



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer

Caroline Lanthier

► To cite this version:

Caroline Lanthier. Conception, synthèse et évaluation de nouveaux composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC415 . tel-03858936

HAL Id: tel-03858936

<https://theses.hal.science/tel-03858936v1>

Submitted on 18 Nov 2022

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer

**Présentée et soutenue par
Caroline LANTHIER**

**Thèse soutenue publiquement le 17/11/2020
devant le jury composé de**

Mme MARION FLIPO	Maître de conférences HDR, Université de Lille	Rapporteur du jury
M. LHASSANE ISMAILI	Professeur des universités, Université de Franche Comté	Rapporteur du jury
Mme ANNE-MARIE CHOLLET	Docteur, Institut de Recherches SERVIER	Membre du jury
M. PATRICK DALLEMAGNE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. CÉDRIC LECOUTEY	Ingénieur de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. CHRISTOPHE ROCHAIS	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

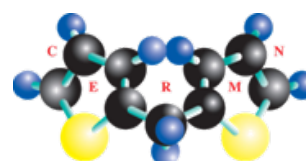
Thèse dirigée par CHRISTOPHE ROCHAIS, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Madame Marion Flipo

Assistant professeur, Université Lille

A Madame Anne Marie Chollet

Docteur, Responsable de projet, Institut de Recherche Servier Croissy-sur-Seine

A Monsieur Lhassane Ismaili

Professeur des universités, Université de Franche-Comté

A Monsieur Patrick Dallemagne

Professeur des universités, Université de Caen Normandie et Directeur du Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie

A Monsieur Cédric Lecoutey

Ingénieur de recherche, Université de Caen Normandie

A Monsieur Christophe Rochais

Professeur des universités, Université de Caen Normandie

*Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,
Et de juger mon travail,
En témoignage de ma profonde reconnaissance.*

« L'Alzheimer était comme l'océan sur cette plage : irrésistible, féroce, destructeur. Et elle n'avait aucune digue dans le cerveau pour protéger ses souvenirs et son esprit du massacre. »

Lisa Genova extrait de l'envol du papillon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : Marion Flipo et Lhassane Ismaili pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs. Je remercie également Anne-Marie Chollet ainsi que Patrick Dallemagne d'avoir examiné mes travaux.

Je remercie la région Normandie d'avoir subventionné cette thèse ainsi que le COST action Mutalig de m'avoir permis de réaliser un échange de 3 mois à l'Université de Bologne au sein du laboratoire du professeur Maria-Laura Bolognesi.

Je tiens à remercier chaleureusement le Prof Christophe Rochais, mon directeur de thèse qui a su m'accorder sa confiance pour mener à bien ce projet. Merci de m'avoir écoutée, guidée et conseillée tout au long de ces trois années. Pardon pour les cris, les pleurs, les danses de la joie qui ont rythmés ces trois années.

Je tiens ensuite à remercier Dr Cédric Lecoutey, co-encadrant de cette thèse pour ces précieux conseils en chimie, pour m'avoir aidé à m'acclimater au laboratoire. Merci pour les corrections whatsapp à minuit le dimanche soir, ta réactivité et ton franc parlé légendaire. Pas merci pour ta musique qui m'a bien cassé les oreilles mais je pense pouvoir dire sans me tromper qu'on est quitte après ce que j'ai pu te faire endurer. #Britney

Je tiens à remercier Prof Patrick Dallemagne, merci d'avoir su me guider et m'aiguiller tout au long de ma thèse. Merci pour les jeux de mots qui tombent toujours à point nommé même s'il m'a fallu un petit temps d'adaptation avant que je ne les comprenne.

Merci l'équipe du CM034,

A Bérénice, on n'a passé qu'une seule année ensemble mais quelle année, merci pour les musiques Disney, les rires, les selfies et Snapchat débiles #ReineDesNeiges et d'avoir été là pour me soutenir face aux garçons, crois moi ils ne m'ont pas épargnée quand tu es partie à Montpellier.

A François-Xavier (*un petit biscuit ?*). FX, merci pour tout, pour ton accueil, pour les soirées koh lanta, l'amour est dans le pré et les sushis. Désolé de t'avoir lancé une spatule à la figure (mais tu l'avais mérité ! #calimero)... Pas merci pour pascal Carion, ton métal et ton rock (enfin ton bruit quoi). En vrai ça a pas dû être si facile que ça de me supporter 2 ans mais je trouve que tu t'en es bien sorti en fin de compte. A bientôt sur Toulouse ou ailleurs !

Benjamin, ou benjaminouuuuuuu, nos fous rires vont me manquer ... Tu es arrivé avec ta bonne humeur et tes goûts musicaux spéciaux (#cotonouaté). J'espère que tu t'épanouira dans ta nouvelle carrière de prof, je compte sur toi pour devenir un MGEN digne de ce nom qui va aller embêter les officinaux :p. J'aimerais juste te dire que c'est triste à dire mais plus rien ne m'attriste...

A petite Camille, Merci pour ton énergie, ta patience et les moments passés au laboratoire, j'espère que tu te plais bien à Amiens.

A mes stagiaires, Alizée et Monica, j'espère que ces stages vous auront donné envie de continuer sur cette voie. Merci pour vos travaux. A Karen, thank you my little sunshine coming from germany, I hope you had a lovely time in the lab, I hope that we will see each other again!

Aux petits nouveaux, Valentin et Chloé, vous venez d'entrer dans le meilleur laboratoire du monde, je compte sur vous pour assurer la relève !

A mes copines Line³,

A Pauline, ma petite popo, ma copine, on est arrivée en même temps au laboratoire de deux contrées lointaines, toi l'Allemagne, moi la Belgique (en tout cas nous on sait prononcer les huites correctement) ... Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments (et dieu sait qu'il y en a eu ... : p). Merci pour les virées shoppings, les soirées filles, les soirées raclettes, les massages post bodypump dans les boxs, et les pétages de câble bulle en rédaction. Je n'ai qu'une chose à dire : elle est DJOMB !

A Line, linou, tu es arrivée 6 mois après nous mais une forte amitié s'est vite formée, merci ma petite fraise des bois <3 pour ton soutien, tes conseils. Merci pour les séances de sports et de m'avoir initiée au bodypump et rpm. Merci d'avoir été là après mon opération et d'avoir pris soin de moi <3. Bon courage pour cette troisième année, tu vas tout déchirer !!

Merci à la dream team de Caen,

A Reynald, compatriote de 3^{ème} année, on a commencé presque en même temps (enfin à 6 mois près mais c'était un M2 ça ne compte pas : p), merci pour toutes les soirées à l'appart, pour les chorées pharma sur ta table basse, pour les stack up endiablés et le cousin de FX ! On aura bien profité de ces 3 dernières années. Tu vas me manquer chaton mais je suis persuadée qu'on se recroisera bien assez vite.

A Mirka, my sweet mirka, I loved spending all our money at Sephora, we can go to another Sephora gold party whenever you want ;). I was the first to welcome you in France and I hope you kept that as a good memory, I will miss our "hello it's me" (seriously we have to learn the lyric of this song ...). I know you will be a friend for a long time, keep faith in you and everything will turn out just fine <3.

Bertille, ma petite bertouille <3 merci pour les dimanches au marché, les brunchs, les soirées au bercail et les fous rires à la piscine.

A Clément, alias Clémichou, merci pour les soirées au bercail, les fous rires au RU, surtout garde le sourire, profite de la vie et C'est quoi le dernier déjà ? Merci de m'avoir fait retenir toutes les répliques d'OSS 117 et de la cité de la peur alors que je n'avais jamais vu les films.

A Hugo, aka blouuuuuuuuuux (coucou pauline et les interphones), merci pour ta bonne humeur, pour les gâteaux du lundi matin (pas merci pour les kg en trop), merci (ou pas d'ailleurs) pour les musiques pourries qu'on garde en tête #djomb #passepardevant ... Merci pour les éponges à stack up mais pense à prévoir un stock de sac poubelle au cas où pour la prochaine soirée ... #Carwash

Merci à tous les collègues qui ont croisé mon chemin ces trois dernières années : Merci aux vieux du CERMN, Victor, Camille et Martina, vous m'avez très bien accueillie j'espère vous revoir bientôt en congrès ou sur Caen ! Merci à la PiPP team, Marie, Nico, Johanna, Anne-Sophie, pour votre bonne humeur et pour m'avoir permis de passer des bons moments pendant que j'utilisais votre flash ! Merci à la super team de la plateforme screening et drugabilité en particulier Audrey et Sophie, vous avez été d'une grande aide pour mener à bien les travaux sur ce projet. Merci à vous les filles. Merci également à toutes les collègues du CERMN, JP, Léna, Pierre Sylvia, Valérie, Marc, Aurélie, Anne-Claire, Peggy, Jana, Rémi, Thomas, Manu, Willy, Charline, Amanda.

Thank you to the Bologna team, Maria-Laura who welcome me and advise me a lot, I'm glad and honored to have spent time with you I hope we will meet again. Thanks to Viktoria and AnaElisa and Irene, without all of you my trip in Bologna would have been sad. I hope we will all meet again my friends.

Merci à la team Pint of science de Caen, j'ai repris l'évènement en 2019 et bien que l'édition de 2020 ait été bousculé par la crise sanitaire je remercie mon équipe de choc avec laquelle on avait préparé un programme aux petits oignons. Merci Virginie, sans toi je n'aurais surement pas osé assurer l'organisation de l'évènement seule, merci de m'avoir embarquée sur réflexion !

Merci à Léo, compatriote de stage de M2, nous avons échangés nos places, toi à Lille, moi à Caen. Merci à toi pour ta bonne humeur, nos fous rires et ton débit de parole qui concurrence le mien. J'espère qu'après ces 3 années sur Lille tu es maintenant capable d'avaler un welsh en entier.

Merci à Kevinou, toi aussi tu t'es expatrié à Lille (en même temps elle est quand même super cette ville)! J'espère que tu t'y plait et que t'es enfin acclimaté à la météo toi qui mettait ton gros gilet alors qu'il faisait 25°C... :p. Attention cependant sur les perroquets, ça monte vite !

