3 : Optimisation



Figure 51: *Docking* des indoles 48 et 49 avec PSD-95 PDZ1 (PDB: 3GSL)

Compte tenu de ces résultats, nous avons donc envisagé de trouver une voie de synthèse permettant facilement de préparer les deux indoles **48** et **49** afin de vérifier les hypothèses de la modélisation et étudier l'influence d'une interaction avec la Ser 72.

# 5.2 Approche rétrosynthètique



Schéma 6: Retrosynthèse des indoles 48 et 49

Les indoles **48** et **49** peuvent être obtenus à partir de l'indole **52** suivant deux voies de synthèse, soit par formation de l'amide à partir de l'ester **50** (voie A), soit par formation de l'amine tertiaire sur l'azote en position 1 par *N*-alkylation de l'indole **51** (voie B). Les deux indoles **50** et **51** pourraient être obtenus à partir de l'indole **52** soit alkylation de l'azote soit par couplage peptidique. L'indole **52** peut être obtenu à partir de l'aniline **45** comme précédemment décrit. Toutefois il sera nécessaire de différencier les deux esters (R' et R'') pour la suite de la synthèse. Nous avons bien sûr envisagé de réaliser le couplage peptidique avec de l'éthanolamine protégée par un groupement benzyle pour pouvoir obtenir aisément les deux indoles **48** et **49**.

Il sera également nécessaire de synthétiser l'éthanolamine protégée qui sera utilisée pour réaliser le couplage peptidique.

### 5.3 Synthèse des indoles 48 et 49

### 5.3.1 Stratégie de synthèse (voie A)

Nous avons, dans un premier temps, envisagé de réaliser la synthèse des indoles **48** et **49** en passant par l'intermédiaire **50**. Nous avons supposé que le fait que l'atome d'azote soit alkylé faciliterait les étapes ultérieures de la synthèse.



Schéma 7: Stratégie de synthèse des indoles 48 et 49

Afin de pouvoir effectuer le couplage peptidique sur l'acide en position 5 (5-COOH), il est nécessaire de différencier les deux esters présents en positions 2 et 5. Nous avons donc choisi de préparer l'indole **54** (Schéma 7) pour lequel l'ester en position 2 serait un ester méthylique et l'ester en position 5 un ester benzylique. En effet, l'ester benzylique, facilement clivable par hydrogénation catalytique pourra ainsi être déprotégé sélectivement avant la réalisation du couplage peptidique. Il est donc nécessaire de préparer le l'aniline **53** et de former l'indole non plus avec l'acide oxobutyrique comme présenté précédemment mais avec l'ester méthylique correspondant. L'iodoaniline **53** sera préparée à partir de l'aniline commerciale **45**.

# 5.3.2 Synthèse de l'amine protégée pour le couplage peptidique

Pour pouvoir réaliser cette synthèse, il est nécessaire de réaliser la synthèse de l'éthanolamine protégée par un groupement benzyle **60** (Schéma 8) qui sera utilisée lors du couplage peptidique.

Il existe dans la littérature plusieurs façons de synthétiser celle-ci (Schéma 8). La première méthode<sup>118</sup> consiste en la protection de l'amine par un groupement Boc suivie de la benzylation<sup>119</sup> et enfin de la déprotection de l'amine<sup>120</sup> avec un rendement global de 33%. La deuxième méthode décrite dans la littérature<sup>121</sup> met en jeu la synthèse de Gabriel avec un rendement global de 39%,. Cette méthode consiste à protéger l'amine secondaire de l'éthanolamine par un phtalimide avant de réaliser la benzylation et la régénération de l'amine.



Schéma 8: Synthèse de l'éthanolamine protégée

Les deux méthodes décrites précédemment ont été testés pour préparer l'amine **60**. La première méthode, qui utilise une protection par un groupement Boc de l'amine, fournit le composé attendu avec un rendement global sur 3 étapes de 8%. La deuxième méthode utilisant la synthèse de Gabriel permet de générer l'amine **60** avec un rendement global de 49%. Celle-ci a ensuite été utilisée dans la synthèse des indoles **48** et **49**.



Schéma 9 : Synthèse de l'amine 60

### 5.3.3 Synthèse des indoles 48 et 49

Ayant synthétisé l'amine pour le couplage peptidique, nous allons nous intéresser à la synthèse des indoles **48** et **49**.

Le dérivé iodé **61** est obtenu par iodation en présence de diiode et de sulfate d'argent suivie d'une protection de la fonction amine par le dicarbonate de di-*tert*-butyle catalysé par le DMAP en présence de triethylamine à partir du 4-aminobenzoate d'éthyle avec un rendement de 85% sur deux étapes. L'ester éthylique est ensuite saponifié en présence de soude, puis l'acide obtenu est estérifié en présence d'alcool benzylique et de CDI avec un rendement de 95% sur deux étapes pour obtenir l'ester benzylique **62**. Ce dernier est ensuite déprotégé par de l'acide trifluoroacétique avec un rendement quantitatif pour obtenir l'aniline **53**.

Dans un premier temps, l'indole **54** est préparé à partir de l'aniline **53** selon la méthode décrite précédemment en utilisant l'oxobutanoate de méthyle. Malheureusement l'indole **54** est obtenu avec un très faible rendement dans ces conditions, une optimisation de cette étape a donc été nécessaire. Les meilleurs rendements ont été obtenus en réalisant, dans un premier temps, la synthèse de l'imine au reflux du toluène puis en effectuant la formation de l'indole par catalyse au diacetate de palladium. L'indole **54** est alors obtenu avec un rendement de 42%.

L'indole **50** est ensuite obtenu par *N*-alkylation en présence du 4-bromobutyrate d'éthyle et de carbonate de césium avec un rendement de 70%. L'ester benzylique **50** est déprotégé par catalyse par de l'hydroxyde de palladium sous une atmosphère d'hydrogène. L'acide ainsi obtenu, le couplage peptidique peut être réalisé. Deux agents de couplage ont été testés afin d'obtenir l'indole **63** : le CDI et l'EDC.HCl. Les essais avec le CDI n'ont jamais permis d'obtenir l'indole **63**, le produit de départ a toujours été retrouvé en RMN. L'essai avec EDC.HCl a, quant à lui, permis d'obtenir l'indole **63** avec un rendement de 65% sur deux étapes (déprotection de l'ester puis couplage).

Enfin l'indole **48** est obtenu par saponification de l'indole **63** avec LiOH dans du THF et une goutte d'eau avec un rendement de 61%. L'indole **49** est ; quant à lui ; obtenu par la déprotection de l'alcool catalysée à l'hydroxyde de palladium sous atmosphère d'hydrogène suivie de la saponification des esters en présence de LiOH dans du THF et une goutte d'eau avec un rendement de 27% sur ces deux dernières étapes.



#### Schéma 10: synthèse des indoles 48 et 49

L'indole **48** a été obtenu en 11 étapes à partir de l'aniline **45** avec un rendement global de 9% et l'indole **49** en 12 étapes avec un rendement de 4%. Nous avons donc développé une méthode de synthèse permettant d'obtenir les deux indoles **48** et **49**.

# 5.4 Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Dans cette partie, nous allons discuter des résultats obtenus en RMN HSQC (Annexe 5 et 6) pour les indoles **48** et **49**, et les comparer aux résultats obtenus précédemment.

Le spectre HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de la protéine en présence des indoles **48** (Figure 52, A) et **49** (Figure 52, B) montrent que l'indole **48** n'interagit que faiblement avec la protéine puisque très peu d'acides aminés sont perturbés. Le spectre de l'indole **49** montre que celui-ci interagit avec la protéine de manière significative puisque nous constatons la perturbation de plusieurs acides aminés comme les His 28 et His 71 ou encore l'Ile 29. Nous constatons également que l'indole **49** perturbe les acides aminés qui se situent plutôt sur le bas de la poche PDZ contrairement à l'indole **24**. Ces informations sont résumées dans le Tableau 6 où nous constatons que la somme des perturbations pour l'indole **48** ( $\Sigma\Delta\delta = 0.497$  ppm) est faible ce qui indique une faible interaction avec la protéine. La somme des différences des perturbations pour l'indole **49** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.033$  ppm) montre que celui-ci interagit avec le domaine PDZ1 de PSD-95 mais moins que l'indole **24** puisque la somme de **49** est inférieure à celle de **1** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.469$  ppm).



Figure 52: Superposition des spectres RMN HSQC de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (noir)/en présence de l'indole 48 (rouge), (B) seul (noir)/en présence de l'indole 49 (rouge) et (C) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

	Acide aminés perturbés							
Ligands	$GLGF + Feuillet \beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Hélice α <sub>2</sub>	Autres résidus perturbés	Perturbations			
2-9	résidus 15-21	résidus 22-34	résidus 71-80		ΣΔδ (ppm)			
5-HT2a	G17, F18, S19, I20,	G22, G23, T24,	H71, S72, A73,	A45, A46, O48	NC			
0 111 <b>2</b> 4	A21	D25, N26, H28	A77, L78, K79	1110, 1110, Q 10				
5-HT2c	G17, F18, S19, I20,	G22, G23, T24,	H71, S72, A73,	A45 A46 O48	NC			
0 11120	A21	D25, N26, H28	V75, A77, L78, K79	1110, 1110, Q10				
24	G15, G17, F18, S19	N26	A74, V75, E76, L78 R11, G12, I40, A45, A G82		2.469			
48	/	/	/	/	0.497			
49	49 S19, I20 H28, I29		H71, S72, V75, E76	E10, V69	2.033			

 Tableau 6: acides aminés perturbés pas les indoles 48 et 49

Une lecture détaillée du tableau montre que l'indole **48** ne perturbe aucun acide aminé de manière significative. L'indole **49**, quant à lui, présente des interactions plutôt avec le milieu et le bas de la poche PDZ au vu des acides aminés perturbés que ce soit sur le feuillet  $\beta_2$ , la boucle S1 ou l'hélice  $\alpha_2$  (Figure 53). Ceci est constaté avec la représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ-1 perturbés par l'indole **49**. Il semblerait donc que celui-ci se positionne plus bas dans la poche PDZ que l'indole **24** et que l'indole **43**.



Figure 53: Représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les indoles 24, 43 et 49.

En comparant les résultats des HSQC à de la modélisation moléculaire, nous constatons que les interactions identifiées lors du *docking* montrant que l'indole **49** interagit

vers le bas de la poche PDZ semble se confirmer en RMN. Cependant nous n'observons plus d'interactions avec le haut de la poche PDZ notamment avec la boucle GLGF.

L'indole **48**, quant à lui, ne montre pas d'interactions significative avec la protéine. Nous pouvons supposer que ceci est dû, comme l'a montré la modélisation, à un positonnemment diférent dans la poche, qui ne lui permet peut être pas de se lier à la protéine.

Nous avons décidé de poursuivre les tests sur l'indole **49**, notamment les tests en biologie *in vitro* pour voir si une molécule qui se place plutôt dans le bas de la poche peut inhiber l'interaction entre PSD-95 et le récepteur de la serotonine 5-HT<sub>2A</sub>. Nous souhaitons aussi vérifier l'hypothèse que nous avons avancée au début de ce chapitre, à savoir, si des ligands qui présentent des inertactions faibles avec le domaine 1 de PSD-95 peuvent être des inhibiteurs spécifques de l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>, interaction faible par apport aux autres ligands endogènes de PSD-95.

# 5.5 Evaluation *in vitro*

Les tests *in vitro* permettent d'évaluer la capacité des ligands préparés à inhiber l'interaction entre la protéine PSD-95 et l'extrémité C-terminale (décapeptide) du récepteur 5- $HT_{2A}$ . Ces tests ont été réalisés sur des extraits totaux de cerveau de souris. Pour ceci différentes concentrations du ligand sont incubés avec l'extrait de cerveaux, puis des billes d'agarose couplées par l'extrémité N-terminale du décapeptide sont ajoutées. Après centrifugation, la protéine non fixée avec le peptide et les ligands libres sont séparés de la protéine liée avec les billes. Les protéines fixées sont ensuite clivées puis séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Elles sont transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées en présence d'anticorps anti-PSD-95. Après rinçage, une deuxième incubation en présence d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire a lieu. L'anticorps secondaire étant lié à une peroxydase, l'ajout d'un réactif chimioluminescent permet de détecter les zones immunoréactives.

L'intensité des différentes bandes obtenues sur le gel après révélation du gel est fonction de la quantité de protéines fixées sur la résine *via* l'interaction avec le peptide. En conséquence plus l'intensité de la bande est faible, moins il y a de protéine liée à la résine, et plus le ligand inhibe l'interaction entre la protéine et le décapeptide donc plus il est efficace.



Figure 54: Gels de chromatographie d'affinité à différentes concentrations de 49



Figure 55: Pourcentage de PSD-95 PDZ1 recruté par 5-HT<sub>2A</sub> en l'abscence de l'indole 49

Les résultats obtenus montrent que l'indole **49** présente une affinité apparente avec PSD-95 meilleure que tous les indoles que nous avons testés par cette méthode antérieurement. Par contre, contrairement à l'indole **24**, il n'inhibe que partiellement l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>. Comme nous pouvons le constater sur la Figure 55, il présente une inhibition d'environ 20% à une concentration de  $10^{-3}$ M. Il serait probablement nécessaire de refaire le test avec l'indole **24** comme témoin afin de vérifier la validité des tests, compte tenu des résultats obtenus pour l'indole **49** par RMN.

# 5.6 Conclusion

Nous avons réalisé, dans ce chapitre, une étude d'optimisation à partir de l'indole 24, afin de développer des inhibiteurs sélectifs de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence les groupements nécessaires à l'interaction et conçu des molécules capables de se lier au site S1 du domaine 1 de PSD-95, domaine peu conservé d'une protéine à une autre. Nous avons notamment synthétisé deux indoles, dérivés de l'indole 24, dont l'un, le composé 49, présente une affinité apparente avec PSD-95 meilleure que toutes les molécules précédemment testées. Cependant cet indole n'inhibe pas totalement l'interaction avec 5-HT<sub>2A</sub>. Malgré ces résultats nous avons envisagé de réaliser des tests *in vivo* afin d'évaluer les propriétés anti-hyperalgiques de ces composés.

Afin de développer de nouveaux inhibiteurs possédant un squelette différent du noyau indole, nous avons envisagé d'utiliser la méthode du FBDD.

# CHAPITRE 4

# SOMMAIRE

1	Intro	oduction			
	1.1	Fragment-based drug design (FBDD)	123		
	1.2	Quelques exemples de la littérature	128		
	1.3	FBDD et Interaction Protéine- Protéine (IPP) – Stratégie de Déconstruction	131		
2	Déc	Déconstruction de l'indole 24 et synthèse des fragments			
	2.1	Déconstruction	133		
	2.2	Synthèse des fragments	135		
	2.2. 2.2. 2.2.	<ol> <li>Synthèse du fragment 87</li> <li>Synthèse des fragments pyrroles 89, 91</li> <li>Synthèse du fragment 92</li> </ol>	135 136 137		
3	Crit	lage des fragments 87-93 par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N	138		
	3.1	Evaluation des fragments seuls	138		
	3.2	Evaluation des couples de fragments	143		
	3.3	Conclusion	152		
4	Moo	lélisation Moléculaire	154		
	4.1	Molécules virtuellement conçues	154		
	4.2	Procédure de modélisation	155		
	4.3	Exploitation des résultats	156		
5	Syn	hèse des molécules 108 et 109	158		
	5.1	Bibliographie	158		
	5.1. 5.1.	1 Généralités sur les pyrroles 2 Synthèse multicomposant des pyrroles	158 159		
	5	1.2.1 A partir d'un alcyne	159		
	5	1.2.2 A partir de dérivés dicarbonylés.	162		
	5.1.	Acylation de Friedel Crafts			
	5.1. 5.1.	4 Autres methodes			
	5.1.	5 Synthèse des acides <b>158</b> et <b>159</b>			
	5.2	Approche retrosynthètique			
	5.3	Synthèse des molecules 108 et 109	170		
	5.3.	Préparation des acides 180 et 181	170		
	5.3.	2 Acylation de Friedel et Crafts			
	5.3.	5.3.3 Formation de la molécule finale <b>110</b>			
¢	J.J.	+ Formation des isomeres 100, 109 et 175	181		
0	Eva	luation par KMIN HSQC H- N			
/	Con	IUSION	186		

# **Chapitre 4: Déconstruction/Reconstruction**

# **1** Introduction

# 1.1 Fragment-based drug design (FBDD)

Le *fragment-based drug design* (conception de médicaments à partir de fragments) est une méthode qui se développe depuis une quinzaine d'années et qui est utilisée en recherche pharmaceutique afin de découvrir de nouvelles molécules chefs de fil (*lead*). Le principe de cette méthode est la construction de molécules qui pourraient agir comme ligands potentiels de protéines, à partir de fragments de bas poids moléculaire.<sup>122</sup> Pour pouvoir élaborer des ligands potentiels, il est nécessaire de pouvoir identifier des fragments qui se lieraient à la protéine cible. Dans le but de simplifier la séléction de ces fragments, il est conseillé d'adapter la « Rule of Five » de Lipinski<sup>123</sup> en la « Rule of Three ».<sup>124–126</sup> Ainsi un fragment doit répondre aux critères suivants :

- sa masse moléculaire doit êtreinférieure à 300 Da (MW < 300 Da),
- il possède au maximum trois groupes donneurs (HBD) et trois groupes accepteurs (HBA) de liaisons hydrogènes (HBD  $\leq$  3, HBA  $\leq$  3),
- son indice de lipophilie doit être inférieur ou égal à 3 (logP  $\leq$  3).

La stratégie à adopter pour réaliser une étude de FBDD se compose de 3 étapes clés qui sont : l'élaboration d'une chimiothèque/bibliothèque de petites molécules (fragments), le criblage de cette bibliothèque par une batterie de tests adaptés aux petites molécules afin d'identifier des fragments *hits* et enfin les cycles d'amélioration de ces fragments afin de construire des ligands potentiels pour la protéine cible. (Figure 56).



Figure 56: Etapes clés de l'appoche FBDD

La préparation de la bibliothèque de fragments est la première étape dans la mise en place de la technique du FBDD. Cette bibliothèque sera composée des fragments qui remplissent les conditions de la « *Rule of Three* » et qui possèdent des fonctions chimiques qui permettraient l'optimisation des fragments *hits* plus facilement. Parmi tous ces fragments, il est cependant nécessaire de retirer tous ceux qui présentent des fonctions instables, réactives vis-à-vis de la cible ou encore toxiques pour celle-ci, comme les groupements alkylant ou alcylant.<sup>127</sup> Il a été montré qu'il était possible de contourner la toxicité de certains groupements en les remplacements par leurs bioisostères.<sup>128</sup> De plus, les bioisostères peuvent apporter d'autres bénéfices à la molécule comme permettre d'améliorer sa perméabilité ou encore de réduire son métabolisme.

L'étape suivante correspond au criblage de cette bibliothèque par différentes techniques adaptées aux molécules de bas poids moléculaire. Ces techniques sont nécessaires car, comme plusieurs études le montrent, les fragments possèdent des affinités plutôt faibles avec la protéine cible qui sont de l'ordre de 0,1 à 10 mM.<sup>129</sup> Parmi ces différentes techniques on peut citer :

• La *Fluorescence-Based Thermal Shift* (TS). Le principe de cette technique est la mesure de la différence de température  $(\Delta T_m)^{130}$  de non repliement de la protéine avec ou sans fragment. La température de non repliement correspond à la température à partir de laquelle la protéine ne possède plus une structure biologique fonctionnelle. L'analyse de cette différence se fait par mesure de la fluorescence d'un colorant exogène au milieu d'étude. Ce colorant ne possède pas de propriétés de fluorescence lorsqu'il se trouve en milieu aqueux, par contre il

est capable de se lier à des sites hydrophobes, ce qui lui confère alors des propriétés de fluorescence. Lors de dépliement de la molécule, un pic de fluorescence est donc observé. En effet, le colorant qui était en milieux aqueux va pouvoir se lier aux sites hydrophobes, non disponible dans l'état fonctionnel de la protéine, et donc fluorescer. Dans le cas du FBDD, les différences de températures seront assez faibles car les fragments qui sont de petites tailles induisent des interactions de faible intensité.

• La spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN). Le criblage le plus rapide en RMN est le criblage par RMN <sup>1</sup>H. Les différentes analyses qui peuvent être réalisées sont Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG),<sup>131</sup> Saturation Transfer Difference (STD)<sup>132</sup> ou encore water-ligand observed *via* gradient spectroscopy (waterLOGSY).<sup>133</sup> En analyse CPMG, une diminution de l'intensité du signal en proton du fragment est observée lorsqu'il présente une interaction avec la protéine cible. Pour les deux autres analyses, l'analyse va être réalisée par irradiation, soit de la protéine (STD), soit des molécules d'eau (waterLOGSY) qui va ensuite entrainer un transfert de l'aimantation au fragment via le complexe fragment/protéine. Dans toutes ces analyses, l'identification de la présence d'une interaction entre le fragment et la protéine est facilement identifiable sur le spectre. Il est même possible d'obtenir des informations sur le site d'interaction des fragments ou encore leur affinité en les mettant en compétition avec un ligand connu de la protéine cible. D'autres analyses plus longues peuvent être réalisées en RMN, ce sont les analyses RMN en deux dimensions (RMN 2D). Celles-ci peuvent être utilisées soit pour réaliser un criblage de fragment, soit pour valider des fragments qui auraient donnés de bons résultats dans d'autres analyses. Les plus courantes sont les RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, c'est-à-dire que seront mesurés les perturbations des acides aminés de la protéine par superposition des spectres HSQC de la protéine marquée à l'azote 15 (<sup>15</sup>N) avec et sans le fragment. La RMN HSOC apporte plus d'informations sur la localisation et la caractérisation du site d'interaction du fragment mais nécessite une plus grande quantité de protéine et une analyse plus longue.

• La diffraction des rayons X (DRX)<sup>134</sup> est une technique de criblage qui permet d'obtenir en une seule analyse des informations structurales sur le site d'interaction ainsi que la validation de fragments *hits*. Pour réaliser l'analyse, les cristaux de protéines sont imprégnés avec une forte concentration de fragments. Pour que les résultats soient exploitables, il faut que la résolution de la diffraction des rayons X seule soit robuste pour

éviter de perdre en cristallinité lors de la mise en interaction avec les fragments par un changement de conformation trop important.

• Surface plasmon resonance (SPR).<sup>135</sup> Le principe de cette analyse est de mesurer le temps de réponse d'association/dissociation entre la protéine et les différents fragments, qui donneront la cinétique de liaison et permettra de déterminer les constantes d'affinité. Pour réaliser l'analyse, la protéine est liée de façon covalente sur la surface en or des biocapteurs de la SPR puis des solutions de fragments sont passées par-dessus. Les biocapteurs mesurent en temps réel la masse des biocapteurs qui va augmenter lorsqu'il y aura une interaction entre la protéine et le fragment. La SPR permet la détection de fragments de bas poids moléculaire allant jusqu'à 100 Da et nécessite peu de protéine (25-50  $\mu$ g) car celle-ci est immobilisée. Un autre avantage est la possibilité de réaliser un criblage d'une bibliothèque en quelques semaine seulement ainsi que de réaliser des études de compétition avec un ligand connu.

• La modélisation moléculaire<sup>136</sup> est une technique qui peut être utilisé de deux façons, soit pour produire en 3D le site d'interaction d'un fragment qui aura été validé par d'autres techniques en l'absence d'informations structurales, soit comme une technique de criblage pour identifier des ligands. Pour le criblage des fragments, la modélisation moléculaire peut simuler sur le mode d'interaction des fragments avec la protéine. Elle permet également d'évaluer l'énergie d'échange du fragment dans le milieu solvaté (score), pour ce calcul il faut prendre en compte la conformation du ligand, la désolvatation, les interactions avec l'eau ainsi que les changements de conformation de la protéine. Cette analyse est la moins performante à cette étape du FBDD car les fragments sont trop petits pour donner suffisamment d'informations, cependant c'est une des techniques largement utiliseé dans la conception des futurs candidats médicaments.

A la fin du criblage des bibliothèques de fragments par une ou plusieurs des techniques énoncées ci-dessus, des fragments appelés « *hits* » sont mis en évidence. Ces fragments seront utilisés dans la suite du principe du *fragment-based drug design* qui est le cycle d'amélioration des fragments *hits* afin d'obtenir un ligand qui pourrait être un candidat-médicament. Dans ce processus d'amélioration, la structure des fragments sera améliorée afin d'augmenter l'affinité des fragments avec la protéine cible grâce à l'utilisation de « *rational design* » et de la synthèse en utilisant les données structurales et les mesures d'affinité obtenues précédemment.

Pour optimiser l'affinité des fragments *hits* pour la protéine cible, il existe trois stratégies qui peuvent être mis en place, la fusion, la liaison ou l'accroissement de la taille des fragments.

L'amélioration du fragment par la fusion de fragments se fait en fusionnant des portions de fragments qui possèdent une zone d'interaction similaire ce qui conduit à une superposition partielle ou totale des fragments entre eux. Cette fusion prend en compte les informations structurales obtenues grâce aux fragments et aux ligands qui forment un complexe avec la protéine cible.

Une autre amélioration est la liaison de deux fragments. Pour réaliser cela il faut que les deux fragments qui doivent être liés interagissent avec la protéine dans deux sites qui ne se superposent pas. La liaison entre les deux fragments doit être faite de la meilleure façon possible. En effet, l'orientation des fragments dans la protéine cible est connue, il faut donc au maximum conserver les interactions au moment du « couplage » des deux fragments, c'est pourquoi le choix du *linker* est important. Le *linker* idéal va être capable de conserver les interactions établies par les fragments seuls.

Enfin, l'amélioration peut se faire par augmentation de la taille du fragment lorsque dans un groupe les fragments intéressants interagissent tous avec le même site de la protéine. Cette amélioration est un processus itératif, à chaque étape du processus des fragments sont additionnés au fragment afin d'améliorer son potentiel et ses propriétés pharmacologiques. Les informations sont obtenues à chaque étape par diffraction des rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces informations permettent aussi de guider l'addition ou la modification d'un groupe dans le but de toujours améliorer l'affinité du fragment avec la protéine. Un autre but est la conservation pour chaque étape d'amélioration de l'interaction entre le fragment de départ et la protéine.

Toutes ces techniques d'amélioration ont pour but d'obtenir un ligand potentiel optimisé qui possède une bonne affinité pour la protéine afin d'en faire un candidat-médicament. (Figure 57)



Figure 57: Principe du *FBDD* 

# **1.2** Quelques exemples de la littérature

Dans ce paragraphe quelques exemples d'inhibiteurs issus de la stratégie du FBDD seront présentés.

Le premier exemple qui va être présenté correspond à l'une des premières molécules issue de cette stratégie approuvée par la Food and Drug Administration (FDA).<sup>137,138</sup> Il a été rapporté que le gène codant pour la protéine kinase BRAF était muté (V600E) chez les patients atteints de mélanome malin.<sup>139</sup> De nombreux groupes se sont alors intéressés à ce sujet dont le groupe de G. Bollag qui a opté pour la stratégie du FBDD pour la recherche d'inhibiteurs de cette protéine. Ainsi une bibliothèque composée de plus de 20000 fragments dont les masses moléculaires sont comprises entre 150 et 300 Da sont criblés par co-cristallisation en DRX avec plusieurs kinases (BRAF, Pim1, p38, CSK, ...) dont les structures sont connues afin de trouver des *scaffolds* intéressants. De ce criblage, 238 fragments inhibant d'au moins 30% l'activité des kinases Pim1, p38 et CSK ont été mis en évidence. D'autres analyses DRX ont montré que le motif 7-azaindole (Figure 58, **64**) se liait avec le site d'interaction des kinases (IC<sub>50</sub> > 200 µM pour Pim1). A partir de ces données des études d'amélioration ont été réalisées et ont permis de synthétiser des 7-azaindole

monosubstitués (Figure 58, **65**) avec de meilleures affinités (IC<sub>50</sub>  $\approx$  100 µM pour Pim1). Ces résultats ont montré que la création de deux liaisons hydrogènes permettait d'améliorer l'affinité des molécules pour les kinases. Cette stratégie a conduit à la synthèse du composé **66** présentant une bonne affinité pour les kinases (IC<sub>50</sub> = 1.9 µM pour FGFR1). L'optimisation du composé **66** a conduit à la préparation de l'azaindole **67** qui inhibe la kinase BRAF (V600E) avec un IC<sub>50</sub> de 13 nM soit dix fois plus que la kinase BRAF ne présentant pas la mutation. Cette molécule présente aussi une sélectivité remarquable vis-à-vis de 70 kinases.<sup>104,137</sup>



Figure 58: Amélioration d'un inhibiteur de kinases

La stratégie du FBDD a été également appliquée à la découverte d'inhibiteur de la protéine Hsp90 (Heat Shock Protein 90). Cette protéine a un rôle de stabilisateur et d'activateur de nombreuses autres protéines,<sup>140</sup> toutefois il a été montré que celle-ci facilite la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Un inhibiteur de cette protéine avec une bonne affinité ( $K_d = 1.2 \ \mu M$ ) a été découvert, la geldanamycin 71.<sup>141</sup> Cependant des problèmes d'hépatotoxicité et de stabilité métabolique ont été détectés. Des études ont donc été menées pour découvrir de nouveaux inhibiteurs en tenant au maximum compte des règles ADMET (absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité).<sup>15-17</sup> Une équipe de chez Abott Laboratories<sup>144</sup> a criblé une bibliothèque de 11520 fragments par RMN HSQC avec l'extrémité N-terminale de Hsp90 ce qui a permis l'identification de trois fragments (68, 69 et 70) avec des affinités entre 10 µM et 250 µM. Ces résultats couplés à une analyse par DRX a permis la découverte de trois séries de molécules dont la molécule 73 qui possède un K<sub>d</sub> de 60 nM. Deux autres études ont également été conduites pour développer des inibiteurs de cette protéine. La première a été réalisée par Vernalis grâce à un criblage par RMN et in silico qui a conduit, après amélioration des fragments hits, à l'obtention de la molécule 72 qui possède un  $IC_{50}$  de 58 nM.<sup>132</sup> Une équipe chez Astex Therapeutics a réalisé la deuxième étude par criblage par RMN et DRX qui a conduit à a découverte d'un composé aromatique

l'étamivan **74** ( $K_d = 0.79$  mM) actuellement sur le marché comme médicament contre les problèmes respiratoire. L'amélioration du fragment étamivan a conduit à l'obtention de la molécule **75** avec une excellente affinité ( $K_d = 0.5$  nM).<sup>142,143</sup>



Figure 59: Molécules issues du fragment based inhibitrices de Hsp90

# **1.3 FBDD et Interaction Protéine- Protéine (IPP) – Stratégie de Déconstruction**

Les interactions protéine-protéine (IPP) sont des cibles thérapeutiques intéressantes, il est cependant difficile de trouver de bons inhibiteurs de synthèse de ces interactions au vu de leurs propriétés qui les distinguent des autres cibles thérapeutiques. En effet, le site d'interactions des IPP est plus grand et plutôt « plat » par rapport à ceux impliquant des interactions entre une molécule et une protéine, de plus le site d'interaction présente une structure 3D plus complexe avec la présence de poche hydrophobe et d'interactions via des molécules d'eau.<sup>145,146</sup> Le FBDD est une stratégie de plus en plus utilisée dans la découverte de nouveaux inhibiteurs. Cependant, au vu des différences entre les IPP et les autres interactions, il est essentiel de savoir si cette stratégie est applicable aux IPP. Des études de fragment based ont déjà été réalisées sur des cibles IPP, cependant il n'a pas été fait de comparaison des fragments hits obtenus pour les IPP avec ceux obtenus pour les autres types d'interactions.<sup>147</sup> Une autre stratégie applicable serait de déconstruire des molécules efficaces comme inhibiteur d'IPP en plus petites molécules (fragments) et de déterminer leurs capacités d'interaction avec la protéine d'intérêt.

Cette stratégie a été appliquée par l'équipe de Fry qui a déconstruit un inhibiteur d'IPP appartenant à la famille des nutlin, le composé **76** (Figure 60).<sup>148</sup> Cette molécule est un inhibiteur de l'interaction entre la protéine MDM2 et le facteur p53, ce qui permet de restaurer l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans cette étude, le composé **76** a été déconstruit systématiquement en dix fragments (Figure 60). Ils ont ensuite été synthétisés et criblés en RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, SPR et DRX afin de déterminer leur capacité à inhiber l'interaction entre les deux protéines. L'autre but de cette étude était de regarder si les propriétés des fragments pour une étude de FBDD dans le cadre des IPP pouvaient être les mêmes que pour les autres systèmes d'interaction.



Figure 60: Déconstruction de la molécule 76

Molécules	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
MW (Da)	727.78	70.09	112.56	246.35	305.2	236.31	356.89	478.65	489.48	565.56	554.75
Interaction RMN	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
Analyse SPR (Kd, µM)	0.22	Non	Non	Non	26	Non	Non	Non	20	14	1000

 Tableau 7: Résultat déconstruction nutlin 76

Les résultats du criblage par RMN (Tableau 7) ont montré que certains composés interagissaient avec la protéine, le plus petit fragment qui interagit à une masse molaire de 305.2 Da. La SPR qui a été réalisée montre qu'il est également possible d'obtenir des constantes de dissociation ( $K_d$ ) pour les fragments qui interagissent en RMN. L'équipe de Fry, a conclu que la molécule **76** aurait pu être découverte par la stratégie du FBDD avec l'utilisation d'une bibliothèque composée de fragments dont la masse molaire est supérieure à 300 Da.

La stratégie du FBDD semble donc applicable aux IPP. D'autres exemples de la littérature font aussi état de cette possibilité.<sup>147,149</sup>

# 2 Déconstruction de l'indole 24 et synthèse des fragments

Nous venons de voir qu'il était possible d'appliquer la stratégie du FBDD aux IPP.<sup>148</sup> Au moment où nous avons démarré ces travaux, nous n'avions pas trouvé dans la littérature d'exemple de FBDD appliquée aux protéines PDZ. Nous avons donc décidé, dans un premier temps, de réaliser une déconstruction de l'indole **24**, qui est un inhibiteur connu de l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>.<sup>100</sup> En effet, nous souhaitons appliquer la stratégie utilisée par l'équipe de Fry afin de déterminer s'il est possible d'appliquer cette stratégie aux protéines à domaines PDZ et plus particulièrement à la protéine qui nous intéresse PSD-95.

#### 2.1 Déconstruction

Nous avons envisagé de déconstruire l'indole **24** de façon à ce que chaque fragment possède au moins un groupement fonctionnel capable d'interagir avec la protéine. Pour que cette stratégie soit efficace nous avons également choisi des fragments qui soient commerciaux ou pour lesquels la synthèse serait relativement courte (3/4 étapes).



Figure 61: Formule chimique de l'indole 24



Figure 62: Structure de 24 avec PDZ1/PSD-95 déterminé par RMN noesy

La déconstruction de l'indole 24 a conduit à l'obtention de sept fragments (Figure 63). L'indole 24 a d'abord été coupé en deux : le benzène disubstitué 87 et le pyrrole trisubstitué 91 D'après la Figure 62, le groupement benzyle de l'indole 24 vient se positionner dans la poche hydrophobe et faire une interaction de type  $\pi$ -stacking (Van der Waals) avec la phénylalanine (F18) au fond dans cette poche. Le fragment 87 nous donc semblé être un fragment pertinent de cette déconstruction. La déconstruction du fragment 87 conduit au fragment 88 afin de vérifier l'influence du groupement benzyle. Le pyrrole 91, quant à lui, subit deux déconstructions successives pour donner le pyrrole disubstitué 89 et le monosubstitué 90. A partir du fragment 91, il serait également pertinent de s'affranchir du noyau aromatique et de ne garder que les substituants, comme l'amine tertiaire 92 ou même l'amine dimethylée 93, ceci afin de se défaire de l'aromaticité et donc d'éventuelles interactions de type Van der Waals.



Figure 63: Déconstruction indole 24

# 2.2 Synthèse des fragments

L'indole a donc été déconstruit en sept fragments (Figure 63). Les fragments **88**, **90**, **93** sont des produits commerciaux. Les fragments **87**, **89**, **91**, **92** ont dû être synthétisés.

#### 2.2.1 Synthèse du fragment 87

La synthèse du fragment **87** a été réalisée à partir de l'acide salicylique commercial **88** en 2 étapes. Ce dernier réagit avec le bromure de benzyle pour obtenir le produit dibenzylé **92** puis une saponification a permis d'obtenir le fragment **87** avec un rendement de 76% sur 2 étapes.<sup>150</sup>



Schéma 11: Synthèse du fragment 87

#### 2.2.2 Synthèse des fragments pyrroles 89, 91

Le pyrrole **89** (Schéma 12) est obtenu à partir de la glycine en utilisant une méthode décrite dans la littérature.<sup>151</sup> L'estérification de la glycine **95** en présence de chlorure de thionyle permet d'obtenir l'ester **96** avec un rendement quantitatif. L'amine **96** est protégée par un groupement tosyle avec un rendement de 77%. Une réaction de Michael avec la méthylvinylcétone, suivie d'une cyclisation, conduit à la pyrrolidine **98** avec un rendement de 85%. Cette dernière est déshydratée puis l'azote est déprotégé pour obtenir le pyrrole **99** avec un rendement de 63%. Enfin la saponification du pyrrole **99** en présence d'hydroxyde de potassium permet d'obtenir le pyrrole **89** avec un rendement de 67%.

Le pyrrole **89** est donc obtenu à partir de la glycine en 6 étapes avec un rendement global de 28%.



#### Schéma 12: synthèse du pyrrole 89

La synthèse du pyrrole **91** est identique à celle du fragment **89** jusqu'au pyrrole **99**. Ensuite une *N*-alkylation en présence du 4-bromobutyrate d'éthyle est réalisée avec un

rendement de 69%, suivie d'une saponification en présence d'hydroxyde de potassium pour obtenir le pyrrole **91** avec un rendement de 67%. Le pyrrole **91** (Schéma 13) est obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 19%, à partir de la glycine.



91: 19% sur 7 étapes

Schéma 13: Synthèse du pyrrole 91 à partir du pyrrole 99.

#### 2.2.3 Synthèse du fragment 92

La première étape de la synthèse de l'amine **92** consiste en l'estérification de la *N*méthylalanine en présence de chlorure de thionyle avec un rendement quantitatif, suivie d'une *N*-alkylation en présence du 3-bromobutyrate d'éthyle qui permet de générer le composé **103** avec un rendement de 30%. Enfin une saponification en présence d'hydroxyde de potassium conduit au chlorhydrate de l'amine **92** avec un rendement quantitatif. Le fragment **92** (Schéma 14) est obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 30%, à partir de la *N*méthylalanine.





# 3 Criblage des fragments 87-93 par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Les sept fragments (87 – 93) ont été criblés par RMN pour déterminer leur capacité à interagir avec le domaine PDZ1 de la protéine PSD-95. Dans un premier temps, nous enregistrons un spectre RMN ( $^{1}H-^{15}N$  HSQC) de la protéine marqué à l'azote 15 seule qui nous servira de référence pour la suite de l'étude (Figure 26). Ensuite, nous réalisons les différents spectres RMN en présence des fragments que nous superposons au spectre de référence (protéine seule), pour identifier les acides aminés de la protéine perturbés par chacun des fragments.

L'étude des fragments a été réalisée en deux temps. Dans un premier temps les 7 fragments ont été testés un par un en présence du domaine PDZ1 de PSD-95 (1 équivalent de protéine marquée et 20 équivalents de fragment). Dans un deuxième temps, des couples de fragments A et B ont été testés (1 équivalent de protéine, 20 équivalents du fragment A et 20 équivalents du fragment B) de manière systématique, soient 21 couples de fragments.

### 3.1 Evaluation des fragments seuls

Lors d'une mission à Liverpool, j'ai pu réaliser l'enregistrement des spectres RMN des fragments.

Dans cette partie, nous allons discuter les données RMN obtenues en présence d'un seul fragment en les comparants aux données obtenues en présence de deux ligands naturels de PSD-95 (5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>) et de l'indole **24** duquel sont issus les fragments. L'analyse des HSQC (Annexe 7 à 13) va nous donner des informations sur la capacité d'interaction des fragments avec le domaine PDZ1 de PSD-95. En effet, à partir de ces HSQC, nous avons extrait des données présentées dans le tableau récapitulatif ci-dessous (Tableau 8). Dans celuici se trouvent les différents acides aminés perturbés en fonction de leur position sur la protéine ainsi que la somme globale des perturbations pour chaque fragment. Les acides aminés indiqués dans le tableau ci-dessous possèdent une différence de déplacement chimique supérieure ou égale à 0.08 ppm. Comme précédemment, les perturbations  $\Delta\delta$  sont calculés à l'aide de la formule suivante  $\Delta\delta = \{(\Delta H)^2 + (0.15\Delta N)^2\}^{1/2}$ , où  $\Delta H$  et  $\Delta N$  sont respectivement le déplacement chimique de l'hydrogène et de l'azote de la protéine.

En comparant plusieurs HSQC (Figure 64), nous constatons que tous les fragments n'interagissent pas de la même façon avec le domaine PDZ1 de PSD-95. En effet, le fragment 92 ne perturbe pas les acides aminés de la protéine (Figure 64, A) contrairement aux fragments 88 (Figure 64, B) et 91 (Figure 64, C) qui déplacent plusieurs acides aminés de manière significative. Cette tendance se retrouve dans le Tableau 8 puisque les sommes des perturbations pour les fragments 88 ( $\Sigma\Delta\delta = 1.785$  ppm) et 91 ( $\Sigma\Delta\delta = 1.421$  ppm) sont plus importantes que celle du fragment 92 ( $\Sigma\Delta\delta = 0.368$  ppm). Ces résultats montrent qu'en survolant le Tableau 8, seul le fragment 92 ne perturbe pas la protéine de manière significative, les autres fragments (87-91, 93) perturbent la protéine ce qui suppose une interaction entre le domaine PDZ1 de PSD-95 et ces fragments. Les constats qui peuvent être faits à partir de ce tableau sont qu'aucun des fragments ne perturbe la protéine plus que l'indole 24 et que la boucle S1 est perturbée par tous les fragments (sauf le 92). Deux groupes ont donc été formés, un où les fragments interagissent avec la protéine (87 - 91 et 93), et un autre composé du fragment 92 qui n'interagit pas avec la protéine.



Figure 64: Superposition des spectres RMN de 24, 88, 91 et 92 avec celui de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence du fragment 92 (rouge), (B) seul (bleu)/en présence du fragment 88 (rouge), (C) seul (bleu)/en présence du fragment 91 (rouge) et (D) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

		Somme des			
Ligands	$GLGF + Feuillet \beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Hélice $\alpha_2$	Autres résidus	perturbations
	résidus 15-21	résidus 22-34	résidus 71-80	perturbés	ΣΔδ (ppm)
5-HT2a	C17 F18 S10 I20 A21	G22, G23, T24,	H71, S72, A73, A77,	A 15 A 16 O 18	NC
	G17, F10, 517, 120, A21	D25, N26, H28	L78, K79	A+3, A+0, Q+0	NC
5-HT2c	C17 F18 S10 I20 A21	G22, G23, T24,	H71, S72, A73, V75,	A 15 A 16 O 18	NC
	G17, F10, 517, 120, A21	D25, N26, H28	A77, L78, K79	A+3, A+0, Q+0	NC
24	G15, G17, F18, S19,	N26	A74, V75, E7, L78	R11, G12, I40, A45, A46, G82	2.469
87	G17	H28, I29	K79	/	1.209
88	S19	H28, I29	H71, K79	L87	1.785
89	G17, F18	H28, I29	K79	/	1.550
90	/	H28, I29	H71, S72	L87	1.662
91	/	H28, I29	H71, S72	L87	1.421
92	/	/	/	/	0.368
93	/	H28, I29	H71, S72	L87	1.422

Tableau 8: Résultats de l'analyse des spectres HSQC pour chaque fragment

Une analyse approfondie des données obtenues à partir des HSQC pour les fragments qui perturbent la protéine, montre que les His 28 et His 71 présentes sur la boucle S1 et sur l'hélice  $\alpha_2$  ainsi que la serine Ser 19 présente sur le feuillet  $\beta_2$  sont perturbés par l'acide salicylique **88**, ce qui montre plutôt un placement au milieu de la poche PDZ (Figure 65, B). Les acides aminés perturbés par les fragments **87** et **89** se situent sur la boucle GLGF (Gly 17, Phe 18) et sur le haut de l'hélice  $\alpha_2$  (Leu 87), ce qui suppose un positionnement dans le haut du site S0 (Figure 65, A, C). Pour les fragments **90, 91, 93** les acides aminés perturbés de manière significative se situent sur la boucle S1 (His 28, Ile 29) et sur le bas de l'hélice  $\alpha$  (His 71, Ser 72) ce qui correspondrait plus à une interaction des différents fragments avec le bas de la poche PDZ (Figure 65, D - F). Nous pouvons également voir que ces fragments ne perturbent pas les mêmes acides aminés que l'indole **24.** En effet, cet indole se place dans le haut de la poche PDZ et déplace donc fortement les acides aminés de la boucle GLGF (Gly 15, Gly 17 et Phe 18) et le milieu de l'hélice  $\alpha_2$  (Val 75, Leu 78).

A partir de ces données il est possible de former, parmi les fragments qui interagissant avec le domaine PDZ1 de PSD-95, deux sous-groupes : les fragments **87, 88, 89** qui perturbent plutôt le haut de la poche PDZ (boucle GLGF et fin de l'hélice  $\alpha_2$ ) et les fragments **90, 91, 93** qui perturbent plutôt le bas de la poche (fin du feuillet  $\beta_2$  et début de l'hélice  $\alpha_2$ ). La visualisation des sites d'interaction est facilitée par la représentation en 3D des acides aminés perturbés par les différents fragments. (Figure 65).

Ces résultats montrent, comme nous pouvions nous y attendre, que la somme des perturbations des déplacements chimiques calculées ( $\Sigma\Delta\delta < 1.8$  ppm) pour les différents fragments est inférieure à celle trouvées pour l'indole **24** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.469$  ppm). En effet les fragments présentent moins d'interactions que l'indole **24**, compte tenu de leur plus petite « taille » ce qui entraine aussi une diminution du nombre de groupes fonctionnels sur les fragments et par conséquent réduit le nombre d'interaction avec la protéine.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de poursuivre l'étude en réalisant un criblage, pour lequel les différents fragments seraient testés par paire de manière systématique. En effet, nous avons supposé que certains fragments pourraient avoir un « effet additif » puisqu'ils semblent interagir soit avec le haut de la protéine soit avec le bas de celleci. Il semble également intéressant d'étudier les interactions entre le domaine PDZ1 de PSD-95 et les couples formés par des fragments n'interagissant pas avec la même zone de la protéine c'est-à-dire des couples comme **87/90**, **87/91** ou encore **87/93**.



Figure 65: Représentation 3D du domaine PDZ de PSD-95 avec les acides aminés perturbés par les fragments , (A) 87, (B) 88, (C) 89, (D) 90, (E) 91, (F) 93.

#### **3.2** Evaluation des couples de fragments

Dans cette partie, nous allons interpréter les spectres RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N (Annexe 14 à 34) enregistrés en présence des couples de fragments (Figure 67) et les comparer aux spectres enregistrés en présence de deux ligands naturels de PSD-95 (5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>), de l'indole **24** duquel sont issus les fragments et bien des fragments individuels.

Démarche. En examinant les spectres RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N des domaines PDZ1 de la protéine PSD-95 en présence des couples de fragments, notre attention s'est portée sur le acides aminés perturbés ( $\Delta\delta > 0,08$  ppm). Les zones d'intérêt (Figure 66) sont celles impliquées dans l'interaction de la protéine avec son ligand, c'est-à-dire la boucle GLGF avec le feuillet  $\beta_2$  et l'hélice  $\alpha_2$  qui délimitent le site S0, ainsi que le site S1 qui correspond à la boucle les feuillets  $\beta_2$  et β3. Suite à cette entre analyse qualitative Tableau 10), nous avons calculé la somme globale des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ), afin de comparer de façon quantitative l'interaction des fragments (Tableau 4) et des ligands connus (5-HT<sub>2C</sub>, 5- $HT_{2A}$ , indole 1).



Figure 66: Structure 3D de PDZ1 de PSD-95 avec quelques acides aminés important
*Interprétation des HSQC*. Les spectres HSQC (En annexe 14 à 34) montrent que la capacité des couples de fragments à interagir avec le domaine PDZ1 de PSD-95 est assez disparate (Tableau 9). En comparant les HSQC (Figure 67), nous constatons que certaines paires, comme par exemple le couple **87/92** (Figure 67 C), perturbent très peu les acides aminés de la protéine. Par contre d'autres paires, tels que les couples **88/93** (Figure 67 A) et **87/89** (Figure 67 B), perturbent la protéine de manière significative.

En regardant plus finement le spectre HSQC relatif au couple 87/92 (Figure 67 C), nous observons la perturbation de l'His 28 présente sur la boucle S1 ainsi que la Gly 17 présente sur la boucle GLGF (Tableau 10). Toutefois, ce couple perturbe moins la protéine que le fragment 87 seul, ce qui confirme que le fragment 92 n'interagit pas avec la protéine. Le couple de fragments 88/93 (Figure 67, A) perturbe de manière significative la quasitotalité des acides aminés de la poche PDZ ( Tableau 10) qui comprend la boucle GLGF (Phe 18), le feuillet  $\beta_2$  (Ser 19, Ile 20), la boucle S1 (Gly 23, Thr 24, His 28, Ile 29, Asp 31) et l'hélice  $\alpha_2$  (His 71 à Glu 80), mais également une vingtaine d'acides aminés qui se situent derrière la poche PDZ. Ces résultats indiquent clairement que les fragments 88 et 93 interagissent ensemble avec le domaine PDZ1 de PSD-95 par rapport aux effets du fragment 88 qui interagit avec le haut de la poche PDZ (boucle GLGF, fin de l'hélice  $\alpha_2$ ) et du fragment 93 qui semble plutôt interagir avec le bas de la poche (fin du feuillet  $\beta_2$  et début de l'hélice  $\alpha_2$ ). Quant au couple **87/89** (Figure 67 B), il perturbe également de manière significative les acides aminés de la poche PDZ : boucle GLGF (Gly 17), le feuillet  $\beta_2$  (Ile 20), la boucle S1 (Gly 23, His 28, Ile 29) et l'hélice  $\alpha_2$  (His 71, Ser 72, Val 75, His 79), et deux acides aminés situés derrière la poche PDZ, suggérant qu'ils interagissent simultanément plutôt que séparément avec la protéine puisque ces deux fragments 87 et 89 seuls perturbent les mêmes acides aminés (Tableau 8, Tableau 10). En comparant avec l'indole 24 (Figure 67, D) qui se place dans le haut de la poche PDZ en déplaçant fortement les acides aminés de la boucle GLGF (Gly 15, Gly 17, Phe 18) et le milieu de l'hélice  $\alpha_2$  (Ala 74, Val 75, Leu 78), nous constatons que certains couples de fragments perturbent la protéine de manière plus significative que l'indole 24 et qu'ils semblent se placer dans la totalité de la poche PDZ, de la même façon que le ligand naturel 5- $HT_{2A}$ .

Suiteàcetteanalysequalitative(Tableau 10), nous avons calculé la somme globale des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ), afin de comparer

de façon quantitative l'interaction des fragments (Tableau 4) et des ligands connus (5- $HT_{2C}$ , 5- $HT_{2A}$ , indole **24**).



Figure 67: Superposition des spectres RMN de 24, 88/93, 87/89, 87/92 avec celui de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence du couple 88/93 (rouge), (B) seul (bleu)/en présence du couple 87/89 (rouge), (C) seul (bleu)/en présence du couple 87/92 (rouge) et (D) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

Fragment B Fragment A	87	88	89	90	91	92	93
87		++	+	+	+	-	+
88			++	++	++	-	++
89				+	+	-	+
90					+	-	+
91						-	+
92							-
93							

Tableau 9: Capacité des couples de fragments à perturber les acides aminés du domaine PDZ1 de PSD-95

Chapter	Chapitre 4	:	Fragment-based	drug	design
---------	------------	---	----------------	------	--------

	Acide aminés perturbés Somme des					
<b>.</b>	<b>GLGF</b> + Feuillet $\beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Hélice α <sub>2</sub>		perturbations	
Ligands	résidus 15-21	résidus 22-34	résidus 71-80 Autres résidus perturbés		ΣΔδ (ppm)	
5-HT2a	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	NC	
5-HT2c	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, V75, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	NC	
24	G15, G17, F18, S19,	N26	A74, V75, E7, L78	R11, G12, I40, A45, A46, G82	2.469	
87/88	G17, S19, I20	G23, H28, I29, D31	H71, S72, A73, V75, E76, L78, K79, E80	I7, T8, E10, G12, L52, E68, V69, R86, L87, M90, R91, R92	2.989	
87/89	G17, I20	G23, H28, I29	H71, S72, V75, K79	V69, L87	2.118	
87/90	G17, I20	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76, K79	T8, E10, V69, R86, L87, V89, M90, R91, R92	2.479	
87/91	G17	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76	T8, E10, V69, L87, M90, R91, R92	2.309	
87/92	G17	H28	/	1	0.829	
87/93	G17	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76	T8, E10, V69, L87, V89, M90, R91, R92	2.435	
88/89	G17, F18, S19, I20	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76, L78, K79	T8, E10, G12, V54, V69, L87, M90, R91, R92	2.698	
88/90	S19, I20	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76, L78, K89, E80	I7, T8, E10, G12, E68, V69, R86, L87, V89, M90, R91, R92	2.666	
88/91	F18, S19, I20	G23, H28, I29, D31	H71, S72, A73, V75, E76, L78, K79, E80	E5, T8, E10, G12, L52, R53, E68, V69, R86, V89, M90, R91, R92	2.976	
88/92	S19	H28, I29	H71, K79	L87	1.690	
88/93	F18, S19, I20	G23, T24, H28, I29, D31	H71, S72, A73, V75, E76, A77, L78, K79, E80	E3, E5, E6, I7, T8, L9, E10, G12, L52, R53, S57, E68, V69, R86, V89, M90, R91, R92	3.243	
89/90	G17, F18, I20	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76, K79	E10, G12, V69, L87, V89, M90, R91, R92	2.435	
89/91	G17, F18	G23, H28, I29	H71, S72, A73, V75, E76, K79	E10, G12, V69, M90, R91, R92	2.344	
89/92	G17, F18	H28, I29	H71, K79	1	1.483	
89/93	F18	G23, H28, I29	H71, S72, A73, E76, K79	E10, G12, V69, L87, M90, R91, R92	2.306	
90/91	1	G23, H28, I29, D31	H71, S72, A73, E76	T8, E10, G12, L52, V69, R86, L87, V89, M90, R91, R92	2.333	
90/92	/	H28, I29	H71	L87	1.252	
90/93	/	G23, N26, H28, I29, D31	H71, S72, A73, E76, A77	T8, E10, G12, L52, R53, V69, R86, L87, V89, M90, R91, R92	2.428	
91/92	/	H28, I29	H71, S72	L87	1.424	
91/93	/	G23, H28, I29, D31	H71, S72, A73, E76, A77	T8, E10, G12, L52, V69, V89, M90, R91, R92	2.350	
92/93	/	H28, I29	H71, S72	L87	1.425	

 $Tableau \ 10: \ R\acute{e} capitulatif \ des \ perturbations \ caus\acute{e} es \ par \ les \ couples \ de \ fragments, \ en \ blanc \ (\Sigma\Delta\delta<2 \ ppm), \ en \ bleu \ (2<10)$ 

 $\Sigma\Delta\delta < 2.5$  ppm) et en orange ( $\Sigma\Delta\delta > 2.5$  ppm).

Analyse quantitative. Les sommes globales des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ) sont comprises entre 0,83 et 3,24 ppm (Tableau 10). De façon générale, ces sommes sont inférieures à l'addition des sommes des fragments seuls ( $\Sigma\Delta\delta_{A/B} < \Sigma\Delta\delta_A + \Sigma\Delta\delta_B$ ), exception faite des couples **87/88** et **88/93** pour lesquels les sommes des couples et des fragments sont du même ordre ( $\Sigma\Delta\delta_{A/B} \approx \Sigma\Delta\delta_A + \Sigma\Delta\delta_B$ ).

Nous avons attribué des notations (-), (+), (++) aux couples de fragments en fonction de leur capacité d'interaction (Tableau 9). Les couples de fragments qui ne perturbent que très peu la protéine ( $\Sigma\Delta\delta < 2$  ppm) sont notés (-). Un (+) a été attribué aux couples qui perturbent la protéine de manière significative (2 ppm  $< \Sigma\Delta\delta < 2.5$  ppm). Enfin un (++) a été attribué aux couples qui perturbent donc plus la protéine que l'indole **24** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.469$  ppm).

Le premier groupe (-) est constitué des couples pour lesquels la somme des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ) est inférieure à 2 ppm. Ce groupe est constitué de tous les couples pour le 92 est présent. lesquels fragment Nous constatons ( Tableau 10) que soit le fragment **92** n'a aucun effet sur le  $2^{em}$  fragment, ce qui est le cas avec les fragments **91** ( $\Sigma \Delta \delta_{91} = 1.421$  ppm,  $\Sigma \Delta \delta_{91/92} = 1.424$  ppm) et **93** ( $\Sigma \Delta \delta_{93} = 1.422$  ppm,  $\Sigma \Delta \delta_{92/93} = 1.425$  ppm), soit il agit comme un « antagoniste » vis-à-vis de l'autre fragment comme dans le cas des fragments 87, 88 ou 90 (Figure 68 A). En effet les sommes totales des perturbations causées par les fragments 87 et 90 seuls ( $\Sigma\Delta\delta_{87} = 1.209$  ppm,  $\Sigma\Delta\delta_{90} = 1.662$ ppm) diminuent de 0.4 ppm en présence du fragment 92 ( $\Sigma \Delta \delta_{87/92} = 0.829$  ppm,  $\Sigma \Delta \delta_{90/92} =$ 1.252 ppm).

Le deuxième groupe (+) est constitué de 10 couples de fragments pour lesquels la perturbations (ΣΔδ) est comprise entre 2 et somme des 2.5 ppm ( Tableau 10). Ces couples de fragments perturbent la protéine de façon moins importante que la somme des deux fragments ( $\Sigma \Delta \delta_{A/B} < \Sigma \Delta \delta_A + \Sigma \Delta \delta_B$ ), et que l'indole 24 ( $\Sigma \Delta \delta = 2.469$  ppm). Parmi ces couples, sept (87/89, 87/90, 87/91, 87/93, 89/90, 89/91 et 89/93) perturbent la poche PDZ dans son intégralité, c'est-à-dire qu'ils modifient l'environnement des acides aminés présents aux sites S0 et S1 (Figure 68 B) En effet, nous constatons que la boucle S1 est affectée par ces couples ainsi que les acides aminés tout le long de l'hélice  $\alpha_2$  en partant de His 71 à Glu 76, voire même jusqu'à Lys 79. Enfin, les acides aminés de la boucle GLGF et

du feuillet  $\beta_2$  en haut du site S0 sont aussi affectés. Les trois derniers couples (**90/91**, **90/93** et **91/93**) interagissent également avec la protéine puisqu'ils perturbent les acides aminés présents sur l'hélice  $\alpha_2$  (His 71, Ser 72, Glu 76) et la boucle S1 (Gly 23, His 28, Ile 29, Asp 31). Cependant ces couples ne perturbent pas la boucle GLGF ni le feuillet  $\beta_2$ . Ces résultats semblent plutôt logiques au vu des résultats obtenus précédemment pour les fragments seuls. En effet, les couples conservent les interactions des fragments seuls que celles-ci se situent plutôt vers le haut de la poche S0 (boucle GLGF) ou vers le bas de la poche S0 et sur le site S1. Enfin, nous observons une augmentation du nombre d'acides aminés perturbés par les couples par rapport aux fragments seuls, par exemple une vingtaine d'acides aminés affectés par l'interaction du couple **90/91** comparé à cinq avec un seul fragment (**90** ou **91**).

Enfin le troisième groupe (++) est composé de 5 couples de fragments dont la somme totale des perturbations ( $\Sigma\Delta\delta$ ) est supérieure à 2.5 ppm, ils se lient donc mieux que l'indole 24  $(\Sigma \Delta \delta = 2.469 \text{ ppm})$ . Ces couples (87/88, 88/89, 88/90, 88/91 et 88/93) possèdent le fragment 88 (acide salicylique) en commun et ensemble ils interagissent avec la totalité de la poche PDZ. En effet, nous observons que les acides aminés sur la boucle GLGF, le feuillet  $\beta_2$ , la boucle S1 et l'hélice  $\alpha_2$  sont affectés (Figure 68 C-G), ainsi que de nombreux acides aminés situés à l'arrière de la poche PDZ. L'addition des sommes totales des perturbations des fragments 87 et 88 ( $\Delta\delta_{87} + \Delta\delta_{88} = 2.994$  ppm) et de 88 et 93 ( $\Delta\delta_{88} + \Delta\delta_{93} = 3.207$  ppm) donne un résultat quasiment égal à la somme des perturbations causées par les couples 87/88  $(\Sigma \Delta \delta_{87/88} = 2.989 \text{ ppm})$  et **88/93**  $(\Sigma \Delta \delta_{88/93} = 3.243 \text{ ppm})$ . Nous en concluons donc que les fragments de ces couples (87/88 et 88/93) interagissent ensemble (effet additif). Alors que les fragments seuls ont chacun leur "zone" d'interaction, plutôt vers le haut de la protéine pour le fragment 88 et plutôt vers le bas pour le fragment 93, (Figure 68 G) on observe une perturbation au milieu de la poche plus importante lorsque les fragments 88 et 93 sont ensemble, ce qui laisse supposer que les deux fragments interagissent simultanément dans la poche PDZ. Pour le couple 87/88, ce sont deux fragments qui vont plutôt se placer dans le haut de la poche, (Figure 68 C) toutefois nous constatons que toute la poche PDZ est perturbée par le couple de fragments, ce qui laisse penser que lorsque les fragments sont ensemble, ils se repoussent mutuellement afin de faire des interactions avec la protéine plus profondément. Pour les autres couples de ce groupe (88/89, 88/90, 88/91), les sommes des perturbations des couples de fragments sont inférieures à celles des fragments qui les composent ( $\Sigma \Delta \delta_{A/B} < \Delta \delta_{A} + \Delta \delta_{B}$ ). En comparant ces trois sommes, nous remarquons que celle du couple 88/91 ( $\Sigma \Delta \delta_{88/91} = 2.976$  ppm) est très proche de celle des fragments 88 et 91

 $(\Delta \delta_{88} + \Delta \delta_{91} = 3.206 \text{ ppm})$  ce qui laisse supposer un effet additif des deux fragments en couple (Figure 68 F). Pour les deux autres couples (**88/89** et **88/90**), bien que les sommes  $(\Sigma \Delta \delta_{88/89} = 2.698 \text{ et } \Sigma \Delta \delta_{88/90} = 2.666 \text{ ppm})$  soient supérieures à celle de l'indole **24**, elles sont très inférieures à celles des fragments seuls de 0.7 ppm ( $\Delta \delta_{88} + \Delta \delta_{89} = 3.335$  ppm et  $\Delta \delta_{88} + \Delta \delta_{90} = 3.447$  ppm). En regardant les représentations de ces perturbations (Figure 68 D-F), nous voyons que ces trois couples interagissent avec la totalité de la poche PDZ, quelque soit leur zone d'interaction lorsqu'ils sont seuls.





Figure 68: Représentation 3D du domaine PDZ1 de PSD-95 indiquant les acides aminés perturbés par les fragments A et B seuls (à gauche) et par le couple de fragments A/B correspondant, (A) Fragments 87, 92 et couple 87/92, (B) Fragments 87, 93 et couple 87/93, (C) Fragments 87, 88 et couple 87/88, (D) Fragments 88, 89 et couple 88/89, (E) Fragments 88, 90 et couple 88/90, (F) Fragments 88, 91 et couple 88/91, (G) Fragments 88, 93 et couple 88/93.

# 3.3 Conclusion

Les résultats de ces deux études (fragments seuls 3.1 et couples de fragments 3.2) sont regroupés dans l'histogramme ci-dessous (Figure 69). Compte tenu de leurs affinités avec la protéine, les couples de fragments ont été divisés en trois groupes qui sont indiqués par des couleurs différentes :

- En orange, le groupe (++) représenté par les couples de fragments pour lesquels la somme des perturbations est supérieure à 2.5 ppm ( $\Sigma\Delta\delta > 2.5$  ppm).
- En bleu, le groupe (+) pour les couples de fragments pour lesquels la somme des perturbations est comprise entre 2 et 2.5 ppm ( $2 < \Sigma \Delta \delta < 2.5$  ppm).
- En noir, le groupe (-) pour les fragments et les couples de fragments dont la somme des perturbations est inférieure à 2 ppm ( $\Sigma\Delta\delta < 2.0$  ppm).



Figure 69: Histogramme de la somme des perturbations pour les fragments et les couples de fragments, en noir  $(\Sigma\Delta\delta < 2 \text{ ppm})$ , en bleu  $(2 < \Sigma\Delta\delta < 2.5 \text{ ppm})$  et en orange  $(\Sigma\Delta\delta > 2.5 \text{ ppm})$ .

Mis à part le fragment **92**, les autres fragments ont plus ou moins affectés les acides aminés du domaine PDZ1 de la protéine PSD-95. En ce qui concerne les couples de fragments, encore une fois mis à part le fragment **92**, tous les autres ont perturbés les acides aminés de la poche PDZ, certains plus que d'autres, notamment les couples **87/88**, **88/91** et **88/93**. Ces trois couples de fragments perturbent la protéine de manière significative par rapport à l'indole **24** puisque la somme des déplacements chimiques est augmentée de plus de 0.5 ppm pour les couples **87/88**, **88/91** et de 0.8 ppm pour le couple **88/93** (Figure 70).



Figure 70: Représentation 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 perturbés par les couples de fragment 87/88, 88/91, 88/93 et l'indole 24.

En FBDD, l'idée est ensuite d'assembler les fragments pour obtenir de nouvelles molécules. Au vu des résultats obtenus, nous avons décidé de continuer l'étude à partir des trois couples présentant un écart important avec l'indole 24 c'est-à-dire les couples 87/88, 88/91 et 88/93 (Figure 71).



Figure 71: Meilleurs couples de fragments

# 4 Modélisation Moléculaire

Cette partie a été réalisée par Lionel Nauton

Avant d'entreprendre la synthèse d'un grand nombre de molécules composés de ces fragments, il a été décidé de réaliser une étude de modélisation moléculaire en réunissant de façon virtuelle les deux fragments de chaque couple par des chaines carbonés de différentes longueurs (Figure 72). Cette simulation devrait nous permettre d'identifier les molécules qui pourraient être de bons candidats potentiels comme inhibiteurs de l'interaction entre PDS-95 et 5- $HT_{2A}$ .

## 4.1 Molécules virtuellement conçues

Les couples de fragments qui perturbent le plus le domaine PDZ1 de PSD-95 ont été retenus pour continuer l'étude en modélisation moléculaire (Figure 71). Les deux fragments de chaque couple seront liés puis leur capacité à interagir avec le domaine PDZ simulé par modélisation moléculaire afin de déterminer les meilleurs ligands potentiels. Les fragments ont été liés par un espaceur carboné, (n =0, 1, 2) en essayant de garder au maximum les fonctions chimiques (potentiellement pharmacophores) présentes sur les différents fragments. (Figure 72). Nous avons choisi un espaceur composé simplement de carbones pour gêner le moins possible le positionnement des fragments et leurs interactions avec la protéine. Nous avons ainsi généré 96 molécules virtuelles (structure en annexe).



Figure 72: Molécules virtuelles

## 4.2 Procédure de modélisation

Dans un premier temps, une étude de dynamique moléculaire (annexe) du complexe formé par la cypin avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (PDB : 3GSL) a permis l'identification de dix conformations différentes de la protéine. Ces conformations ont ensuite été utilisées dans la réalisation des études de *docking*, ce qui donne potentiellement de meilleurs résultats qu'un *docking* sur une seule conformation. Le *docking* des différentes molécules a été réalisé avec le logiciel AutoDock Vina (vina.scripps.edu) qui donne comme résultats des estimations de l'énergie libre de liaison (Figure 73).<sup>152</sup>



Figure 73: Estimation de l'énergie libre de liaison par AutoDock Vina<sup>152</sup>

## 4.3 Exploitation des résultats

Onze expériences de *docking* ont été réalisées pour chaque molécule virtuelle, ces expériences ont été faites sur les dix structures de la protéine obtenues après la dynamique moléculaire et sur la structure 3GSL disponible sur PDB (Annexe 38).

Selon les estimations de Vina (Figure 73), l'énérgie libre de liaisons des molécules varie entre -5.1 et -6.5 Kcal/mol. Les meilleurs scores sont présentés ci-dessous (Tableau 11) pour les sept meilleures molécules (Figure 74).

Numéro des molécules	Score = Estimation de l'énergie libre de liaison)
105	-6,5
110	-6,5
104	-6,5
108	-6,5
106	-6,4
109	-6,4
107	-6,4

Tableau 11: Résultat du docking









Figure 74: Molécules possédant les meilleurs scores



Figure 75: Représentation en 3D de la modélisation moléculaire

Les représentations en 3D des sept molécules au sein du domaine PDZ1 de PSD-95 (Figure 75) montrent toutes les molécules sauf les **106** et **110** font des interactions avec la boucle GLGF et l'His 71 située sur l'hélice  $\alpha_2$ .

Ces résultats nous permettent de sélectionner les molécules **104**, **105**, **108**, **109** pour continuer l'étude avec ces molécules. Nous avons choisi de synthétiser dans un premier temps les molécules **108** et **109** car au vu de la taille de la poche PDZ, il nous a semblé essentiel d'apporter un peu de flexibilité et d'espace entre les deux fragments dans le but d'atteindre la boucle S1 situé dans le bas de la poche PDZ délimité par la boucle GLGF, le feuillet  $\beta_2$ , la boucle S1 et l'hélice  $\alpha_2$ , les molécules **104** et **105** ayant deux cycles aromatiques liés directement, ils présentent moins de flexibilité.



Figure 76: Molécules issues de la modélisation moléculaire à synthétiser

## 5 Synthèse des molécules 108 et 109

## 5.1 Bibliographie

## 5.1.1 Généralités sur les pyrroles

Bien que le noyau pyrrole soit l'un des hétérocyles azotés les plus simples, il est présent dans de nombreux produits naturels ou composés de synthèse possédant des propriétés biologiques intéressantes (Figure 77). De nombreux produits naturels d'origine marine contiennent le noyau pyrrole. Les Lamellarins, composés naturels issus de divers organismes marins comme les mollusques et les éponges, présentent des propriétés biologiques prometteuses, notamment le Lamellarin R<sup>153</sup>, qui possède des activités antitumorales. Les pyrrolo-imidazoles constituent une famille d'une centaine d'alcaloïdes naturels extraits d'éponges marines. L'Oroidin<sup>154</sup> a été identifié comme étant le plus « simple » de ces alcaloïdes et est considéré comme étant le précurseur de tous les autres. Des analogues de l'Oroidin présentant des propriétés antimicrobiennes intéressantes ont été décrits récemment.<sup>155</sup> Enfin, la structure du pyrrole **111**, extrait de fruits *Lycium Chinense MILLER* a été élucidée récemment.<sup>156</sup> Ces fruits sont utilisés en médecine traditionnelle pour des déficiences du foie et des reins.

Si beaucoup de composés possédant le noyau pyrrole sont issus du monde animal ou végétal, ce noyau est également présent dans divers principes actifs, composés non naturels, présentant des activités biologiques variées. C'est le cas notamment du Tolmetin® ou du Zomépirac®,<sup>157</sup> pyrroles trisubstitués connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Le Sunitinib®,<sup>158</sup> possédant un noyau pyrrole tétrasubstitué est, quant à lui, un inhibiteur de tyrosines kinases utilisé pour le traitement du cancer du rein. Enfin l'Atorvastatine® est un pyrrole tétrasubstitué commercialisé pour son activité cholestérolémiante.<sup>159</sup>



Figure 77: Exemples de pyrroles

Cette présentation non exhaustive des composés naturels et non naturels possédant le squelette pyrrole explique le nombre important de méthodes de synthèse décrites dans la littérature. Nous nous intéresserons par la suite seulement à la synthèse de pyrroles possédant une fonction ester ou acide en position 2 puisque nous avons montré que la présence de ce groupement est indispensable pour l'interaction des ligands futurs avec le domaine PDZ1 de PSD-95.

## 5.1.2 Synthèse multicomposant des pyrroles

## 5.1.2.1 A partir d'un alcyne

Une méthode permettant de générer des pyroles tétrasubstitués par des groupements esters à partir d'un alcyne et d'une amine, soit en présence de CAN,<sup>160</sup> soit de l'acétate de cuivre<sup>161</sup> a été récemment décrite. Les rendements obtenus varient respectivement de 55 à 75% et de 26 à 76% en fonction du groupement protecteur de l'azote.





D'autres méthodes permettent d'obtenir des pyrroles disubstitués en 2 et 3 par des fonctions ester. Toutes ces méthodes utilisent un alcyne dicarboxylé et une amine diversement substituée (RNH<sub>2</sub>) et fournissent des pyrroles substitués en position 4 et 5 (Schéma 16).