Je remercie ma famille également, merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue, de m'avoir épaulée pendant toutes ces années. Merci à mes grands-parents également, à mon frère et mes oncles et tantes. Merci à Yuki, ma petite boule de poil. Je vous aime.

Merci à mes copains du lycée, Florine, Adèle, Marie, Jérôme, Lisa, Sophie, Mathou, Hélène. Vous avez su être présent pour moi tout au long de ces années malgré la distance qui nous sépare. On a tous pris des chemins différents pourtant nous restons tous très proches.

Merci aux copains de la faculté de pharmacie de Lille, Claire, Elodie, Marine, Elise, William et Clément. Merci pour ces six années merveilleuses à la faculté et aux moments passés en amphithéâtre ou en TP.

A Claire particulièrement, merci. Merci de ta présence à Caen, bien que je n'en sois pas la seule fautive, merci pour l'aide apportée après mon opération, merci d'avoir été là de ma 2^{ème} année de pharmacie à ma 3^{ème} année de doctorat. J'espère que tu seras là encore de nombreuses années.

Merci à mon chirurgien, le Pr Julien Girard du CHU de Lille, qui m'a permis de regaloper dans les couloirs du laboratoire même si dorénavant je sonnerais aux portiques de sécurité des aéroports.

Merci à Focusmate (et aux 220 inconnus ayant travaillé avec moi ces derniers mois), forest et toutes ces applications qui m'ont permis de me concentrer quand j'en avais le plus besoin. Merci à twitter, Netflix, Amazon Prime, Youtube, Spotify et Facebook d'avoir occupé mes pauses.

Merci au Bercaïl, le QG des jeudis depuis bientôt 2 ans. Vous avez gardé le cerf fringant à la carte et je vous en serais éternellement reconnaissante ! On espère que vous connaîtrez le même succès avec la pagaille mais je n'en doute pas.

Merci à tous ceux que j'ai oublié mais qui se reconnaîtront...

Conception, synthèse et évaluation biologique de
nouveaux composés à dualité d'action agoniste des
récepteurs 5-HT₄ et antioxydante, d'intérêt
thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer.

Table des matières

CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER	1
I. La maladie d'Alzheimer	3
1. Introduction et généralités (histoire de la maladie)	3
2. Signes cliniques de la maladie	4
3. Signes histopathologiques	6
a. Aspect du cerveau	6
b. Les plaques amyloïdes	7
c. Les enchevêtrements neurofibrillaires	7
4. Epidémiologie de la maladie	8
II. Causes moléculaires de la maladie	9
1. Hypothèse cholinergique	10
2. Hypothèse amyloïde	11
a. Phénomène d'agrégation	12
b. Phénomène de cascade amyloïde selon Hardy <i>et al.</i>	15
3. Hypothèse Tau	17
4. Autres hypothèses	18
III. Facteurs de risque	19
1. L'âge	19
2. Le sexe	20
3. Les prédispositions génétiques	20
4. Les maladies cardiovasculaires ou métaboliques	21
5. L'environnement	22
6. Les traitements non médicamenteux	22
IV. Les traitements médicamenteux actuels	23
V. Les composés en essais cliniques dans la MA	25
1. Agents ciblant les peptides A β	26
a. L'inhibition de γ -sécrétase	26
b. Les inhibiteurs BACE-1	27
c. Les anticorps monoclonaux, un nouvel espoir contre les peptides A β	28
2. Les limites des essais cliniques	28
VI. Biomarqueurs de la MA	29
VII. Conclusion	32
CHAPITRE 2 : CONCEPTION DE COMPOSES PLEIOTROPES	33
I. Introduction	35
II. Les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄	37
1. Intérêt de la cible dans la maladie d'Alzheimer	37
2. Effets de l'activation du récepteur 5-HT ₄ R dans la MA	38
3. Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT ₄ receptor: a patent review (2014-present)	41

4.	Résumé des principales structures agonistes des récepteurs 5-HT ₄ R	73
a.	Pharmacophore des ligands 5-HT ₄ R	73
b.	Modulation du noyau aromatique	73
c.	Etude des linkers	76
d.	Etude pharmacophorique du profil	77
III.	Le stress oxydant ou déséquilibre radicalaire.....	79
1.	Définition	79
2.	Les espèces radicalaires	80
a.	Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais)	80
b.	Les espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS en anglais)	81
c.	Les espèces réactives du soufre (ERS ou RSS en anglais)	82
3.	Effet du stress oxydant sur l'organisme	82
4.	Les antioxydants	85
5.	Déséquilibre radicalaire et MA	87
a.	Déséquilibre radicalaire et pathologie amyloïde	87
b.	Déséquilibre radicalaire et dysfonction mitochondriale	89
c.	Déséquilibre radicalaire et homéostasie des métaux	89
d.	Déséquilibre radicalaire et neuroinflammation	90
e.	Rôle central du déséquilibre radicalaire	90
6.	Les antioxydants comme stratégie thérapeutique dans la MA	91
IV.	La stratégie polypharmacologique	95
1.	Introduction	95
2.	Définition	95
3.	Travaux de l'axe polypharmacologique du laboratoire	98
a.	MTDL à activité agoniste 5-HT ₄ / inhibiteur d'AChE	98
b.	MTDL à activité agoniste 5-HT ₄ / antagoniste 5-HT ₆	100
c.	Développement de MTDL triple action : projet TRIAD	101
d.	Développement de MTDL prodrogues : inhibiteur l'AChE et agoniste des 5-HT ₄ R	102
4.	Les composés polypharmacologiques à propriétés antioxydantes	104
a.	Découverte de la mémoquine	105
b.	Analogue mémoquine/acide Lipoïque	106
c.	Dérivé tacrine/CR-6	107
d.	Dérivé co-drogue tacrine/silibinine	108
e.	Dérivé tacrine/acide férulique/mélatonine	109
f.	Conclusion	110
V.	Objectifs et étapes du projet.....	111
1.	Objectifs globaux	111
2.	Test <i>in vitro</i> sélectionnés et effectués sur ce projet	112
a.	Affinité envers le récepteur 5-HT ₄	112
b.	Tests d'évaluation de capacité antioxydante	113
3.	Tests in cellulo	116
a.	Test de profil envers 5 HT ₄ R	116
b.	Test d'induction du stress oxydant	116
c.	Test de neuroprotection	118
d.	Test MTT	118
VI.	Conclusion du chapitre.....	119
	CHAPITRE 3 : TRAVAUX PERSONNELS	121
I.	Article 1: Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with <i>in cellulo</i> antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's Disease.....	123

1.	Introduction	123
2.	Article	125
3.	Résumé des principaux résultats	149
	a. Synthèse des composés	150
	b. Evaluation <i>in vitro</i> des composés	151
	c. Évaluation <i>in cellulo</i> des composés	152
	d. Conclusion de l'article	152
4.	Discussion et projets annexes	153
	a. Préparation du fragment pipéridine central	153
	b. Préparation des motifs antioxydants	153
	c. Travaux annexes réalisés autour du motif aminochlorobenzophénone	156
5.	Conclusion	159
II.	Article 2: Benzisoxazoles targeting 5-HT₄ receptors with <i>in cellulo</i> antioxidant properties as promising compound in Alzheimer's Disease.	163
1.	Introduction	163
2.	Article	165
3.	Résumé des principaux résultats	191
	a. Introduction	191
	b. Synthèses des composés	191
	c. Evaluation <i>in vitro</i> des composés	194
	d. Évaluation <i>in cellulo</i> des composés	195
	e. Conclusion provisoire de l'article	196
4.	Travaux annexes et discussions	197
	a. Composés dérivés de la mélatonine	197
	b. Composés dérivés du coenzyme Q10	198
5.	Conclusion	199
III.	Modulation du centre hétérocyclique à activité agoniste envers 5-HT₄R	205
1.	Introduction	205
2.	Choix du motif antioxydant	205
3.	Préparation des fragments pipéridine-méthyl-isovanilline	207
4.	Conditions de purifications des composés finaux	209
5.	Nouveaux hétérocycles aromatiques agonistes 5-HT ₄ R	210
	a. Conception et synthèse des nouveaux composés	211
	b. Résultats obtenus sur ces nouvelles séries	227
	CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	229
I.	Conclusion	231
II.	Perspectives de modulation	233
	METHODOLOGIE	237
I.	Synthèse Organique	239
II.	Protocoles des tests <i>In vitro</i> and <i>in cellulo</i>	341
a.	<i>In vitro</i> experiments	341
	1. DPPH radical scavenging activity	341
	b. ORAC assay	342
	c. Affinity as Regards 5-HT ₄ Receptors	342
2.	<i>In cellulo</i> experiment	343

a. Determination of cAMP production	343
b. MTT ASSAY	343
c. ROS assay	344
d. Neuroprotection assay	344
 ANNEXES	 347
 I. Publications et communications	 349
1. Publications scientifiques:	349
2. Communications orales:	349
3. Communications par poster:	350
 II. Article 3 : Three are better than one: A multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent Alzheimer's disease	 353
 BIBLIOGRAPHIE	 375

Table des Figures

<i>Figure 1 - Portrait d'Alois Alzheimer (A) et d'Auguste Deter, sa patiente (B).</i>	3
<i>Figure 2 - Principales lésions observées chez les patients atteints de la MA. ³</i>	4
<i>Figure 3 - Évolution de la maladie en fonction des années. MMS=Mini Mental Status (examen cognitif global rendant compte du statut cognitif des patients); état de démence encadré. ⁸</i>	6
<i>Figure 4 - Comparaison neuro-anatomique d'un cerveau sain (A,B) et d'un cerveau de MA (C,D). La flèche montre un élargissement des ventricules et une atrophie sélective de l'hippocampe. ¹⁰</i>	7
<i>Figure 5 - Photographie au microscope du cortex temporal d'un patient atteint de la MA (coloration Bielschowski, x100); flèche noire : plaques séniles; flèche rouge : enchevêtrement neurofibrillaire. ¹⁴</i>	8
<i>Figure 6 - Nombre de patients estimés atteints de démence dans le monde adapté du World Alzheimer Report 2015. ¹⁷</i>	9
<i>Figure 7 - Cycle de transmission cholinergique et d'hydrolyse de l'ACh. ¹⁹</i>	10
<i>Figure 8 - Différentes voies de métabolisation de l'APP par Claeysen et al. ²¹</i>	11
<i>Figure 9 - a) séquence du peptide Aβ₁₋₄₀ ou ₄₂ b) représentation schématique de l'agrégation des monomères de peptides Aβ à des fibrilles formant des feuilletts β grâce à la formation d'oligomères métastables par Takahashi et al. ²⁸</i>	13
<i>Figure 10 - Schéma des effets neurotoxiques des Aβos par Huang et al. ³¹</i>	14
<i>Figure 11 - Cascade amyloïde selon Hardy et al. Revisité en 2016. Flèche bleu indique l'action des oligomères. ⁴¹</i>	16
<i>Figure 12 - Agrégats intracellulaires dans les Tauopathies. ⁴⁴</i>	17
<i>Figure 13 - Composés sur le marché en Europe et en Amérique dans le traitement de la MA.</i>	23
<i>Figure 14 - Composés en essais cliniques à la date du 27 février 2020 par Cummings et al. Les agents soulignés sont nouveaux par rapport à la pipeline de 2019. ⁹¹</i>	25
<i>Figure 15 - Structure du semagacestat.</i>	27
<i>Figure 16 - Structure chimique des inhibiteurs de BACE-1 ayant échoués durant les essais cliniques.</i>	28
<i>Figure 17 - Structure du RS-67333.</i>	38
<i>Figure 18 - Effets principaux de l'activation du 5-HT₄R dans le contexte de la MA. ²¹</i>	40
<i>Figure 19 - Structure générale des ligands 5HT₄R. ¹²⁸</i>	73
<i>Figure 20 - Structures des composés de la famille des aminochlorobenzènes.</i>	74
<i>Figure 21 - Structures des composés de la famille pyridinone.</i>	75
<i>Figure 22 - Structures des composés de la famille des benzazoles.</i>	76
<i>Figure 23 - Structure du capeserod.</i>	77
<i>Figure 24 - Balance entre les phénomènes pro-oxydants et les mécanismes anti-oxydants. ¹⁴¹</i>	79
<i>Figure 25 - Schéma résumant la formation des EROs, flèche verte représentant la peroxydation des lipides, en bleu les réactions de type Haber Weiss et en rouge les réactions de Fenton. En gras les molécules radicalaires ou oxydantes, SOD (superoxyde dismutase), CAT (Catalases). ¹⁴⁵</i>	81
<i>Figure 26 - Oxydation des thiols en présence d'oxydants. ¹⁴⁷</i>	82
<i>Figure 27 - Cibles des radicaux libres. ¹⁴⁵</i>	83

<i>Figure 28 - Mécanisme d'action des antioxydants.</i> ¹⁵⁷	86
<i>Figure 29 - Interconnexions entre DR et les facteurs clés dans la dans la MA.</i>	91
<i>Figure 30 - Stratégies polypharmacologiques possibles d'après Morphy et al.</i> ²⁰³	96
<i>Figure 31 - Stratégie de développement de MTDLs.</i> ²⁰⁶	97
<i>Figure 32 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/inhibiteur AChE.</i>	99
<i>Figure 33 - Positionnement et interaction du donécopride au sein du récepteur 5-HT₄ issu d'étude de docking.</i> ²¹²	100
<i>Figure 34 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/antagoniste 5-HT₆.</i>	101
<i>Figure 35 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/inhibiteur AChE/ antagoniste 5-HT₆.</i>	102
<i>Figure 36 - Concept de la prodrogue multi-cible d'après Toublert et al.</i> ²¹⁷	103
<i>Figure 37- Composés prodrogues multi-cibles développés par Toublert et al.</i>	104
<i>Figure 38 - Développement de la mémoquine.</i>	105
<i>Figure 39 - Développement d'analogues mémoquine/acide lipoïque.</i>	106
<i>Figure 40 - Développement du MTDL AChE/CR-6.</i>	107
<i>Figure 41 - Conception d'un analogue tacrine/silibiline.</i>	108
<i>Figure 42 - conception d'un analogue tacrine/acide férulique/mélatonine.</i>	109
<i>Figure 43 - Etapes clés du projet.</i>	111
<i>Figure 44- Conception des premières séries.</i>	111
<i>Figure 45 - Structure du GR-113808 ; * indique la position du radiomarquage au tritium.</i>	113
<i>Figure 46 - Principe du test ORAC.</i> ²²⁹	114
<i>Figure 47 - Principe du test DPPH.</i>	115
<i>Figure 48 - Principe de l'utilisation de la sonde fluorescente H₂DCFDA.</i> ²³⁴	117
<i>Figure 49 - Principe des tests MTT de viabilité cellulaire.</i>	119
<i>Figure 50 - Conception des composés MTDLs.</i> ²³⁸	149
<i>Figure 51- structure des composés les plus intéressants et de leur résultats aux tests in vitro.</i>	151
<i>Figure 52 - Motifs antioxydants sélectionnés.</i>	154
<i>Figure 53 - Récapitulatifs des tests in vitro sur la série aminochlorobenzophénone</i>	159
<i>Figure 54 - Composés 9b et 9g, cLogP calculé comme moyenne des cinq prédictions disponibles sur SwissADME.</i> ²⁴⁴	161
<i>Figure 55 - Stratégie de MTDL décrit dans l'article 2</i>	191
<i>Figure 56 - Composés sélectionnés pour les tests cellulaires.</i>	195
<i>Figure 57 - Récapitulatifs des test in vitro sur la série benzisoxazole.</i>	199
<i>Figure 58 - Molécule potentiellement Hit sur la série benzisoxazole.</i>	201
<i>Figure 59 - Composés développés par Lalut et al. A) Docking de la structure a avec 5-HT₄R ; B) structure des composés a et b ; C) Résultats des tests cellulaires de production de cAMP.</i>	202
<i>Figure 60 - Résultats des études de profil pharmacologique.</i>	203
<i>Figure 61 - Structure du composé 7'.</i>	207
<i>Figure 62 - Structure des produits secondaire à l'étapes de S_N des pipéridines.</i>	209

<i>Figure 63 - Récapitulatif des têtes hétérocycliques pour la conception de ligands 5-HT₄R.</i>	210
<i>Figure 64 - Agents de couplage peptidiques.</i>	211
<i>Figure 65 - Spectre LC-MS de l'amination réductrice; espèces encerclées : composés isolés et dont la structure a été confirmée par analyse RMN.</i>	215
<i>Figure 66 - Structure des produits secondaires et intermédiaires à la synthèse de la série benzimidazolinone</i>	218
<i>Figure 67 - Produit secondaire lié au TFA.</i>	221
<i>Figure 68 - spectres des deux composés 70a isolés.</i>	225
<i>Figure 69 - Structure cristallographique du composé 70a sous forme de bromhydrate en présence d'H₂O et de CDCl₃; oxygène en rouge, carbone en gris, azote en bleu, brome en marron, chlore en vert, hydrogène en blanc.</i>	225
<i>Figure 70 - Récapitulatif des structures mentionnées dans la conclusion.</i>	232
<i>Figure 71 - Résumé des modulation du pharmacophore effectué lors de cette thèse et perspectives sur le linker.</i>	233

Liste des abréviations

A

AA : acide aminé
A β : β -amyloïde
A β os : Oligomères de peptides β -amyloïde
ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholinestérase
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
AICD : domaine intracellulaire de l'APP
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APO ϵ : apolipoprotéine epsilon
APP : protéine précurseur de l'amyloïde
APPH : 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ARN : acide ribonucléique
AUC : aire sous la courbe

B

BACE-1 : β -sécrétase 1
BHE : barrière hémato-encéphalique
BuChE : butyrylcholinestérase

C

CAN : nitrate d'ammonium cérique
CAT : catalase
CCM : chromatographie sur couche mince
CDI : *carbonyldiimidazole*
CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie
cHex : cyclohexane
COMT : catéchol-*O*-méthyltransférase

E

E_{max} : effet maximum
ERA : espèce réactive de l'azote
ERO : espèce réactive de l'Oxygène
ERS : espèce réactive du soufre
EC₅₀ : Concentration efficace 50
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

D

DCC : *dicyclohexylcarbodiimide*
DCFDA : diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
DCM : dichlorométhane
DME : diméthoxyéthane
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DR : déséquilibre radicalaire

F

FDA : *Food and Drug Administration*

G

Gpx : glutathion peroxydase

H

HAS : haute autorité de santé
HAT : *hydrogen atom transfer*
hERG : *human Ether-à-go-go-Related Gene*
HNE : 4-hydroxynonanéal
HOBt : 1-hydroxy-benzotriazole
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution

I

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50
IL-1 β : interleukine-1 β
IRM : Imagerie par résonance magnétique

K

K_i : constante d'inhibition

L

LC-MS : chromatographie liquide lié à un spectrophotomètre de masse
LCS : liquide cérébro-spinal

M

MA : maladie d'Alzheimer
MDA : malondialdéhyde
MMS : *Mini mental status*
MS : spectrométrie de masse
MTDL : Multi-Target Directed Ligand
MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5
diphényle tetrazolium

N

NMDA : *N*-Méthyl-D-aspartic acid
NOS : NO-synthase
NQ01 : *NAD(P)H dehydrogenase quinone 1*

O

ORAC : capacité d'absorbance des radicaux oxygénés
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

P-gp : glycoprotéine-P
PAINS: *Pan assay interference inhibitors*
PAMPA : *Parallel artificial membrane permeability assay*
PBS: tampon phosphate salin
PSEN-1 : présénilines 1
PSEN-2: présénilines 2