Schéma 16: Synthèse de pyrroles disubstitués par des fonctions ester

La voie A (Schéma 16) consiste en la formation d'un 2-amino phosphorane par réaction entre la triphénylphosphine, l'alcyne et l'amine, suivie d'une réaction de Wittig avec le dérivé dicarbonylé et d'une cyclisation pour donner le pyrrole souhaité. Une vingtaine

d'exemples ont été décrits avec des rendements variant de 60 à 90% suivant la nature des substituants. De la même manière l'utilisation du glyoxal en présence de DABCO (voie B) permet de générer des pyrroles substitués en position 4 par un groupement hydroxyle avec un rendement moyen de 80%.<sup>157</sup>

Deux méthodes (voies D et E) permettent de générer des pyrroles trisubstitués possédant un groupement aromatique en position 4 ou 5. La voie D, réaction de type Hantzsch, consiste en une réaction de Michael de l'amine sur l'alcyne en présence d'un acide de Lewis pour conduire à l'énamine, puis substitution nucléophile sur le dérivé bromé et enfin cyclisation. Cette méthode conduit à des pyrroles trisubtitués avec des rendements variant de 84 à 89%.<sup>162</sup> La voie E consiste en une réaction de Michael entre l'énaminoester et le dérivé nitrostyrène suivie d'une cyclisation en présence d'un acide de Lewis et aromatisation.<sup>163</sup> Le nitrosytrène peut être généré *in situ* en présence de diiode. Cette méthode conduit aux pyrroles attendus avec des rendements variant de 65 à 88%.<sup>164</sup>

Les deux dernières voies (C et F) génèrent des pyrroles tétrasubtitués. La voie C débute par une réaction de Knoevenagel entre le malononitrile et l'arylglyoxal, suivie d'une réaction de Michael entre le dérivé formé et l'énaminoester. Une double cyclisation permet de former une intermédiaire furopyrrole qui subit une aromatisation par ouverture du cycle furanique. Divers pyrroles sont ainsi obtenus avec des rendements de 64 à 93%.<sup>165</sup> La voie F permet d'obtenir des pyrroles possédant un groupement benzyle en position 5 à partir d'un alcyne, d'une amine et d'un dérivé d'alcool propargylique substitué en présence de diiode.

L'équipe de Manahey<sup>166</sup> a décrit la synthèse régiosélective de pyrroles trisubstitués par cyclisation pallado-catalysée d'alcynes et du 2-amino-3-iodoacrylate **121** (Schéma 17). Une douzaine de pyrroles ont été ainsi synthétisés à partir d'alcynes diversement substitués avec des rendements variant de 40 à 82%.



Schéma 17: synthèse de pyrrole à partir d'alcynes

Enfin, des pyrroles substitués en position 2 par un ester et en position 3 par une dérivé aromatique peuvent être générés par chimie click<sup>167</sup> en présence d'un alcyne et d'un

isocyanide catalysé par du carbonate d'argent (Schéma 18). Une quinzaine de pyrroles a été synthétisés avec des rendements variant de 40 à 98%.



Schéma 18: synthèse de pyrroles par chimie click

### 5.1.2.2 A partir de dérivés dicarbonylés.

L'équipe de Narasaka a décrit la préparation de pyrroles polysubsitués à partir de composés 1,3-dicarbonylés et d'azotures vinyliques catalysée par du cuivre (Schéma 19). Cette méthode consiste en une addition catalysée au cuivre du composé carbonylé sur une 2H-azirine formé *in situ* à partir de l'azoture vinylique. Les rendements varient de 52 à 88%, le groupement R' étant dans la majorité des cas un noyau aromatique.





Toutes les méthodes décrites précédemment permettent donc d'obtenir des pyrroles polysubstitués possédant une fonction ester en position 2, mais la plupart de ces méthodes conduisent à des composés présentant au moins deux groupements carbonyles.

Nous nous sommes donc intéressés à d'autres méthodes, notamment à l'introduction de substituants sur un pyrrole substitué par une fonction ester en position 2. La plupart des méthodes décrites font intervenir des réactions de Friedel Crafts.

### 5.1.3 Acylation de Friedel Crafts

Plusieurs méthodes de couplages existent dans la littérature, celle qui est la plus couramment utilisée est la réaction de Friedel et Crafts.

La synthèse des composés **134**, **135** et **136**, dont les structures sont similaires aux composés que nous souhaitons préparer, a été brevetée par l'entreprise Sepracor.<sup>151</sup> Les inventeurs ont mis en évidence les différences de réactivité de deux acides de Lewis, le trichlorure d'aluminium et le chlorure de zinc. En effet, lorsque l'acylation se fait en présence d'AlCl<sub>3</sub>, l'acylation se fait régiospécifiquement en position 4 du pyrrole. Les auteurs ont décrits plusieurs exemples de chlorures d'acyles diversement substitués. Dans tous les cas, les pyrroles sont obtenus avec des bons rendements variant de 92 à 95%. Le traitement de la cétone correspondant en présence de de triéthylsilane et de TFA fournit le dérivé alkylé correspondant avec de faibles rendements (23 - 46%.). L'utilisation de ZnCl<sub>2</sub> lors de l'acylation fournit un mélange des pyrroles substitués en position 4 et en 5. La proportion de chacun des régioisoméres n'a pas été précisée dans le brevet.

L'orientation de la liaison lors de l'acylation est guidée par la présence de l'ester en position 2 du pyrrole. En effet, l'ester est un groupement attracteur ce qui va favoriser l'attaque du carbocation par le carbone 4 du pyrrole. Nous supposons que lors de l'acylation en présence de chlorure de zinc, ce dernier va se complexer avec l'azote du pyrrole ce qui va également permettre l'attaque du carbocation par le carbone 5 du pyrrole d'où l'obtention des deux regioisomères.



Schéma 20: acylation de Friedel Crafts

Une étude de l'influence des acides de Lewis utilisés sur la régiosélectivité de l'acylation de Friedel et Crafts a été décrite sur des pyrroles non substitués et dont l'azote est protégé par un groupement phenylsulfonyle (Schéma 21).<sup>168</sup>. Bien que cette étude n'ait pas été réalisée sur des pyrroles possédant une fonction ester en position 2, il nous a semblé intéressant de la décrire. Les auteurs ont montré, comme précédemment, que la réaction

catalysée par AlCl<sub>3</sub> donne la meilleure régiosélectivité avec des rendements supérieurs à 90% pour l'obtention du régioisomère **140**. Les autres catalyseurs sont moins régioséléctifs, ainsi les catalyses avec SnCl<sub>4</sub> et ZnCl<sub>2</sub> favorisent plutôt l'obtention du composé **138** alors que TiCl<sub>4</sub> et FeCl<sub>3</sub> favorisent plutôt l'obtention du composé **140**. Au contraire l'utilisation d'un acide de Lewis « mou » comme BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O permet l'obtention de l'autre régioisomère, le composé **138**. Cependant les rendements de réaction sont nettement inférieurs puisqu'aucun n'est supérieur à 90% avec une moyenne de 55%. Puis les cetopyrroles sont obtenues par déprotection de l'azote du pyrrole en milieu basique avec des rendements plutôt bons (allant de 50% à 100%).



Schéma 21: Régiosélectivité de l'acylation de Friedel<sup>168</sup>

La faible régiosélectivité de d'acylation de Friedel Crafts en présence de  $ZnCl_2$  a été décrite sur divers exemples de pyrroles disubstitués.<sup>169,170</sup>

Enfin, il a été montré que l'acylation de Friedel Crafts sur des pyrroles substitués en 2 par une fonction ester pouvait être catalysée par du triflate d'ytterbium mais avec de faibles rendements (Schéma 22).



Schéma 22: Réaction de Friedel Crafts catalysé par de l'yterbium

#### 5.1.4 Autres méthodes

Une méthode de formation de 2-cétopyrroles **147** à partir d'acide carboxylique a été décrite par Nicolaou (Schéma 23)<sup>171</sup>. Cette méthode consiste à activer l'acide carboxylique sous la forme de 2-pyridylthioester **146**, puis a formé la cétone **147** par addition du chlorure de pyrrolmagnésium correspondant avec des rendements allant de 80 à 95%.



Schéma 23: couplage thio

Enfin, les auteurs d'une autre publication<sup>172</sup> ont montré qu'il était possible d'utiliser un autre acide de Lewis, le tetrachlorure de zirconium, pour réaliser la benzylation d'un pyrrole à partir d'un dérivé bromé. De nombreux bromure de benzyle diversement substitués ont été testés et ont permis d'obtenir la benzylation en position 2 du pyrrole avec des rendements de 67 à 90%.



Schéma 24: Benzylation d'un pyrrole à l'aide d'un dérivé bromé

Pour réaliser la benzylation (Schéma 25), il faut dans un premier temps former le sel de lithium avec le n-butyllithium, sel qui sera ensuite complexé sous la forme d'un dimère avec le chlorure de zirconium. Ceci permettra l'obtention du carbanion en position 2 du pyrrole, qui va attaquer le bromure de benzyle pour former le pyrrole benzylé en position 2 (Schéma 25).



Schéma 25: Mécanisme de benzylation avec ZrCl<sub>4</sub>

## 5.1.5 Conclusion «pyrrole »

Parmi toutes ces méthodes, nous nous sommes orientés, dans un premier temps, vers l'acylation de Friedel Crafts à partir du pyrrole synthétisé pour l'étude des fragments. Même si les rendements décrits dans la littérature ne sont pas très élevés, cette méthode nous permettra d'obtenir les régioisomères des molécules **108** et **109**. En effet, les scores de *docking* de ces molécules étant proches, nous avons décidé de les synthétiser afin de comparer leur capacité à interagir avec la protéine. Nous envisageons donc de préparer les composés **154** et **155** à partir des pyrroles **156** et **157** en réalisant une réduction puis une deoxygénation suivie d'une alkylation de l'azote du pyrrole et d'une déprotection. Les pyrroles **156** et **157** seront obtenus par acylation de Friedel Crafts du pyrrole **99** et des chlorures d'acyle correspondants aux acides **158** et **159**.





Dans l'optique de mettre cette retrosynthèse en application, il nous faudra préparer les acides **158** et **159**.

### 5.1.6 Synthèse des acides 158 et 159

Dans un premier temps, nous avons envisagé de préparer les acides benzoïques 160 à partir des toluènes substitués 161 correspondants.



Schéma 27: Retrosynthèse des acides benzoïques

Nous nous sommes donc intéressés à la préparation d'acides benzoïques substitués par un alcool et un méthyle.

Dans la plupart des publications faisant état de la présence de ces groupements, la première étape consiste en la protection des fonctions acide et alcool. Cette protection se fait par ajout d'un dérivé halogéné en présence d'une base ( $K_2CO_3$ ).



Schéma 28: Protection des fonctions présente sur le cycle benzénique

Ensuite pour obtenir l'acide benzoïque, l'étape suivante correspond à l'oxydation du groupement méthyle. Dans la littérature, nous avons recensé plusieurs voies de synthèse pour obtenir cet acide carboxylique.

La première méthode correspond à une oxydation directe du méthyle par des oxydants classiques (trioxide de chrome (CrO<sub>3</sub>) ou permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>)) (Schéma 29). L'équipe de Zhu<sup>173</sup> a réalisée une oxydation avec du CrO<sub>3</sub> sur le dérivé de l'acide salicylique **163** pour obtenir l'acide carboxylique correspondant **164** avec un rendement de 75%. L'équipe de Chen a obtenu<sup>174</sup> le même rendement d'oxydation avec du CrO<sub>3</sub> sur le dérivé de benzophénone **167**. L'équipe de Lee<sup>175</sup> a montré qu'il était possible d'oxyder directement un

méthyle en acide carboxylique avec la présence d'une fonction amide sur le cycle benzénique en présence de permanganate de potassium ( $KMnO_4$ ). Ces acides sont obtenus avec des rendements variant de 30 à 70%.



Schéma 29: Oxydation directe des methyles en acide carboxylique

Une autre méthode décrite dans la littérature est le passage par un dérivé bromé qui peut être transformé en aldéhyde ou en alcool, ce dernier subit ensuite une oxydation de Jones pour obtenir l'acide carboxylique (Schéma 30). La bromation du méthyle se fait avec du *N*-bromosuccinimide par une catalyse radicalaire (AIBN<sup>176</sup> ou peroxyde de dibenzoyle<sup>177</sup>) avec des rendements variant entre 70 et 80%. Ce dérivé peut ensuite être utilisé pour la formation de l'aldéhyde qui peut, soit être préparé avec du nitromethane,<sup>178</sup> soit avec du DMSO<sup>179</sup> avec des rendements variant de 80% et 75%. Le dérivé bromé peut aussi être transformé en alcool lorsqu'il est mis en présence de CaCO<sub>3</sub> avec un rendement de 96%.<sup>180</sup> L'oxydation de Jones (CrO<sub>3</sub>) est ensuite réalisée afin d'obtenir l'acide carboxylique avec des rendements d'environ 95% quelque soit l'intermédiaire de départ.



Schéma 30: Synthèse de l'acide carboxylique par le dérivé bromé

## 5.2 Approche retrosynthètique

Le schéma retrosynthétique envisagé pour préparer ces quatre molécules est représenté sur le Schéma 31.

Les molécules **108**, **109**, **110** et **175** seront obtenues par deoxygénation, *N*-alkylation et déprotection des fonctions acides et alcool des molécules **176**, **177**, **178** et **179**. Celles-ci seront obtenues par une acylation de Friedel et Crafts entre les acides **180**, **181** et le pyrrole **99**. Les acides **180** et **181** seront obtenus à partir des composés **162** et **186** par oxydation du méthyle, après une étape de protection des fonctions alcool et acide. La synthèse du pyrrole **99** a déjà été présentée lors de la préparation du fragment **89** (Chapitre 4 2.2.2).



Schéma 31: Analyse rétrosynthètique des molécules 108, 109, 110 et 175

## 5.3 Synthèse des molecules 108 et 109

### 5.3.1 Préparation des acides 180 et 181

Comme nous l'avons décrit précédemment, les acides **180** et **181** peuvent être obtenus par oxydation des composés méthylés **183** et **184**, eux-mêmes issus de la protection des fonctions alcool et acide des molécules **162** et **182** (Schéma 32).



Schéma 32: Synthèse envisagée pour former les acides 180 et 181

La première étape (Schéma 33) consiste en la protection du phénol ainsi qu'en l'estérification de l'acide de 162, en présence d'iodure de méthyle pour obtenir le composé 183 avec un rendement de 87%.



Schéma 33: Protection de l'acide 4-methylsalicylique

Parmi les méthodes décrites dans la littérature, nous avons choisi de réaliser l'oxydation du groupement méthyle du composé **180** soit en présence d'oxyde de chrome et d'acide acétique, soit de permanganate de potassium (Schéma 34) pour générer l'acide **180**. Aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir l'acide souhaité. L'utilisation de permanganate a mené à la formation du diacide **185**. Nous le constatons par la disparition sur le spectre RMN <sup>1</sup>H du signal intégrant pour le méthyle de la fonction ester ainsi que la disparition du signal du méthyle sur le cycle benzénique.



Schéma 34: Différentes techniques d'oxydation trouvées dans la littérature

Compte tenu de ces échecs une deuxième voie de synthèse a été explorée en passant par un dérivé bromé **187** (Schéma 35). Nous avons alors envisagé de synthétiser l'aldéhyde **186** *via* le dérivé bromé **187**, lui-même obtenu à partir du dérivé **183**, puis d'oxyder l'aldéhyde en acide (Schéma 35).



Schéma 35: Retrosynthèse de l'acide 180 à partir du composé 183

Le dérivé bromé **187** est obtenu à partir du composé **183** (Schéma 36), en présence de NBS et d'AIBN avec un rendement de 58%.<sup>176</sup> Ce rendement modeste peut s'expliquer par la présence d'un sous-produit (le composé dibromé qui possède un rapport frontal ( $\Delta R_f = 0.04$ ) très proche de celui du produit **187**) identifié par RMN et qui rend la purification difficile. Deux voies de synthèse ont alors été envisagées pour préparer l'aldéhyde **186**. La première consiste en le traitement de **187** en présence de méthanolate de sodium dans le nitrométhane. Ces conditions n'ont pas permis pas d'obtenir l'aldéhyde **186**. La deuxième voie consiste à oxyder le dérivé bromé **187** par une oxydation de Kornblum en présence de DMSO.<sup>179</sup> L'aldéhyde **186** et alors obtenu avec un faible rendement de 20%.



Schéma 36: Formation de l'aldéhyde 186 à partir du composé méthylé 183

Malgré le faible rendement obtenu lors de la formation de l'aldéhyde nous avons poursuivi la synthèse afin de valider la stratégie. L'oxydation de l'aldéhyde **186** en présence d'oxyde de chrome permet de générer l'acide **180** avec un rendement de 68% (Schéma 37).



Schéma 37: Formation de l'acide 180 par une oxydation de Jones de l'aldéhyde 186

Compte tenu du faible rendement obtenu lors de la formation de l'aldéhyde (12% sur 2 étapes), nous avons envisagé une autre voie d'accès à cet intermédiaire. Celui-ci consiste à préparer l'acide par oxydation de l'alcool correspondant et non de l'aldéhyde (Schéma 38). L'alcool **188** est obtenu par traitement basique du dérivé bromé **187**, avec un rendement de 98%. L'oxydation de l'alcool par la méthode de Jones conduit à l'acide **180** avec un rendement de 77%. L'acide **180** est donc obtenu en 4 étapes à partir l'acide 4-methylsalicylique **162** avec un rendement global de 38%.



Schéma 38: Synthèse de l'acide 180 à partir du composé bromé 187

La synthèse de l'acide **180** ayant été mise au point, nous l'avons ensuite appliquée pour la préparation de l'acide **181** (Schéma 39). La première étape consiste en la méthylation de l'acide 5-methylsalicylique **182** en présence d'iodure de méthyle et de carbonate de potassium avec un rendement de 88%, suivie d'une étape de bromation radicalaire catalysée par l'AIBN en présence de *N*-bromosuccinimide avec un rendement de 64%. L'alcool correspondant **190** est obtenu, par traitement basique du dérivé bromé **189**, avec un rendement de 99%. Enfin, l'oxydation de l'alcool **190** par la méthode de Jones conduit à l'acide **181** avec un rendement de 72%. L'acide **181** est donc obtenu en 4 étapes à partir l'acide 4-methylsalicylique avec un rendement global de 40%.

Chapitre 4 : Fragment-based drug design



Schéma 39: Synthèse de l'acide 181

Une fois la faisabilité de la synthèse pour les deux synthons **180** et **181** démontrés, nous avons réalisés deux essais pour remplacer le CCl<sub>4</sub> utilisé lors de l'étape de bromation par le chloroforme et le 1,2-dichloroéthane. Lors de ces tests, seul le paramètre solvant a été modifié, c'est-à-dire que le nombre d'équivalent de NBS et d'AIBN par rapport aux dérivés **183** ou **184**, ainsi que le temps de réaction (18h) n'ont pas été modifiés. La réaction se déroulant à reflux, le paramètre température a donc été modifié puisque le chloroforme (T = 61°C) a une température d'ébullition inférieure à celle du 1,2-dichloroéthane (T = 83°C) et du tetrachlorure de carbone (T = 77°C) (Schéma 40).

L'utilisation du chloroforme n'a pas permis la transformation complète du produit de départ **182** même après 72h de réaction. Aucune évolution significative n'a été constatée après 18h de réaction. Une fois le traitement et la purification réalisée, le dérivé **187** a été obtenu avec un ratio de 2/3 par rapport au produit de départ **182**.

L'utilisation du 1,2-dichloroéthane, permet d'obtenir le dérivé **187** avec un rendement de 82%, ce qui nous a permis d'améliorer le rendement de 24% par rapport à l'utilisation du CCl<sub>4</sub> comme solvant (58%). Ce meilleur rendement peut s'expliquer notamment par une diminution de la formation de composé dibromé.

En conclusion, nous avons décidé de poursuivre les synthèses en utilisant le 1,2dichloroéthane comme solvant de bromation.



Schéma 40: Tests de substitution de CCl<sub>4</sub>

La purification des produits issus de la bromation par chromatographie sur colonne de silice étant assez délicate, compte tenu des Rf très proches des composés mono- et di-bromés (8/2) il a été décidé de réalisé l'étape de formation de l'alcool **188** directement sur le brut (Schéma 41). Lors de ce test, nous constatons la disparition totale des dérivés bromés et la formation de deux produits l'alcool **188** et l'aldéhyde **186**. Nous avons poursuivi la synthèse avec le mélange des deux produits sachant qu'ils conduiront tous les deux à l'acide lors de l'oxydation de Jones.



Schéma 41: Formation de l'alcool avec le brut issu de la bromation

L'acide **180** a donc été préparé en quatre étapes à partir de l'acide 162 avec un rendement global satisafaisant de 49%.

Nous avons donc mis au point une méthode efficace pour préparer les acides **180** et **181** nécessaires à la synthèse des pyrroles.

## 5.3.2 Acylation de Friedel et Crafts

Comme expliqué dans la partie bibliographie, nous avons envisagé de préparer les deux régiosiomères des pyrroles **156** et **157** par une réaction de Friedel Crafts à partir des synthons **192**, **193** et **99** (Schéma 42).



Schéma 42: Retrosynthèse des pyrroles 156 et 157

Afin de mettre au point la synthèse, nous nous sommes tout d'abord intéressé à la préparation du pyrrole **156**.

La première étape consiste à préparer le chlorure d'acide **192** à partir de l'acide **180**. Deux méthodes de synthèse ont été tentées, la première (voie A, Schéma 43) est réalisée en présence de chlorure d'oxalyle catalysé au DMF et la deuxième (voie B, Schéma 43) est réalisée en présence de chlorure de thionyle. Les deux synthèses ont permis l'obtention du chlorure d'acyle **192** souhaité avec un rendement quantitatif.



Schéma 43: Synthèse du chlorure d'acide 192

Le chlorure d'acide **192** ayant ainsi été obtenu, des essais d'acylation de Friedel et Crafts ont été réalisés, sous atmosphère inerte en présence de chlorure de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) dans du 1,2-dichloroéthane au reflux.

L'acylation à partir du chlorure d'acide **192** obtenu à partir de la voie A, ne conduit pas à l'obtention du produit désiré **176** (Schéma 44). Nous observons la présence de l'acide de départ **180** et du diester **195** ainsi que des aldéhydes **193** et **194**, issus du pyrrole de départ **99** par une réaction de Vielsmeier.



Schéma 44: Acylation de Friedel et Crafts après la synthèse de 192 par la voie A

Le deuxième essai d'acylation est réalisé avec le chlorure d'acide obtenu par la voie B (Schéma 45). Cette synthèse a permis l'obtention du dérivé cétone **176** voulu, ainsi que son isomère **178** avec des rendements respectifs de 33% et 45% (Schéma 45). Nous observons

également après séparation par chromatographie flash, la présence de l'acide **180** issu de l'hydrolyse du chlorure d'acide **192** en excès, ainsi que la présence du diester **195** (3%).



Schéma 45: Synthèse de la cétone 176 à partir de 192 obtenu par la voie B

## 5.3.3 Formation de la molécule finale 110

Cette étape consiste en l'élimination du groupement cétone de **176** pour obtenir le pyrrole **196**. Pour cela un premier test d'élimination directe du groupement cétone a été réalisé en présence de triethylsilane et d'acide trifluoroacétique qui joue aussi le rôle de solvant.<sup>151</sup> Ces conditions n'ont permis d'obtenir le pyrrole **196**, en effet nous retrouvons la cétone **176** sur le spectre RMN du brut. Au vu de cet échec, nous avons réalisé un deuxième test en ajoutant de l'acide triflique comme catalyseur et du dichlorométhane comme solvant aux conditions du premier test (triethylsilane, l'acide trifluoroacétique). Ce deuxième test n'a pas permis d'obtenir le produit désiré (Schéma 46).



Schéma 46: Tests d'élimination directe de la cétone pour obtenir 37a

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, nous avons envisagé une autre voie de synthèse en réduisant la cétone en alcool<sup>181</sup> suivi d'une hydrogénation (Schéma 47).<sup>182</sup> L'alcool **197** est obtenu après réduction par du tetrahydroborure de sodium de la cétone **176** avec un rendement de 81%, suivi d'une hydrogénation catalytique sur palladium sur charbon qui permet d'éliminer l'alcool secondaire avec un rendement de 73%. Le pyrrole **196** souhaité est donc obtenu à partir de la cétone **176** avec un rendement de 59% sur deux étapes (Schéma 47).



Schéma 47: Synthèse du pyrrole 196

L'étape suivante est l'étape d'alkylation de l'azote du pyrrole par le 3-bromobutyrate d'éthyle qui est réalisée de la même manière que celle du fragment **91** (Chapitre 4, 2.2.2). Le pyrrole alkylé **198** est obtenu avec un rendement de 58%. Cette étape est suivie de la déprotection de l'alcool protégé par le groupement méthoxy en présence de tribromure de bore à -78°C ce qui conduit au dérivé **199** avec un rendement de 98% (Schéma 48).
Chapitre 4 : Fragment-based drug design



Schéma 48: synthèse du pyrrole 199

L'alcool **199** ayant été obtenu, la saponification (Schéma 49) a été réalisée en présence d'hydroxyde de lithium dans du THF avec une ou deux gouttes d'eau pour permettre la solubilisation du LiOH.Le pyrrole **110** a été identifié en LC-MS en mélange avec des produits pas totalement saponifié. Une purification par HPLC préparative a été réalisée, cependant nous n'avons pas réussi à obtenir le produit désiré **110** avec une pureté suffisante pour réaliser les tests biologiques.



Schéma 49: Etape de saponification

#### 5.3.4 Formation des isomères 108, 109 et 175.

La synthèse que nous venons de présenter a ensuite été appliquée pour la synthèse des pyrroles **108** (Schéma 50) et **109** et **175** (Schéma 51).

La cétone obtenue précédemment a été réduit par le tétrahydroborure de sodium pour obtenir l'alcool **201** avec un rendement de 50%. L'hydrogénation catalytique de celui-ci a conduit à la formation du pyrrole **202** avec un rendement de 65%. L'alkylation de l'azote du pyrrole a ensuite permis d'obtenir le pyrrole **203** avec un rendement de 67%, qui a ensuite été déméthylé par du tribromure de bore avec un rendement de 88%. Enfin la saponification a permis d'obtenir le produit avec un rendement de 8%. Ce faible rendement peut être expliquer par une faible stabilité du composé final lors de la saponification



Le pyrrole **108** a été obtenu en 5 étapes à partir de **178** avec un rendement global de 2%.

Le couplage entre les chlorures d'acides **193**, et le pyrrole **99**, conduit à la formation des régioisomères **205** et **206** avec des rendements respectifs de 40% et30%. La réduction par le tétrahydroborure de sodium des cétones **205**, **206** conduit aux alcools **207** et **208** avec des rendements similaires de 50 et 54%. L'hydrogénation de ces derniers conduit à la formation des pyrroles **209** et **210** avec des rendements respectifs de 50% et 88%, suivi de l'étape d'alkylation de l'azote pour donner les pyrroles **211** et **212** avec des rendements de 55% et 62%. L'étape de déprotection par le tribromure de bore donne les alcools **213** et **214** avec des rendements corrects de 87% et 88%. La saponification permet d'obtenir les composés voulus **109** et **175** avec des rendements de 41% et 20%.



Schéma 51: Synthèse des pyrroles 109 et 175

Les pyrroles **109** et **175** ont été obtenus en 6 étapes à partir de **193** avec des rendements globaux respectifs de 4% et 1%.

Les analyses effectuées sur les pyrroles **108**, **109**, **110** et **175** ont été compliquées par leur instabilité en solution. Il semblerait que les pyrroles **108** et **109** se transforment en composés cycliques représentés ci-dessous (Figure 78). Plusieurs molécules de ce type sont décrites dans la littérature.



Figure 78: Structure chimique du produit supposé après dégradation en solution

Nous pouvons également envisager que la liaison entre les deux aromatiques ne soit pas très stable et entraîne ainsi une dégradation du produit. Des études ont été menées pour caractériser les sous-produits de réaction, sans donner de résultats conclusifs.

Nous avons cependant réalisé les spectres RMN HSQC pour déterminer les interactions entre les molécules synthétisés et le domaine PDZ1 de PSD-95.

# 6 Evaluation par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Dans cette partie, nous allons discuter des résultats obtenus par HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N (Annexe 35 à 37) de la protéine marquée en présence des pyrroles **108, 109** et **175**, et les comparer aux résultats obtenus précédemment.

Les HSQC en présence des pyrroles **109** (Figure 79, A), **175** (Figure 79, B) et **108** (Figure 79, C) montrent qu'ils interagissent avec la protéine puisque nous constatons que les acides aminés perturbés par leur présence appartiennent à la poche PDZ. En effet, les acides aminés de la boucle GLGF (Gly 17), du feuillet  $\beta_2$  (Ser 19), de la boucle S1 (His 28) et de l'hélice  $\alpha_2$  (His 71) sont perturbés par ces pyrroles. Les trois pyrroles perturbent l'intégralité de la poche PDZ contrairement à l'indole **24** qui ne perturbe que le haut de la poche PDZ (Figure 79). Ces informations sont reportées dans le Tableau 12 et nous constatons que les

sommes des perturbations pour le pyrrole **109** ( $\Sigma\Delta\delta = 1.935$  ppm), le pyrrole **175** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.410$  ppm) et le pyrrole **108** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.455$  ppm) confirment qu'ils interagissent avec le domaine PDZ1 de PSD-95. Cependant le pyrrole **109** semble interagir avec moins d'affinité que l'indole **24** puisque sa somme est inférieure à celle de **24** ( $\Sigma\Delta\delta = 2.469$  ppm), contrairement aux pyrroles **175** et **108** dont les sommes sont équivalentes à celle de l'indole **24**.



Figure 79: Superposition des spectres RMN de 24, 108, 109 et 175 avec celui de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (bleu)/en présence du couple 109 (rouge), (C) seul (noir)/en présence du couple 108 (bleu) et (D) seul (noir)/en présence de l'indole 24 (vert)

	Acide aminés perturbés			Somme des	
Licondo	$GLGF + Feuillet \beta_2$	Boucle $\beta_2$ - $\beta_3$ (S1)	Ligands	Autros résidus porturbés	perturbations ΣΔδ (ppm)
Liganus	résidues 15-21	résidues 22-34	résidues 71-80	Autres residus perturbes	
5-HT2a	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	/
5-HT2c	G17, F18, S19, I20, A21	G22, G23, T24, D25, N26, H28	H71, S72, A73, V75, A77, L78, K79	A45, A46, Q48	/
24	G15, G17, F18, S19,	N26	A74, V75, E7, L78	R11, G12, I40, A45, A46, G82	2.469
109	G17, S19	H28, I29	H71, S72, V75, K79	G12, V54, L87	1.935
175	G17, F18, S19, I20	H28, I29	H71, S72, V75, L78, K79	G12, V54, V69, L87, V89	2.410
108	G15, G17, F18, S19, I20	H28, I29	H71, S72, V75, E76, A77, L78, K89	L87	2,452

Tableau 12: Acides aminés perturbés par les biligands

Une lecture plus détaillée du tableau montre que les pyrroles **108**, **109** et **175** occupent l'ensemble de la poche PDZ, en effet, les acides aminés de la boucle GLGF (Gly 17), du feuillet  $\beta_2$  (Ser 19), de la boucle S1 (His 28) ou de l'hélice  $\alpha_2$  (His 71, Leu 78) sont perturbés par ces molécules. Ceci est visible avec la représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ-1 perturbés par les pyrroles **108**, **109** et **175** (Figure 80).



Figure 80: Représentation 3D du domaine PDZ de PSD-95 avec les acides aminés perturbés par les fragments , (A) 108, (B) 109, (C) 175.

En comparant les résultats des HSQC avec ceux de la modélisation moléculaire, nous constatons que les interactions identifiées lors du *docking* semblent se confirmer en RMN, en effet nous retrouvons des interactions avec la Gly 17 et la Phe 18 de la boucle GLGF ainsi que l'interaction avec les His 28 et His 71 qui appartiennent respectivement à la boucle S1 et à l'helice  $\alpha_2$ .

Nous avons décidé de poursuivre les tests sur les pyrroles **108**, **109** et **175**, notamment pour déterminer si ces molécules pouvaient inhiber l'interaction entre PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>.

## 7 Conlusion

Le FBDD est une méthode de plus en plus utilisée en recherche pharmaceutique pour découvrir de nouvelles molécules chefs de file (*lead*), à partir de petits fragments, afin de concevoir de nouveaux principes actifs. Nous avons appliqué, pour la première fois, cette méthode aux protéines à domaines PDZ dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs d'IPP. Pour concevoir les fragments, nous avons choisi de « déconstruire » une molécule connue pour sa capacité à inhiber l'IPP entre 5-HT2a et PSD-95 et présentant une activité anti-hyperalgique. De plus, nous possédions une structure du complexe protéine/ligand. Nous avons ensuite évalué la capacité d'interaction des différents fragments en RMN HSQC puis de tous les couples de fragments possibles. Nous avons ainsi pu identifier les couples de fragments susceptibles d'interagir avec la protéine.

A partir de ces fragments, nous avons conçu des ligands virtuels qui ont été étudié par modélisation moléculaire (*docking*) nous permettant de mettre en évidence une dizaine de molécules présentant des interactions intéressantes ainsi qu'un positionnement favorable dans le site de la protéine. Parmi ces molécules, quatre ont été synthétisés, en utilisant un schéma de synthèse permettant facilement de générer différents régioisomères, pertinents pour les études ultérieures. Malheureusement ces composés ont montré une très faible stabilité en solution, ce qui a rendu très difficile, voire impossible les analyses nécessaires à l'évaluation biologique. Nous avons cependant pu évaluer la capacité d'interaction avec le domaine PDZ1 de PSD-95 et les premiers résultats sont très encourageants.

Nous avons développé donc une approche pertinente, en utilisant la méthode du FBDD, pour concevoir de nouveaux inhibiteurs d'IPP et plus particulièrement de protéines à domaines PDZ. Nous espérons, grâce à cette méthode, préparer de nouveaux antalgiques, inhibiteurs sélectifs de l'interaction entre PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5- $HT_{2A}$ .

# TRAVAUX PARALLELES

# CHAPITRE 5

#### SOMMAIRE

1	Intro	oduction	193
2	Ana	nalyse des tripeptides	
	2.1	Analyse par RMN HSQC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N	194
	2.2	Simulation par Modélisation moléculaire	197
	2.3	Analyse par ITC	199
3	Con	clusion	202

# **Chapitre 5 : Tripeptides**

#### Préambule

Lors d'une mission à Liverpool, j'ai eu l'occasion de réaliser les analyses ITC de ce chapitre. Pour des raisons de facilité de lecture, nous définirons, dans ce chapitre, les acides aminés par des simples lettres.

# **1** Introduction

Nous avons montré, dans le chapitre 1, que les interactions les plus importantes, notamment en terme de sélectivité, entre les différents domaines PDZ et leurs ligands endogènes concernent les résidus (0) et (-2). Il semblerait donc qu'un tripeptide serait suffisant pour interagir de façon significative avec la protéine. Cependant, la plupart des études qui portent sur les interactions protéine-protéine, impliquant les protéines à domaine PDZ, sont réalisées à l'aide de tetrapetides ou de peptides plus longs allant jusqu'à douze acides aminés. Nous n'avons pas trouvé, à ce jour, d'étude faisant état de l'utilisation d'un tripeptide pour identifier les interactions importantes avec la protéine ainsi que les pharmacophores essentielles à l'interaction.

Dans ce cadre, nous avons décidé de mener une étude sur PSD-95 à l'aide de divers tripeptides afin de montrer si un tripeptide présente un pharmacophore suffisant, mais également de tirer des informations sur les types d'interactions nécessaires pour obtenir un inhibiteur efficace d'interactions protéine-protéine.

# 2 Analyse des tripeptides

Dans cette étude, nous avons testé plusieurs tripeptides commerciaux correspondant aux extrémités C-terminales de différents ligands endogènes. Dans un premier temps, nous avons envisagé de nous intéresser aux extrémités C-terminales de 5- $HT_{2A}$ , tripeptide SCV et de 5- $HT_{2C}$ , tripeptide SSV. Ensuite nous avons décidé de tester les deux tripeptides TQA et TQV similaires aux extrémités C-terminales de GluR6 (TMA) et de Kv1.1 et Kv1.4 (TDV). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les résidus impliqués dans les interactions sont essentiellement les résidus (0) et (-2). Ces composés ont d'abord été criblés par RMN HSQC, puis une étude de modélisation moléculaire a été réalisée pour déterminer leur capacité à se lier au domaine PDZ, puis une étude de modélisation moléculaire a été menée et enfin des études en ITC pour déterminer leurs constantes d'affinités ont été menées.