R

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RMN : résonance magnétique nucléaire

S

SET: *single electron transfer*
SNC : système nerveux central
SO : stress oxydant
SOD : superoxyde dismutase
sAPP α : *soluble amyloid precursor protein α*

T

Tau : *Tubulin-associated unit*
TEP : tomographie par émission de positons
TEA : triéthylamine
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane

X

XO : xanthine oxydase

Autre

5-HT₄R : récepteur 5-hydroxytryptamine 4

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux
composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-
HT₄ et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope
dans la maladie d'Alzheimer

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-HT4 et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

I. La maladie d'Alzheimer

1. Introduction et généralités (histoire de la maladie)

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative, chronique et évolutive. C'est la maladie neurodégénérative la plus fréquente affectant les personnes âgées. Elle fut pour la première fois décrite par le médecin et psychiatre Aloïs Alzheimer en 1906, comme étant une maladie particulière du cortex cérébral qu'il repéra chez une de ses patientes, Auguste Deter, âgée de 51 ans souffrant de démence précoce (Figure 1).¹

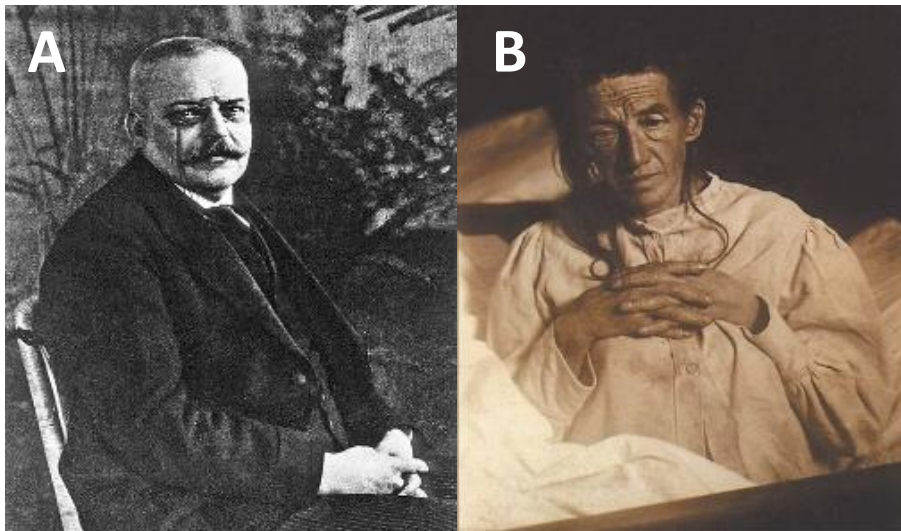


Figure 1 - Portrait d'Aloïs Alzheimer (A) et d'Auguste Deter, sa patiente (B).

Cette patiente présentait des symptômes divers : agressivité, changement de tempérament, perte de mémoire, désorientation spatiale et temporelle ainsi que des hallucinations auditives. L'autopsie cérébrale de celle-ci permit alors à Aloïs Alzheimer de mettre en évidence plusieurs éléments caractéristiques.

Il constata tout d'abord une atrophie générale du cerveau avec disparition de nombreuses couches de neurones, ainsi que deux grands types de lésions (Figure 2), qui sont, encore à l'heure actuelle, étudiés comme étant les principales causes moléculaire de la maladie :²

- Les plaques séniles situées au niveau extracellulaire ;
- Les enchevêtrements neurofibrillaires situés au niveau intracellulaire.

¹ Alzheimer, A. Uber Einen Eigenartigen Schweren Erkrankungsprozess Der Hirnrinde. *Neurol Zentralbl* **1906**, 23, 1129–1136.

² Strassnig, M. *et al.* About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex. *Psychiatry Edgmont* **2005**, 2 (9), 30–33.

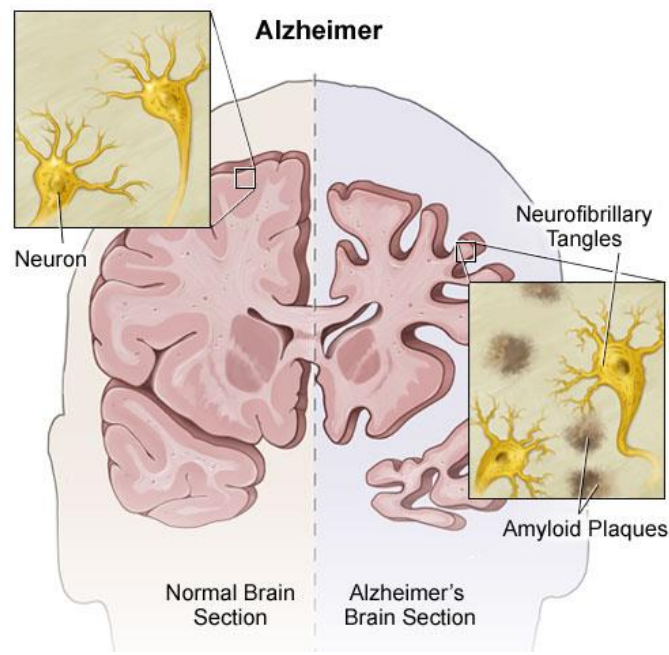


Figure 2 - Principales lésions observées chez les patients atteints de la MA.³

C'est en 1910, sous l'impulsion du Docteur Emil Kraepelin, collègue d'Aloïs Alzheimer, que cette pathologie prit le nom qu'on lui connaît aujourd'hui. A l'heure actuelle, soit plus de 100 ans après ces découvertes, on ne sait toujours pas avec exactitude le lien qui existe entre ces deux lésions, on sait cependant qu'elles sont toujours présentes ensemble. De nombreuses équipes de recherche travaillent encore aujourd'hui à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la MA, et ont permis de mettre en évidence plus d'une vingtaine de cibles potentielles.⁴

2. Signes cliniques de la maladie

La MA va s'exprimer différemment selon les personnes, certaines vont développer fortement certains signes au début de la maladie alors que chez d'autres individus ils apparaîtront à la fin.⁵ Les premiers signes de celle-ci sont souvent peu spécifiques tels que l'indifférence, l'inquiétude, un comportement distant ou des petits « trous » de mémoire. On peut cependant caractériser 4 grands types de symptômes généraux ce qui lui vaut l'appellation de maladie des « 4A ».⁶

³ Pescosolido, N. *et al.* Critical Review on the Relationship between Glaucoma and Alzheimer's Disease. *Adv. Ophthalmol. Vis. Syst.* **2014**, Volume 1 (Issue 4).

⁴ Kumar, A. *et al.* A Review on Alzheimer's Disease Pathophysiology and Its Management: An Update. *Pharmacol. Rep.* **2015**, 67 (2), 195–203.

⁵ Thalhauser, C. J. *et al.* Alzheimer's Disease: Rapid and Slow Progression. *J. R. Soc. Interface* **2012**, 9 (66), 119–126.

⁶ Dubois, B. *et al.* Revising the Definition of Alzheimer's Disease: A New Lexicon. *Lancet Neurol.* **2010**, 9 (11), 1118–1127.

- Amnésie: troubles de la mémoire, avec une perte totale ou partielle des processus de mémorisation de l'information. Les patients vont alors avoir du mal à mémoriser de nouvelles informations et à se souvenir d'évènements récents.
- Aphasie : troubles du langage et de sa compréhension écrite ou orale. Le patient va alors chercher ses mots, va utiliser un vocabulaire plus simple ou tenir des propos incohérents. Cela rend la communication avec le patient plus compliquée ce qui peut l'isoler jusqu'à entrer dans une phase de mutisme.
- Agnosie : troubles de la reconnaissance des objets ou des personnes. Le patient ne saura plus reconnaître des objets et les utiliser correctement.
- Apraxie : troubles de la réalisation des gestes. Le patient va alors perdre en autonomie et ne saura réaliser les actions du quotidien, comme se faire à manger, cuisiner, se laver...

A tout cela vont s'ajouter des troubles de la fonction exécutive, des troubles de l'orientation spatiale et temporelle ainsi que des troubles du comportement. Il n'est pas rare d'observer une certaine agitation ou même une agressivité chez les patients atteints qui sont plutôt la conséquence logique des différents troubles décrits précédemment. Les patients vont également présenter des signes de dépression bien qu'à ce jour on ne sache pas clairement si il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la maladie.⁷

La maladie va évoluer en suivant 4 stades principaux :

- Un premier stade préclinique. A ce stade, le patient sera asymptomatique, cependant il commencera à présenter et développer les lésions cérébrales observées par Aloïs Alzheimer chez Auguste Deter. Ce stade peut durer de 10 à 15 ans avant l'arrivée des premiers symptômes.
- Le second stade est le stade prodromal ou prédéméntiel. Il se caractérise par des pertes de mémoires épisodiques sans pour autant qu'il y ait un retentissement sur la qualité de vie du patient. On diagnostique rarement les patients à ce stade car ces premiers symptômes ne sont pas spécifiques et peuvent s'apparenter à une vieillesse commune.
- Le troisième stade est le stade modéré. Le patient aura de plus en plus de trous de mémoire accompagnés par des premiers signes de troubles de l'orientation et de l'aphasie. Le patient va peu à peu perdre son autonomie à ce stade.

⁷ Ownby, R. *et al.* Depression and Risk for Alzheimer Disease: Systematic Review, Meta-Analysis, and Metaregression Analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* **2006**, 63 (5), 530–538.

- Enfin le dernier stade est le stade avancé : les symptômes vont s'aggraver jusqu'à la perte totale d'autonomie pour le patient. Cette dernière phase est la plus courte et dure en moyenne 2 ans avant la mort du patient.