Ligand PDZ (9 acides aminés du C-terminal)	Tripeptide testé correspond ou similaire
5-HT <sub>2A</sub> (GVNEKVSCV)	SCV ( <b>215</b> )
5-HT <sub>2C</sub> (VVSERISSV)	SSV ( <b>216</b> )
GluR6 (RLPGKETMA)	TQA ( <b>217</b> )
Kv1.1 (NKSKLLTDV) et Kv1.4 (NAKAVETDV)	TQV ( <b>218</b> )

Tableau 13: protéine d'origine des tripeptides



Figure 81: Structure chimique des tripeptides 215, 216, 217 et 218

### 2.1 Analyse par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N

Nous allons, dans cette partie, interpréter les spectres RMN HSQC en présence de ces différents tripeptides avec le domaine PDZ1 de PSD-95 (Figure 82). Les spectres vont nous indiquer les acides aminés perturbés par les tripeptides lors de l'interaction avec le domaine PDZ et ainsi nous donner une idée de leur positionnement dans celui-ci. Grâce à ces informations nous pourrons identifier les pharmacophores indispensables à l'interaction entre la protéine et le ligand, notamment en comparant les acides aminés perturbés en fonction de la nature des acides aminés des tripeptides.

Nous constatons, d'après les spectres RMN (Figure 82) que les peptides SCV et SSV perturbent les acides aminés de la boucle GLGF (Gly 17, la Phe 18). L'His 71 de l'hélice  $\alpha_2$  ne semble pas, quant à elle, perturbée par ces tripeptides, ce qui implique que la liaison hydrogène n'est pas assez forte pour perturber cet acide aminé. Le peptide TQA présente des interactions faibles avec le domaine PDZ1 de PSD-95. En effet les acides aminés de la boucle GLGF ne sont que très peu perturbés tout comme l'His 71. Le peptide TQV, quant à lui, perturbe beaucoup les acides aminés de la boucle GLGF notamment la Gly 17 et la Phe 18 pour lesquels les différences de déplacements chimiques sont importantes, encore plus importantes que ceux des peptides SCV et SSV. Nous constatons également que l'His 71 n'est que très peu perturbée par ce peptide mais que l'His 28 ainsi que l'Ile 29 sont plus perturbés par ce peptide que par les peptides précédents.



Figure 82: Superposition des spectres RMN de 215, 216, 217 et 218 avec celui de PSD-95 PDZ1 : (A) seul (noir)/en présence du tripeptide 215 (rouge), (B) seul (noir)/en présence du tripeptide 216 (rouge), (C) seul (noir)/en présence du tripeptide 217 (rouge) et (D) seul (noir)/en présence du tripeptide 218 (rouge).

En conclusion sur ces spectres RMN, nous constatons que les peptides sont capables d'interagir avec la protéine notamment avec la boucle GLGF. En comparant les HSQC, nous pouvons dire que le résidu hydrophobe en (0) est important pour faire ses interactions. En effet, il semble nécessaire que le résidu en (0) possède une partie hydrophobe relativement encombrante pour pouvoir interagir avec la poche hydrophobe de PSD-95, comme c'est le cas pour le ligand endogène. En comparant les tripetides TQA **217** et TQV **218**, nous constatons que l'alanine n'est pas assez encombrante pour faire des interactions efficaces contrairement à la valine (Tableau 14). Nous constatons également que les peptides ne font, pour ainsi dire, aucune liaison hydrogène avec l'His 71, ce qui peut être du aux interactions hydrophobes et ioniques du résidu (0) du tripeptide avec le GLGF qui le tire vers le haut de la poche au détriment de l'interaction hydrogène avec l'His 71 (Figure 83)

Acide aminé	Volume (A <sup>3</sup> )	logP
Ala	8,86	-2,69
Val	140,0	-1,38

Tableau 14: Comparaison des volumes et des lipophilies des acides aminés Ala et Val



Figure 83: Placement supposé du tripeptide TXV dans le poche

Afin de vérifier cela nous avons décidé de faire une analyse de dynamique moléculaire pour voir comment pourraient se positionner les tripeptides au sein de la protéine.

#### 2.2 Simulation par Modélisation moléculaire

#### Cette partie à été réalisée par Lionel Nauton

Dans cette partie, la dynamique moléculaire (10 ns) a été réalisée sur les quatre tripeptides, auxquels nous ajoutons le peptide TSV pour vérifier si le résidu en (-1) a un impact sur l'interaction avec la protéine.





La dynamique moléculaire du peptide SCV **215** nous indique que le peptide ne reste pas dans la poche PDZ jusqu'à ne faire aucune interaction avec la protéine ( $E \approx 0$  kcal/mol) pendant environ 2.5 ns (Figure 84, A). Nous retrouvons une interaction sur la fin de la dynamique avec les résidus Lys 138 et Glu 135 qui sont des résidus situés en dehors de la poche d'interaction PDZ, ce qui lui permet d'avoir une énergie moyenne d'interaction de -49.1 kcal/mol.

Le peptide SSV **216** (Figure 84, B) reste, quant à lui, en contact avec la poche PDZ pendant toute la durée de la dynamique (10 ns), même si les interactions avec celle-ci changent au cours de la dynamique. Ce qui n'est pas le cas pour l'interaction hydrophobe de la Val (0) qui est constante au cours de la simulation. La moyenne de l'énergie d'interaction est de -45.6 kcal/mol.

L'énergie moyenne d'interaction pour le peptide TQA **217** (Figure 84, C) est de -91.2 kcal/mol. Ceci s'explique par l'interaction forte de la fonction acide (COOH) de l'Ala (0) avec la boucle GLGF qui est stable tout au long de la dynamique. De plus, le remplacement de la Ser (-2) par une Thr (-2) permet une interaction forte entre son oxygène et le NH de l'Ile 20 très stable dans le temps. Cette interaction force le méthyle à se placer dans la poche de manière à former des interactions hydrophobes.

L'énergie moyenne d'interaction pour le peptide TQV **218** (Figure 84, D) est de -62.3 kcal/mol. Nous constatons que cette interaction est très stable pendant toute la dynamique, ce qui peut être corrélé avec le positionnement de la Val (0) dans la poche PDZ. Nous remarquons une plus grande stabilité du peptide dans la poche, mais l'énergie moyenne d'interaction est plus faible que pour le peptide TQA. Il semblerait donc que l'utilisation d'un résidu hydrophobe plus petit que la Val permette une meilleure adaptation et donc une meilleure interaction avec la poche PDZ.

La dernière dynamique qui a été réalisée est celle du peptide TSV **219** (Figure 84, E) qui possède une énergie d'interaction moyenne de -49.9 kcal/mol. Nous constatons une grande stabilité de l'interaction pendant toute la dynamique, ce qui semble confirmer le choix de la Thr (-2) pour avoir une meilleure accroche dans la poche PDZ. La Val (0) interagit avec le domaine PDZ1 de PSD-95 soit de façon directe avec d'autres résidus, comme des Gly ou des Lys, soit via des molécules d'eau présentes dans le modèle.

Cependant les dynamiques de TQV **217** et TSV **218** ne nous permettent pas de déterminer si le résidu en (-1) joue un rôle important dans l'interaction avec la protéine.

La dynamique nous a permis de confirmer qu'il était important que le peptide possède une fonction acide sur le résidu (0) même si cette fonction peut induire des interactions avec d'autres acides aminés de la protéine dans la poche. Une seconde information que nous avons pu tirer de cette dynamique est le fait qu'un résidu Thr (-2) permet de faire des interactions plus stables avec la protéine grâce au méthyle qui va former une interaction hydrophobe avec l'Ala 73 ou la Val 75

Parmi les quatre tripeptides étudiés à la fois en RMN et par modélisation moléculaire, nous constatons que le tripeptide TQV **218** est celui qui présente l'interaction la plus stable tout au long de la dynamique et celui qui présente les interactions els plus fortes avec les acide aminées de la boucle GLGF.

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de poursuivre l'étude en déterminant des constantes de dissociation pour ces tripeptides en ITC.

#### 2.3 Analyse par ITC

Nous allons dans cette partie, utilisé l'analyse par ITC pour étudier les interactions entre la protéine PDZ et les peptides et déterminer des constantes de dissociation. Pour réaliser ces analyses, la protéine PSD-95 PDZ1 n'étant pas disponible, nous avons réalisé les tests sur SAP97 qui est également une protéine à domaine PDZ dont la séquence est similaire à celle de PSD-95 (90% d'homologie pour PDZ1), comme nous le constatons sur de l'alignement des séquences de celles-ci. (Figure 85). Nous constatons, en ce qui concerne la poche PDZ, qu'il y a deux acides aminés apolaires et hydrophobes qui sont différents entre les deux protéines. Une des Pro de la boucle S1 est remplacée par une Ser qui est un acide aminé polaire, et une des Ala de l'hélice  $\alpha_2$  est remplacé par une Lys qui est un acide aminé basique.



Figure 85: alignement des séquences de PSD-95 PDZ1 (PDB: 1IU2) et SAP-97 PDZ1 (PDB: 1ZOK)

Pour réaliser cette étude calorimétrique, nous avons choisi d'utiliser les tripeptides SSV **215** et SCV **216** qui correspondent aux C-terminaux de 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>. Nous avons ensuite choisi d'étudier le tripeptide TQV **218** qui présente les meilleurs résultats en RMN HSQC, et la plus grande stabilité dans la poche PDZ lors de la dynamique moléculaire même si ce n'était pas lui qui avait la plus grande énergie d'interaction. Nous avons également étudié les constantes de dissociation de deux autres peptides commerciaux, le pentapeptide RETQV **220** et le nonapeptide LQRRRETQV **221**, afin de mettre en évidence l'influence de la longueur du peptide sur l'affinité avec la protéine. Ces peptides ont donc été testés en ITC avec la protéine SAP-97 PDZ1 selon le principe expliqué dans le chapitre 3.

Les courbes d'interaction ITC avec les peptides SCV **215** (Figure 86, A) et SSV **216** (Figure 86, B) ne montrent pas de liaison avec la protéine. En effet, nous ne constatons pas de libération ou d'absorption de chaleur suffisante au cours de l'expérience pour déterminer une constante de dissociation.

Sur le graphe de l'ITC de TQV 218 (Figure 86, C), nous voyons clairement une libération de chaleur ce qui signifie que le peptide se lie avec le domaine PDZ1 de SAP-97. Ce graphe nous permet de tracer la courbe en fonction du ratio molaire, qui nous permet de déterminer la constante de dissociation pour TQV et SAP-97 PDZ1 qui est égale à  $284.09 \pm$ 306.75 µM. Cependant, la courbe n'est pas sigmoïdale comme les courbes habituellement obtenues, le calcul du K<sub>d</sub> peut présenter des incertitudes. Afin de valider l'efficacité du tripeptide dans la détermination de constante de dissociation par ITC, nous avons décidé de continuer les études avec le pentapeptide 220 (RETQV) et le nonapeptide 221 (LORRRETOV). Le graphe du pentapeptide en fonction du changement de température montre bien que celui-ci se lie à la protéine (Figure 86, D), nous observons même le phénomène de saturation en peptide dans le milieu d'étude, ce qui signifie que le peptide s'est complètement lié avec SAP-97 PDZ1. Ces données nous ont permis de tracer la courbe en fonction du ratio molaire et donc de déterminer la constante de dissociation à  $3.18 \pm 46.51$ µM. Pour le nonapeptide (Figure 86, E) nous avons le même type de données, même si la saturation en peptide n'est pas complètement atteinte en fin d'analyse, ce qui nous donne une courbe sigmoïdale moins bien résolue que celle du pentapeptide. Nous avons quand même pu calculer la constante de dissociation qui est de  $8.00 \pm 63.69 \mu$ M.



Figure 86: Courbes d'interaction ITC du domaine PDZ1 de SAP-97 (100 µM) avec différents peptides (750 µM), (A) SCV 215, (B) SSV 216, (C) TQV 218, (D) RETQV 220, (E) LQRRETQV 221.

Peptides	K <sub>d</sub> (µM)
SCV (215)	Non déterminé
SSV (216)	Non déterminé
TQV (218)	$284.09 \pm 306.75$
<b>RETQV (220)</b>	$3.18\pm46.51$
LQRRRETQV (221)	8.00 ± 63.69

Tableau 15: Récapitulatif des Kd déterminés à partir des analyses ITC

Ces analyses en ITC, nous ont permis de montrer que les interactions provoquées par les tripeptides sont trop faibles pour fournir une constante de dissociation fiable ( $K_d = 284$  $\mu$ M) par rapport aux pentapeptide ( $K_d = 3 \mu$ M) et nonapeptide ( $K_d = 8 \mu$ M). Nous constatons également qu'une meilleure résolution de la courbe ITC est obtenue dans le cas du pentapeptide mais nous obtenons le même ordre de grandeur avec le nonapeptide. Les meilleures affinités qui sont observées avec les peptides plus longs peuvent également être expliquées par le nombre d'interactions créé entre les peptides et le domaine PDZ. En effet, en augmentant la longueur du peptide, le nombre d'interaction avec le domaine va également augmenter.

# 3 Conclusion

Cette étude a permis de confirmer l'importance des résidus (0) et (-2) pour interagir avec le domaine PDZ. Elle a également permis de mettre en avant le fait qu'un tripeptide pouvait être suffisant pour obtenir des informations sur le type d'interaction ainsi que dans la détermination de constante de couplage par ITC.

Les différents résultats obtenus à la fois par RMN, dynamique moléculaire et ITC montre que parmi les tripeptides étudiés, le peptide qui présente la meilleure affinité avec la protéine PSD-95 est le tripeptide TQV **218**.

Nous pouvons donc en déduire que les études par dynamique moléculaire donne des résultats particulièrement fiables et pourront donc être utilisé pour concevoir de nouvelles molécules à partir des interactions mises en évidence.

# CHAPITRE 6

# SOMMAIRE

1	Intro	oduction	
2	Mod	lélisation	
3	3 Synthèse		214
4	Eval	uation biologique du pentapeptoïde 224	216
	4.1	Evaluation par RMN	216
	4.2	Evaluation in vitro	
5	Con	clusion	219

# Chapitre 6: Les peptoïdes

### **1** Introduction

Les peptoïdes ou glycines *N*-substituées sont des oligoamides introduits par Zuckermann<sup>183</sup> il y une vingtaine d'années. Ce sont des mimes de peptides, la différence réside dans le fait que la chaîne latérale des acides aminés n'est pas portée par le carbone en alpha des fonctions amides mais par l'azote de cette fonction amide (Figure 87).<sup>105</sup> Les peptoïdes présentent également des propriétés pharmacologiques intéressantes, comme une meilleure stabilité métabolique ou une meilleure perméabilité membranaire.<sup>184</sup> Un autre atout majeur des peptoïdes, par rapport aux autres mimes de peptides, vient de leur facilité de synthèse par la méthode submonomère qui permet d'introduire une grande variété de chaines latérales, puisque cette synthèse repose sur l'utilisation d'amines primaires.<sup>105</sup>





Figure 87: Peptide et peptoïde

Les peptoïdes ont déjà fait leur preuve en chimie médicinale. En effet, des tripeptoïdes ont montré des affinités de l'ordre du nanomolaire avec des récepteurs aux opiacés ou adrénergiques (Figure 88).<sup>185</sup> Des études montrent également que les propriétés des peptoïdes ont permis de monter leur potentiel pour mimer les ligand d'interactions protéine-protéine.<sup>186</sup>



Figure 88: Tripeptoïdes se liant au récepteurs opioïdes<sup>185</sup>

C'est dans ce cadre que nous avons décidé, en collaboration avec l'équipe du Pr Claude Taillefumier (ICCF), de débuter une étude sur les peptoïdes comme inhibiteurs potentiels de l'interaction entre la protéine PDZ PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5- $HT_{2A}$ . Comme lors des études précédentes, une étape de modélisation moléculaire a été réalisée afin de mettre en évidence les peptoïdes présentant les meilleures interactions avant la synthèse des composés puis leur évaluation par RMN. Chapitre 6 : Les peptoïdes

### 2 Modélisation

Ces travaux ont été réalisés par Lionel Nauton

L'étude sur les peptoïdes a commencé par une étape de modélisation moléculaire afin d'identifier un peptoïde mime du peptide ligand 5-HT<sub>2A</sub> qui se lierait avec le domaine PDZ1 de PSD-95.



Figure 89: Représentation en 3D des interactions entre 5-HT2a et PSD-95 PDZ1

Une étude de dynamique moléculaire entre le domaine PDZ1 de PSD-95 et l'extrémité C-terminale de 5-HT<sub>2A</sub> a permis d'identifier des interactions fortes et stables dans le temps entre les squelettes des deux protéines par liaisons hydrogène (Figure 91). En effet, en regardant les distances ( $\approx 2$  Å) entre la fonction carbonyle de la Ser (-2) de 5-HT<sub>2A</sub> et le NH de l'Ile 20 du feuillet  $\beta_2$  de PSD-95 ainsi que la distance entre le carbonyle de l'Ile 20 et du NH de la Ser (-2), nous constatons de fortes liaisons hydrogènes entre ces deux résidus qui sont stable sur toute durée de la dynamique moléculaire (Figure 91), ce qui permet au peptide de rester ancré dans la poche PDZ. D'autres interactions ont également été observées avec la boucle GLGF ou encore l'His 71 de l'hélice  $\alpha_2$ . Ces informations sont en accord avec l'importance du résidu en (-2) dans l'interaction avec le domaine PDZ.



Figure 90: interactions entre l'Ile 20 de PSD-95 PDZ1et la Ser (-2) de 5-HT2a



Figure 91: Distance entre l'Ile 20 et la Ser (-2), en rouge la distance A et en bleu la distance B.

Ensuite plusieurs peptoïdes ont été créés virtuellement (*de novo design*) pour être ensuite évalués en dynamique moléculaire et ainsi identifier les composés qu'il serait intéressant de synthétiser. Pour la conception des peptoïdes, il a été décidé de partir des liaisons hydrogène essentielles existantes entre les fonctions amides de l'Ile 20 et de la Ser (-2) afin de conserver cette stabilité dans la poche PDZ.

Les peptoïdes sont des mimes de peptides qui possèdent une chaîne latérale sur l'azote de leur fonction amide. Ces chaines latérales sont alors décalées d'un atome sur le squelette des peptoïdes par rapport aux peptides lors de la conception de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale (Figure 92). Compte tenu de ces faits et afin de mimer au mieux l'extrémité C-terminale de 5-HT2a, nous nous sommes intéressés à la conception de retropeptoïde, ce qui correspond à la conception d'un peptoïde du N-terminale vers le C-terminale (Figure 92). Ainsi, les chaines latérales présentes sur les fonctions amides seront à nouveau orientées de la même façon que sur le peptide de départ, et le retropeptoïde devrait interagir avec la boucle GLGF par son extrémité N-terminale tout en gardant la superposition des cétones.



Figure 92: Différence entre un peptide, un peptoide et un retropeptoide

#### Chapitre 6 : Les peptoïdes



Figure 93: Représentation 3D des interactions entre PSD-95 PDZ1 et le peptoïde 224

Plusieurs peptoïdes ont été construits et étudiés par dynamique moléculaire afin de concevoir le peptoïde présentant les interactions les plus stables avec le domaine 1 de PSD-95. Ces études ont permis l'identification du pentapeptoïde **224** qui possède cette interaction entre le carbonyle du résidu (-3) du peptoïde, ici un mime de Val et l'Ile 20 de PSD-95 (Figure 94 et Figure 95). Des interactions sont aussi détectées avec la boucle GLGF et l'His 71.



Figure 94: Différence des interactions entre le peptide de 5-HT2A et la protéine PSD-95 e PDZ et le retropeptoïde et la protéine PSD-95 PDZ1.



Nombre d'images

Figure 95: Distance entre le NH de l'Ile 20 et le C=O du mime de la Val du retropeptoïde 224

Le pentapetoïde ayant été conçu, il été décidé de le synthétiser afin de pouvoir évaluer sa capacité à perturber la protéine par RMN HSQC.

### 3 Synthèse

#### Ces travaux ont été réalisés par Sarra Zekri (Stage M2, début 2015)

Le peptoïde conçu par modélisation a été synthétisé par la méthode submonomère en deux étapes de manière itérative en solution (Schéma 52). La première étape de cette synthèse correspond à une réaction d'acylation qui va permettre la création de la liaison peptidique **B** ainsi que l'introduction d'un carbone électrophile substituable, réalisé ici avec l'anhydride bromoacétique en présence de triethylamine. La deuxième correspond à une substitution nucléophile à l'aide d'amines primaires substituées avec la chaine latérale désirée pour donner **C**.



Schéma 52: Principe de la synthèse submonomère en solution

L'utilisation de cinq aminés primaires (225 - 229) a été nécessaire pour réaliser la synthèse du pentapeptoïde (Figure 96). Ces amines permettront ainsi de mimer les acides aminés, en effet, l'acide aspartique est mimé par la Gly 225, l'acide glutamique par l'amine 226, la Thr par l'aminopropan-2-ol 228, la leucine par l'isobutylamine 227 et l'Ala par la méthylamine 229.



Figure 96: Amines primaires utilisées dans la synthèse du pentapeptoïde

Avant de réaliser la synthèse du pentapeptoïde **224**, il a été nécessaire de protéger les fonctions acides de la Gly **230** et de l'Ala **231** ainsi que la fonction alcool de l'aminopropan-2-ol **228** pour éviter des réactions secondaires. Ainsi, les deux acides ont été protégés sous la forme d'ester tertbutylique **236** et **237** avec des rendements 39% et 38% et l'alcool sous la forme d'un éther silylé avec un rendement de 95% (Schéma 53).



Schéma 53: protection des acides 234-235 et alcool 236



Schéma 54: Synthèse du pentapeptoïde 224
La première étape de la synthèse du pentapeptoïde (Schéma 54) est la réaction de substitution nucléophile du 2-bromoacétate de *tert*-butyle par l'ester 3-aminopropanoate de *tert*-butyle **235** pour obtenir l'amine secondaire **238**. La molécule **238** est ensuite acylée par l'anhydride bromoacétique pour obtenir l'amine tertiaire **239**, qui est ensuite substituée par l'aminopropan-2-ol protégé **236** pour donner le composé **240**. Les deux dernières étapes sont répétées encore trois fois avec les amines **234**, **227** et **229** avant les étapes de déprotection des acides et de l'éther de silyle pour obtenir le pentapeptoïde **224** avec un rendement global sur étapes de 2%.

#### 4 Evaluation biologique du pentapeptoïde 224

#### 4.1 Evaluation par RMN

La synthèse du peptoïde **224** ayant été réalisée, celui-ci a été évalué en RMN HSQC avec le domaine PDZ1 de PSD-95 afin de vérifier sa capacité à perturber la protéine.

D'après le spectre HSQC, nous constatons que de nombreux acides aminés sont perturbés de manière significative par le peptoïde **224.** En effet, nous observons la perturbation d'acides aminés de la totalité de la poche PDZ, la Gly 17 et la Phe 18 de la boucle GLGF, l'Hid 28 et l'Ile 29 de la boucle S1, la Ser 19 du feuillet  $\beta_2$ , et l'His 71 de l'hélice  $\alpha_2$ .





#### Chapitre 6 : Les peptoïdes

Ces informations sont confirmées par la représentation en 3D des acides aminés de PSD-95 PDZ1 par le peptoïde **224** (Figure 98). En effet, nous constatons que la quasi-totalité des acides aminés de la poche PDZ constituée de la boucle GLGF, du feuillet  $\beta_2$ , de la boucle S1 et de l'hélice  $\alpha_2$  sont perturbés par le peptoïde.



Figure 98: Réprésentation 3D PSD-95 avec 224

Au vu de ces résultats, il a été décidé d'évaluer sa capacité à inhiber l'interaction entre la protéine PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5- $HT_{2A}$ . (IGF Montpellier)

#### 4.2 Evaluation in vitro

L'évaluation de la capacité du peptoïde à inhiber l'interaction entre la protéine PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> a été réalisée.

Les résultats obtenus montrent que le peptoïde **224** présente une affinité apparente avec PSD-95 meilleur que tous les indoles que nous avons testés par cette méthode antérieurement. Comme l'indole **49**, il inhibe partiellement l'interaction entre PSD-95 et 5- $HT_{2A}$ , contrairement à l'indole **24**. Comme nous pouvons le constater sur la Figure 99, il présente une inhibition d'environ 40% à une concentration de  $10^{-3}M$ , ce qui correspond au double d'inhibition par rapport à l'indole **49**. Il serait probablement nécessaire de refaire le test avec l'indole **24** comme témoin afin de vérifier la validité des tests, compte tenu des résultats obtenus pour l'indole **224** par RMN.



Figure 99: Gel de chromatographie d'affinité à différentes concentrations de 224



Figure 100: Pourcentage de PSD-95 PDZ1 recruté par 5-HT2A en l'abscence de l'indole 49 et du peptoïde 224

#### 5 Conclusion

Nous avons dans ce chapitre utilisé une stratégie peptidomiétique pour developper des nouveaux inhibiteurs d'interactions prottéine-protéine. Nous avons tout d'abord réalisé une étude par dynamique moléculaire afin de determiner les interactions indispensables pour que le peptide se lie à la protéine, puis un pentapeptoïde a été conçu à partir de ces données. Les résultats obtenus par RMN sont très encourageants.

Cette stratégie nous semble très prometteuse. Nous envisageons d'optimiser le peptoïde soit, en remplaçant un à un les monomères dans le but d'identifier monomères indispensables (pharmacophore) ou optimiser son interaction avec le domaine PDZ, soit en réduisant sa taille (MW < 500 Da).

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### **Conclusion et Perspectives**

Les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans des interactions protéine/protéine, ce qui leur confère un rôle clé dans de nombreux mécanismes biologiques. Elles peuvent être impliquées dans diverses pathologies, telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer ou la douleur. Il a été démontré que certaines protéines PDZ sont surpexprimées chez des sujets neuropathiques et que l'interruption de l'interaction ente la protéine PSD-95 et divers ligands endogènes entraîne une réduction de différents types de douleur telle que la douleur chronique (récepteur NMDA) ou la douleur neuropathique (récepteur à la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>).<sup>73</sup> La conception de molécules permettant d'inhiber spécifiquement l'interaction entre la protéine PSD-95 et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> devrait donc permettre de développer de nouveaux composés pouvant être utilisés dans le traitement de douleurs neuropathiques (Figure 101).



Figure 101: Interaction entre la protéine PDZ PSD-95 et le récepteur de la sérotonine 5-HT2a, (A): Représentation schématique de l'interaction entre les deux protéines, (B) Représentation en 3D du domaine PDZ1 de PSD-95 en interaction avec l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (KVSCV)

Au cours de ce travail nous avons conçu différents inhibiteurs potentiels d'IPP en utilisant trois stratégies différentes.

La première stratégie a été de concevoir des analogues de l'indole **24**, composé présentant une activité antalgique particulièrement prometteuse.<sup>187</sup>



Figure 102: Indoles 24, 48 et 49

Nous avons, dans un premier temps, identifié les groupements fonctionnels indispensables à une interaction suffisante avec la protéine, par comparaison à la fois avec l'indole **24** et le C-terminale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Après une étude de relation structure/activité, nous avons choisi de synthétiser deux indoles **48 - 49** (Figure 102). Nous avons ainsi mis au point une méthode de synthèse versatile qui permet de préparer des analogues indoliques en peu d'étapes. Les molécules préparées ont été évaluées pour leur capacité à se lier à la protéine par RMN HSQC. Cette étude a montré que notre approche permet de préparer de nouveaux indoles présentant des interactions avec la protéine mais avec une orientation différente dans le site de la protéine PDZ.

Ces résultats sont très encourageants pour le développement d'inhibiteurs spécifiques. Les tests *in vivo* sont actuellement en cours. Si ces molécules présentent une activité antalgique chez le rat neuropathique, il faudra envisager de concevoir des molécules présentant des interactions à la fois avec la boucle GLGF et la boucle S1 du domaine PDZ, et de vérifier si ce type d'interaction rend l'inhibiteur spécifique.

La deuxième approche a consisté à adapter, pour la première fois à notre connaissance, la méthode du FBDD à des interactions protéine-protéine, et plus particulièrement aux protéines à domaines PDZ. Pour ceci, nous avons adopté une stratégie originale de déconstruction d'une molécule connue, de laquelle nous avons obtenu sept fragments. Les interactions de ces derniers ont été évaluées par RMN, puis une étude systématique de tous les couples de fragments a été menée. Nous avons pu ainsi identifier les couples de fragments présentant les meilleures interactions, à savoir avec les acides aminés présents au niveau de la boucle GLGF et des sites S0 et S1. Une étude par modélisation moléculaire nous a permis de sélectionner quatre molécules issues de l'assemblage de deux fragments ayant démontrés une interaction « additive » (Figure 103). Nous avons alors mis au point une voie de synthèse permettant de préparer les différentes régioisomères (Figure 103) dans le cadre d'une étude de relation structure/activité. Malheureusement l'instabilité des molécules finales ne nous a pas permis de poursuivre les évaluations biologiques. Nous avons cependant montré que trois d'entre elles présentent des interactions avec les acides aminées du site S0 et S1 du domaine PDZ étudié.



Figure 103: Structure chimique des molécules issues du fragment based

Cette étude nous a permis de valider l'efficacité de la méthode du FBDD dans le cas des protéines à domaines PDZ.

Parmi les molécules modélisées, d'autres molécules avaient attiré notre attention (Figure 104). Ces molécules présentaient des scores et des interactions similaires aux pyrroles préparés (Figure 103) et qui seraient probablement plus stables.



Figure 104: Molécules possible à synthétiser pour la suite du fragment based

Avec cette preuve de concept, nous pouvons imaginer l'application de cette stratégie FBDD en réalisant un criblage par RMN d'une bibliothèque de fragments, d'identifier les fragments qui se lient au site d'interaction de la protéine et de concevoir les ligands potentiels construits à partir de ces fragments.

Enfin, la troisième méthode a consisté à utiliser une stratégie peptidomimétique, en collaboration avec l'équipe du Pr. Taillefumier de l'ICCF. Après une étude de dynamique moléculaire sur l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub>, les interactions indispensables et stables dans le temps ont puis être identifiées et nous ont permis de concevoir le pentapeptoïde **224**. Les peptoïdes sont des composés qui miment les peptides naturels tout en présentant une meilleure stabilité et perméabilité



Figure 105: Peptoïde 224

L'évaluation par RMN HSQC montre que ce pentapeptoïde inhibe l'interaction entre PSD-95 et 5- $HT_{2A}$ , aussi bien que l'indole **24**. L'évaluation de l'activité antalgique de ce peptoïde est actuellement en cours. Par la suite, il faudrait envisager de préparer des analogues de ce peptoïde, afin d'identifier les monomères pharmacophores. L'idée étant de ne conserver que les monomères utiles et éventuellement de réduire la taille du peptoïde de façon

à obtenir une molécule plus « drug-like » (MW < 500 Da, nombre d'HBD <10 et nombre d'HBA <5).

Enfin, il serait intéressant de combiner les différentes stratégies de ces travaux afin de développer un inhibiteur sélectif qui irait se lier à la fois avec la boucle GLGF et la boucle S1, en concevant une molécule hybride qui possèderait un motif peptoide (Chapitre 6) lier avec une molécule de synthèse type indole (Chapitre 3) ou benzène-pyrrole (Chapitre 4) (Figure 106)



Figure 106: Motif des molécules possiblezs lors de la combinaison des différentes stratégies

## EXPERIMENTAL PART

## **Experimental Part**

"La partie expérimentale est rédigée en anlgais pour faciliter la redaction des publications"

#### **General remarks**

Thin layer chromatography was performed on TLC glass backed silica Duracil  $UV_{254}$  (Macherey Nagel). Solvents of elution depend on compounds polarity and are indicated in each case. Spots were visualised using UV light (254 nm) before using an ethanolic solution of *para*-anisaldehyde (heating).

Purification by column chromatography was carried out on silica gel Kieselgel 60 (0.073-0.230 nm).

Flash chromatography was performed with ARMEN Spot® and columns:

- Column A : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 4 g
- Column B : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 15 g
- Column C : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 25 g
- Column D : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 40 g
- Column E : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 80 g
- Column F : Chromabond RS 15 SiOH Macherey- Nagel, 120 g

Purity was controlled by HPLC (Agilent® serie 1600 (254 and 280 nm)) and >95%. Conditions used or purity of the product; column: Poroschell 120 EC-C18 2.7  $\mu$ m (3.0 x 50 mm); temperature column: 40°C; injection: 10  $\mu$ L, 1 mL/min; solvents used A-water with 0.1% formic acid and B-Acetonitrile (95:5 to 5:95).

Melting points were determined using a Buchi® apparatus and are given uncorrected.

#### Experimental Part

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Advanced spectrometer at 400 and 101 MHz. Chemical shifts  $\delta$  are reported in ppm relative to residual solvent. The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz). The abbreviations used for signal descriptions are as:

- s: singlet

- brs: broad singlet
- d: doublet
- t : triplet
- -q: quartet
- -p: quintuplet

High Resolution Electro-Spray Ionisation Mass Spectra (HR-ESI-MS) were obtained from the 'Centre Régional de Mesures Physiques de l'Université Blaise Pascal' (Clermont II).

#### **CHEMISTRY PART**

#### **General procedures**

.....

#### **Procedure A: Esterification and methylation**



 $R^1 = CO_2Me \text{ or }OMe$  $R^2 = OMe \text{ or }CO_2Me$ 

#### A

Under atmosphere of argon, potassium carbonate (2.5 eq.) and methyl iodide (2.5 eq.) were added to a solution of salicylic acid derivatives (1 eq.) in anhydrous DMF (0.35 M). The reaction was stirred for 20 h at room temperature, then filtered to remove potassium carbonate and concentrated to remove DMF. The resulting solid was dissolved in DCM and washed with H<sub>2</sub>O and brine. The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated *under vacuo* to give ester <u>A</u>.



To a stirred solution of ester <u>A</u> (1 eq) in 1,2-dichloroéthane (0.35 M), NBS (1.2 eq.) and AIBN (0.01 eq) were added. The reaction was stirred for 18 h under reflux, then diluted with diethyl ether and washed with NaOH (1M). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then concentrated under *vacuo*. The resulting solid was purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc) to give the brominated molecule <u>B</u>.

.....

#### **Procedure C: Hydroxylation**



#### <u>C</u>

To a stirred solution of halogenated compound <u>**B**</u> (1 eq.) in dioxane (0.25 M), a suspension of calcium carbonate (4.4 eq.) in H<sub>2</sub>O (0.25 M) was added. The reaction was stirred for 6.5 h at 103 °C then concentrated to remove dioxane. The resulting solid was dissolved in DCM and washed with HCl (1N). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated *under vacuo* to give the alcohol <u>**C**</u>.

#### **Procedure D: Jones Oxidation**



#### D

To a stirred solution of alcohol <u>C</u> (1 eq.) in acetone (0.10 M) at 0 °C, a mixture of  $CrO_3$  (5.3 eq.) and  $H_2SO_{4(C)}$  (9.2 eq.) in  $H_2O$  (3.0 M) was added dropwise. The reaction was stirred for 1 h at 0 °C, filtered over celite® then concentrated to remove acetone. The mixture was purified by trituration in  $H_2O$  to give the acid <u>D</u>.



#### **E, E'**

#### **Experimental Part**

To a stirred solution of the carboxylic acid  $\underline{\mathbf{D}}$  (1 eq.) in DCM (0.17 M), thionyl chloride (2 eq.) was added. The reaction was stirred for 4 h under reflux, and then concentrated to give the corresponding acyl chloride which was directly engaged into the next step.

To a solution of this intermediate and  $ZnCl_2$  (1eq.) in 1,2-dichloroethane (1 M) at 0°C under argon atmosphere, a solution of substituted pyrrole (0.5 eq.) in a minimal amount of 1,2dichloroethane was added. The mixture was stirred for overnight under reflux, poured onto ice, extracted twice with DCM, washed with H<sub>2</sub>O, HCl (1M) and brine. Then the mixture was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated and purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc) to obtain isomers <u>**E**</u> and <u>**E'**</u>.

#### **Procedure F: Reduction**



#### <u>F, F'</u>

To a solution of isomers  $\underline{\mathbf{E}}$  or  $\underline{\mathbf{E'}}$  (1 eq.) in MeOH (0.04 M), sodium borohydride (4 eq.) was added. The reaction was stirred for 2 h at room temperature, then concentrated to remove MeOH. The resulting solid was dissolved in DCM, washed successively with H<sub>2</sub>O, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated and purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc)to obtain the corresponding alcohols  $\underline{\mathbf{F}}$  and  $\underline{\mathbf{F'}}$ .

#### **Procedure G: Hydrogenation**



A solution of alcohols <u>**F**</u> or <u>**F'**</u> (1 eq.) and Pd/C (10 wt%, 0.3 eq.) in MeOH (0.10 M) was stirred overnight under a hydrogen atmosphere at room temperature. The mixture was filtered over celite® and concentrated to remove MeOH. The resulting solid was dissolved in DCM, washed with H<sub>2</sub>O, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated and purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc) to obtain the corresponding alkanes <u>**G**</u> and <u>**G'**</u>.

#### **Procedure H:** *N*-alkylation



 $R^1 = CO_2Me \text{ or }OMe$  $R^2 = OMe \text{ or }CO_2Me$ 

#### <u>H, H'</u>

To a solution of substituted pyrroles <u>**G**</u> or <u>**G'**</u> (1 eq.) in acetonitrile (0.04 M) were added cesium carbonate (2 eq.) and ethyl 3-bromobutanoate (1 eq.). The solution was heated under reflux overnight, and then concentrated *in vacuo* to remove acetonitrile. The residue was dissolved in DCM and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and then concentrated and purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc) to obtain the triesters <u>**H**</u> or <u>**H'**</u>.

#### **Procedure I: Deprotection of phenol**



To a solution of methoxy compounds <u>**H**</u> or <u>**H'**</u> (1 eq.) in dry DCM (0.45 M) at -78 °C, BBr<sub>3</sub> (1M in DCM) (4 eq) was added and the mixture was stirred at -78 °C for 1 h. The mixture was diluted with DCM and washed with saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl. The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> filtered, concentrated and purified by flash chromatography (gradient 100% Cyc/ 100% EtOAc) to obtain phenols <u>**I**</u> or <u>**I'**</u>.

#### **Procedure J: Saponification**



#### <u>J, J'</u>

To a solution of esters  $\underline{I}$  or  $\underline{I'}$  (1 eq.) in MeOH (0.01 M), KOH (67 eq., 5M in H<sub>2</sub>O) was added and the mixture was stirred overnight under reflux. Then the mixture was acidified with diluted HCl (5M) until pH was around 4 and concentrated under *vacuo*. The resulting solid was dissolved in DCM and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> filtered and concentrated to obtain the triacid  $\underline{J}$  or  $\underline{J'}$ .

#### **Procedure K: Saponification**



= OH or 
$$CO_2H$$

#### <u>K, K'</u>

Alternatively, to a solution of  $\underline{I}$  or  $\underline{I'}$  (1 eq) in THF (0.1 M) and a small amount of H<sub>2</sub>O, LiOH (10 eq) was added and the mixture was stirred at 50°C, and followed by HPLC until the consumption of all the starting material. Then the solvent was removed under *vacuo*. The resulting solid was dissolved in H<sub>2</sub>O, acidified with diluted HCl (1M) until pH was around 2/3 and then extracted in ethyl acetate. The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> filtered, concentrated and purified by preparative HPLC to obtain compound <u>K</u> or <u>K'</u>.

#### **Products**





 $C_{22}H_{21}NO_7 M = 411.4 \text{ g/mol}$ 

To a solution of indole **29** (50 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) in acetonitrile were added  $Cs_2CO_3$  (41 mg, 0.30 mmol, 2 eq.) and ethyl 3-bromobutanoate (CAS: 2969-81-5) (20 µL, 0.15 mmol, 1 eq.). The solution was heated to reflux for 48 h, then the solvent was removed and the mixture was directly engaged into the next step. MeOH (5 mL) and KOH (5 M) (2 mL) were added and the solution was heated to reflux for 12 h. The solution was neutralized with HCl (5 M), concentrated *in vacuo* and purified by trituration in H<sub>2</sub>O to give the desired triacid **24** as a yellow powder (25 mg, 0.06 mmol, 40%).

**Mp:** 240-250 °C (Dec).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.40$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH: 4/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.05 (s, 1H, H-7), 7.57-7.32 (m, 6H, 5 x CH<sub>ar</sub>, H-4), 5.28 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.61 (t, 2H, *J* = 8.0, CH<sub>2</sub>), 2.54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.27 (t, 2H, *J* = 8.0, CH<sub>2</sub>), 2.04 (qt, 2H, *J* = 8.0, CH<sub>2</sub>).

#### Methyl 2-hydroxy-4-iodo-5-nitrobenzoate

26



 $C_8H_6INO_5M = 322.9 \text{ g/mol}$ 

A cold mixture of HNO<sub>3</sub> (0.6 mL, 14 M) and  $H_2SO_4$  (1.0 mL, 36 M) was added slowly to a solution of methyl 4-iodosalicylate (1.00 g, 3.60 mmol) dissolved in  $H_2SO_4$  (1.7 mL, 36 M) within 30 min with vigorous stirring at 0°C. Upon completion of the addition the solution was allowed to warm to room temperature, stirred for 5 h and was poured onto crushed ice and  $H_2O$  (150 mL). The aqueous layer was exctracted with EtOAc (3 x 150 mL), and the combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated *in vacuo*. Purificcation by FC (Column A, 100% Cyc to 100% EtOAc) gave the desired nitro compound **26** as an orange powder (349 mg, 1.08 mmol, 30%).

**Mp:** 126-128 °C.

 $\mathbf{R}_{f} = 0.75$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 1/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ 11.15 (s, 1H, OH), 8.45 (s, 1H, H-6), 7.77 (s, 1H, H-3), 4.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

.....

#### Methyl 2-(benzyloxy)-4-iodo-5-nitrobenzoate



#### $C_{15}H_{12}INO_5 M = 413.0 \text{ g/mol}$

Methyl 2-hydroxy-4-iodo-5-nitrobenzoate **26** (320 mg, 0.99 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Cesium carbonate (645 mg, 1.98 mmol, 2eq.) and benzyl bromide (153  $\mu$ L, 1.28 mmol, 1.3 eq.) were added. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature and DMF was removed. The residue was diluted with EtOAc (100 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (2 x 50 mL). The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give compound **27** as a brown oil in quantitative yield (408 mg, 0.99 mmol).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.78$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 4/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (s, 1H, H-6), 7.66 (s, 1H, H-3), 7.49-7.36 (m, 5H, 5 x H<sub>ar</sub>), 5.26 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### Methyl 5-amino-2-(benzyloxy)-4-iodobenzoate

28



 $C_{15}H_{14}NO_{3}IM = 383.2g/mol$ 

Methyl 2-(benzyloxy)-4-iodo-5-nitrobenzoate **27** (380 mg, 0.92 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetone (50 mL). A saturated solution of  $Na_2S_2O_4$  in 0.1 M phosphate buffer (pH 7, 50 mL) was added and the solution was stirred at reflux for 2 h. Acetone was removed *in vacuo*, then the solution was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , concentrated *in vacuo* and the resulting oil was purified by FC (Column A, 100% cyclohexane to 100% EtOAc ) to give the desired amine **28** as a yellow foam in a quantitative yield (350 mg, 0.92 mmol).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.38$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 4/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.48-7.24 (m, 7H, 5 x H<sub>ar</sub>, H-3 and H-6), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

5-(Benzyloxy)-6-(methoxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid

29



 $C_{19}H_{17}NO_5 M = 339.3 \text{ g/mol}$ 

**Experimental Part** 

To a solution of methyl 5-amino-2-(benzyloxy)-4-iodobenzoate **28** (300 mg, 0.78 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), under argon, 2-oxobutyric acid (399 mg, 3.91 mmol, 5 eq.) and DABCO (262 mg, 2.34 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (8 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then concentrated *in vacuo* to afford a dark brown solid. The residue was filtered over silica gel (EtOAc) and the residue was purified by trituration in H<sub>2</sub>O to give the desired indole **29** as a brown foam (185 mg, 0.55 mmol, 70%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.38$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 1/4).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 11.57 (s, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, H-7), 7.43-7.32 (m, 6H, 5 x CH<sub>ar</sub>, H-4), 5.20 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

5-(Benzyloxy)-1-(3-carboxypropyl)-1H-indole-2,6-dicarboxylic acid

30





Acid compound **30** was obtained, following procedure **H** using compound **33** (0.150 g, 0.46 mmol),  $Cs_2CO_3$  (0.364 g, 0.92 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.067 mL, 0.46 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (15 mL). Because f its low stability, compound **40** was directly engaged in the saponifications step following procedure **J** using KOH (5M) (2.2 mL, 2.3 mmol) and MeOH (20 mL), as a brown solid (0.110 g, 0.32 mmol, 70%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.40$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH: 4/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.94 (s, 1H, H-7), 7.53 (d, *J* = 7.0, 2H, H-3 and H-6), 7.43 – 7.29 (m, 4H, 4 x H<sub>ar</sub>), 7.16 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.58 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.20 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.90 (dd, *J* = 14.5, 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173.9 (C), 168.0 (C), 162.6 (C), 151.3 (C), 137.4 (C), 133.0 (C), 130.4 (C), 128.3 (2 x CH), 127.7 (CH), 127.2 (2 x CH), 121.5 (C), 113.4 (CH), 109.2 (CH), 105.0 (CH), 70.1 (CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 25.7 (CH<sub>2</sub>).

**HR-ESIMS**: (M-H)<sup>-</sup>*m*/*z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>7</sub> 396.1083 found 396.1065.

5-(Benzyloxy)-1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid



 $C_{20}H_{19}NO_5 M = 353.4 \text{ g/mol}$ 

Acid compound **31** was obtained, following procedure **H** using compound **34** (0.120 g, 0.45 mmol), ceisum carbonate (0.292 g, 0.90 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.061 mL, 0.177 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (10 mL). Compound **41** was directly engaged in the saponification step followed by procedure **J** using KOH (5M) (6.03 mL, 30.15 mmol) and MeOH (15 mL), to afford compound **31** as a brown oil (0.156 g, 0.44 mmol, 49%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.40$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH: 7/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.36 – 7.04 (m, 6H, 5 x H<sub>ar</sub> and H-7), 6.99 (s, 1H, H-6), 6.89 (s, 1H H-3), 6.82 (d, *J* = 9.0, 1H, H-4), 4.86 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.31 (t, *J* = 6.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.94 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.75 – 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173.9 (C), 162.7 (C), 153.1 (C), 137.4 (C), 134.3 (C), 128.4 (CH), 128.0 (C), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 125.6 (C), 116.5 (CH), 111.8 (CH), 109.5 (CH), 103.9 (CH), 69.6 (CH<sub>2</sub>), 43.2 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 25.7 (CH<sub>2</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M-H)^{-}m/z$  calcd for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub> 352.1185 found 352.11156.





 $C_{21}H_{21}NO_5 M = 367.4 \text{ g/mol}$ 

Acid compound **32** was obtained, following procedure **H** without the purification step using compound **35** (0.050 g, 0.177 mmol), cesium carbonate (0.115 g, 0.354 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.025 mL, 0.177 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (6 mL). This is directly followed by procedure **J** using KOH (5M) (2.4 mL, 11.86 mmol) and MeOH (10 mL), as a pale brown oil (0.032 g, 0.087 mmol, 49%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.40$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH: 7/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.38 (d, J = 7.5, 2H, H<sub>ar</sub> and H-6 ), 7.33 – 7.17 (m, 4H, 4 x H<sub>ar</sub>), 7.06 (d, J = 2.5, 1H, H-3), 6.98 (dt, J = 9.0, 2.5, 1H, H-4), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.48 – 4.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.16 (t, J = 7.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.96 – 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 173.9 (C), 163.5 (C), 152.7 (C), 137.5 (C), 133.3 (C), 128.4 (CH), 127.7 (CH), 126.8 (C), 125.0 (C), 118.9 (C), 116.7 (CH), 111.6 (CH), 102.4 (CH), 69.7 (CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 25.8 (CH<sub>2</sub>), 10.8 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M-H)^{-} m/z$  calcd for  $C_{21}H_{20}NO_5$  366.1341 found 362.1305



33



 $C_{19}H_{17}NO_5 M = 325.3 \text{ g/mol}$ 

To a solution of methyl 5-amino-2-(benzyloxy)-4-iodobenzoate **28** (266 mg, 0.69 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), under argon atmosphere, pyruvic acid (0.25 mL, 3.47 mmol, 5 eq.) and DABCO (240 mg, 2.08 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (8 mg, 0.04 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred during 16 h and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The resulting solid was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> filtered and then concentrated *in vacuo* to afford a dark brown solid. The residue was filtered over silica gel (EtOAc) and the residue was purified by chromatography on silica gel (90% DCM and 10% MeOH) to give the desired indole **33** as a brown foam (150 mg, 0.46 mmol, 66%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.35$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 1/4).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.90 (s, 1H, H-7), 7.52 (d, J = 7.0, 2H, H-3 and H-6), 7.40 – 7.29 (m, 4H, 4 x H<sub>ar</sub>), 7.07 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 168.7 (C), 161.0 (C), 152.4 (C), 132.8 (C), 131.9 (C), 129.4 (2 x CH), 128.7 (CH), 128.3 (2 x CH), 125.3 (C), 121.0 (C), 120.0 (C), 116.8 (CH), 108.3 (CH), 106.8 (CH), 72.6 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (CH<sub>3</sub>).



 $C_{16}H_{13}NO_3 M = 267.3 \text{ g/mol}$ 

To a solution of 5-(benzyloxy)-3-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid **29** (300 mg, 0.92 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), under argon, pyruvic acid (0.32 mL, 4.6 mmol, 5 eq.) and DABCO (309 mg, 2.76 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (10 mg, 0.05 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred overnight and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The residue was filtered over silica gel (EtOAc) and the residue was purified by silica column (50% Cyclohexane and 50% EtOAc) to give the desired indole **34** as a brown oil (120 mg, 0.45 mmol, 49%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.35$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, Acetone) 7.55 - 7.30 (m, 6H, 5x H<sub>ar</sub> and H-7), 7.27 (s, 1H, H-6), 7.14 (s, 1H, H-3), 7.07 (d, J = 9.0, 1H, H-4), 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.7 (C), 153.7 (C), 137.4 (C), 132.9 (2 x C), 128.5 (2 x CH), 128.0 (C), 127.8 (CH), 127.6 (2 x CH), 117.5 (CH), 113.2 (CH), 108.9 (CH), 104.0 (CH), 70.6 (CH<sub>2</sub>).

5-(Benzyloxy)-3-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid

35



#### $C_{17}H_{15}NO_3 M = 281.3 \text{ g/mol}$

To a solution of 5-(benzyloxy)-3-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid **39** (360 mg, 1.11 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL), under argon atmosphere, oxobutyric acid (561 mg, 5.55 mmol, 5 eq.) and DABCO (363 mg, 3.33 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 15 min and then palladium (II) diacetate (10 mg, 0.05 mmol, 0.05 eq.) was added. The mixture was warmed to 75 °C, stirred overnight and then concentrated *in vacuo* to remove DMF. The residue was filtered over silica gel (EtOAc) and the residue was purified by silica column (50% Cyclohexane and 50% EtOAc) to give the desired indole **35** as a brown foam (140 mg, 0.50 mmol, 45%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, Acetone)  $\delta$  7.54 – 7.50 (m, 2H, H<sub>ar</sub> and H-6), 7.43 – 7.29 (m, 4H, 4 x H<sub>ar</sub>), 7.24 (d, J = 2.5, 1H, H-3), 7.05 (dd, J = 9.0, 2.5, 1H, H-4), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.0 (C), 152.9 (C), 137.5 (C), 132.9 (2 x C), 128.8 (2 x CH), 128.0 (C), 127.5 (CH), 127.8 (2 x CH), 117.5 (CH), 123.5 (C), 108.9 (CH), 104.0 (CH), 70.8 (CH<sub>2</sub>), 10.6 (CH<sub>3</sub>).



CAS: 50590-07-3

#### $C_6H_4INO_3M = 265.0 \text{ g/mol}$

To a solution of NaNO<sub>2</sub> (3.12 g, 36.72 mmol, 2.7 eq) in H<sub>2</sub>O (5 mL) at -5 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.8 mL, 35.36 mmol, 2.6 eq) was added dropwise. Then a solution of 3-iodophenol (3 g, 13.6 mmol, 1 eq) in MeOH (5 mL) was added and the mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred during 36h. Then the mixture was diluted with ethyl acetate (200mL), washed with brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered andconcentrated *in vacuo*. Purified by chromatography on silica gel (100% cyclohexane to 100% EtOAc) afforded the desired product **37** as an orange powder (0.900 g, 3.39 mmol, 25%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.2$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 9/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.97 (d, J = 9.0, 1H, H-3), 7.53 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 6.91 (dd, J = 9.0, 2.5, 1H, H-4).



38



 $C_{13}H_{10}INO_3M = 355.1 \text{ g/mol}$ 

3-Iodo-4-nitrophenol **37** (900 mg, 3.39 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (20 mL). potassium carbonate (940 mg, 6.78 mmol, 2eq.) and benzyl bromide (0.85 mL, 6.44 mmol, 1.9 eq.) were added. The reaction was stirred for 16 h at room temperature and DMF was removed. The residue was diluted with EtOAc (100 mL) and washed with  $H_2O$  (2 x 50 mL). The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give compound **38** as a brown oil (830 mg, 0.99 mmol, 69 %).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.4$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 9/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.99 (d, J = 9.0, 1H, H-3), 7.63 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.45 – 7.32 (m, 5H, 5 x H<sub>ar</sub>), 7.01 (dd, J = 9.0, 2.5, 1H, H-4), 5.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

.....

4-(Benzyloxy)-2-iodoaniline





C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>INO M = 325.1 g/mol

4-(Benzyloxy)-2-iodo-1-nitrobenzene **38** (800 mg, 2.25 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetone (70 mL). A saturated solution of  $Na_2S_2O_4$  in 0.1 M phosphate buffer (pH 7, 70 mL) was added and the solution was stirred at 60 °C overnight. Acetone was removed *in vacuo*, then the solution was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting oil was purified by FC (Column B, 100% Cyclohexane to 100% EtOAc) to give the desired amine **39** as a yellow foam (360 mg, 1.11 mmol, 49%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.5$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 4/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.49 – 7.35 (m, 6H, 5 x H<sub>ar</sub> and H-6), 6.89 (dd, *J* = 9.0, 2.5, 1H, H-3), 6.71 (d, *J* = 9.0, 1H, H-4), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.81 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>).

#### 5-(Ethoxycarbonyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid



 $C_{15}H_{15}NO_6 M = 305.3 \text{ g/mol}$ 

Indole **47** was obtained, following procedure <u>**H**</u> using indole **54** (0.76 mg, 0.31 mmol, 1 eq.), cesium carbonate (0.200 g, 0.61 mmol, 2 eq.), ethyl 3-bromobutanoate (44  $\mu$ L, 0.56 mmol, 1 eq.) and acetonitrile, as a yellow oil (0.075 g, 0.22 mmol, 70%). The compound was directly engaged in the next step following procedure **J** using KOH (3.5 mL), and MeOH (1 mL), as a pale blue oil (44 mg, 0.11 mmol, 50%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.35$  (SiO<sub>2</sub>, DCM/EMeOH: 6/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.39 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 7.90 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.0, H-6), 7.43 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 4.38 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (t, 3H, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).





 $C_{13}H_{13}NO_4 M = 247.3 \text{ g/mol}$ 

#### Experimental Part

To a solution of amino compound **46** (1.00 g, 3.44 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (10 mL) under argon, 2-oxobutyric acid (1.75 g, 17.18 mmol, 5 eq.) and DABCO (1.16 g, 10.31 mmol, 3 eq.) were added. The solution was stirred for 5 min before addition of palladium (II) diacetate (386 mg, 0.17 mmol, 0.05 eq.). The mixture was stirred at 105 °C for 16 h. After cooling to room temperature, DMF was removed. The resulting solid was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with NaOH (1 M, 4 x 150 mL). The aqueous layers were combined, acidified with HCl (1 M) to pH 3 and extracted with EtOAc (3 x 150 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to obtain a brown solid which was purified by trituration in Et<sub>2</sub>O to give the desired indole **44** as a pale brown powder (554 mg, 2.24 mmol, 65%).

**Mp :** 265-266 °C.

 $\mathbf{R}_{f} = 0.32$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.39 (d, 1H, J = 2.0, H-4), 7.90 (dd, 1H, J = 9.0, 2.0, H-6), 7.43 (d, 1H, J = 9.0, H-7), 4.38 (q, 2H, J = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (t, 3H, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### Ethyl 4-amino-3-iodobenzoate



 $C_9H_{10}INO_2M = 291.1 \text{ g/mol}$ 

#### CAS: 62875-84-7

To a solution of iodine (13.80 g, 54.50 mmol, 1 eq.) and silver sulfate (17.00 g, 54.50 mmol, 1 eq.) in ethanol (300 mL) was slowly added a solution of ethyl 4-aminobenzoate **45** (CAS: 619-45-4) (9.00 g, 54.50 mmol, 1 eq.) in ethanol (100 mL). After 30 min of stirring at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in DCM (300 mL), washed with NaOH (1 M, 2 x 150 mL) and saturated Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give a brown solid which was purified by FC (Column C, 100% Cyc to 100% DCM) to give the desired iodo compound **46** as a pale yellow powder (13.48 g, 46.32 mmol, 85%).

**Mp:** 80-83 °C (81-83 °C litt.<sup>175</sup>).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.33 (d, 1H, *J* = 1.5, H-2), 7.81 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.5, H-5), 4.50 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.32 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 1.36 (t, 3H, *J* = 7.0, CH<sub>3</sub>).

## 5-(2-(Benzyloxy)ethylcarbamoyl)-1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-1*H*-indole-2-carboxylic acid

.....



 $C_{24}H_{26}N_2O_6 M = 438.5 \text{ g/mol}$ 

Indole **48** was obtained, following procedure **K** using indole **63** (45 mg, 0.094 mmol), LiOH (16 mg, 0.38 mmol),  $H_2O$  (1 drop) and THF (1 mL), as a pale yellow oil (25 mg, 0.057 mmol 61%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.11$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.23 (d, 1H, J = 1.5, H-4), 7.81 (dd, 1H, J = 9.0, 1.5, H-6), 7.54 (d, 1H, J = 9.0, H-7), 7.38 – 7.23 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 4.62 (t, 2H, J = 7, CH<sub>2</sub>), 4.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.72 – 3.61 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.28 (t, 2H, J = 7, CH<sub>2</sub>), 2.09 – 2.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)  $\delta$  168.9 (C), 164.5 (2 x C), 139.8 (C), 137.6 (C), 128.5 (2 x CH), 127.9 (3 x CH), 126.8 (C), 125.9 (C), 125.7 (C), 123.9 (CH), 122.8 (C), 120.7 (CH), 110.2 (CH), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 69.0 (CH<sub>2</sub>), 44.0 (CH<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 10.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for  $C_{27}H_{33}N_2O_6$  481.2354 found 481.2339.

#### 1-(3-carboxy propyl)-5-(2-hydroxy ethyl carbamoyl)-3-methyl-1 H-indole-2-carboxy lic acid



 $C_{17}H_{20}N_2O_6 M = 348.4 \text{ g/mol}$ 

Indole **63** (0.053 g, 0.11 mmol, 1 eq.) was dissolved in degassed MeOH (5 mL) and Pd(OH)<sub>2</sub> (20%) on carbon (8 mg, 0.055 mmol, 0.14 eq.) was added under an atmosphere of H<sub>2</sub>. The reaction was stirred overnight at room temperature, the mixture was filtered under celite® and the solvent was removed to give the desired alcool which was directly engaged in the next step. Indole **49** was obtained, following procedure **K** using previous alcohol (41 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), LiOH (45 mg, 0.44 mmol), H<sub>2</sub>O (1 drop) and THF (1 mL), as a pale blue solid (17 mg, 0.049 mmol, 45%).

 $\mathbf{Pf} = 250^{\circ}\mathrm{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.08 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 5/5)$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.25 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 7.83 (dd, 1H, *J* = 9.0, 1.5, H-6), 7.52 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 4.59 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 3.76 (t, 2H, *J* = 6.0, CH<sub>2</sub>), 3.55 (t, 2H, *J* = 6.0, CH<sub>2</sub>), 2.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.27 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.09 – 1.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.8 (C), 171.2 (C), 165.5 (C), 141.2 (2 x C), 128.1 (C), 127.1 (C), 125.2 (CH), 123.2 (C), 121.9 (CH), 111.4 (CH), 61.9 (CH<sub>2</sub>), 45.1 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 11.0 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for  $C_{17}H_{21}N_2O_6$  349.1411 found 349.1400.





 $C_{25}H_{27}NO_6 M = 437.5 \text{ g/mol}$ 

Indole **50** was obtained, following procedure <u>**H**</u> using indole **54** (0.18 mg, 0.56 mmol, 1 eq.), cesium carbonate (0.40 g, 1.12 mmol, 2 eq.), ethyl 3-bromobutanoate (80  $\mu$ L, 0.56 mmol, 1 eq.) and acetonitrile, as a yellow oil (0.171 g, 0.39 mmol, 70%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.86$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.48 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 8.06 (dd, 1H *J* = 9,0, 1.5, H-7), 7.48 (m, 2H, H-6 and H<sub>ar</sub>), 7.44 – 7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.40 (s, 2H), 4.58 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 3.95 (s, 3H), 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.15 – 2.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.24 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.9 (C), 167.1 (C), 163.0 (C), 140.6 (C), 136.5 (C), 128.6 (CH), 128.2 (2 x CH), 126.8 (C), 126.4 (2 x CH), 125.4 (C), 124.4 (2 x CH), 122.9 (C), 121.9 (C), 110.0 (CH), 66.5 (CH<sub>2</sub>), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.0 (CH<sub>3</sub>).





C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>INO<sub>2</sub> M = 353.1 g/mol
**Experimental Part** 

To a solution of carbamate **62** (2.40 g, 4.34 mmol, 1 eq.) in DCM (100 mL), trifluoroacetic acid (3.4 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature overnight and then NaOH (1 M) was added to reach basic pH (10-12). The organic layer was dried and concentrated to give the desired amine **53** as yellow oil in quantitative yield (1.52 g, 4.32 mmol).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.32 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 9/1)$ 

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.36 (s, 1H, H-2), 7.86 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.44 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.26 (m, 3H, 4 x H<sub>ar</sub>), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.0, H-5), 5.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.53 (sl, 2H, NH<sub>2</sub>).

.....

#### 5-(Benzyloxycarbonyl)-3-methyl-1H-indole-2-carboxylic acid



C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> M = 323.3 g/mol

To a solution of amine **53** (5.00 g, 14.00 mmol, 1 eq.) in anhydrous toluene (400 mL), methyl 2-oxobutanoate (3.00 mL, 28.00 mmol, 2 eq.) and MgSO<sub>4</sub> were added. The solution was stirred under reflux overnight, then filtered and concentrated to give the intermediate enamine which was directly engaged into the next step.

To a solution of this intermediate in DMF (400 mL), palladium (II) diacetate (0.48 g, 0.7 mmol, 0.05 eq.) and DABCO (3.14 g, 28.00 mmol, 2 eq.) were added. The mixture was warmed to 90 °C, stirred overnight, and then concentrated to remove DMF. The resulting solid was dissolved in DCM (150 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (150 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, fltered and concentrated *in vacuo* to obtain a dark brown solid which was purified by FC (100% Cyc to 100% EtOAc) to afford the desired indole **54** as a brown oil (1.90 g, 5.90 mmol, 42%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.63$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.97 (s, 1H), 8.49 (m, 1H, H-4), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 7.51 – 7.45 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.43 – 7.34 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.41 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.63 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.1 (C), 162.8 (C), 138.3 (C), 136.4 (C), 128.6 (CH), 128.2 (2 x CH), 126.7 (2 x CH), 124.6 (C), 124.4 (2 x CH), 122.1 (C), 121.8 (C), 111.4 (CH), 66.6 (CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 10.0 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 324.1236 found 324.1252.

#### 2-(2-hydroxyethyl)isoindoline-1,3-dione



M=191.06g/mol

A mixture of the anhydride phtalic (21 g, 127.26 mmol, 1.01 eq), ethanolamine (11.25 mL, 126.87 mmol, 1 eq), and triéthylamine (0.3 mL, 2.1 mmol, cat) in toluene (150 mL) equiped with a Dean stark apparatus was stirred under reflux overnight. The toluene was removed and the mixture was washed with EtOAc (500 mL) and HCl (1M) (300 mL). The organic layer was dried over MgSO4 and the solvent was removed to afford the 2-(2-hydroxyethyl)isoindoline-1,3-dione as a white solid (16.8 g, 88 mmol, 69%).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl3) δ 7.88 – 7.79 (m, 2H, ArH), 7.77 – 7.67 (m, 2H, ArH), 3.97 – 3.80 (m, 4H, CH2-CH2), 2.04 (s, 1H, OH).

### 2-(2-(benzyloxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione



M = 281.1 g/mol

To a solution of **14** (26.8 g, 87.3 mmol, 1eq) in anhydrous DCM was added NaH (5.24 g, 104.16 mmol, 1.2 eq). The solution was stirred 30 min at room temperature and the benzyl bromide (15.6 mL, 130.95 mmol, 1.5 eq) was added. The mixture was stirred one hour and water was added. The organic layer was extracted with EtOAc (500 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The mixture was purified by silica gel column chromatography (8:2, Cyclohexane:EtOAc) to afford the 2-(2-(benzyloxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione as a white solid (5.5g, 19 mmol, 22%).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.87 – 7.81 (m, 2H, ArH), 7.76 – 7.68 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, *J* = 5.0, 2H, ArH), 7.27 – 7.21 (m, 3H, ArH), 4.54 (s, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 3.94 (t, *J* = 6.0, 2H, Pht-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OBn), 3.73 (t, *J* = 6.0, 2H, Pht-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OBn).

 $\mathbf{R}_f = 0.54$  (SiO<sub>2</sub>, cyclo/EtOAc:8/2).

#### 2-(benzyloxy)ethanamine

**60** H<sub>2</sub>N-\_\_\_\_OBn

#### M=151.1g/mol

To a solution of **15** (3 g, 10.5 mmol, 1 eq) in ethanol (90 mL), the hydrazine (1.06 g, 21 mmol, 2 eq) was added. The solution was stirred under reflux overnight. The ethanol was removed and the solid obtained was dissolved in DCM. The organic layer was washed with a solution of HCl (1M). The aqueous layer was then basified with NaOH until pH=14 and extracted with DCM (150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to afford 2-(benzyloxy)ethanamine as a pale yellow liquid (1.3 g, 8.6 mmol, 81%)

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.32 – 7.26 (m, 2H, ArH), 7.22 – 7.13 (m, 3H, ArH), 5.20 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 3.43 (t, *J* = 5.0, 2H, Pht-C<u>H<sub>2</sub></u>-CH<sub>2</sub>-OBn), 2.81 (t, *J* = 5.0, 2H, Pht-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OBn).

.....

Ethyl 4-(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)-3-iodobenzoate

 $\mathbf{R}_{f} = 0.04$  (SiO<sub>2</sub>, cyclo/EtOAc: 7/3).



 $C_{19}H_{26}INO_{6}M = 491.3 \text{ g/mol}$ 

To a solution of substituted aniline **46** (4.00 g, 13.65 mmol, 1 eq.) in DCM (100 mL), DMAP (0.17 g, 1.36 mmol, 0.1 eq.), triethylamine (1.9 mL, 13.65 mmol, 1 eq.) and Boc<sub>2</sub>O (6.30 g, 28.66 mmol, 2.1 eq.) were added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and washed with HCl (0.1 M, 100 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo* and the resulting solid was purified by FC (Column D, 9/1 Cyc/EtOAc to 4/1) to give the desired product **61** as a pale yellow powder (5.70 g, 11.60 mmol, 85%).

**Mp :** 118-120 °C.

 $\mathbf{R}_{f} = 0.48$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc: 4/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.50 (d, 1H, *J* = 1.0, H-2), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.0, H-6), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.0, H-5), 4.38 (q, 2H, *J* = 8.0, CH<sub>2</sub>), 1.43-1.39 (m, 21H, 7 x CH<sub>3</sub>).

.....

#### Benzyl 4-(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)-3-iodobenzoate



C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>INO<sub>6</sub> M = 553.4 g/mol

To a solution of **61** (5.70 g, 11.60 mmol, 1 eq.) in EtOH (200 mL) was added NaOH (1 M, 35 mL). The solution was stirred for 12 h at room temperature and then concentrated *in vacuo* to remove EtOH. The resulting solid was dissolved in H<sub>2</sub>O (50 mL), acidified with HCl (1 M) to pH 3 and then extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The organic layers was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo* to give the acid intermediate which was directly engaged into the next step.

To a solution of this intermediate in DMF (85 mL), CDI (2.06 g, 12.72 mmol, 1.1 eq.) were added and stirred 30 min then benzyl alcohol (1.32 mL, 12.72 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction was stirred for 24 h then concentrated *in vacuo* and purified by FC (column C, 100% Cyc to 100% EtOAc) to give the desired product **62** as a pale yellow powder (6.08 g, 10.99 mmol, 95%).

**Pf :** 96-98 °C.

 $\mathbf{R}_{f} = 0.60 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc: 9/1)}.$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.52 (s, 1H, H-2), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.0, H-6), 7.47-7.25 (m, 6H, H-5, 5 x CH<sub>ar</sub>), 5.37 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.42-1.39 (m, 18H, 6 x CH<sub>3</sub>).

#### .....

### Methyl 5-(2-(benzyloxy)ethylcarbamoyl)-1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-3-methyl-1*H*-indole-2carboxylate



 $C_{27}H_{32}N_2O_6 M = 480.6 g/mol$ 

Indole **50** (0.171 g, 0.39 mmol, 1 eq.) was dissolved in degassed MeOH (15 mL) and Pd(OH)<sub>2</sub> (20%) on carbon (8 mg, 0.055 mmol, 0.14 eq.) was added under an atmosphere of H<sub>2</sub>. The reaction was stirred overnight at room temperature, the mixture was filtered under celite® and the solvent was removed to give the desired acid which was directly engaged in the next step. To a solution of the acid (60 mg, 0.17 mmol) in anhydrous DCM (10 mL), 2-(benzyloxy)ethanamine (39 mg, 0.26 mmol, 1.5eq), EDC.HCl (29.5 mg, 0.19 mmol, 1.1eq), HOBT (25.6 mg, 0.19 mmol, 1.1eq) and DIEA (45  $\mu$ L, 0.26 mmol, 1.5eq) were added then the mixture was stirred at room temperature overnight. Then the reaction mixture was diluted with DCM (30 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give the desired indole 63 as a light brown oil (121 mg, 0.25 mmol, 65%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.58$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.15 (d, 1H, *J* = 1.5, H-4), 7.74 (dd, 1H, *J* = 9.0, 1.5 , H-6), 7.42 (d, 1H, *J* = 9.0, H-7), 7.37 – 7.27 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.63 (m, 1H, NH), 4.62 – 4.53 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 3.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.76 – 3.67 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.15 – 2.05 (m, 2H, , CH<sub>2</sub>), 1.26 – 1.22 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 C), 168.0 (C), 163.0 (C), 139.7 (C), 137.9 (C), 128.6 (2 x CH), 127.9 (3 x CH), 126.8 (C), 126.4 (C), 125.3 (C), 124.0 (CH), 122.4 (C), 120.8 (CH), 110.2 (CH), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (CH<sub>2</sub>), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 51.6 (CH<sub>3</sub>), 44.2 (CH<sub>2</sub>), 39.9 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.0 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 481.2339 found 481.2315.

#### 2-(Benzyloxy)benzoic acid



 $C_{14}H_{12}O_3 M = 228.2 \text{ g/mol}$ 

To a solution of salicylic acid **88** (5.0 g, 36.2 mmol, 1 eq) in acetone (70 mL), potassium carbonate (12.50 g, 90.5 mmol, 2.5 eq.) was added. The reaction was stirred 45 min under reflux. Then benzyl bromide (10.75 mL, 90.5 mmol, 2.5 eq) was added dropwise at room temperature, the mixture was stirred overnight under reflux and then concentrated to remove acetone. The resulting solid was dissolved in DCM (300 mL) and washed with  $H_2O$  (150 mL). The organic layer was dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , and then concentrated to give the intermediate ester which was directly engaged into the next step. To a solution of this intermediate in 90% aqueous ethanol, NaOH (5.67 g, 141.6 mmol, 3.9 eq) was added and the reaction mixture was stirred overnight under reflux. The mixture was concentrated, acidified with HCl (1M) and extracted with toluene. The organic layer was dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , and then concentrated to obtain a brown solid which was purified by FC (100% cyclohexane to 100% ethyl acetate) to give the desired product **87** as a white solid (6.27 g, 27.5 mmol, 76%).

 $Mp = 73-75^{\circ}C$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.20 (dd, 1H, J = 2.0, 8.0, H-1), 7.55 (dt, 1H, J = 2.0, 8.0, H-3), 7.42 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 7.14 (t, 2H, J = 8.0, H-2 and H-4), 5.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 229.0865 found 229.0875.

#### 3-Methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid

89

C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> M = 125.1 g/mol

Experimental Part

Ester **99** (300 mg, 2.0 mmol) was engaged with MeOH (65 mL) and KOH (2.6 M, 50 mL) and heated to reflux for 24 h. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (5 M).) and evaporated to dryness. Ethyl acetate and H<sub>2</sub>O, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give the desired acid **89** as a white solid (167 mg, 1.34 mmol, 67%).

 $\mathbf{M}\mathbf{p} = 198^{\circ}\mathrm{C}$ 

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, MeOD) δ 6.81 (d, 1H, J = 2.5, H-5), 6.01 (d, 1H, J = 2.5, H-4), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 126.0555 found 126.0551.