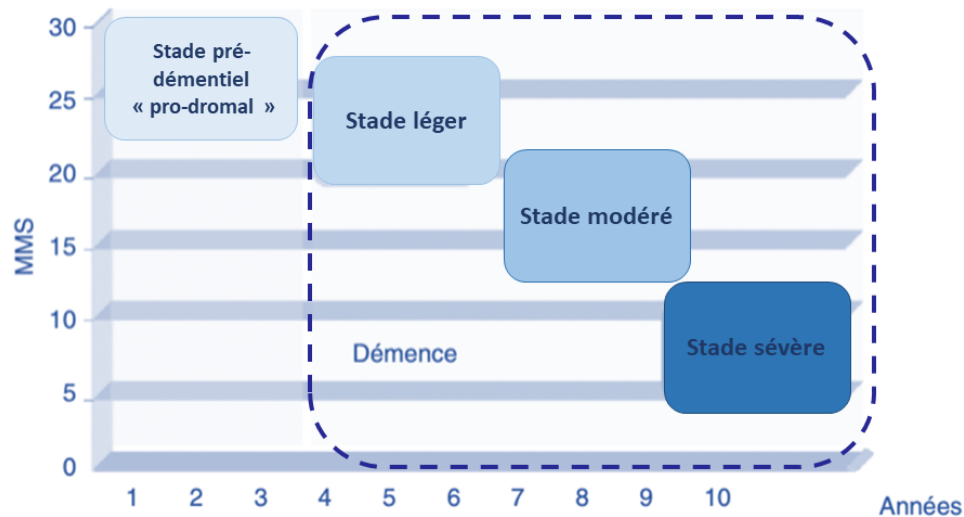


Figure 3 - Évolution de la maladie en fonction des années. MMS=Mini Mental Status (examen cognitif global rendant compte du statut cognitif des patients); état de démence encadré.⁸

On estime qu'un patient atteint de la MA aura une espérance de vie en moyenne de 5 à 20 ans après le diagnostic, suivant le stade auquel elle a été diagnostiquée. On ne meurt cependant pas de la maladie elle-même mais plutôt des complications qu'elle entraîne, ou de pathologies associées comme ce fut le cas avec Auguste Deter qui succomba d'une surinfection de ses escarres.

3. Signes histopathologiques

a. Aspect du cerveau

Le cerveau est l'organe le plus important du corps humain mais aussi le plus complexe. Dans la MA, le volume du cerveau va être significativement diminué par rapport à un cerveau sain du même âge.⁹ (Figure 4) L'atrophie générale qu'avait aussi observée Aloïs Alzheimer durant l'autopsie

⁸ Troubles cognitifs du sujet âgé <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle/troubles-cognitifs-du-sujet-age> (accessed Jul 10, 2020).

d'Auguste Deter est en fait le résultat de la dégénérescence et de la mort de neurones. L'hippocampe, qui est une région primordiale pour la mémoire et l'apprentissage, va être l'une des zones les plus touchées assez précocement dans le développement de la maladie.

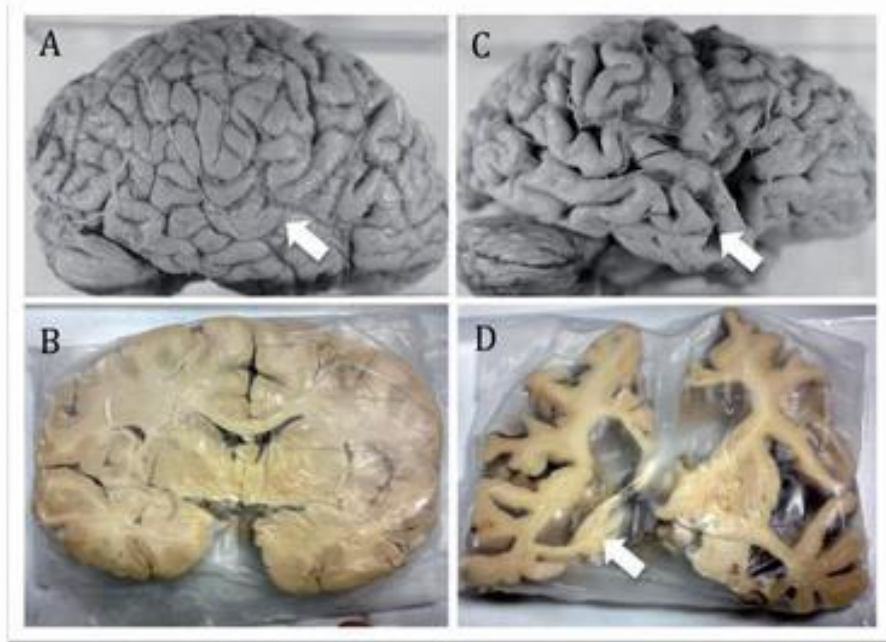


Figure 4 - Comparaison neuro-anatomique d'un cerveau sain (A,B) et d'un cerveau de MA (C,D). La flèche montre un élargissement des ventricules et une atrophie sélective de l'hippocampe.¹⁰

b. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes ont été directement observées et rapportées par Aloïs Alzheimer dès 1907. A l'époque, il les a décrites comme des « minute miliary foci » provoquées par le dépôt d'une substance spécifique dans le cortex.¹¹ On sait aujourd'hui que ces plaques amyloïdes sont en réalité constituées de peptides β -amyloïdes (ou peptide A β) dont l'accumulation sous forme de plaques sera développée dans le paragraphe 2 : Hypothèse amyloïde. Ces plaques sont également nommées plaques séniles (Figure 5).

c. Les enchevêtrements neurofibrillaires

⁹ Mattson, M. P. Pathways towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature* **2004**, *430*, 631–639.

¹⁰ Soto-Rojas, L. O. *et al.* Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. In *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*; Zerr, I., Ed.; InTech, **2015**.

¹¹ Stelzmann, R. A. *et al.* An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde." *Clin. Anat.* **1995**, *8* (6), 429–431.

Les secondes lésions moléculaires observées par Aloïs Alzheimer sont les enchevêtrements neurofibrillaires (Figure 5). Ces lésions ne sont cependant pas spécifiques de la MA. En effet, on retrouve ces lésions dans d'autres maladies neurodégénératives appelées Tauopathies telles que la maladie de Parkinson.^{12,13}

Ces lésions sont principalement dues à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Tubulin-associated-unit), une protéine stabilisatrice du cytosquelette cellulaire. L'origine et le développement de ces lésions seront détaillés dans le paragraphe 3. Hypothèse Tau.

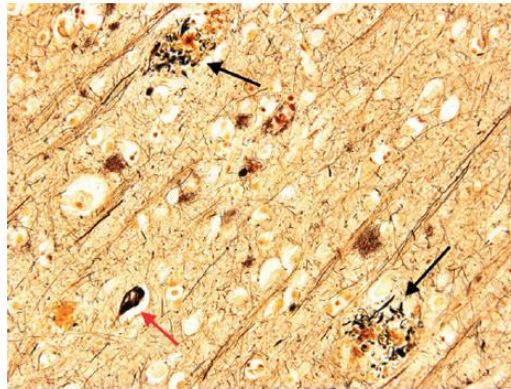


Figure 5 - Photographie au microscope du cortex temporal d'un patient atteint de la MA (coloration Bielschowski, x100); flèche noire : plaques séniles; flèche rouge : enchevêtrement neurofibrillaire.¹⁴

4. Epidémiologie de la maladie

La MA est responsable de 60 à 80% des démences dans le monde.¹⁵ En 2015, en France, on estimait à plus de 900 000 le nombre de personnes atteintes par une démence et près de 47 millions dans le monde.¹⁶ Une démence se définit comme un syndrome comprenant un trouble résultant d'une perte des capacités cognitives (mémoire, attention, langage, raisonnement) s'aggravant par désorientation spatio-temporelle et un délire.

¹² Lee, V. M.-Y. *et al.* Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, 24 (1), 1121–1159.

¹³ Ballatore, C. *et al.* Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8 (9), 663–672.

¹⁴ Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. J. Transl. Pers. Med.* **2010**, 77 (1), 32–42.

¹⁵ Alzheimer (maladie d') | Inserm - La science pour la santé <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie> (accessed Sep 26, 2019).

¹⁶ Prince, M. *et al.* The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimers Dement.* **2013**, 9 (1), 63-75.

D'après les prédictions du World Alzheimer Report de 2015, ce nombre pourrait même doubler tous les 20 ans pour arriver à 131 millions en 2050. La Figure 6 montre la répartition des cas estimés de démence dans le monde en 2015. L'Asie est la première région touchée avec près de 23 millions de personnes atteintes puis ensuite vient l'Europe avec près de 10,5 millions de cas estimés.¹⁷ Cependant, une nouvelle étude publiée en 2020, tend à montrer que, sur les 25 dernières années, une diminution de l'incidence de 13% par décennie des cas de démences a été observée en Europe et en Amérique du Nord bien que la raison soit encore inconnue.¹⁸

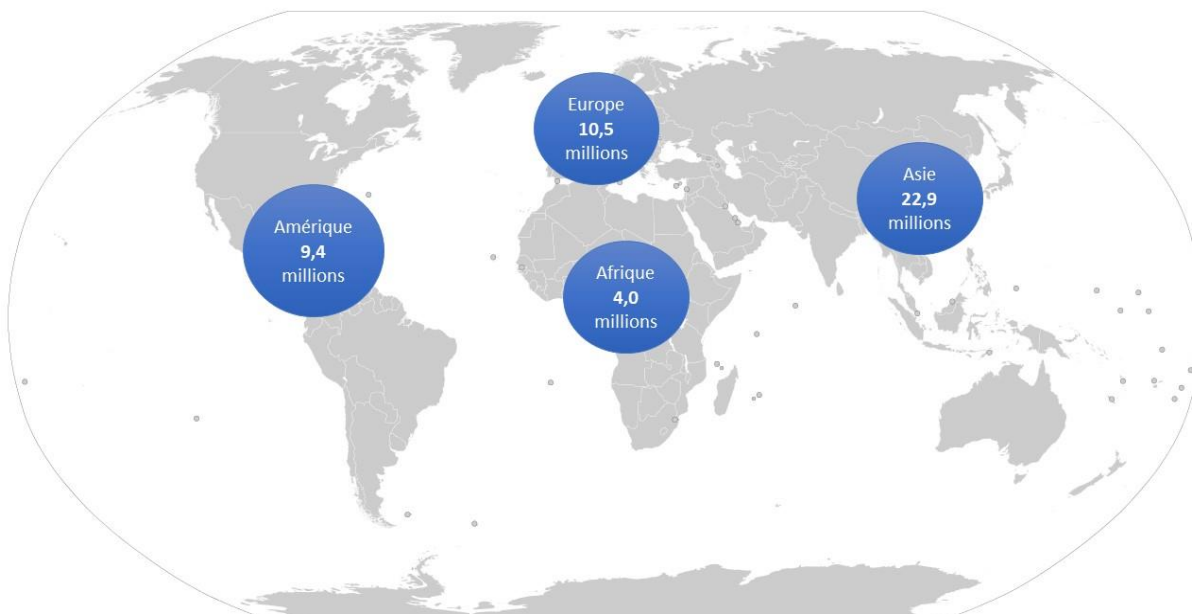


Figure 6 - Nombre de patients estimés atteints de démence dans le monde adapté du World Alzheimer Report 2015.¹⁷