1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid



 $C_{24}H_{26}N_2O_6 M = 211.2 \text{ g/mol}$ 

Ester **100** (0.599 g, 2.24 mmol) was engaged with MeOH (75 mL) and KOH (5 M, 30 mL) and the mixture was heated to reflux overnight. The mixture was acidified to pH 3 with HCl (6 M) and ethyl acetate was added. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to obtain the desired acid **91** as a brown oil (0.329 g, 1.49 mmol, 67%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.25$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 3/7).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.54 (d, 1H, *J* = 2.0, H-5), 5.97 (d, 1H, *J* = 2.0, H-4), 3.88 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.13 – 2.02 (m, 5H, CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.5 (C), 162.4 (C), 131.3 (C), 128.3 (CH), 120.1 (C), 112.5 (CH), 49.8 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H-CO_2)^+ m/z$  calcd for 168.1025 found 168.1009.





 $C_8H_{15}NO_4 M = 225.7 \text{ g/mol}$ 

Ester **103** (0.179 g, 0.73 mmol) was engaged with MeOH (20 mL) and KOH (5 M, 10 mL) and heated to reflux overnight. The mixture was evaporated to dryness and acidified to pH 3 with HCl (6 M). H<sub>2</sub>O (20 mL) was added and the precipitate was extracted with ethyl acetate (2 x 15 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to obtain the desired acid **92** in quantitative yield as a white solid (0.164 g, 0.73 mmol).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.40 (m, 1H, CH), 2.83 – 2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.24 (t, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 1.91 – 1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.33 (d, 3H, *J* = 7.0, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 182.3 (C), 180.3 (C), 64.5 (CH), 54.0 (CH<sub>2</sub>), 37.7 (CH<sub>3</sub>), 35.0 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 13.6 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H-CO_2)^+ m/z$  calcd for 190.1079 found 190.1076.

.....

### Ethyl 2-aminoacetate hydrochloride

96

H<sub>2</sub>N<sup>CO</sup>2Et.HCI

### $C_4H_{10}CINO_2 M = 139.6 \text{ g/mol}$

To a solution of glycine (5.0 g, 66.6 mmol, 1 eq.) in ethanol (50 mL), thionyl chloride (7.3 mL, 99.9 mmol, 1.5 eq) was added dropwise. The mixture was stirred 5 h under reflux and then concentrated to give the desired ester **96** as a yellow oil in quantitative yield (9.30 g, 66.6 mmol).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.05$  (SiO<sub>2</sub>, EtOAc).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.29 (q, 2H, J = 7.0, CH<sub>2</sub>), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28 (t, 3H, J = 7.0, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H-Cl)^+ m/z$  calcd for 104.0712 found 104.0716.

.....

#### Ethyl 2-(tosylamino)acetate

#### 97

#### TsHN<sup>CO2Et</sup>

#### $C_{11}H_{15}NO_4S M = 257.3 \text{ g/mol}$

To a solution of amine **96** (9.30 g, 66.6 mmol, 1 eq) and pyridine (14.5 mL, 179.8 mmol, 2.7 eq) in DCM (140 mL), tosyl chloride (15.24 g, 79.92 mmol, 1.2 eq.) was added. The solution was stirred overnight at room temperature. The mixture was washed with  $H_2O$  (60 mL) and NaOH (1M, 60 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and then concentrated *in vacuuo* to obtain the desired ester **97** as brown oil (13.24 g, 51.5 mmol, 77%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.29$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (d, 2H, *J* = 8.0, H<sub>ar</sub>), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.0, H<sub>ar</sub>), 5.61 (s, 1H), 4.07 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (t, 3H, *J* = 7.0, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 258.0800 found 258.0806.

#### .....

#### Ethyl 3-hydroxy-3-methyl-1-tosylpyrrolidine-2-carboxylate

98



#### C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>S M = 327.40 g/mol

To a solution of amine **97** (5.5 g, 21.4 mmol, 1 eq.) and methyl vinyl ketone (1.80 mL, 21.4 mmol, 1 eq.) in THF (50 mL) was added DBU (7 mL, 47.1 mmol, 2.2 eq.). The solution was stirred overnight at room temperature. The solution was diluted with diethyl ether (100 mL)and washed with HCl (1M) (50 mL), NaHCO<sub>3(sat)</sub> (50 mL), and H<sub>2</sub>O (50 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and then concentrated *in vacuuo* to give the crude oil **98** (5.964 g, 18.2 mmol, 85%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.86$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.72 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.29 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 4.25 – 4.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 1H, CH), 3.61 – 3.51 (m, 1H, CH), 3.42 – 3.31 (m, 1H, CH), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 – 2.03 (m, 1H, CH), 1.75 – 1.64 (m, 1H, CH), 1.30 – 1.20 (m, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>).

### Ethyl 3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylate



 $C_8H_{13}NO_2 M = 155.2 \text{ g/mol}$ 

Pyrrolidine **98** (5.964 g, 18.2 mmol, 1 eq.) was dissolved in pyridine (50 mL), POCl<sub>3</sub> (4.24 mL, 45.5 mmol, 2.5 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was poured with ice, extracted with diethyl ether (200 mL) and washed with HCl (1M) (100 mL), NaHCO<sub>3(sat)</sub> (100 mL) and H<sub>2</sub>O (100 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give the intermediate ester which was directly engaged into the next step. To a solution of the intermediate in THF (70 mL), DBU (6.26 mL, 41.9 mmol, 2.3 eq) was added dropwise to the solution. The mixture was stirred under reflux overnight. Then the solvent was removed, the residue diluted in DCM (200 mL) and washed with HCl (1M) (100 mL), NaHCO<sub>3(sat)</sub> (100 mL), and H<sub>2</sub>O (100 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to obtain a brown solid which was purified by FC (Column C, 100% Cyc to 100% EtOAc) to afford the desired pyrrole **99** as a yellow oil (1.787 g, 11.5 mmol, 63%).

 $Mp = 56.1^{\circ}C$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.45$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 8/2).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.88 (s, 1H, NH), 6.81 (t, 1H, *J* = 2.5, H-5), 6.09 (t, *J* = 2.5, 1H, H-4), 4.32 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, 3H, *J* = 7.0, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**: (M+H)<sup>-</sup> *m/z* calcd for 154.0868 found 154.0848.

ethyl 1-(3-(ethoxycarbonyl)propyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylate

100



 $C_{14}H_{21}NO_2 M = 267.3 \text{ g/mol}$ 

Pyrrole **100** was obtained, following procedure <u>H</u>, using pyrrole **99** (0.500 g, 3.26 mmol, 1 eq.), cesium carbonate (2.12 g, 6.52 mmol, 2 eq.), ethyl 3-bromobutanoate (0.47 mL, 3.26 mmol, 1 eq.) and acetonitrile as an oil (0.599 g, 2.24 mmol, 69%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.50$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 9/1).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.69 (d, 1H, J = 2.5, H-5), 5.95 (d, 1H, J = 2.5, H-5), 4.33 – 4.25 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.11 (q, 2H, J = 7.0, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.25 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.05 (qt, 2H, J = 7.0, CH<sub>2</sub>), 1.36 (t, 3H, J = 7.0, CH<sub>3</sub>), 1.24 (t, 3H, J = 7.0, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 161.9 (C), 130.5 (C), 127.7 (CH), 118.8 (C), 110.5 (CH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>), 48.7 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 26.8 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

#### .....

#### Ethyl 2-(methylamino)propanoate hydrochloride

102

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>2</sub> M = 167.6 g/mol

To a solution of *N*-methyl-L-alanine (0.250 g, 2.42 mmol, 1 eq.) in ethanol (20 mL), thionyl chloride (0.26 mL, 3.63 mmol, 1.5 eq) was added dropwise. The mixture was stirred 5h under reflux and then concentrated to give the desired ester **102** as yellow oil in quantitative yield (0.406 g, 2.42 mmol).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.05$  (SiO<sub>2</sub>, EtOAc).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.31 (q, 2H, *J* = 7.0, CH<sub>2</sub>), 4.09 (q, 1H, *J* = 7.0, CH), 2.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.57 (d, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.0, CH<sub>3</sub>).







Compound **103** was obtained, following procedure <u>**H**</u> using ester **9** (0.406 g, 2.42 mmol, 1 eq.), cesium carbonate (2.76 g, 8.47 mmol, 3.5 eq.) ethyl 3-bromobutanoate (0.47 mL, 2.42 mmol, 1 eq.) an acetonitrile as an oil (0.179 g, 0.73 mmol, 30%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.50 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 9/1).$ 

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.20 – 4.05 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.36 (q, 1H, *J* = 7.0, CH), 2.63 – 2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.34 – 2.26 (m, 5H, CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>), 1.82 – 1.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.30 – 1.18 (m, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.5 (C), 171.9 (C), 71.5 (CH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 59.9 (CH<sub>2</sub>), 55.5 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>3</sub>), 31.3 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 13.7 (CH<sub>3</sub>).

.....

# 4-(4-Carboxy-3-hydroxybenzyl)-1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylic acid

108



 $C_{18}H_{19}NO_7 M = 361.3 \text{ g/mol}$ 

Triacid **108** was obtained, following procedure **K** using *N*-alkylated compound **204** (0.220 g, 0.51 mmol), LiOH (0.13 g, 3.06 mmol), THF (6 mL) and H<sub>2</sub>O (3 drops), as an oil (0.015 g, 0.04 mmol, 8%). The compound was purified by HPLC (column Agilent nucleodur C18 25cm, 0.8 ml/min, eluent : acetonitrile/H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) : 45/55).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.62 (d, J = 8.0, 1H, H-6), 6.65 – 6.58 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.33 – 6.28 (m, 1H, H-8), 3.73 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.11 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.87 (p, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H-CO_2)^+ m/z$  calcd for 318.1357 found 318.1341.

# 5-(3-Carboxy-4-hydroxybenzyl)-1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid



#### C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub> M = 361.3 g/mol

Triacid **109** was obtained, following procedure J using *N*-alkylated compound **214** (0.093 g, 0.22 mmol), KOH (5M) (3.0 mL, 14.74 mmol) and MeOH (40 mL), as a pink oil (0.033 g, 0.091 mmol, 41%).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.79 (s, 1H, H-6), 7.28 (dd, J = 8.5, 2.0, 1H, H-3), 6.90 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 6.36 (s, 1H, OH), 5.80 (s, 1H, H-8), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.70 (d,  $J = 7.0, 2H, CH_2$ ), 2.31 (t,  $J = 6.5, 2H, CH_2$ ), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.85 – 1.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

# 4-(3-Carboxy-4-hydroxybenzyl)-1-(3-carboxypropyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid

175



C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub> M = 361.3 g/mol

Triacid **175** was obtained, following procedure **I** using *N*-alkylated compound **213** (0.050 g, 0.14 mmol), KOH (5M) (1.9 mL, 9.38 mmol) and MeOH (20 mL) as an oil (0.010 g, 0.028 mmol, 20%). The compound was purified by HPLC (column Agilent nucleodur C18 25cm, 0.8 ml/min, eluent : acetonitrile/H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) : 45/55).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.68 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.37 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.90 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 6.39 (s, 1H, OH), 6.24 (d, J = 2.5, 1H, H-8), 3.82 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.32 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.10 – 1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### .....

### Ethyl 5-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzoyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate and ethyl 4-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzoyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2carboxylate

#### 176 and 178



 $C_{18}H_{19}NO_6 M = 345.3 \text{ g/mol}$ 

Ketones **176** and **178** were obtained, following procedure **E** using acid **180** (5.20 g, 24.75 mmol), thionyl chloride (3.60 mL, 49.50 mmol), DCM (150 mL), methyl 3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate (1.89 g, 12.38 mmol),  $ZnCl_2$  (3.37 g, 24.75 mmol), 1,2-dichloroéthane (25 mL+ 5 mL), as a yellow solid for **176** (1.40 g, 4.04 mmol, 33%) and a yellow solid for **178** (1.93 g, 5.58 mmol, 45%).

Compound **176**:

 $\mathbf{Pf} = 147^{\circ}\mathbf{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.15$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.86 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 7.49 – 7.42 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.65 (d, *J* = 2.5, 1H, H-8), 4.38 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.40 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 184.2 (C), 166.1 (C), 160.9 (C), 159.0 (C), 141.9 (C), 131.5 (CH), 131.0 (C), 128.2 (C), 124.9 (C), 123.6 (C), 120.7 (CH), 120.5 (CH), 112.1 (CH), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>), 52.4 (CH<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 346.1291 found 346.1262.

Compound 178 :

**Pf** = 139 °C

 $\mathbf{R}_{f} = 0.35 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 7/3).$ 

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 7.83 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 7.36 (d, *J* = 1.5, 1H, H-3), 7.30 (dd, *J* = 8.0, 1.5, 1H, H-5), 7.20 (d, *J* = 3.5, 1H, H-8), 4.38 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.40 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101, MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 185.1 (C), 166.0 (C), 161.9 (C), 160.2 (C), 139.7 (CH), 132.3 (CH), 131.5 (C), 128.9 (C), 124.8 (CH), 124.5 (C), 120.6 (C), 119.9 (C), 111.8 (CH), 60.9 (CH<sub>2</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 346.1291 found 346.1286.

#### 3-Methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzoic acid

.....

180



CAS: 162046-51-7

#### $C_{10}H_{10}O_5 M = 210.2 \text{ g/mol}$

Acid **180** was obtained, following procedure **D** using alcohol **188** (5.99 g, 30.53 mmol),  $CrO_3$  (16.30 g, 161.81 mmol),  $H_2SO_4$  (14.97 mL, 280.88 mmol),  $H_2O$  (50 mL) and acetone (250 mL), as a white solid (4.9 g, 23.5 mmol, 77%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.11$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 7.75 – 7.69 (m, 2H, H-3 and H-5), 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 211.0606 found 211.0617.

.....



181



CAS: 28045-71-8

### $C_{10}H_{10}O_5 \ M = 210.2 \ g/mol$

Acid **181** was obtained, following procedure **D** using alcohol **190** (2.293 g, 11.69 mmol),  $CrO_3$  (6.20 g, 61.96 mmol),  $H_2SO_4$  (5.73 mL, 107.59 mmol),  $H_2O$  (20 mL) and acetone (96 mL), as a white solid (1.767 g, 8.41 mmol, 72%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.1$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.40 (d, *J* = 2.5, 1H, H-6), 8.18 (dd, *J* = 9.0, 2.5, 1H, H-3), 7.21 (d, *J* = 9.0, 1H, H-5), 3.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### Methyl 2-methoxy-4-methylbenzoate

.....

183



CAS: 81245-24-1

#### $C_{10}H_{12}O_3 M = 180.2 \text{ g/mol}$

Compound **183** was obtained, following procedure **A** using 4-methylsalicylic acid (5.00 g, 32.86 mmol), methyl iodide (5.11 mL, 82.15 mmol), potassium carbonate (11.35 g, 82.15 mmol) and DMF (100 mL). Compound 1 was obtained as a yellow oil (5.14 g, 28.52 mmol, 87%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.80$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 1/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.71 (d, *J* = 8.5, 1H, H-6), 6.77 (m, 2H, H-3 and H-5), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 181.0865 found 181.0847.

.....

#### Methyl 2-methoxy-5-methylbenzoate

184



CAS: 63113-79-1

#### $C_{10}H_{12}O_3 M = 180.2 \text{ g/mol}$

Compound **184** was obtained, following procedure **A** using 5-methylsalicylic acid (5 g, 32.86 mmol), methyl iodide (5.11 mL, 82.15 mmol), potassium carbonate (11.35 g, 82.15 mmol) and DMF (100 mL), as a yellow oil (5.19 g, 28.80 mmol, 88%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.88$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 1/1).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.57 (d, *J* = 2.0, 1H, H-6), 7.22 (dd, *J* = 8.5, 2.0, 1H, H-3), 6.83 (d, *J* = 8.5, 1H, H-5), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### Methyl 4-(bromomethyl)-2-methoxybenzoate

.....

#### 187



CAS: 74733-27-0

#### C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub> M = 259.1 g/mol

The bromo compound **187** was obtained, following procedure **B** using compound **183** (10.00 g, 55.49 mmol), NBS (11.85 g, 66.6 mmol), AIBN (0.090 g) and 1,2-dichloroéthane (162 mL), as a yellow oil (10.53 g, 40.64 mmol, 73%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.49$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.71 (d, J = 8.5, 1H, H-6), 6.96 – 6.92 (m, 2H, H-3 and H-5), 4.41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 258.9970 found 258.9970.

.....

#### Methyl 4-(hydroxymethyl)-2-methoxybenzoate

188



CAS: 57757-74-1

#### $C_{10}H_{12}O_4 M = 196.2 \text{ g/mol}$

Alcohol **188** was obtained, following procedure **C** using bromo compound **187** (10.00 g, 38.60 mmol), calcium carbonate (17.00 g, 169.84 mmol), dioxane (160 mL) and H<sub>2</sub>O (160 mL), as a yellow oil (7.42 g, 37.83 mmol, 98%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.11$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.66 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 6.89 (s, 1H, H-3), 6.82 (d, *J* = 8.0, 1H, H-5), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 197.0814 found 197.0799.

.....

#### Methyl 5-(bromomethyl)-2-methoxybenzoate

## 189 MeO\_6 MeO\_2C\_3 B



### $C_{10}H_{11}BrO_3 M = 259.1 \text{ g/mol}$

Compound **189** was obtained, following procedure **B** using compound **184** (2.50 g, 13.87 mmol), NBS (2.96 g, 16.64 mmol), AIBN (0.025 g) and CCl<sub>4</sub> (39 mL), as a white solid (2.30 g, 8.87 mmol, 64%, mixture of **18** and dibrominated compound (17%)).

 $Mp = 79 \ ^{\circ}C$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.56$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.84 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.50 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.95 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 4.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

.....

### Methyl 5-(hydroxymethyl)-2-methoxybenzoate

190



CAS: 191604-81-6

 $C_{10}H_{12}O_4 M = 196.2 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **190** was obtained, following procedure C using compound **189** (3.04 g, 11.73 mmol), calcium carbonate (5.17 g, 51.61 mmol), dioxane (49 mL) and H<sub>2</sub>O (49 mL), as a pale yellow oil (2.29 g, 11.69 mmol, 99%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.11$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.44 (dd, J = 8.5, 2. 5, 1H, H-3), 6.93 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).



196



C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub> M = 331.4 g/mol

Compound **196** was obtained, following procedure **G** using alcohol **197** (1.13 g, 3.25 mmol), Pd/C (10%) (1 g, 0.98 mmol), MeOH (30 mL), as a yellow oil (0.79 g, 2.38 mmol, 73%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.72$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 6.83 – 6.78 (m, 2H, H-3 and H-5), 5.85 (d, *J* = 2.5, 1H, H-8), 4.28 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.5 (C), 161.9 (C), 159.5 (C), 144.7 (C), 134.1 (C), 132.2 (CH), 128.8 (C), 120.4 (CH) 118.7 (C), 118.3 (C), 112.3 (CH), 111.8 (CH), 59.9 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 34.3 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 12.9 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**: (M+H)<sup>+</sup> *m*/*z* calcd for 332.1498 found 332.1527.

Ethyl 5-(hydroxy(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)phenyl)methyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

197



 $C_{18}H_{21}NO_6 M = 347.4 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **197** was obtained, following procedure **F** using ketone **176** (1.39 g, 4.02 mmol), sodium borohydride (0.61 g, 16.08 mmol), MeOH (100 mL), as an orange oil (1.13 g, 3.27 mmol, 81%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.67 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 5/5).$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 7.05 (d, *J* = 1.0, 1H, H-3), 6.95 (dd, *J* = 8.0, 1.0, 1H, H-5), 5.76 (d, *J* = 3.0, 1H, H-8), 4.27 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.5 (C), 162.2 (C), 159.4 (C), 147.7 (C), 137.0 (C), 132.0 (CH), 128.6 (C), 119.4 (C), 119.1 (C), 118.1 (CH), 110.9 (CH), 109.8 (CH), 69.9 (CH<sub>3</sub>), 60.2 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 52.1 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 12.9 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 348.1447 found 348.1427.

# Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-5-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate

.....

198



 $C_{24}H_{31}NO_7 M = 445.5 \text{ g/mol}$ 

*N*-alkylated compound **198** was obtained, following procedure **H** using compound **196** (0.75 g, 2.26 mmol), cesium carbonate (2.21 g, 6.78 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.32 mL, 2.26 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (60 mL), as a brown oil (0.58 g, 1.30 mmol, 58%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.80$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.71 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 6.81 (d, *J* = 1.5, 1H, H-3), 6.75 (dd, *J* = 8.0, 1.5, 1H, H-5), 5.69 (s, 1H, H-8), 4.25 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.20 – 4.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.08 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.29 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 – 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.33 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 166.5 (C), 162.0 (C), 159.5 (C), 144.5 (C), 136.6 (C), 132.0 (CH), 129.8 (C), 120.5 (CH), 119.0 (C), 118.2 (C), 112.5 (CH), 112.0 (CH), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 44.7 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 446.2179 found 446.2178.



### Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-5-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-1Hpyrrole-2-carboxylate



 $C_{23}H_{29}NO_7 M = 431.5 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **199** was obtained, following procedure **I** using *N*-alkylated compound **198** (0.20 g, 0.45 mmol), BBr<sub>3</sub> (1M) (1.8 mL, 1.8 mmol) and DCM (1 mL), as a pink oil (0.19 g, 0.44 mmol, 98%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.90$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 10.73 (s, 1H, OH), 7.73 (d, J = 8.0, 1H, H-6), 6.77 (d, J = 1.5, 1H, H-3), 6.69 (dd, J = 8.0, 1.5, 1H, H-5), 5.76 (s, 1H, H-8), 4.27 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.19 – 4.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.11 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.92 (s, 5H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 2.34 – 2.26 (m, 5H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 1.96 – 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.23 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 170.4 (C), 162.0 (C), 161.8 (C), 147.2 (C), 136.2 (C), 130.1 (CH), 129.9 (C), 119.7 (CH), 119.0 (C), 117.4 (CH), 112.2 (CH), 110.8 (C), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 44.7 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 432.2022 found 432.2024.

### Ethyl 4-(hydroxy(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)phenyl)methyl)-3-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxylate

201



 $C_{18}H_{21}NO_6 M = 347.4 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **201** was obtained, following procedure **F** using ketone **178** (1.927 g, 5.58 mmol), sodium borohydride (0.844 g, 22.32 mmol), MeOH (130 mL), as an orange oil (0.970 g, 2.79 mmol, 50%).

 $\mathbf{R}_{f} = 043$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 7.09 (s, 1H, H-3), 6.95 (dd, *J* = 8.0, 1.5, 1H, H-5), 6.55 (d, *J* = 3.0, 1H, H-8), 5.82 (s, 1H, CH), 4.30 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.6 (C), 161.7 (C), 159.3 (C), 149.6 (C), 131.7 (CH), 127.9 (C), 125.7 (C), 120.6 (CH), 120.4 (C), 118.7 (C), 118.0 (CH), 109.8 (CH), 69.0 (CH), 60.2 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 10.5 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 348.1447 found 348.1460.

 $Ethyl \ 4-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl) benzyl)-3-methyl- 1H-pyrrole-2-carboxylate$ 

202



 $C_{18}H_{21}NO_5 M = 331.4 \text{ g/mol}$ 

Compound **202** was obtained, following procedure **G** using alcohol **201** (0.970 g, 2.73 mmol), Pd/C (10%) (0.873g, 0.82 mmol) and MeOH (25 mL), as a yellow oil (0.586 g, 1.77 mmol, 65%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.79$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.72 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6, 6.81 – 6.75 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.59 (d, *J* = 3.0, 1H, H-8), 4.31 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.6 (C), 161.7 (C), 159.4 (C), 147.6 (C), 131.9 (CH), 126.2 (C), 123.3 (C), 120.6 (CH), 120.4 (CH), 119.8 (C), 117.5 (C), 112.2 (CH), 60.0 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 31.8 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 10.4 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 332.1498 found 332.1493.

#### .....

# Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-4-(3-methoxy-4-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate





 $C_{24}H_{31}NO_7 M = 445.5 \text{ g/mol}$ 

*N*-alkylated compound **203** was obtained, following procedure **H** using compound **202** (0.200 g, 0.60 mmol), cesium carbonate (0.586 g, 1.8 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.086 mL, 0.60 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (20 mL), as a yellow oil (0.18 g, 0.40 mmol, 67%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.72$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.72 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H-3 and H-5), 6.47 (s, 1H, H-8), 4.32 – 4.23 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.10 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.23 (t, *J* = 7.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.08 – 1.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.22 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 172.9 (C), 166.6 (C), 161.9 (C), 159.4 (C), 147.7 (C), 131.9 (CH), 128.4 (C), 127.2 (CH), 120.9 (C), 120.4 (CH), 119.3 (C), 117.5 (C), 112.2 (CH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 59.6 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 48.6 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>), 26.8 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 446.2179 found 446.2207.

Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-4-(3-hydroxy-4-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

204



 $C_{23}H_{29}NO_7 M = 431.5 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **204** was obtained, following procedure **I** using *N*-alkylated compound **203** (0.317 g, 0.71 mmol), BBr<sub>3</sub> (1M) (2.84 mL, 2.84 mmol) and DCM (5 mL), as an pink oil (0.26 g, 0.60 mmol, 85%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.87$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.72 (s, 1H OH), 7.72 (d, *J* = 8.0, 1H, H-6), 6.75 (d, *J* = 1.5, 1H, H-3), 6.69 (dd, *J* = 8.0, 1.5, 1H, H-5), 6.52 (s, 1H, H-8), 4.35 – 4.20 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.11 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (t, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 – 1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 170.5 (C), 161.9 (C), 161.7 (C), 150.2 (C), 129.8 (CH), 128.4 (C), 127.2 (CH), 120.5 (C), 119.7 (CH), 119.3 (C), 117.1 (CH), 110.2 (C), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 59.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 48.5 (CH<sub>2</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 26.8 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 432.2022 found 432.1995.

Ethyl 5-(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)benzoyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate and ethyl 4-(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)benzoyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2carboxylate

205 and 206



 $C_{18}H_{19}NO_6 M = 345.3 \text{ g/mol}$ 

Ketones **205** and **206** were obtained, following procedure **E** using acid **181** (4.027 g, 19.17 mmol), thionyl chloride (2.34 mL, 38.34 mmol), DCM (116 mL), methyl 3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylate (1.47 g, 9.59 mmol),  $ZnCl_2$  (2.61 g, 19.17 mmol) and 1,2-dichloroéthane (14 mL+ 3 mL), as a brown solid for **205** (2.60 g, 7.67 mmol, 40%) and a brown solid for **206** (1.980 g, 5.75 mmol, 30%).

Ketone 205 :

 $\mathbf{Pf} = 147^{\circ}\mathbf{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.12$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.41 (d, *J* = 2.5, 1H, H-6), 8.08 (dd, *J* = 9.0, 2.5, 1H, H-3), 7.08 (d, *J* = 9.0, 1H, H-5), 6.66 (d, *J* = 2.5, 1H, H-8), 4.37 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.39 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101, MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 182.9 (C), 165.8 (C), 162.3 (C), 160.9 (C), 134.7 (CH), 133.2 (CH), 131.0 (C), 129.7 (C), 128.3 (C), 124.2 (C), 120.0 (C), 119.6 (CH), 111.8 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (CH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>).

Experimental Part

**205**: (M+Na)<sup>+</sup> *m*/*z* calcd for 346.1291 found 346.1288.

Ketone **206**:

 $\mathbf{Pf} = 179^{\circ}\mathrm{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.30 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 7/3).$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.25 (d, *J* = 2.5, 1H, H-6), 7.98 (dd, *J* = 9.0, 2.5, 1H, H-3), 7.21 (d, *J* = 3.5, 1H, H-5), 7.06 (d, *J* = 9.0, 1H, H-8), 4.38 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.40 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101, MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 189.6 (C), 166.0 (C), 161.9 (C), 161.6 (C), 134.7 (CH), 133.3 (CH), 132.0 (C), 129.9 (C), 127.7 (CH), 124.5 (C), 121.6 (C), 119.5 (C), 111.8 (CH), 60.7 (CH<sub>2</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 11.6 (CH<sub>3</sub>).

**206**:  $(M+Na)^+ m/z$  calcd for 346.1291 found 346.1303.

.....

### ethyl 4-(hydroxy(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)phenyl)methyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

207



 $C_{18}H_{21}NO_6 M = 347.4 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **207** was obtained, following procedure **F** using ketone **206** (0.400 g, 1.16 mmol), sodium borohydride (0.175 g, 4.64 mmol), MeOH (20 mL), as a orange solid (0.200 g, 0.58 mmol, 50%).

 $\mathbf{Pf} = 117^{\circ}\mathbf{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.43$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.79 (d, *J* = 2.5, 1H, H-6), 7.45 (dd, *J* = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.91 (d, *J* = 8.5, 1H, H-5), 6.59 (d, *J* = 3.0, 1H, H-8), 4.27 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 167.1 (C), 162.2 (C), 158.8 (C), 134.0 (C), 132.7 (CH), 131.0 (CH), 126.3 (C), 126.2 (C), 121.6 (CH), 120.5 (C), 120.0 (C), 112.3 (CH), 73.3 (CH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 56.5 (CH<sub>3</sub>), 52.4 (CH<sub>3</sub>), 14.9 (CH<sub>3</sub>), 11.1 (CH<sub>3</sub>).

#### 

### Ethyl 5-(hydroxy(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)phenyl)methyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

208



 $C_{18}H_{21}NO_6 M = 347.4 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **208** was obtained, following procedure **F** using ketone **205** (0.400 g, 1.16 mmol), sodium borohydride (0.175 g, 4.64 mmol) and MeOH (20 mL), as a pale yellow solid (0.220 g, 0.63 mmol, 54%).

 $\mathbf{Pf} = 175^{\circ}\mathrm{C}$ 

 $\mathbf{R}_{f} = 0.48$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.83 (d, *J* = 2.5 1H, H-6), 7.47 (dd, *J* = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.97 (d, *J* = 8.5, 1H, H-5), 5.80 (d, *J* = 2.0, 1H, CH), 5.76 (d, *J* = 2.5, 1H, H-8), 4.29 (q, *J* = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.4 (C), 161.9 (C), 159.0 (C), 137.4 (C), 133.7 (C), 131.8 (CH), 130.1 (CH), 128.6 (C), 118.9 (C), 112.3 (CH), 112.0 (C), 110.6 (CH), 69.65 (CH), 60.1 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>), 52.1 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 12.9 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 348.1447 found 348.1467.



209



 $C_{18}H_{21}NO_5 M = 331.4 \text{ g/mol}$ 

Compound **209** was obtained, following procedure **G** using alcohol **207** (0.200 g, 0.58 mmol), Pd/C (10%) (0.186 g, 0.174 mmol), MeOH (10 mL), as a orange oil (0.095 g, 0.29 mmol, 50%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.60 \text{ (SiO}_{2}, \text{Cyc/EtOAc}, 7/3).$ 

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.61 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.24 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.89 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 6.57 (d, J = 2.5, 1H, H-8), 4.31 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.9 (C), 161.9 (C), 157.2 (C), 133.4 (CH), 132.8 (C), 131.5 (CH), 128.0 (C), 126.1 (C), 124.1 (C), 120.8 (CH), 119.7 (C), 112.1 (CH), 59.9 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 10.5 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**: (M+H)<sup>+</sup> *m*/*z* calcd for 332.1498 found 332.1480.

Ethyl 5-(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylate

210



 $C_{18}H_{21}NO_5 M = 331.4 \text{ g/mol}$ 

Compound **210** was obtained, following procedure **G** using alcohol **208** (0.200 g, 0.58 mmol), Pd/C (10%) (0.186 g, 0.174 mmol) and MeOH (10 mL), as a orange oil (0.170 g, 0.51 mmol, 88%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.84$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.64 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.28 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.93 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 5.83 (d, J = 2.5, 1H, H-8), 4.28 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.6 (C), 162.2 (C), 157.8 (C), 135.6 (CH), 133.5 (C), 131.7 (CH), 130.4 (C), 128.7 (C), 119.8 (CH), 118.4 (C), 112.2 (CH), 111.4, (C), 59.8 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>), 12.9 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+H)^+ m/z$  calcd for 332.1498 found 332.1483.

# Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-4-(4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate



 $C_{24}H_{31}NO_7 M = 445.5 \text{ g/mol}$ 

*N*-alkylated compound **211** was obtained, following procedure **H** using compound **209** (0.090 g, 0.27 mmol), cesium carbonate (0.176 g, 0.54 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.040 mL, 0.27 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (15 mL), as a pale yellow oil (0.066 g, 0.15 mmol, 55%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.76$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.60 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.22 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.88 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 6.45 (s, 1H, H-8), 4.31 – 4.21 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.10 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.24 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06 – 1.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.22 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 166.8 (C), 161.9 (C), 157.4 (C), 133.4 (CH), 132.8 (C), 131.5 (CH), 128.3 (C), 127.1 (CH), 121.8 (C), 119.8 (C), 119.2 (C), 112.2 (CH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 59.6 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>), 48.5 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 26.8 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 446.2179 found 446.2218.



212



 $C_{24}H_{31}NO_7 M = 445.5 \text{ g/mol}$ 

*N*-alkylated compound **212** was obtained, following procedure **H** using compound **210** (0.165 g, 0.50 mmol), cesium carbonate (0.326 g, 1 mmol), ethyl 4-bromobutyrate (0.072 mL, 0.5 mmol) and CH<sub>3</sub>CN (30 mL), as a brown oil (0.136 g, 0.31 mmol, 62%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.96$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.62 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.24 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.90 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 5.65 (s, 1H, H-8), 4.26 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.23 – 4.17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.11 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.91 – 3.84 (m, 8H, 2 x CH<sub>3</sub> + CH<sub>2</sub>), 2.30 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.97 – 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 166.6 (C), 162.0 (C), 157.9 (C), 137.6 (C), 133.7 (CH), 131.8 (CH), 130.0 (C), 129.8 (C), 120.1 (C), 118.9 (C), 112.3 (CH), 111.8 (CH), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 59.4 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 52.1 (CH<sub>3</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 446.2179 found 446.2189.

Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-4-(4-hydroxy-3-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

213



 $C_{23}H_{29}NO_7 M = 431.5 \text{ g/mol}$ 

Alcohol **213** was obtained, following procedure **I** using *N*-alkylated compound **211** (0.066 g, 0.15 mmol), BBr<sub>3</sub> (1M) (0.6 mL, 0.6 mmol) and DCM (1 mL), as a pink oil (0.056 g, 0.13 mmol, 87%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.95$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 7/3).

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.62 (s, 1H, CH, 7.63 (d, J = 2.0, 1H, H-6), 7.25 (dd, J = 8.5, 2.0, 1H, H-3), 6.90 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 6.45 (s, 1H, H-8), 4.33 – 4.23 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 4.11 (q,  $J = 7.0, 2H, CH_2$ ), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.28 – 2.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 – 1.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.36 (t,  $J = 7.0, 3H, CH_3$ ), 1.23 (t,  $J = 7.0, 3H, CH_3$ ).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.1 (C), 170.6 (C), 162.0 (C), 159.9 (C), 136.1 (CH), 131.8 (C), 129.2 (CH), 128.3 (C), 127.1 (CH), 121.9 (C), 119.2 (C), 117.5 (CH), 112.0 (C), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 59.6 (CH<sub>2</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>), 48.7 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 26.8 (CH<sub>2</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 432.2022 found 432.2022.

# Ethyl 1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-5-(4-hydroxy-3-(methoxycarbonyl)benzyl)-3-methyl-*1H*-pyrrole-2-carboxylate

. . . . . . . . . . . . . . . .



### $C_{23}H_{29}NO_7 M = 431.5 \text{ g/mol}$

Alcohol **214** was obtained, following procedure **I** using *N*-alkylated compound **212** (0.112 g, 0.25 mmol), BBr<sub>3</sub> (1M) (1.0 mL, 1.0 mmol) and DCM (1 mL), as a yellow oil (0.093 g, 0.22 mmol, 88%).

 $\mathbf{R}_{f} = 0.97$  (SiO<sub>2</sub>, Cyc/EtOAc, 5/5).

<sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.67 (s, 1H, OH), 7.66 (d, J = 2.5, 1H, H-6), 7.27 (dd, J = 8.5, 2.5, 1H, H-3), 6.92 (d, J = 8.5, 1H, H-5), 5.65 (s, 1H, H-8), 4.27 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.23 – 4.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.12 (q, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (t, J = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 – 1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.35 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (t, J = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.0 (C), 170.4 (C), 162.0 (C), 160.4 (C), 137.6 (C), 136.3 (CH), 129.8 (C), 129.6 (CH), 128.9 (C), 118.9 (CH), 117.8(C), 112.3 (CH), 111.8 (C), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-ESIMS**:  $(M+Na)^+$  *m*/*z* calcd for 432.2022 found 432.2015.