II. Causes moléculaires de la maladie

La MA est une maladie complexe, elle continue d'ailleurs à cliver encore la communauté scientifique à l'heure actuelle. De nombreux progrès sont encore à réaliser notamment dans la compréhension moléculaire, environnementale ou génétique de la maladie. Plus de 100 ans après sa découverte, les causes physiopathologiques exactes ne sont toujours pas élucidées. Il existe cependant plusieurs grandes hypothèses autour desquelles les chercheurs se mobilisent.

¹⁷ Prince, M. J. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015> (accessed Jun 26, 2020).

¹⁸ Wolters, F. J. *et al.* Twenty-Seven-Year Time Trends in Dementia Incidence in Europe and the United States. *Neurology* **2020**, *95* (5), 519–531.

1. Hypothèse cholinergique

Cette hypothèse repose sur le fait que la MA provoque la dégénérescence des neurones cholinergiques et donc une diminution globale de la neurotransmission cholinergique dans le cortex cérébral. L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur impliqué dans les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. Son déficit serait donc responsable des principaux symptômes de la maladie, à savoir la détérioration de la fonction cognitive des patients. C'est pour cela que la plupart des molécules sur le marché ciblent l'enzyme qui la dégrade. Ces dernières seront détaillées par la suite dans le paragraphe IV : Les traitements actuels.

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme située au niveau synaptique, elle va avoir comme rôle physiologique d'hydrolyser l'ACh en choline et en acétate. Dans les conditions physiologiques, l'ACh transmet son message en se fixant à un récepteur cholinergique de type nicotinique ou muscarinique. Sa concentration synaptique est alors régulée par l'AChE (Figure 7). Chez les patients atteints de la MA, une partie de l'ACh va être hydrolysée avant d'atteindre son récepteur et l'influx nerveux ne va donc pas passer aussi efficacement que chez une personne saine, expliquant ainsi les déficiences cognitives chez les patients concernés.

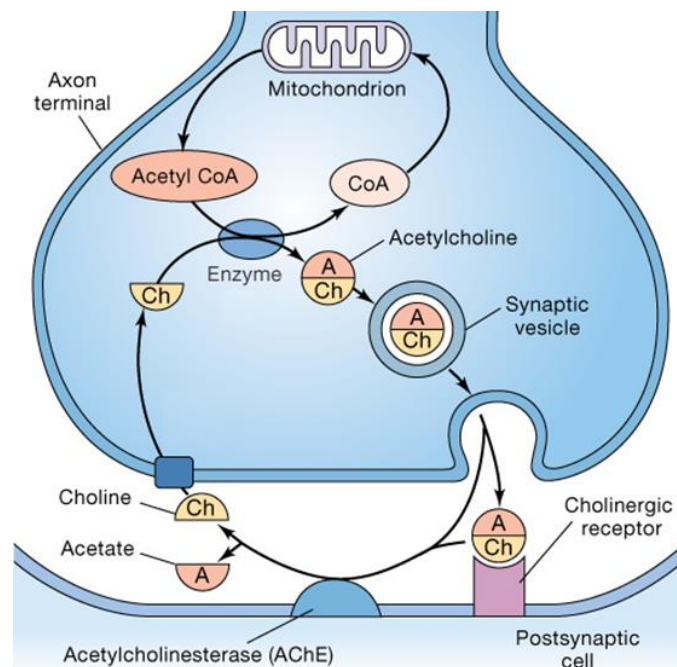


Figure 7 - Cycle de transmission cholinergique et d'hydrolyse de l'ACh.¹⁹

¹⁹ What is the role of acetylcholinesterase at a synapse? | Socratic <https://socratic.org/questions/what-is-the-role-of-acetylcholinesterase-at-a-synapse-1> (accessed Apr 9, 2020).

2. Hypothèse amyloïde

Comme indiqué dans l'introduction, Aloïs Alzheimer a observé et décrit deux types de lésions, que sont les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. D'après cette hypothèse, énoncée en 1992 par Hardy *et al.*, la maladie aurait pour cause principale la formation et l'accumulation anormale de peptides β amyloïdes (ou $A\beta$) sous forme de plaques séniles.²⁰

Pour comprendre un peu mieux cette hypothèse, il est nécessaire d'expliquer la formation de ces peptides $A\beta$. Ceux-ci sont formés lors de la métabolisation de la protéine précurseur de l'amyloïde (communément appelée APP). Il va alors exister un équilibre dans la métabolisation de cette APP mettant en jeu deux voies principales possibles (Figure 8) :²¹

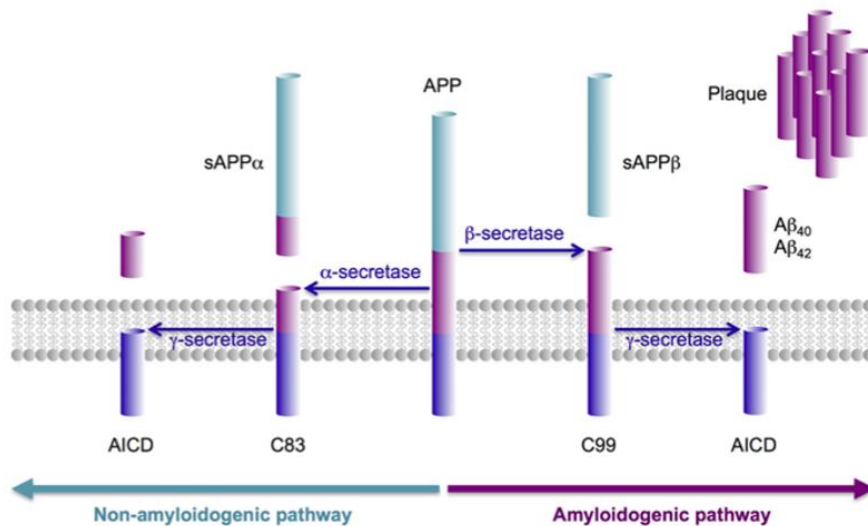


Figure 8 - Différentes voies de métabolisation de l'APP par Claeysen *et al.* ²¹

- La voie non amyloïdogénique est la voie prépondérante chez les patients jeunes. Celle-ci clive l'APP par l'activation d'une α -sécrétase formant ainsi un fragment $sAPP\alpha$ extracellulaire, neurosoluble et neuroprotecteur, puis d'une γ -sécrétase. La γ -sécrétase est un complexe multi-protéique composé 4 protéines distinctes : la préséniline 1 (PSEN-1), la nicastrine, l'antérieur pharynx defective 1 et l'enhancer préséniline 2 (PSEN-2). Celle-ci permet d'obtenir un fragment AICD (APP intra cellular domain) intracellulaire ainsi qu'un petit fragment p3.
- La voie amyloïdogénique est une voie qui apparaît dans les populations plus âgées et chez les patients atteints de la MA. Elle clive l'APP en faisant intervenir une β -sécrétase ainsi qu'une γ -

²⁰ Hardy, J. A. *et al.* Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* **1992**, 256 (5054), 184–185.

²¹ Claeysen, S. *et al.* Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, 6 (7), 940–943.

sécrétase, ceci aboutissant à la libération de peptides A β qui vont s'agréger sous forme de plaques séniles. La formation de ces plaques va passer par plusieurs intermédiaires distincts. Tout d'abord il y aura la formation d'oligomères (allant jusqu'à 12 unités) organisés en feuillets β grâce à des liaisons de Van der Waals. Ces structures vont ensuite avoir tendance à former des proto-fibrilles, qui, en présence d'autres éléments (métaux, protéines) vont s'agréger sous forme de fibrilles et ainsi former les plaques comme détaillé ci-dessous.

Au cours de la vie, la voie amyloïdogénique a donc tendance à prendre le dessus sur la voie non amyloïdogénique. Or, chez les patients atteints de la MA, on retrouve un déséquilibre dans l'élimination des peptides A β menant à l'accumulation de ceux-ci sous forme de plaques. Ces plaques séniles, ou ses constituants, entraîneraient alors des altérations cellulaires menant à l'apoptose ou la nécrose des neurones ainsi qu'à l'augmentation de stress oxydant.²¹

a. Phénomène d'agrégation

Comme mentionné ci-dessus, les peptides A β sont issus de l'APP. Ceux-ci ne vont pas directement s'agréger sous forme de plaques, ils vont passer par différentes formes telles que les oligomères et les fibrilles avant de former ces plaques séniles.²²

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP va tout d'abord être pris en charge par une β -sécrétase (BACE 1) dans son domaine N-terminal pour relarguer un fragment sAPP β et un fragment transmembranaire C99 (Figure 7). Ce fragment C99 sera ensuite pris en charge par le complexe γ -sécrétase afin d'obtenir le peptide A β extracellulaire ainsi qu'un fragment intracellulaire AICD. Ce peptide A β va exister sous plusieurs formes, la principale étant A β_{1-40} constituée de 40 acides aminés (AA) (Figure 9), elle représente près de 95% des peptides A β produits par la cellule. Il existe cependant une autre forme, A β_{1-42} constitué de 42 AA dont la séquence est décrite dans la Figure 9.²¹

Dans les conditions physiologiques, A β permet d'inhiber la sur-activation des synapses et réduire ainsi leur excitotoxicité.²³ Il semblerait également que ce peptide ait des propriétés antibactériennes

²² Cheng, P.-N. *et al.* Amyloid β -Sheet Mimics That Antagonize Protein Aggregation and Reduce Amyloid Toxicity. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (11), 927–933.