#### **BIOCHEMISTRY PART**

#### **RMN evaluation:**

The NMR samples were: 0.1mM PDZ1 PSD-95, 0.2 mM phosphate buffer, 1 mM ligand, in 90%  $H_2O/10\%$   $D_2O$  at pH 6.5. If necessary, the ligands were dissolved in DMSO and a correct aliquot added to the protein sample to achieve a 1:10 protein:ligand ratio, and with <1% DMSO in the final sample. Spectra were recorded at 25 °C using a Bruker Avance 600 MHz spectrometer fitted with a triple resonance, single z-axis gradient cryogenic probehead. <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H spectra were acquired using H<sub>2</sub>O flip-back pulses. Spectra were processed using Bruker Topspin software.

#### ITC experiment:

#### Determination of K<sub>D</sub> of the PSD-95 PDZ1/24 Interaction by ITC

Isothermal titration calorimetry experiments were performed by Liam Dorr in the group of Professor Lu-Yun Lian at the University of Liverpool, UK.

Isothermal Titration Calorimetry was carried out on purified samples of protein exchanged into 20mM phosphate buffer at pH 6.3 using a PD-10 desalting column (GE Healthcare). The HPLC purified, lyophilised peptides (GenicBio) were directly resuspended in the required buffer and pH adjusted where necessary. The small molecule inhibitor compounds were dissolved in DMSO. For the initial protein - natural ligand binding experiments (i.e. with no small molecule inhibitor present), control experiments whereby the peptide was titrated into buffer and buffer into protein exhibited undetectable heat exchange, confirming that there was appropriate match of buffer conditions with no evidence of dilution effects. For the competition experiments, the exact final DMSO percentage present in the protein solution was calculated and peptide samples were then prepared in buffer containing this DMSO concentration. Control experiments whereby the peptide was titrated into buffer (containing DMSO) and buffer (containing DMSO) into protein exhibited undetectable heat exchange, confirming that there was appropriate match of DMSO/buffer conditions with no evidence of dilution effects. To maintain consistency between titrations the same stock buffer was used in all protein and peptide preparations. Experiments were conducted at 25 °C with an ITC200 (GE Healthcare) with a 60 µl syringe volume and 200 µl cell capacity. The protein - natural ligand titrations were carried out using between 94 µM of protein in the cell and 750 µM concentration of peptide in the syringe. For the competition experiments, the small molecule inhibitor was added the protein sample prior to being put in the cell, with the final concentration of inhibitor present in the sample being in the protein:inhibitor ratio of 1:5,

**Experimental Part** 

1:15, 1:30). The peptide was added into the cell in sequential 2.39  $\mu$ l injections (at a rate of 1.195  $\mu$ l per second) with a 180 second interval between each injection. One site (3 parameters) curve fitting was carried out using the MicroCal-supported ITC module within Origin version 7 to obtain the K<sub>d</sub> values.

The Ki value of the ligand is determined using the equation:

$$K_D^{app} = K_D + \frac{K_D}{K_I} \left[ L_{2tot} \right]$$

where  $K_D^{app}$  is the measured Kd in the presence of inhibitor, and  $L_{2tot}$  is the concentration of the ligand present.



# ANNEXES

# ANNEXE 1: RMN HSQC 24





# ANNEXE 2: RMN HSQC 30


ANNEXE 3: RMN HSQC 31



ANNEXE 4: RMN HSQC 32



# ANNEXE 5: RMN HSQC 48



# ANNEXE 6: RMN HSQC 49

Annexes



### ANNEXE 7: RMN HSQC 87

ANNEXE 8: RMN HSQC 88





#### ANNEXE 9: RMN HSQC 89

ANNEXE 10: RMN HSQC 90





#### ANNEXE 11: RMN HSQC 91

ANNEXE 12: RMN HSQC 92





ANNEXE 13: RMN HSQC 93

ANNEXE 14: RMN HSQC 87/88





ANNEXE 15: RMN HSQC 87/89

ANNEXE 16: RMN HSQC 87/90





ANNEXE 17: RMN HSQC 87/91

ANNEXE 18: RMN HSQC 87/92





### ANNEXE 19: RMN HSQC 87/93

ANNEXE 20: RMN HSQC 88/89





ANNEXE 21: RMN HSQC 88/90

ANNEXE 22: RMN HSQC 88/91





ANNEXE 23: RMN HSQC 88/92

ANNEXE 24: RMN HSQC 88/93





ANNEXE 25: RMN HSQC 89/90

ANNEXE 26: RMN HSQC 89/91





ANNEXE 27: RMN HSQC 89/92

ANNEXE 28: RMN HSQC 89/93





ANNEXE 29: RMN HSQC 90/91

ANNEXE 30: RMN HSQC 90/92





ANNEXE 31: RMN HSQC 90/93

ANNEXE 32: RMN HSQC 91/92





ANNEXE 33: RMN HSQC 91/93

ANNEXE 34: RMN HSQC 92/93





# ANNEXE 35: RMN HSQC 108



# ANNEXE 36: RMN HSQC 109



### ANNEXE 37: RMN HSQC 175

#### **ANNEXE 38: Dynamique moléculaire**

#### Conditions générale pour la réalisation des différentes dynamiques :

Les différentes dynamiques ont été réalisées à partir de la structure cristallographique 3GSL de PSD-95 disponible sur PDB qui dispose des domaines PDZ1 et PDZ2 de la protéine. Pour les études, nous nous affranchirons du domaine PDZ2 de la protéine en ne gardant que les résidus avant le résidu Arg 150 afin de ne conserver que le domaine PDZ1.

A l'aide des différentes structure disponibles sur PDB contenant des ligands peptidiques, un ligand a été ajouté dans la poche PDZ en respectant les interactions avec la protéine puis des mutations ont été réalisées sur ce modèle afin d'obtenir les peptides ou peptoïdes désirés pour les différentes études.

Tout les modèles ont fait l'objet de la même préparation, les hydrogènes ont été ajoutés à partir du site H++, afin de calculer à l'aide de l'équation de poisson boltzman le plus précisément possible les pKa locaux, et ce dans le but de prédire au mieux l'état de protonation des histidines. La protonation réalisée, les modèles ont été minimisé avec le logiciel sybylx2.1 afin de vérifier qu'aucune gène stérique n'est été oubliée.

La solvatation des modèles est ensuite réalisée, en sachant que les molécules d'eau cristallographique ont été conservées à leur place depuis le départ afin d'éviter une trop grand respiration de la structure lors du démarrage de la dynamique. Cette solvatation se passe en deux étapes :

- A l'aide de sybyl, une première sphère de coordination pour la protéine est réalisée (ajout d'environ 500 molécules d'eau).
- Une boite d'eau est créée autour du précédent système grâce à l'aide VMD et du module solvate 1.4 (solvate nom.psf nom.pdb –t 15 –o nom-vmd). La boite fait donc comme dimension 15 Å, de part et d'autre du précédent modèle.

Le modèle est ensuite ionisé, c'est-à-dire qu'une fois la boite de solvant créée, une concentration en sel NaCl de 150 mm est ajoutée au système.

Les conditions utilisées pour chaque dynamique sont les suivantes :

- 10 ps de minimisation

- 10 ns de dynamique
- Condition périodique
- Interaction longue distance
- Champ de force CHARMM
- Paramètre : Charmm 22
- Température : 298 K

#### <u>Résultats des *dockings* sur les molécules créées virtuellement lors du</u> <u>FBDD :</u>

Dans le tableau, la numérotation utilisée pour nommer les molécules sera la suivante : A-X-B où A correspond à la position du premier frament où se fera la liaison, X correspond au nombre de carbones entre les deux fragments et B à la position du deuxième fragment.



Dans le tableau ci-dessous, nous retrouvons les résultats des 11 dockings ainsi que la moyenne de ceux-ci. Dans le tableau, PSD 3GSL correspond à la structure de PSD-95 PDZ1 issu de la structure 3GSL de PDB. PSD 1 à PSD 10 correspondent aux structures de PSD-95 PDZ1 issues de la dynamique moléculaire réalisée entre PSD-95 PDZ1 (PDB : 3GSL) et la cypin.

Numérotation molécule	PSD 3GSL	PSD 1	PSD 2	PSD 3	PSD 4	PSD 5	PSD 6	PSD 7	PSD 8	PSD 9	PSD 10	moyenne
1d-0-2a	-6,3	-6,3	-6,1	-5,9	-6,1	-6,2	-6,2	-6	-6,3	-6,2	-5,5	-6,1
1c-0-2a	-6,6	-6,7	-6,8	-6,1	-6,3	-6,6	-6,4	-6,2	-6,6	-6,9	-6	-6,5
1b-0-2a	-6,4	-6,3	-6,6	-6,1	-5,9	-6,4	-6,2	-6,4	-6,2	-6,4	-5,4	-6,2
1a-0-2a	-6,5	-5,7	-6,2	-5,9	-5,9	-6	-5,9	-6,3	-6,4	-6	-5,3	-6,0
1d-1-2a	-7	-6,4	-6,4	-6,4	-6,6	-6,2	-6,2	-6,4	-6,3	-6,4	-5,5	-6,3
1c-1-2a	-6,7	-6,7	-6,8	-6,3	-6,6	-6,5	-6,4	-6,2	-6,8	-7	-5,6	-6,5
1b-1-2a	-6,8	-6,8	-6,3	-6	-6,4	-6,5	-5,8	-6,2	-6,2	-6,5	-5,5	-6,3
1a-1-2a	-6,9	-6,1	-6,8	-6,2	-6,2	-6,1	-6,1	-6,1	-6,3	-6,5	-5,6	-6,3
1c-2-2a	-6,4	-6,4	-6,5	-6,3	-6,3	-6,1	-6,5	-5,9	-6,6	-6,2	-5,7	-6,3
1b-2-2a	-7,1	-6,6	-6,4	-6,6	-6,5	-6,3	-5,8	-6	-6,1	-6,3	-5,8	-6,3
1d-2-2a	-7,2	-6,7	-6,5	-6,4	-6,2	-6,6	-6,1	-6,2	-6,4	-6,5	-5,8	-6,4
1a-2-2a	-7	-6,3	-6,6	-6,2	-6,1	-6,4	-6,5	-6,2	-5,9	-5,9	-5,7	-6,3
1d-0-2b	-6,6	-6,4	-6,1	-6,2	-6,6	-6,2	-6	-6,4	-6,2	-6,3	-4,8	-6,2
1c-0-2b	-6,9	-6,2	-6,4	-6	-5,9	-6,2	-6,1	-6,5	-6,5	-6,9	-5,5	-6,3

1b-0-2b	-7	-6,4	-6,6	-6,2	-6,4	-6,3	-6,7	-6,7	-6,9	-7,1	-5,7	-6,5
1a-0-2b	-6,6	-6,2	-6,4	-6,2	-6,2	-6,1	-6,3	-6,2	-5,9	-6,4	-5,1	-6,1
1d-1-2b	-6,9	-6,4	-6,5	-6,4	-6,7	-6,2	-6,3	-6,2	-6,6	-6,2	-5,3	-6,3
1c-1-2b	-7,5	-6,7	-6,7	-6,4	-6,4	-6,4	-6,4	-6	-6,4	-6,9	-5,5	-6,5
1b-1-2b	-7,3	-6,5	-6,7	-6,7	-6	-6,5	-6,1	-6,4	-6,5	-6,2	-5,4	-6,4
1a-1-2b	-6,9	-6,4	-6,5	-6,4	-6,1	-6,1	-5,9	-6,1	-6,1	-6,2	-5,3	-6,2
1d-2-2b	-6,7	-6,7	-6	-6	-6,1	-6,2	-6,1	-6,2	-6,4	-6,3	-5,4	-6,2
1c-2-2b	-6,7	-6,1	-6,5	-6,2	-6,4	-6	-6,4	-6,2	-6,4	-6,7	-4,9	-6,2
1b-2-2b	-7,2	-6,7	-6,3	-5,7	-6,4	-6,3	-6,3	-6,5	-6,6	-6,9	-5,5	-6,4
1a-2-2b	-6,8	-6,4	-6,5	-6	-6	-6,1	-5,7	-6,1	-6,3	-6	-5,4	-6,1
1d-0-3c	-5,7	-5,6	-5,4	-5,4	-5,7	-5,3	-5,1	-4,9	-5,5	-5,4	-4,2	-5,3
1c-0-3c	-5,5	-5,2	-5,1	-5,2	-5,1	-5,6	-5	-5,4	-6	-5,2	-4,6	-5,3
1b-0-3c	-5,9	-5,6	-5,6	-5,3	-5,7	-5,8	-5,3	-5,2	-5,4	-5,4	-4,4	-5,4
1a-0-3c	-6	-5,4	-5,1	-4,8	-5,1	-5,1	-4,8	-4,9	-5	-5,3	-4,3	-5,1
1d-1-3c	-5,9	-5,5	-5,8	-5,1	-5,2	-5,6	-5	-4,9	-5,3	-5,6	-4,5	-5,3
1c-1-3c	-5,5	-5,1	-4,6	-5,1	-5	-5,7	-5,2	-5,4	-6,1	-5,3	-4,7	-5,2
1b-1-3c	-5,8	-5,6	-5,7	-5,3	-5,4	-5,9	-5,2	-5,1	-5,5	-5,6	-4,5	-5,4
1a-1-3c	-5,9	-5,3	-5,1	-5	-5,2	-5	-4,7	-5,1	-5,5	-5,5	-4,5	-5,2
1d-2-3c	-5,7	-5,4	-5,2	-5,1	-5,2	-5,7	-5,1	-4,9	-5,2	-5,3	-4,3	-5,2
1c-2-3c	-5,6	-5	-4,9	-5,3	-5,4	-5,8	-4,8	-4,9	-6	-5,5	-4,4	-5,2
1b-2-3c	-5,7	-5,7	-5,2	-5,2	-5,3	-5,4	-4,9	-5,3	-5,1	-5,5	-4,6	-5,3
1a-2-3c	-6	-5,4	-5,1	-5,3	-4,9	-5,2	-4,9	-4,7	-5,1	-5,5	-4,2	-5,1
1d-0-3a	-6,2	-6,1	-6,1	-5,6	-5,7	-5,6	-5,4	-5,3	-6,1	-5,6	-4,8	-5,7
1c-0-3a	-5,7	-5,7	-5,3	-5,5	-5,3	-6,1	-5,6	-5,3	-6,5	-5,4	-5	-5,6
1b-0-3a	-6	-6,1	-6,2	-5,7	-5,8	-6,3	-5,3	-5,5	-6,1	-5,9	-4,7	-5,8
1a-0-3a	-6,1	-5,7	-5,7	-5,3	-5,6	-5,7	-5,4	-5,3	-6	-5,6	-4,6	-5,5
1d-1-3a	-6	-5,7	-5,7	-5,5	-5,7	-5,6	-5,6	-5,2	-5,7	-5,7	-4,7	-5,6
1c-1-3a	-5,7	-5,5	-5,5	-5,6	-5,5	-5,9	-5,3	-5,3	-6,5	-5,7	-4,9	-5,6
1b-1-3a	-5,8	-6	-5,9	-5,3	-5,6	-6	-5,2	-5,4	-5,9	-5,9	-4,7	-5,6
1a-1-3a	-6,1	-5,8	-5,7	-5,7	-5,7	-5,6	-5,6	-5,6	-5,8	-5,8	-4,8	-5,7
1d-2-3a	-6,1	-5,8	-5,8	-5,4	-5,5	-6,2	-5,2	-5,3	-5,2	-5,4	-4,8	-5,5
1c-2-3a	-5,7	-5,4	-5,5	-5,4	-5,4	-5,6	-5,5	-5,4	-6,1	-5,4	-4,9	-5,5
1b-2-3a	-5,8	-5,5	-5,6	-5,6	-5,5	-5,6	-5,3	-5,1	-5,5	-5,8	-4,8	-5,5
1a-2-3a	-5,8	-5,7	-5,2	-5,6	-5,1	-5,7	-5,3	-5,5	-5,8	-5,5	-4,4	-5,4
1d-0-3b	-5,5	-5,5	-5,5	-5,4	-5,1	-5,6	-5,3	-5,4	-5,5	-5,8	-4,5	-5,4
1c-0-3b	-5,8	-5,5	-5,5	-5,6	-5,5	-5,5	-5,1	-5,2	-5,6	-5,5	-4,7	-5,4
1b-0-3b	-5,7	-5,7	-5,9	-5,4	-5,6	-5,7	-5,5	-5,6	-5,8	-5,5	-4,9	-5,6
1a-0-3b	-5,7	-5,6	-5,2	-5,4	-5,5	-5,5	-5,8	-5,7	-5,4	-5,3	-4,4	-5,4
1d-1-3b	-6,1	-5,9	-6	-5,6	-5,6	-6	-5,9	-5,4	-5,9	-5,3	-4,7	-5,7
1c-1-3b	-5,7	-5,8	-5,5	-5,5	-5,5	-5,6	-5,5	-5,6	-5,7	-5,8	-5,1	-5,6
1b-1-3b	-6	-5,7	-5,9	-5,5	-5,7	-5,4	-5,5	-5,6	-5,7	-5,6	-4,8	-5,6
1a-1-3b	-6,1	-5,9	-5,4	-5	-5,4	-5,5	-5,6	-5,6	-5,5	-5,7	-4,7	-5,5
1d-2-3b	-6,1	-6	-5,7	-5,5	-5,8	-5,5	-5,6	-5,5	-5,7	-5,5	-5,1	-5,6
1c-2-3b	-6	-5,6	-5,8	-5,5	-5,3	-5,9	-5,2	-5,9	-6,4	-5,9	-5	-5,7
1b-2-3b	-6,2	-6,2	-6	-5,6	-5,7	-6,3	-5,8	-5,8	-5,9	-5,6	-4,8	-5,8
1a-2-3b	-5,6	-5,6	-5,5	-5,2	-5,6	-5,5	-5,5	-5,3	-5,8	-5,4	-4,7	-5,4

#### ANNEXE 39: ITC TQV 218











### **ANNEXE 41: ITC LQRRRETQV 221**





#### ANNEXE 42: ITC 5-HT<sub>2C</sub>





ANNEXE 43: ITC 5-HT<sub>2A</sub>



# BIBLIOGRAPHIE
## Bibliographie

- (1) Merskey, H. The Definition of Pain. *Eur. Psychiatry* **1991**, *6* (4), 153–159.
- (2) Mazzuca, M. Canaux ioniques, douleur et analgésie Effets analgésiques du blocage d'ASIC 1a par la Psalmotoxine 1 École Doctorale Des Sciences de La Vie et de La Santé, Université de Nice-Sophia Antipolis, 2008.
- (3) Boccard, E.; Deymier, V.; Institut UPSA de la douleur (France). *Pratique du traitement de la douleur*; A Éditorial: Paris, **2006**.
- (4) O'Brien, T.; Breivik, H. The Impact of Chronic pain—European Patients' Perspective over 12 Months. *Scand. J. Pain* **2012**, *3* (1), 23–29.
- (5) Finnerup, N. B.; Attal, N.; Haroutounian, S.; McNicol, E.; Baron, R.; Dworkin, R. H.; Gilron, I.; Haanpää, M.; Hansson, P.; Jensen, T. S.; Kamerman, P. R.; Lund, K.; Moore, A.; Raja, S. N.; Rice, A. S. C.; Rowbotham, M.; Sena, E.; Siddall, P.; Smith, B. H.; Wallace, M. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Neurol.* 2015, *14* (2), 162–173.
- (6) Merskey, H.; Bogduk, N.; International Association for the Study of Pain; Task Force on Taxonomy. *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*; IASP Press: Seattle, **1994**.
- Dworkin RH; Backonja M; Rowbotham MC; et al. Advances in Neuropathic Pain: Diagnosis, Mechanisms, and Treatment Recommendations. *Arch. Neurol.* 2003, 60 (11), 1524–1534.
- (8) Jensen, T. S.; Gottrup, H.; Sindrup, S. H.; Bach, F. W. The Clinical Picture of Neuropathic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429* (1–3), 1–11.
- (9) Jensen, T. S.; Baron, R. Translation of Symptoms and Signs into Mechanisms in Neuropathic Pain. *Pain* **2003**, *102* (1–2), 1–8.
- (10) Bouhassira, D. *Les douleurs neuropathiques*; Institut UPSA de la douleur: Rueil-Malmaison, 2000.
- (11) Bouhassira, D.; Attal, N. *Douleurs neuropathiques*; Arnette, **2012.**
- (12) Poupon, L.; Kerckhove, N.; Vein, J.; Lamoine, S.; Authier, N.; Busserolles, J.; Balayssac, D. Minimizing Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Preclinical and Clinical Development of New Perspectives. *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, *14* (8), 1269–1282.
- Bouhassira, D.; Attal, N.; Alchaar, H.; Boureau, F.; Brochet, B.; Bruxelle, J.; Cunin, G.; Fermanian, J.; Ginies, P.; Grun-Overdyking, A.; Jafari-Schluep, H.; Lantéri-Minet, M.; Laurent, B.; Mick, G.; Serrie, A.; Valade, D.; Vicaut, E. Comparison of Pain Syndromes Associated with Nervous or Somatic Lesions and Development of a New Neuropathic Pain Diagnostic Questionnaire (DN4). *Pain* 2005, *114* (1–2), 29–36.
- (14) Bennett, M. The LANSS Pain Scale: The Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs. *Pain* **2001**, *92* (1–2), 147–157.
- (15) Freynhagen, R.; Baron, R.; Gockel, U.; Tölle, T. R. painDETECT: A New Screening Questionnaire to Identify Neuropathic Components in Patients with Back Pain. *Curr. Med. Res. Opin.* 2006, 22 (10), 1911–1920.
- (16) Rasmussen, P. V.; Sindrup, S. H.; Jensen, T. S.; Bach, F. W. Symptoms and Signs in Patients with Suspected Neuropathic Pain. *Pain* **2004**, *110* (1–2), 461–469.
- (17) Melzack, R. The McGill Pain Questionnaire: Major Properties and Scoring Methods. *PAIN* **1975**, *1* (3), 277–299.
- (18) Boureau, F.; Doubrère, J.F; Luu M. Study of Verbal Description in Neuropathic Pain. *Pain* **1990**, *42*, 145–152.

- (19) Bennett, M. I.; Attal, N.; Backonja, M. M.; Baron, R.; Bouhassira, D.; Freynhagen, R.; Scholz, J.; Tölle, T. R.; Wittchen, H.-U.; Jensen, T. S. Using Screening Tools to Identify Neuropathic Pain. *PAIN* **2007**, *127* (3), 199–203.
- (20) Bennett, M. I.; Smith, B. H.; Torrance, N.; Potter, J. The S-LANSS Score for Identifying Pain of Predominantly Neuropathic Origin: Validation for Use in Clinical and Postal Research. *J. Pain* **2005**, *6* (3), 149–158.
- (21) Dworkin, R. H.; O'Connor, A. B.; Backonja, M.; Farrar, J. T.; Finnerup, N. B.; Jensen, T. S.; Kalso, E. A.; Loeser, J. D.; Miaskowski, C.; Nurmikko, T. J.; Portenoy, R. K.; Rice, A. S. C.; Stacey, B. R.; Treede, R.-D.; Turk, D. C.; Wallace, M. S. Pharmacologic Management of Neuropathic Pain: Evidence-Based Recommendations. *PAIN* 2007, *132* (3), 237–251.
- (22) Paoli, F.; Darcourt, G.; Cossa, P. [Preliminary note on the action of imipramine in painful states]. *Rev. Neurol. (Paris)* **1960**, *102*, 503–504.
- (23) Bennett, D. L. H. Informed Drug Choices for Neuropathic Pain. *Lancet Neurol.* 2015, *14* (2), 129–130.
- Martinez, V.; Attal, N.; Bouhassira, D.; Lantéri-Minet, M. Les Douleurs Neuropathiques Chroniques : Diagnostic, évaluation et Traitement En Médecine Ambulatoire. Recommandations Pour La Pratique Clinique de La Société Française D'étude et de Traitement de La Douleur. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* 2010, 11 (1), 3–21.
- Martinez, V.; Attal, N.; Vanzo, B.; Vicaut, E.; Gautier, J. M.; Bouhassira, D.; Lantéri-Minet, M. Adherence of French GPs to Chronic Neuropathic Pain Clinical Guidelines: Results of a Cross-Sectional, Randomized, "e" Case-Vignette Survey. *PLoS ONE* 2014, 9 (4), e93855.
- (26) Fanning, A. S.; Anderson, J. M. PDZ Domains: Fundamental Building Blocks in the Organization of Protein Complexes at the Plasma Membrane. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103* (6), 767–772.
- (27) Arkin, M. Protein–protein Interactions and Cancer: Small Molecules Going in for the Kill. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (3), 317–324.
- (28) Jubb, H.; Higueruelo, A. P.; Winter, A.; Blundell, T. L. Structural Biology and Drug Discovery for Protein–protein Interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33* (5), 241–248.
- (29) Braun, P.; Gingras, A.-C. History of Protein-Protein Interactions: From Egg-White to Complex Networks. *Proteomics* **2012**, *12* (10), 1478–1498.
- (30) Nooren, I. M.; Thornton, J. M. Diversity of Protein–protein Interactions. *EMBO J.* **2003**, *22* (14), 3486–3492.
- (31) Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlaff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksöz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H.; Wanker, E. E. A Human Protein-Protein Interaction Network: A Resource for Annotating the Proteome. *Cell* 2005, *122* (6), 957–968.
- (32) Braun, P.; Gingras, A.-C. History of Protein-Protein Interactions: From Egg-White to Complex Networks. *PROTEOMICS* **2012**, *12* (10), 1478–1498.
- (33) Fletcher, S.; Hamilton, A. D. Protein Surface Recognition and Proteomimetics: Mimics of Protein Surface Structure and Function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 9 (6), 632–638.
- (34) Basdevant, N.; Weinstein, H.; Ceruso, M. Thermodynamic Basis for Promiscuity and Selectivity in Protein–Protein Interactions: PDZ Domains, a Case Study. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128 (39), 12766–12777.

- (35) Zimmermann, P.; Meerschaert, K.; Reekmans, G.; Leenaerts, I.; Small, J. V.; Vandekerckhove, J.; David, G.; Gettemans, J. PIP2-PDZ Domain Binding Controls the Association of Syntenin with the Plasma Membrane. *Mol. Cell* **2002**, *9* (6), 1215–1225.
- (36) Kennedy, M. B. Origin of Pdz (Dhr, Glgf) Domains. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20 (9), 350.
- (37) Ye, F.; Zhang, M. Structures and Target Recognition Modes of PDZ Domains: Recurring Themes and Emerging Pictures. *Biochem. J.* **2013**, 455 (1), 1–14.
- (38) Kaneko, T.; Sidhu, S. S.; Li, S. S. C. Evolving Specificity from Variability for Protein Interaction Domains. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (4), 183–190.
- (39) Jansen, F.; Kalbe, B.; Scholz, P.; Fraenzel, B.; Osterloh, M.; Wolters, D.; Hatt, H.; Neuhaus, E. M.; Baumgart, S. Biochemical Large-Scale Interaction Analysis of Murine Olfactory Receptors and Associated Signaling Proteins with PDZ Domains. *Mol. Cell. Proteomics* 2015, mcp.M114.045997.
- (40) Kimber, W. A.; Trinkle-Mulcahy, L.; Cheung, P. C. F.; Deak, M.; Marsden, L. J.; Kieloch, A.; Watt, S.; Javier, R. T.; Gray, A.; Downes, C. P.; Lucocq, J. M.; Alessi, D. R. Evidence That the Tandem-Pleckstrin-Homology-Domain-Containing Protein TAPP1 Interacts with Ptd(3,4)P2 and the Multi-PDZ-Domain-Containing Protein MUPP1 in Vivo. *Biochem. J.* 2002, *361* (3), 525–536.
- (41) Hung, A. Y.; Sheng, M. PDZ Domains: Structural Modules for Protein Complex Assembly. J. Biol. Chem. 2002, 277 (8), 5699–5702.
- (42) Ducki, S.; Bennett, E. Protein-Protein Interactions: Recent Progress in the Development of Selective PDZ Inhibitors. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3* (2), 146–158.
- (43) Niv, M. Y.; Weinstein, H. A Flexible Docking Procedure for the Exploration of Peptide Binding Selectivity to Known Structures and Homology Models of PDZ Domains. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (40), 14072–14079.
- (44) Gianni, S.; Engström, Å.; Larsson, M.; Calosci, N.; Malatesta, F.; Eklund, L.; Ngang, C. C.; Travaglini-Allocatelli, C.; Jemth, P. The Kinetics of PDZ Domain-Ligand Interactions and Implications for the Binding Mechanism. J. Biol. Chem. 2005, 280 (41), 34805–34812.
- (45) Fan, J.-S.; Zhang, M. Signaling Complex Organization by PDZ Domain Proteins. *Neurosignals* **2002**, *11* (6), 315–321.
- (46) http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do.
- (47) Kundu, K.; Backofen, R. Cluster Based Prediction of PDZ-Peptide Interactions. *BMC Genomics* **2014**, *15* (Suppl 1), S5.
- (48) Tonikian, R.; Zhang, Y.; Sazinsky, S. L.; Currell, B.; Yeh, J.-H.; Reva, B.; Held, H. A.; Appleton, B. A.; Evangelista, M.; Wu, Y.; Xin, X.; Chan, A. C.; Seshagiri, S.; Lasky, L. A.; Sander, C.; Boone, C.; Bader, G. D.; Sidhu, S. S. A Specificity Map for the PDZ Domain Family. *PLoS Biol* 2008, 6 (9), e239.
- (49) Birrane, G.; Chung, J.; Ladias, J. A. A. Novel Mode of Ligand Recognition by the Erbin PDZ Domain. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (3), 1399–1402.
- (50) Nissen, K. B.; Haugaard-Kedström, L. M.; Wilbek, T. S.; Nielsen, L. S.; Åberg, E.; Kristensen, A. S.; Bach, A.; Jemth, P.; Strømgaard, K. Targeting Protein-Protein Interactions with Trimeric Ligands: High Affinity Inhibitors of the MAGUK Protein Family. *PLOS ONE* 2015, 10 (2), e0117668.
- (51) Piserchio, A.; Pellegrini, M.; Mehta, S.; Blackman, S. M.; Garcia, E. P.; Marshall, J.; Mierke, D. F. The PDZ1 Domain of SAP90: Characterization of Structure and Binding. J. Biol. Chem. 2002, 277 (9), 6967–6973.
- (52) Piserchio, A.; Pellegrini, M.; Mehta, S.; Blackman, S. M.; Garcia, E. P.; Marshall, J.; Mierke, D. F. The PDZ1 Domain of SAP90: CHARACTERIZATION OF STRUCTURE AND BINDING. J. Biol. Chem. 2002, 277 (9), 6967–6973.

- (53) Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. Crystal Structures of a Complexed and Peptide-Free Membrane Protein–Binding Domain: Molecular Basis of Peptide Recognition by PDZ. *Cell* **1996**, *85* (7), 1067–1076.
- (54) Vries, L. D.; Lou, X.; Zhao, G.; Zheng, B.; Farquhar, M. G. GIPC, a PDZ Domain Containing Protein, Interacts Specifically with the C Terminus of RGS-GAIP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (21), 12340–12345.
- Patra, C. R.; Rupasinghe, C. N.; Dutta, S. K.; Bhattacharya, S.; Wang, E.; Spaller, M. R.; Mukhopadhyay, D. Chemically Modified Peptides Targeting the PDZ Domain of GIPC as a Therapeutic Approach for Cancer. ACS Chem. Biol. 2012, 7 (4), 770–779.
- (56) Muders, M. H.; Vohra, P. K.; Dutta, S. K.; Wang, E.; Ikeda, Y.; Wang, L.; Udugamasooriya, D. G.; Memic, A.; Rupashinghe, C. N.; Baretton, G. B.; Aust, D. E.; Langer, S.; Datta, K.; Simons, M.; Spaller, M. R.; Mukhopadhyay, D. Targeting GIPC/Synectin in Pancreatic Cancer Inhibits Tumor Growth. *Clin. Cancer Res.* 2009, *15* (12), 4095–4103.
- (57) Roberts, K. E.; Cushing, P. R.; Boisguerin, P.; Madden, D. R.; Donald, B. R. Computational Design of a PDZ Domain Peptide Inhibitor That Rescues CFTR Activity. *PLoS Comput Biol* **2012**, *8* (4), e1002477.
- (58) Pedemonte, N. Small-Molecule Correctors of Defective F508-CFTR Cellular Processing Identified by High-Throughput Screening. J. Clin. Invest. 2005, 115 (9), 2564–2571.
- (59) Goor, F. V.; Straley, K. S.; Cao, D.; González, J.; Hadida, S.; Hazlewood, A.; Joubran, J.; Knapp, T.; Makings, L. R.; Miller, M.; Neuberger, T.; Olson, E.; Panchenko, V.; Rader, J.; Singh, A.; Stack, J. H.; Tung, R.; Grootenhuis, P. D. J.; Negulescu, P. Rescue of ΔF508-CFTR Trafficking and Gating in Human Cystic Fibrosis Airway Primary Cultures by Small Molecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, *290* (6), L1117–L1130.
- (60) Aarts, M. Treatment of Ischemic Brain Damage by Perturbing NMDA Receptor-PSD-95 Protein Interactions. *Science* **2002**, *298* (5594), 846–850.
- (61) Cook, D. J.; Teves, L.; Tymianski, M. Treatment of Stroke with a PSD-95 Inhibitor in the Gyrencephalic Primate Brain. *Nature* **2012**, *483* (7388), 213–217.
- (62) Tao, Y.-X.; Johns, R. PDZ Domains at Excitatory Synapses: Potential Molecular Targets for Persistent Pain Treatment. *Curr. Neuropharmacol.* **2006**, *4* (3), 217–223.
- (63) Wattiez, A.-S.; Courteix, C. Protéines à domaines PDZ: cibles potentielles pour le traitement de la douleur chronique. *Douleurs Eval. Diagn. Trait.* 2011, 12 (1), 7–14.
- (64) Tao, F.; Tao, Y.-X.; Gonzalez, J. A.; Fang, M.; Mao, P.; Johns, R. Knockdown of PSD-95/SAP90 Delays the Development of Neuropathic Pain in Rats. *Neuroreport* 2001, 12, 3251–3255.
- (65) Knockdown of PSD-95/SAP90 delays the development of neuropat...: NeuroReport http://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2001/10290/Knockdown\_of\_PSD\_95\_S AP90\_delays\_the\_development.22.aspx (accessed Sep 25, 2015).
- (66) Garry, E. M.; Moss, A.; Delaney, A.; O'Neill, F.; Blakemore, J.; Bowen, J.; Husi, H.; Mitchell, R.; Grant, S. G. N.; Fleetwood-Walker, S. M. Neuropathic Sensitization of Behavioral Reflexes and Spinal NMDA Receptor/CaM Kinase II Interactions Are Disrupted in PSD-95 Mutant Mice. *Curr. Biol.* **2003**, *13* (4), 321–328.
- (67) Zhang, B.; Tao, F.; Liaw, W.-J.; Bredt, D. S.; Johns, R. A.; Tao, Y.-X. Effect of Knock down of Spinal Cord PSD-93/chapsin-110 on Persistent Pain Induced by Complete Freund's Adjuvant and Peripheral Nerve Injury. *Pain* 2003, *106* (1–2), 187– 196.
- (68) Tao, Y.-X.; Rumbaugh, G.; Wang, G.-D.; Petralia, R. S.; Zhao, C.; Kauer, F. W.; Tao, F.; Zhuo, M.; Wenthold, R. J.; Raja, S. N.; Huganir, R. L.; Bredt, D. S.; Johns, R. A.

Impaired NMDA Receptor-Mediated Postsynaptic Function and Blunted NMDA Receptor-Dependent Persistent Pain in Mice Lacking Postsynaptic Density-93 Protein. *J. Neurosci.* **2003**, *23* (17), 6703–6712.

- (69) Atianjoh, F. E.; Yaster, M.; Zhao, X.; Takamiya, K.; Xia, J.; Gauda, E. B.; Huganir, R. L.; Tao, Y.-X. Spinal Cord Protein Interacting with C Kinase 1 Is Required for the Maintenance of Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain but Not for Incision-Induced Post-Operative Pain. *PAIN* 2010, *151* (1), 226–234.
- (70) Florio, S.; Loh, C.; Huang, S.; Iwamaye, A.; Kitto, K.; Fowler, K.; Treiberg, J.; Hayflick, J.; Walker, J.; Fairbanks, C.; Lai, Y. Disruption of nNOS-PSD95 Protein– protein Interaction Inhibits Acute Thermal Hyperalgesia and Chronic Mechanical Allodynia in Rodents. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158* (2), 494–506.
- (71) Shao, D.; Okuse, K.; Djamgoz, M. B. A. Protein–protein Interactions Involving Voltage-Gated Sodium Channels: Post-Translational Regulation, Intracellular Trafficking and Functional Expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009, 41 (7), 1471– 1481.
- (72) Xia, Z.; Gray, J. A.; Compton-Toth, B. A.; Roth, B. L. A Direct Interaction of PSD-95 with 5-HT2A Serotonin Receptors Regulates Receptor Trafficking and Signal Transduction. J. Biol. Chem. 2003, 278 (24), 21901–21908.
- (73) Pichon, X.; Wattiez, A. S.; Becamel, C.; Ehrlich, I.; Bockaert, J.; Eschalier, A.; Marin, P.; Courteix, C. Disrupting 5-HT2A Receptor/PDZ Protein Interactions Reduces Hyperalgesia and Enhances SSRI Efficacy in Neuropathic Pain. *Mol. Ther.* 2010, *18* (8), 1462–1470.
- (74) Patrick, G. L. *Chimie pharmaceutique*; De Boeck Supérieur, 2002.
- (75) Grillo-Bosch, D.; Choquet, D.; Sainlos, M. Inhibition of PDZ Domain-Mediated Interactions. *Drug Discov. Today Technol.* **2013**, *10* (4), e531–e540.
- (76) Lim, I. A.; Merrill, M. A.; Chen, Y.; Hell, J. W. Disruption of the NMDA receptor– PSD-95 Interaction in Hippocampal Neurons with No Obvious Physiological Short-Term Effect. *Neuropharmacology* 2003, 45 (6), 738–754.
- Babault, N.; Cordier, F.; Lafage, M.; Cockburn, J.; Haouz, A.; Prehaud, C.; Rey, F. A.; Delepierre, M.; Buc, H.; Lafon, M.; Wolff, N. Peptides Targeting the PDZ Domain of PTPN4 Are Efficient Inducers of Glioblastoma Cell Death. *Structure* 2011, *19* (10), 1518–1524.
- (78) Yuan, J.; Krämer, A.; Eckerdt, F.; Kaufmann, M.; Strebhardt, K. Efficient Internalization of the Polo-Box of Polo-like Kinase 1 Fused to an Antennapedia Peptide Results in Inhibition of Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res.* 2002, 62 (15), 4186–4190.
- Wei, L.; Butcher, C.; Miao, Y.; Gallazzi, F.; Quinn, T. P.; Welch, M. J.; Lewis, J. S. Synthesis and Biologic Evaluation of 64Cu-Labeled Rhenium-Cyclized Alpha-MSH Peptide Analog Using a Cross-Bridged Cyclam Chelator. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 2007, 48 (1), 64–72.
- (80) Hirbec, H.; Francis, J. C.; Lauri, S. E.; Braithwaite, S. P.; Coussen, F.; Mulle, C.; Dev, K. K.; Couthino, V.; Meyer, G.; Isaac, J. T. R.; Collingridge, G. L.; Henley, J. M. Rapid and Differential Regulation of AMPA and Kainate Receptors at Hippocampal Mossy Fibre Synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 2003, *37* (4), 625–638.
- (81) Vouilleme, L.; Cushing, P. R.; Volkmer, R.; Madden, D. R.; Boisguerin, P. Engineering Peptide Inhibitors To Overcome PDZ Binding Promiscuity. Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49 (51), 9912–9916.
- (82) Cushing, P. R.; Vouilleme, L.; Pellegrini, M.; Boisguerin, P.; Madden, D. R. A Stabilizing Influence: CAL PDZ Inhibition Extends the Half-Life of  $\Delta$ F508-CFTR. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49 (51), 9907–9911.

- (83) Novak, K. A. P.; Fujii, N.; Guy, R. K. Investigation of the PDZ Domain Ligand Binding Site Using Chemically Modified Peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (17), 2471–2474.
- (84) Udugamasooriya, D. G.; Sharma, S. C.; Spaller, M. R. A Chemical Library Approach to Organic-Modified Peptide Ligands for PDZ Domain Proteins: A Synthetic, Thermodynamic and Structural Investigation. *ChemBioChem* 2008, 9 (10), 1587– 1589.
- (85) Bach, A.; Chi, C. N.; Olsen, T. B.; Pedersen, S. W.; Røder, M. U.; Pang, G. F.; Clausen, R. P.; Jemth, P.; Strømgaard, K. Modified Peptides as Potent Inhibitors of the Postsynaptic Density-95/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Interaction. *J. Med. Chem.* 2008, *51* (20), 6450–6459.
- (86) Li, T.; Saro, D.; Spaller, M. R. Thermodynamic Profiling of Conformationally Constrained Cyclic Ligands for the PDZ Domain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14 (6), 1385–1388.
- (87) Piserchio, A.; Salinas, G. D.; Li, T.; Marshall, J.; Spaller, M. R.; Mierke, D. F. Targeting Specific PDZ Domains of PSD-95: Structural Basis for Enhanced Affinity and Enzymatic Stability of a Cyclic Peptide. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (4), 469–473.
- LeBlanc, B. W.; Iwata, M.; Mallon, A. P.; Rupasinghe, C. N.; Goebel, D. J.; Marshall, J.; Spaller, M. R.; Saab, C. Y. A Cyclic Peptide Targeted against PSD-95 Blocks Central Sensitization and Attenuates Thermal Hyperalgesia. *Neuroscience* 2010, *167* (2), 490–500.
- (89) Seedorff, S.; Appelt, C.; Beyermann, M.; Schmieder, P. Design, Synthesis, Structure and Binding Properties of PDZ Binding, Cyclic β-Finger Peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 395 (4), 535–539.
- (90) Hammond, M. C.; Harris, B. Z.; Lim, W. A.; Bartlett, P. A. β Strand Peptidomimetics as Potent PDZ Domain Ligands. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (12), 1247–1251.
- Bach, A.; Eildal, J. N. N.; Stuhr-Hansen, N.; Deeskamp, R.; Gottschalk, M.; Pedersen, S. W.; Kristensen, A. S.; Strømgaard, K. Cell-Permeable and Plasma-Stable Peptidomimetic Inhibitors of the Postsynaptic Density-95/ N-Methyl-D-Aspartate Receptor Interaction. J. Med. Chem. 2011, 54 (5), 1333–1346.
- (92) Grandy, D.; Shan, J.; Zhang, X.; Rao, S.; Akunuru, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Alpatov, I.; Zhang, X. A.; Lang, R. A.; Shi, D.-L.; Zheng, J. J. Discovery and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of the PDZ Domain of Dishevelled. *J. Biol. Chem.* 2009, 284 (24), 16256–16263.
- (93) Thorsen, T. S.; Madsen, K. L.; Rebola, N.; Rathje, M.; Anggono, V.; Bach, A.; Moreira, I. S.; Stuhr-Hansen, N.; Dyhring, T.; Peters, D.; Beuming, T.; Huganir, R.; Weinstein, H.; Mulle, C.; Stromgaard, K.; Ronn, L. C. B.; Gether, U. Identification of a Small-Molecule Inhibitor of the PICK1 PDZ Domain That Inhibits Hippocampal LTP and LTD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, *107* (1), 413–418.
- (94) Zhang, W.; Penmatsa, H.; Ren, A.; Punchihewa, C.; Lemoff, A.; Yan, B.; Fujii, N.; Naren, A. P. Functional Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Containing Macromolecular Complexes: A Small-Molecule Inhibitor Approach. *Biochem. J.* 2011, 435 (2), 451–462.
- Bach, A.; Stuhr-Hansen, N.; Thorsen, T. S.; Bork, N.; Moreira, I. S.; Frydenvang, K.; Padrah, S.; Christensen, S. B.; Madsen, K. L.; Weinstein, H.; Gether, U.; Strømgaard, K. Structure–activity Relationships of a Small-Molecule Inhibitor of the PDZ Domain of PICK1. *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8 (19), 4281.
- (96) Fujii, N.; Haresco, J. J.; Novak, K. A. P.; Stokoe, D.; Kuntz, I. D.; Guy, R. K. A Selective Irreversible Inhibitor Targeting a PDZ Protein Interaction Domain. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (40), 12074–12075.

- (97) Saupe, J.; Roske, Y.; Schillinger, C.; Kamdem, N.; Radetzki, S.; Diehl, A.; Oschkinat, H.; Krause, G.; Heinemann, U.; Rademann, J. Discovery, Structure–Activity Relationship Studies, and Crystal Structure of Nonpeptide Inhibitors Bound to the Shank3 PDZ Domain. *ChemMedChem* 2011, 6 (8), 1411–1422.
- (98) Zhou, L.; Li, F.; Xu, H.-B.; Luo, C.-X.; Wu, H.-Y.; Zhu, M.-M.; Lu, W.; Ji, X.; Zhou, Q.-G.; Zhu, D.-Y. Treatment of Cerebral Ischemia by Disrupting Ischemia-Induced Interaction of nNOS with PSD-95. *Nat. Med.* **2010**, *16* (12), 1439–1443.
- (99) Belmares, M. P.; Mendoza, K. a; Lu, P. S.; Garman, D.; Tymianski, M. Small Molecule Inhibitors of PDZ Interactions. US2009062213 (A1), March 5, 2009.
- (100) Vogrig, A.; Dorr, L.; Bouzidi, N.; Boucherle, B.; Wattiez, A.-S.; Cassier, E.; Vallon, G.; Ripoche, I.; Abrunhosa-Thomas, I.; Marin, P.; Nauton, L.; Thery, V.; Courteix, C.; Lian, L.-Y.; Ducki, S. Structure-Based Design of PDZ Ligands as Inhibitors of 5-HT <sub>2A</sub> Receptor/PSD-95 PDZ1 Domain Interaction Possessing Anti-Hyperalgesic Activity. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8 (10), 2209–2216.
- (101) Bouzidi, N.; Deokar, H.; Vogrig, A.; Boucherle, B.; Ripoche, I.; Abrunhosa-Thomas, I.; Dorr, L.; Wattiez, A.-S.; Lian, L.-Y.; Marin, P.; Courteix, C.; Ducki, S. Identification of PDZ Ligands by Docking-Based Virtual Screening for the Development of Novel Analgesic Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23 (9), 2624–2627.
- (102) Guy, R.; Kuntz, I.; Haresco, J.; Fujii, N.; Novak, K.; Stokoe, D.; He, B.; You, L.; Xu, Z.; Jablons, D. Small Molecule Inhibition of a Pdz-Domain Interaction. WO2004092346 (A2), October 28, 2004.
- (103) Guy, R. K.; Fujii, N.; You, L.; Jablons, D. M. Small Molecule Inhibition of PDZ-Domain Interaction. US2011160263 (A1), June 30, 2011.
- (104) Kumar, A.; Voet, A.; Zhang, K. Y. J. Fragment Based Drug Design: From Experimental to Computational Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (30), 5128–5147.
- (105) Szekely, T.; Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. α-Peptoïdes et composés apparentés : synthèse et contrôle de la conformation. *Comptes Rendus Chim.* 2013, *16* (4), 318–330.
- (106) Swett, J. E.; Woolf, C. J. The Somatotopic Organization of Primary Afferent Terminals in the Superficial Laminae of the Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord. J. *Comp. Neurol.* **1985**, 231 (1), 66–77.
- (107) Bennett, G. J.; Xie, Y.-K. A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation like Those Seen in Man: *Pain* **1988**, *33* (1), 87–107.
- (108) Randall, L. O.; Selitto, J. J. A Method for Measurement of Analgesic Activity on Inflamed Tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* **1957**, *111* (4), 409–419.
- (109) Hata, Y.; Takai, Y. Roles of Postsynaptic Density-95/synapse-Associated Protein 90 and Its Interacting Proteins in the Organization of Synapses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 1999, 56 (5-6), 461–472.
- (110) Yusaf, S. P.; Goodman, J.; Gonzalez, I. M.; Bramwell, S.; Pinnock, R. D.; Dixon, A. K.; Lee, K. Streptozocin-Induced Neuropathy Is Associated with Altered Expression of Voltage-Gated Calcium Channel Subunit mRNAs in Rat Dorsal Root Ganglion Neurones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 289 (2), 402–406.
- (111) Yamamoto, W.; Mikami, T.; Iwamura, H. Involvement of Central Cannabinoid CB2 Receptor in Reducing Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 583 (1), 56–61.
- (112) Sun Ho Kim, J. M. C. An Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation on the Rat. *Pain* **1992**, *50*, 355–363.
- (113) Dixon, W. J. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20* (1), 441–462.

- (114) Boucherle, B.; Vogrig, A.; Deokar, H.; Bouzidi, N.; Ripoche, I.; Thomas, I.; Marin, P.; Ducki, S. Synthesis and Evaluation of Bidentate Ligands Designed to Interact with PDZ Domains. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (14), 4346–4354.
- (115) Lim, I. A. Selectivity and Promiscuity of the First and Second PDZ Domains of PSD-95 and Synapse-Associated Protein 102. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (24), 21697–21711.
- (116) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein– Protein Interactions. *Methods* **1999**, *19* (2), 213–221.
- (117) Banwell, M. G.; Jones, M. T.; Loong, D. T. J.; Lupton, D. W.; Pinkerton, D. M.; Ray, J. K.; Willis, A. C. A Pd[0]-Catalyzed Ullmann Cross-Coupling/reductive Cyclization Approach to C-3 Mono-Alkylated Oxindoles and Related Compounds. *Tetrahedron* 2010, *66* (47), 9252–9262.
- (118) Becht, J.-M.; Meyer, O.; Helmchen, G. Enantioselective Syntheses of (-)-(*R*)-Rolipram, (-)-(*R*)-Baclofen and Other GABA Analogues via Rhodium-Catalyzed Conjugate Addition of Arylboronic Acids. *Synthesis* **2003**, No. 18, 2805–2810.
- (119) Showell, G.; Walsh, L.; Mandal, A.; Miller, D. Silicon Compounds and Their Use. WO2006064277 (A1), June 22, 2006.
- (120) Faroux-Corlay, B.; Clary, L.; Gadras, C.; Hammache, D.; Greiner, J.; Santaella, C.; Aubertin, A.-M.; Vierling, P.; Fantini, J. Synthesis of Single- and Double-Chain Fluorocarbon and Hydrocarbon Galactosyl Amphiphiles and Their Anti-HIV-1 Activity. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327* (3), 223–260.
- (121) Alliband, A.; Meece, F. A.; Jayasinghe, C.; Burns, D. H. Synthesis and Characterization of Picket Porphyrin Receptors That Bind Phosphatidylglycerol, an Anionic Phospholipid Found in Bacterial Membranes. J. Org. Chem. 2013, 78 (2), 356–362.
- (122) Murray, C. W.; Rees, D. C. The Rise of Fragment-Based Drug Discovery. *Nat. Chem.* **2009**, *1* (3), 187–192.
- (123) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
- (124) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A "Rule of Three" for Fragment-Based Lead Discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (19), 876–877.
- (125) Carr, R.; Jhoti, H. Structure-Based Screening of Low-Affinity Compounds. Drug Discov. Today 2002, 7 (9), 522–527.
- (126) Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A. Site-Directed Ligand Discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97 (17), 9367–9372.
- (127) Rishton, G. M. Nonleadlikeness and Leadlikeness in Biochemical Screening. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (2), 86–96.
- (128) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. J. Med. Chem. 2011, 54 (8), 2529–2591.
- (129) Zhao, L.; Cao, D.; Chen, T.; Wang, Y.; Miao, Z.; Xu, Y.; Chen, W.; Wang, X.; Li, Y.; Du, Z.; Xiong, B.; Li, J.; Xu, C.; Zhang, N.; He, J.; Shen, J. Fragment-Based Drug Discovery of 2-Thiazolidinones as Inhibitors of the Histone Reader BRD4 Bromodomain. J. Med. Chem. 2013, 56 (10), 3833–3851.
- (130) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2212–2221.
- (131) Meiboom, S.; Gill, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29* (8), 688–691.
- (132) Brough, P. A.; Barril, X.; Borgognoni, J.; Chene, P.; Davies, N. G. M.; Davis, B.; Drysdale, M. J.; Dymock, B.; Eccles, S. A.; Garcia-Echeverria, C.; Fromont, C.;

Hayes, A.; Hubbard, R. E.; Jordan, A. M.; Jensen, M. R.; Massey, A.; Merrett, A.; Padfield, A.; Parsons, R.; Radimerski, T.; Raynaud, F. I.; Robertson, A.; Roughley, S. D.; Schoepfer, J.; Simmonite, H.; Sharp, S. Y.; Surgenor, A.; Valenti, M.; Walls, S.; Webb, P.; Wood, M.; Workman, P.; Wright, L. Combining Hit Identification Strategies: Fragment-Based and in Silico Approaches to Orally Active 2-Aminothieno[2,3-D]pyrimidine Inhibitors of the Hsp90 Molecular Chaperone. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (15), 4794–4809.

- (133) Basse, N.; Kaar, J. L.; Settanni, G.; Joerger, A. C.; Rutherford, T. J.; Fersht, A. R. Toward the Rational Design of p53-Stabilizing Drugs: Probing the Surface of the Oncogenic Y220C Mutant. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (1), 46–56.
- (134) Gibbs, A. C.; Abad, M. C.; Zhang, X.; Tounge, B. A.; Lewandowski, F. A.; Struble, G. T.; Sun, W.; Sui, Z.; Kuo, L. C. Electron Density Guided Fragment-Based Lead Discovery of Ketohexokinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2010, *53* (22), 7979–7991.
- (135) Navratilova, I.; Hopkins, A. L. Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1* (1), 44–48.
- (136) Verdonk, M. L.; Giangreco, I.; Hall, R. J.; Korb, O.; Mortenson, P. N.; Murray, C. W. Docking Performance of Fragments and Druglike Compounds. J. Med. Chem. 2011, 54 (15), 5422–5431.
- (137) Tsai, J.; Lee, J. T.; Wang, W.; Zhang, J.; Cho, H.; Mamo, S.; Bremer, R.; Gillette, S.; Kong, J.; Haass, N. K.; Sproesser, K.; Li, L.; Smalley, K. S. M.; Fong, D.; Zhu, Y.-L.; Marimuthu, A.; Nguyen, H.; Lam, B.; Liu, J.; Cheung, I.; Rice, J.; Suzuki, Y.; Luu, C.; Settachatgul, C.; Shellooe, R.; Cantwell, J.; Kim, S.-H.; Schlessinger, J.; Zhang, K. Y. J.; West, B. L.; Powell, B.; Habets, G.; Zhang, C.; Ibrahim, P. N.; Hirth, P.; Artis, D. R.; Herlyn, M.; Bollag, G. Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, *105* (8), 3041–3046.
- Bollag, G.; Hirth, P.; Tsai, J.; Zhang, J.; Ibrahim, P. N.; Cho, H.; Spevak, W.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Habets, G.; Burton, E. A.; Wong, B.; Tsang, G.; West, B. L.; Powell, B.; Shellooe, R.; Marimuthu, A.; Nguyen, H.; Zhang, K. Y. J.; Artis, D. R.; Schlessinger, J.; Su, F.; Higgins, B.; Iyer, R.; D'Andrea, K.; Koehler, A.; Stumm, M.; Lin, P. S.; Lee, R. J.; Grippo, J.; Puzanov, I.; Kim, K. B.; Ribas, A.; McArthur, G. A.; Sosman, J. A.; Chapman, P. B.; Flaherty, K. T.; Xu, X.; Nathanson, K. L.; Nolop, K. Clinical Efficacy of a RAF Inhibitor Needs Broad Target Blockade in BRAF-Mutant Melanoma. *Nature* 2010, *467* (7315), 596–599.
- (139) Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* 2002, *417* (6892), 949–954.
- (140) Sgobba, M.; Rastelli, G. Structure-Based and in Silico Design of Hsp90 Inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4* (9), 1399–1409.
- Miller, J. R.; Dunham, S.; Mochalkin, I.; Banotai, C.; Bowman, M.; Buist, S.; Dunkle, B.; Hanna, D.; Harwood, H. J.; Huband, M. D.; Karnovsky, A.; Kuhn, M.; Limberakis, C.; Liu, J. Y.; Mehrens, S.; Mueller, W. T.; Narasimhan, L.; Ogden, A.; Ohren, J.; Prasad, J. V. N. V.; Shelly, J. A.; Skerlos, L.; Sulavik, M.; Thomas, V. H.; VanderRoest, S.; Wang, L.; Wang, Z.; Whitton, A.; Zhu, T.; Stover, C. K. A Class of

Selective Antibacterials Derived from a Protein Kinase Inhibitor Pharmacophore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (6), 1737–1742.

- (142) Murray, C. W.; Carr, M. G.; Callaghan, O.; Chessari, G.; Congreve, M.; Cowan, S.; Coyle, J. E.; Downham, R.; Figueroa, E.; Frederickson, M.; Graham, B.; McMenamin, R.; O'Brien, M. A.; Patel, S.; Phillips, T. R.; Williams, G.; Woodhead, A. J.; Woolford, A. J.-A. Fragment-Based Drug Discovery Applied to Hsp90. Discovery of Two Lead Series with High Ligand Efficiency. J. Med. Chem. 2010, 53 (16), 5942– 5955.
- (143) Woodhead, A. J.; Angove, H.; Carr, M. G.; Chessari, G.; Congreve, M.; Coyle, J. E.; Cosme, J.; Graham, B.; Day, P. J.; Downham, R.; Fazal, L.; Feltell, R.; Figueroa, E.; Frederickson, M.; Lewis, J.; McMenamin, R.; Murray, C. W.; O'Brien, M. A.; Parra, L.; Patel, S.; Phillips, T.; Rees, D. C.; Rich, S.; Smith, D.-M.; Trewartha, G.; Vinkovic, M.; Williams, B.; Woolford, A. J.-A. Discovery of (2,4-Dihydroxy-5-Isopropylphenyl)-[5-(4-Methylpiperazin-1-Ylmethyl)-1,3-Dihydroisoindol-2-Yl]methanone (AT13387), a Novel Inhibitor of the Molecular Chaperone Hsp90 by Fragment Based Drug Design. J. Med. Chem. 2010, 53 (16), 5956–5969.
- (144) Huth, J. R.; Park, C.; Petros, A. M.; Kunzer, A. R.; Wendt, M. D.; Wang, X.; Lynch, C. L.; Mack, J. C.; Swift, K. M.; Judge, R. A.; Chen, J.; Richardson, P. L.; Jin, S.; Tahir, S. K.; Matayoshi, E. D.; Dorwin, S. A.; Ladror, U. S.; Severin, J. M.; Walter, K. A.; Bartley, D. M.; Fesik, S. W.; Elmore, S. W.; Hajduk, P. J. Discovery and Design of Novel HSP90 Inhibitors Using Multiple Fragment-Based Design Strategies. *Chem. Biol. Drug Des.* 2007, 70 (1), 1–12.
- (145) Sperandio, O.; Reynès, C. H.; Camproux, A.-C.; Villoutreix, B. O. Rationalizing the Chemical Space of Protein–protein Interaction Inhibitors. *Drug Discov. Today* 2010, 15 (5–6), 220–229.
- (146) Wells, J. A.; McClendon, C. L. Reaching for High-Hanging Fruit in Drug Discovery at Protein–protein Interfaces. *Nature* **2007**, *450* (7172), 1001–1009.
- (147) F. Bower, J.; Pannifer, A. Using Fragment-Based Technologies to Target Protein-Protein Interactions. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (30), 4685–4696.
- (148) <sup>2</sup>
- (149) Barelier, S.; Pons, J.; Marcillat, O.; Lancelin, J.-M.; Krimm, I. Fragment-Based Deconstruction of Bcl-xL Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2577–2588.
- (150) Ye, T.; García, C. F.; McKervey, M. A. Chemoselectivity and Stereoselectivity of Cyclisation of α-Diazocarbonyls Leading to Oxygen and Sulfur Heterocycles Catalysed by Chiral Rhodium and Copper Catalysts. J. Chem. Soc. [Perkin 1] 1995, No. 11, 1373–1379.
- (151) Fang, Q. K.; Hopkins, S.; Jones, S.; Fang, Q. K.; Heffernan, M.; Chytil, M. Pyrrole and Pyrazole DAAO Inhibitors. US2005143443 (A1), June 30, 2005.
- (152) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. J. Comput. Chem. 2010, 31 (2), 455–461.
- (153) Li, Q.; Jiang, J.; Fan, A.; Cui, Y.; Jia, Y. Total Synthesis of Lamellarins D, H, and R and Ningalin B. *Org. Lett.* **2011**, *13* (2), 312–315.
- (154) Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G. A Submarine Journey: The Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Mar. Drugs* **2009**, *7* (4), 705–753.
- (155) Zidar, N.; Montalvão, S.; Hodnik, Ž.; Nawrot, D.; Žula, A.; Ilaš, J.; Kikelj, D.; Tammela, P.; Mašič, L. Antimicrobial Activity of the Marine Alkaloids, Clathrodin and Oroidin, and Their Synthetic Analogues. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (2), 940–963.
- (156) Joung Youn, U.; Kil, Y.-S.; Nam, J.-W.; Jin Lee, Y.; Kim, J.; Lee, D.; Lee, J.-H.; Seo, E.-K. New Pyrrole Alkaloids with Bulky N-Alkyl Side Chains Containing Stereogenic Centers from Lycium Chinense. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96* (8), 1482–1487.

- (157) Ramesh, K.; Murthy, S. N.; Karnakar, K.; Nageswar, Y. V. D. DABCO-Promoted Three-Component Reaction between Amines, Dialkyl Acetylenedicarboxylates, and Glyoxal. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (30), 3937–3941.
- (158) Bhirud, S. B.; Johar, P. S.; Sharma, V.; Sandhu, H. Process for Preparation of Sunitinib Malate and Salts Thereof. WO2012059941 (A1), May 10, 2012.
- (159) Mathew, P.; Asokan, C. V. An Efficient Synthesis of Highly Substituted Pyrroles from β-Oxodithiocarboxylates. *Tetrahedron* 2006, 62 (8), 1708–1716.
- (160) Madabhushi, S.; Vangipuram, V. S.; Mallu, K. K. R.; Jillella, R.; Kurva, S.; Pamulaparthi, S. R. Ceric (IV) Ammonium Nitrate (CAN) Mediated Synthesis of Pyrrole-2,3,4,5-Tetracarboxylates by Reaction of Dimethyl Acetylenedicarboxylate with an Amine. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (49), 6737–6739.
- (161) Zhang, L.; Wang, X.; Li, S.; Wu, J. Synthesis of Pyrrole-2,3,4,5-Tetracarboxylates via a Copper-Catalyzed Reaction of Amine with but-2-Ynedioate. *Tetrahedron* 2013, 69 (19), 3805–3809.
- (162) Das, B.; Reddy, G.; Balasubramanyam, P.; Veeranjaneyulu, B. An Efficient New Method for the Synthesis of Polysubstituted Pyrroles<sup>1</sup>. Synthesis **2010**, 2010 (10), 1625–1628.
- (163) Ghabraie, E.; Balalaie, S.; Bararjanian, M.; Bijanzadeh, H. R.; Rominger, F. An Efficient One-Pot Synthesis of Tetra-Substituted Pyrroles. *Tetrahedron* 2011, 67 (30), 5415–5420.
- (164) Das, B.; Bhunia, N.; Lingaiah, M. A Simple and Efficient Metal-Free Synthesis of Tetrasubstituted Pyrroles by Iodine-Catalyzed Four-Component Coupling Reaction of Aldehydes, Amines, Dialkyl Acetylenedicarboxylates, and Nitromethane<sup>1</sup>. Synthesis 2011, 2011 (21), 3471–3474.
- (165) Feng, X.; Wang, Q.; Lin, W.; Dou, G.-L.; Huang, Z.-B.; Shi, D.-Q. Highly Efficient Synthesis of Polysubstituted Pyrroles via Four-Component Domino Reaction. Org. Lett. 2013, 15 (10), 2542–2545.
- (166) Crawley, M. L.; Goljer, I.; Jenkins, D. J.; Mehlmann, J. F.; Nogle, L.; Dooley, R.; Mahaney, P. E. Regioselective Synthesis of Substituted Pyrroles: Efficient Palladium-Catalyzed Cyclization of Internal Alkynes and 2-Amino-3-Iodoacrylate Derivatives. *Org. Lett.* **2006**, *8* (25), 5837–5840.
- (167) Gao, M.; He, C.; Chen, H.; Bai, R.; Cheng, B.; Lei, A. Synthesis of Pyrroles by Click Reaction: Silver-Catalyzed Cycloaddition of Terminal Alkynes with Isocyanides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (27), 6958–6961.
- (168) Kakushima, M.; Hamel, P.; Frenette, R.; Rokach, J. Regioselective Synthesis of Acylpyrroles. J. Org. Chem. 1983, 48 (19), 3214–3219.
- (169) Schmuck, C.; Geiger, L. Dipeptide Binding in Water by a de Novo Designed Guanidiniocarbonylpyrrole Receptor. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126 (29), 8898–8899.
- (170) Martyn, D. C.; Vernall, A. J.; Clark, B. M.; Abell, A. D. Ring-Deactivated Hydroxyalkylpyrrole-Based Inhibitors of α-Chymotrypsin: Synthesis and Mechanism of Action. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (12), 2103–2110.
- (171) Nicolaou, K. C.; Claremon, D. A.; Papahatjis, D. P. A Mild Method for the Synthesis of 2-Ketopyrroles from Carboxylic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (46), 4647–4650.
- (172) Sharma, R.; Chouhan, M.; Sood, D.; Nair, V. A. An Efficient One-Pot Synthesis of 2-Benzylpyrroles and 3-Benzylindoles. *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, *25* (4), 305–309.
- (173) Zhu, J.; Lin, J.-B.; Xu, Y.-X.; Shao, X.-B.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T. Hydrogen-Bonding-Mediated Anthranilamide Homoduplexes. Increasing Stability through Preorganization and Iterative Arrangement of a Simple Amide Binding Site. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128 (37), 12307–12313.

- (174) Chen, H.-S.; Kuo, S.-C.; Teng, C.-M.; Lee, F.-Y.; Wang, J.-P.; Lee, Y.-C.; Kuo, C.-W.; Huang, C.-C.; Wu, C.-C.; Huang, L.-J. Synthesis and Antiplatelet Activity of Ethyl 4-(1-Benzyl-1H-Indazol-3-Yl)benzoate (YD-3) Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16* (3), 1262–1278.
- (175) Lee, C. K.; Ahn, Y. M. Reactions of Amides with Potassium Permanganate in Neutral Aqueous Solution. J. Org. Chem. **1989**, 54 (15), 3744–3747.
- (176) Gharat, L. A.; Muthukaman, N.; Khairatkar-Joshi, N.; Kattige, V. G. Triazolone Compounds as M-PGES-1 Ihibitors. WO2013186692 (A1), December 19, 2013.
- (177) Grell, W.; Hurnaus, R.; Griss, G.; Sauter, R.; Rupprecht, E.; Mark, M.; Luger, P.; Nar, H.; Wittneben, H.; Müller, P. Repaglinide and Related Hypoglycemic Benzoic Acid Derivatives. J. Med. Chem. 1998, 41 (26), 5219–5246.
- (178) Gharat, L. A.; Muthukaman, N.; Khairatkar-Joshi, N.; Kattige, V. G. TRIAZOLONE COMPOUNDS AS mPGES-1 INHIBITORS. WO2013186692 (A1), December 19, 2013.
- (179) Mizutani, T.; Wada, K.; Kitagawa, S. Molecular Recognition of Amines and Amino Esters by Zinc Porphyrin Receptors: Binding Mechanisms and Solvent Effects. J. Org. Chem. 2000, 65 (19), 6097–6106.
- (180) Blumenfeld, M.; Compere, D.; Gauthier, J.-M. Piperidine Derivatives as Human Papilloma Virus Inhibitors. US2009209586 (A1), August 20, 2009.
- (181) Process for Preparing 2,5-Disubstituted 3-Alkylthiophenes. WO2004035562 (A1), April 29, 2004.
- (182) Bartolome-Nebreda, J. M.; Macdonald, G.; Van, G.; Conde-Ceide, S.; Delgado-Jimenez, F. Substituted 6- (1-Piperazinyl) -Pyridazines as 5-Ht6 Receptor Antagonists. WO2010000456 (A1), January 7, 2010.
- (183) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: A Modular Approach to Drug Discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (20), 9367–9371.
- (184) Schwochert, J.; Turner, R.; Thang, M.; Berkeley, R. F.; Ponkey, A. R.; Rodriguez, K. M.; Leung, S. S. F.; Khunte, B.; Goetz, G.; Limberakis, C.; Kalgutkar, A. S.; Eng, H.; Shapiro, M. J.; Mathiowetz, A. M.; Price, D. A.; Liras, S.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. Peptide to Peptoid Substitutions Increase Cell Permeability in Cyclic Hexapeptides. *Org. Lett.* 2015, *17* (12), 2928–2931.
- (185) Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A. Discovery of Nanomolar Ligands for 7-Transmembrane G-Protein-Coupled Receptors from a Diverse N-(Substituted)glycine Peptoid Library. J. Med. Chem. 1994, 37 (17), 2678–2685.
- (186) Yoo, B.; Kirshenbaum, K. Peptoid Architectures: Elaboration, Actuation, and Application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (6), 714–721.
- (187) Vogrig, A.; Dorr, L.; Bouzidi, N.; Boucherle, B.; Wattiez, A.-S.; Cassier, E.; Vallon, G.; Ripoche, I.; Abrunhosa-Thomas, I.; Marin, P.; Nauton, L.; Thery, V.; Courteix, C.; Lian, L.-Y.; Ducki, S. Structure-Based Design of PDZ Ligands as Inhibitors of 5-HT <sub>2A</sub> Receptor/PSD-95 PDZ1 Domain Interaction Possessing Anti-Hyperalgesic Activity. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8 (10), 2209–2216.
- (188) Korsager, S.; Taaning, R. H.; Skrydstrup, T. Effective Palladium-Catalyzed Hydroxycarbonylation of Aryl Halides with Substoichiometric Carbon Monoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (8), 2891–2894.

## **Résumé :**

Les protéines à domaines PDZ sont impliquées dans des interactions protéine-protéine (IPP) et participent aux transports de signaux impliqués dans de nombreuses pathologies (cancer, mucoviscidose, douleur,...). L'interruption de l'interaction entre la protéine à domaine PDZ, PSD-95, et le récepteur de la sérotonine, 5-HT<sub>2A</sub>, réduit l'hyperalgie mécanique sur un modèle expérimental de douleur neuropathique chez les rats. Afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs de cette interaction, antalgiques potentiels, trois stratégies ont été développées au cours de ces travaux.

Une première stratégie a consisté à réaliser une étude de relation structure-activité à partir d'un inhibiteur connu, qui nous a permis d'identifier des groupements pharmacophores et ainsi obtenir une nouvelle molécule possédant un noyau indolique, capable d'inhiber l'interaction entre PSD-95 et 5-HT<sub>2A</sub> et possédant un effet anti-hyperalgique chez le rat neuropathique. La deuxième stratégie a consisté à valider la méthode du fragment-based drug design aux protéines à domaines PDZ en réalisant la déconstruction d'un inhibiteur connu de l'interaction en plusieurs fragments qui ont été criblés par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. Une évaluation systématique par RMN de chaque couple de fragments, suivie d'une étude de modélisation moléculaire a ensuite permis de mettre en évidence trois nouvelles molécules qui ont été synthétisées et évaluées par RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. La troisième stratégie a été une approche peptidomimétique à partir de l'extrémité C-terminale de 5-HT<sub>2A</sub>, qui a conduit à la synthèse d'un peptoïde capable d'interagir avec la protéine à domaine PDZ. Ces études nous permettent d'envisager le développement de nouveaux antalgiques soient issus de la synthèse organique soient issus de mimes de peptides.

<u>Mots clés</u>: Protéines à domaines PDZ, récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub>, Relation Structure Activité, fragment-based drug design, modélisation moléculaire, synthèse organique multi-étapes, douleur

## Abstract:

PDZ domains proteins are involved in protein-protein interaction (PPI) and participate in the transport of signals involved in numerous diseases (cancer, cystic fibrosis, pain, ...). The disruption the interaction between the PDZ domains protein, PSD-95, and the serotonin receptor, 5-HT<sub>2A</sub>, reduces mechanical hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain in rats. To design new inhibitors as potential analgesics of this interaction, three strategies have been developed in this work.

A first strategy was to conduct a study of structure-activity relationship from a known inhibitor, which allowed us to identify the pharmacophore groups and obtain a new molecule with an indole ring, capable of inhibiting the interaction between PSD-95 and 5-HT<sub>2A</sub> and possessing an anti-hyperalgesic effect on neuropathic rats. The second strategy was to validate the method of fragment-based drug design with PDZ domains proteins by deconstruction of a known inhibitor of the interaction in several fragments which were screened by NMR HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. Systematic evaluation by NMR of each pair of fragments, followed by molecular modeling study was then used to highlight three new molecules that were synthesized, and evaluated by NMR HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. The third strategy was a peptidomimetic approach from the C-terminal of 5-HT<sub>2A</sub> receptors, which led to the synthesis of a peptoid able to interact with the PDZ domain protein. These studies allow us to consider the development of new analgesics either from organic synthesis or from peptide mimetics.

<u>Keywords</u>: PDZ domains proteins, serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub>, Structure Activity Relationship, fragment-based drug design, molecular modeling, organic multi-step synthesis, pain