²³ Kamenetz, F. *et al.* APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* **2003**, *37* (6), 925–937.

et antivirales permettant la défense du système nerveux central (SNC) contre des infections.^{24,25}

Dans la MA, l'élimination de ce peptide va être diminuée ou sa production augmentée, menant à un déséquilibre de la balance et amenant à terme à la formation de plaques séniles.²⁶

Les monomères A β vont alors être capables de s'auto-assembler sous forme d'oligomères. Les oligomères A β (ou A β os) sont un ensemble polymérique **soluble** de peptides A β . Ils peuvent varier en poids moléculaire et conformations, certains de ces A β os seront précurseurs dans la formation de protofibrilles **insolubles** notamment les oligomères issus des A β_{1-42} .²⁷

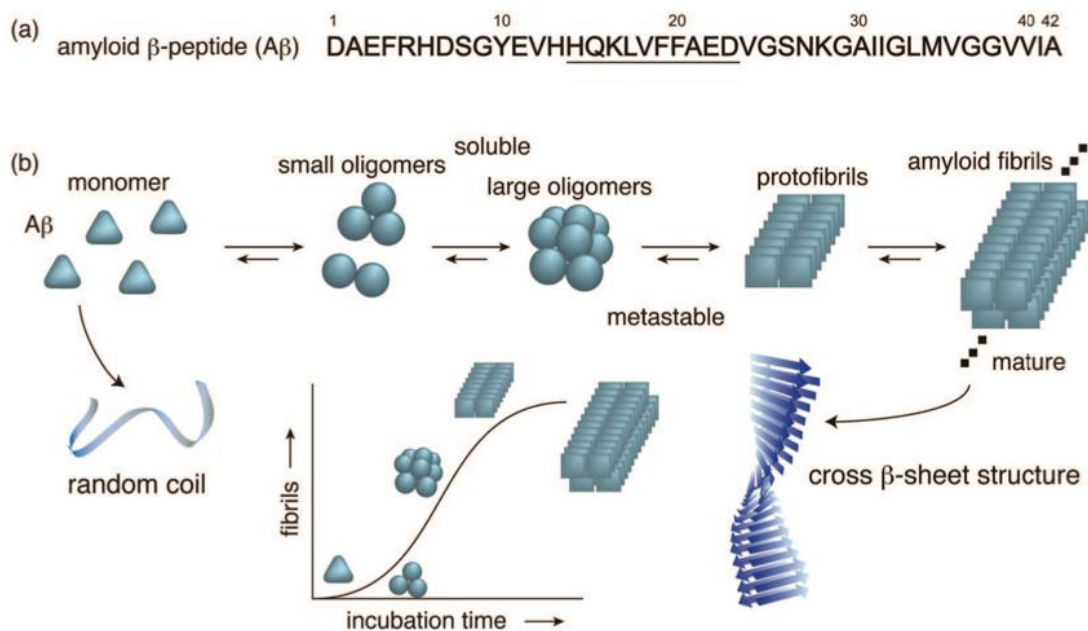


Figure 9 - a) séquence du peptide A β_{1-40} ou 42 b) représentation schématique de l'agrégation des monomères de peptides A β à des fibrilles formant des feuillets β grâce à la formation d'oligomères métastables par Takahashi *et al.*²⁸

L'observation de l'agrégation sur des modèles *in vitro* a permis de diviser ce phénomène en 3 étapes clés :^{29,30}

²⁴ Hubin, E. *et al.* Two Distinct β -Sheet Structures in Italian-Mutant Amyloid-Beta Fibrils: A Potential Link to Different Clinical Phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, 72 (24), 4899–4913.

²⁵ Bourgade, K. *et al.* Protective Effect of Amyloid- β Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, 50 (4), 1227–1241.

²⁶ Bourgade, K. *et al.* Anti-Viral Properties of Amyloid- β Peptides. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, 54 (3), 859–878.

²⁷ Fändrich, M. Oligomeric Intermediates in Amyloid Formation: Structure Determination and Mechanisms of Toxicity. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421 (4), 427–440.

²⁸ Takahashi, T. *et al.* Peptide and Protein Mimetics Inhibiting Amyloid β -Peptide Aggregation. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41 (10), 1309–1318.

²⁹ Szczepankiewicz, O. *et al.* N-Terminal Extensions Retard A β 42 Fibril Formation but Allow Cross-Seeding and Coaggregation with A β 42. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (46), 14673–14685.

³⁰ Törnquist, M. *et al.* Secondary Nucleation in Amyloid Formation. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (63), 8667–8684.

- Une phase initiale de latence ou de nucléation primaire, dans laquelle les monomères A β vont commencer à se dimériser lentement ;
- Une deuxième phase d'expansion, beaucoup plus rapide, où les oligomères vont commencer à se rassembler sous différentes formes et tailles. Certains A β os vont former des oligomères fibrillaires (ou proto fibrilles) qui pourront plus tard former des fibrilles (on parle de nucléation secondaire), alors que d'autres A β os (plutôt trimériques ou globulomériques) vont plutôt former des oligomères stables non fibrillaires ;
- Et enfin une phase stationnaire où les fibrilles amyloïdes matures vont former des feuilletts β et s'agréger sous forme de plaques grâce à la formation de liaisons de Van der Waals.

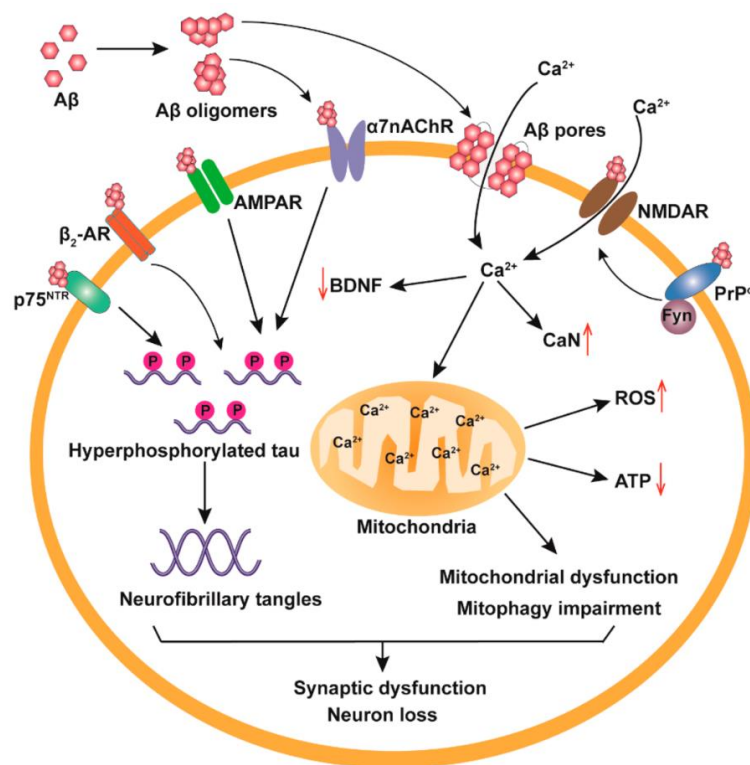


Figure 10 - Schéma des effets neurotoxiques des A β os par Huang *et al.* ³¹

Depuis quelques années les oligomères ont été étudiés et caractérisés. Il semblerait que cette espèce d'A β soit la plus neurotoxique, jouant un rôle dans le développement de la MA en provoquant la mort neuronale.³¹ Comme le montre la Figure 10, bien que ceux-ci soient produits dans le milieu extracellulaire, ils vont être capables d'agir à l'intérieur de la cellule en se liant à plusieurs récepteurs à la surface des neurones. Ces A β os vont ainsi agir sur les différentes voies de signalisation cellulaire.³²

³¹ Huang, Y. *et al.* The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (12), 4477-4496

³² Mroczko, B. *et al.* Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (A β Os) in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (7), 1884.

Ils vont également pouvoir interagir directement avec la membrane et former des pores en modifiant la perméabilité et l'intégrité de celle-ci.³³

Ces différentes actions sur les récepteurs membranaires vont avoir un effet sur l'hyperphosphorylation de Tau et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires dans un premier temps. Dans un second temps, la formation de pores et l'activation de certains récepteurs tels que les récepteurs NMDA vont augmenter la concentration en calcium intracellulaire. Ce phénomène aura des effets sur plusieurs voies de signalisation et mènera à une dysfonction mitochondriale, elle-même liée à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais), ainsi qu'à la réduction de production d'ATP.³⁴⁻³⁷ Ces différents phénomènes vont, à terme, provoquer une dysfonction synaptique et empêcher la transmission d'influx nerveux, poussant le neurone dysfonctionnel à mourir.

b. Phénomène de cascade amyloïde selon Hardy *et al.*

L'hypothèse initialement émise par Hardy *et al.* en 1992 a évolué au fil des années et de nouvelles découvertes notamment autour des oligomères A β ont émergé depuis.²⁰ C'est l'une des hypothèses les plus controversées dans la MA. En effet plusieurs équipes de recherche ont remis en cause cette hypothèse ces derniers temps suite à l'échec des différentes thérapeutiques ciblant cette cascade.³⁸⁻

40

Cette hypothèse repose sur le fait que la surproduction et le défaut d'élimination des peptides A β_{1-42} et apparentés sont le point de départ menant à la MA, qu'elle soit d'origine sporadique ou familiale. Dans les deux cas, l'accumulation de A β_{1-42} mènera à son oligomérisation. Les oligomères vont ensuite avoir plusieurs effets neurotoxiques, puis certains de ceux-ci vont s'agréger pour former des plaques diffuses. Ces plaques vont alors provoquer un phénomène de neuroinflammation, ce qui va aggraver et altérer l'homéostasie ionique et radicalaire. Cela aura ainsi un impact sur les différentes

³³ Bode, D. C. *et al.* Amyloid- β Oligomers Have a Profound Detergent-like Effect on Lipid Membrane Bilayers, Imaged by Atomic Force and Electron Microscopy. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (19), 7566–7572.

³⁴ Yasumoto, T. *et al.* High Molecular Weight Amyloid B1-42 Oligomers Induce Neurotoxicity via Plasma Membrane Damage. *FASEB J.* **2019**, *33* (8), 9220–9234.

³⁵ Kaye, R. *et al.* Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33* (s1), 67–78.

³⁶ Swerdlow, R. H. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *62* (3), 1403–1416.

³⁷ Zhang, F. *et al.* β -Amyloid Redirects Norepinephrine Signaling to Activate the Pathogenic GSK3 β /Tau Cascade. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12* (526).

³⁸ Herrup, K. The Case for Rejecting the Amyloid Cascade Hypothesis. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18* (6), 794–799.

³⁹ Makin, S. The Amyloid Hypothesis on Trial. *Nature* **2018**, *559*, 4–7.

⁴⁰ Panza, F. *et al.* A Critical Appraisal of Amyloid- β -Targeting Therapies for Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (2), 73–88.

voies de signalisation et sur l'activité des différentes kinases et phosphatases (reliant les plaques amyloïdes aux enchevêtrements neurofibrillaires ainsi qu'au stress oxydant). Ces différents événements vont provoquer un dysfonctionnement des synapses et une neurodégénérescence menant à la démence.⁴¹

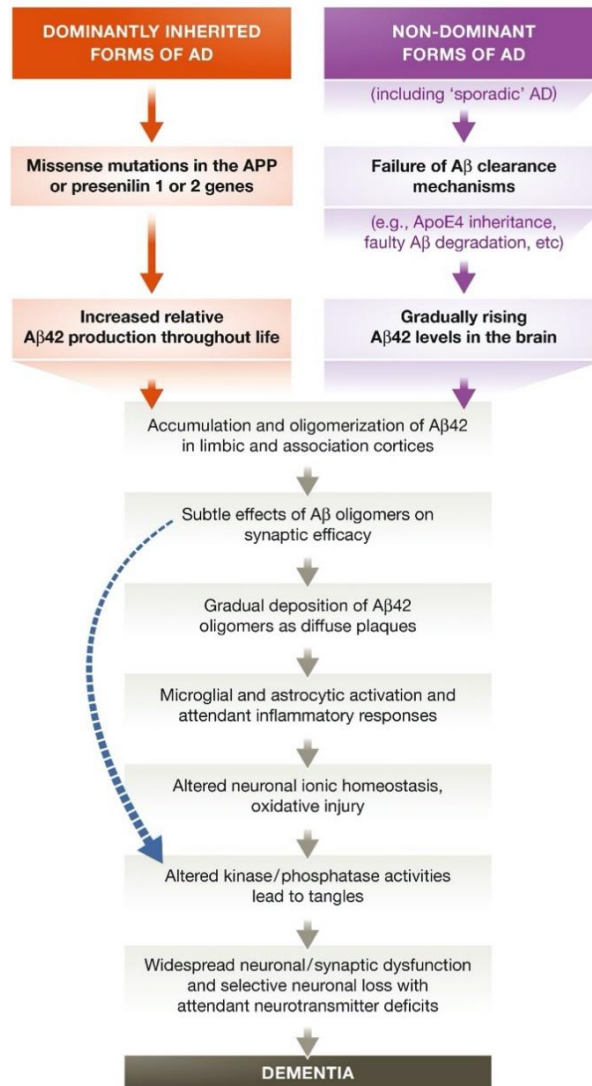


Figure 11 - Cascade amyloïde selon Hardy *et al.* revisitée en 2016. La flèche bleu indique l'action des oligomères.⁴¹

Les indices génétiques (développés dans la partie III : Facteurs de risque) tendent à confirmer cette hypothèse. En effet les mutations de gènes retrouvées chez les patients atteints de la MA sont corrélées soit à la production de l'APP et des peptides A β à travers les PSEN, soit à l'élimination des peptides A β (APO ϵ étant liée au fonctionnement de la microglie). L'administration d'A β _{os1-42} isolés a

⁴¹ Selkoe, D. J. *et al.* The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8* (6), 595–608.

⁴² Wang, H.-W. *et al.* Soluble Oligomers of β Amyloid (1-42) Inhibit Long-Term Potentiation but Not Long-Term Depression in Rat Dentate Gyrus. *Brain Res.* **2002**, *924* (2), 133–140.

d'ailleurs montré la diminution des synapses, ainsi que la diminution de la potentialisation à long terme de celles-ci et l'augmentation des dépressions à long terme des synapses sur des modèles murins.⁴²

3. Hypothèse Tau

La seconde lésion observée par Aloïs Alzheimer concerne les enchevêtrements neurofibrillaires. Ces lésions intra-neurales seraient causées par l'enchevêtrement de neurofibrilles constituées d'agrégats de protéine Tau. Dans les conditions physiologiques, la protéine Tau non phosphorylée vient stabiliser les microtubules formant le « squelette » cellulaire, favorisant le transport axonal et le soutien de la structure dendritique.^{13,43}

Chez les patients atteints de la MA, il semble exister une hyperphosphorylation de cette protéine Tau conduisant à son agrégation intracellulaire. Dans ce contexte particulier, elle ne va donc pas pouvoir jouer son rôle de stabilisation des microtubules. Ceux-ci vont alors se dégrader provoquant l'altération du passage nerveux et conduisant à la dégénérescence des neurones puis finalement à leur mort. On retrouve d'ailleurs ce phénomène dans d'autres tauopathies telles que la trisomie 21, la maladie de Pick et la maladie de Parkinson suggérant un lien entre plusieurs maladies neurodégénératives.^{12,44}

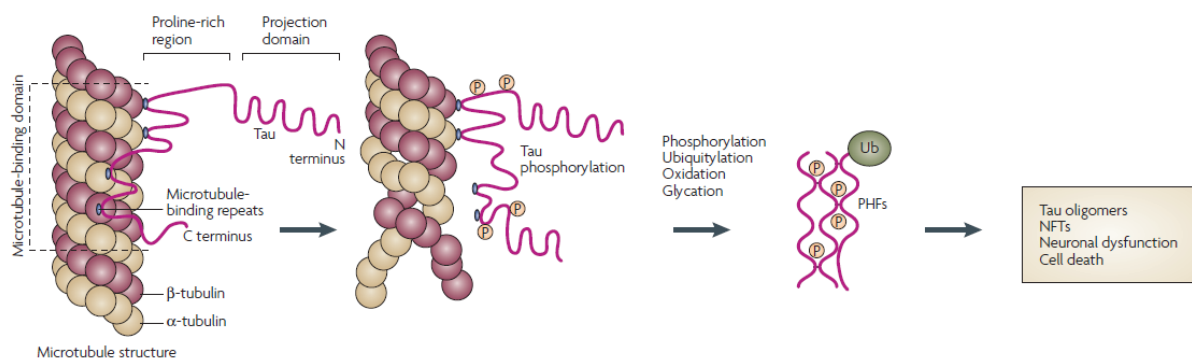


Figure 12 - Agrégats intracellulaires dans les Tauopathies⁴⁴

⁴³ Goedert, M. *et al.* Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1989**, 3 (4), 519–526.

⁴⁴ Mazanetz, M. P. *et al.* Untangling Tau Hyperphosphorylation in Drug Design for Neurodegenerative Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6 (6), 464–479.

Cependant, il est apparu au travers de nouvelles études que les oligomères de Tau seraient responsables de la toxicité et non des enchevêtrements neurofibrillaires comme le laissait présager les hypothèses initiales. En effet les oligomères Tau joueraient un rôle précoce dans la MA en perturbant le transport axonal et en altérant la potentialisation à long terme.⁴⁵

Une fois formées, les protéines hyperphosphorylées de Tau vont s'agréger à leur tour et présenter une conformation pathologique spécifique appelée « seed ». Ces dernières vont se comporter comme des amorces capables de modifier la conformation de la protéine Tau physiologique vers sa forme pathologique ce qui va progressivement aboutir à une accumulation de filaments insolubles. Ces amorces vont « contaminer » les cellules voisines par un mécanisme semblable aux prions.^{46,47}

La physiopathologie liée à l'hyperphosphorylation de Tau est reliée de manière spatio-temporelle aux déclin cognitifs observés dans la MA. Cette hypothèse a été vérifiée par Clavaguera *et al.* Il s'est avéré que l'injection de protéine anormale Tau humaine mutante dans un modèle murin a induit l'agrégation de la protéine Tau murine endogène, et que la pathologie s'est transmise à partir du site d'injection aux régions cérébrales voisines.⁴⁸

4. Autres hypothèses

De nombreuses autres pistes sont étudiées afin d'élucider les causes de cette pathologie complexe et multifactorielle.

Ces dernières années, les chercheurs ont étudié de plus en plus les phénomènes liés à la neuroinflammation et au stress oxydant. En effet, ces phénomènes semblent être au centre de la pathologie d'Alzheimer en agissant aussi bien sur l'hyperphosphorylation de Tau que sur la formation

⁴⁵ Ward, S. M. *et al.* Tau Oligomers and Tau Toxicity in Neurodegenerative Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (4), 667–671.

⁴⁶ Frost, B. *et al.* Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (19), 12845–12852.

⁴⁷ Brundin, P. *et al.* Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (4), 301–307.

⁴⁸ Clavaguera, F. *et al.* Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (7), 909–913.

de plaques séniles et de peptides A β .^{49,50} Il existe également un défaut d'homéostasie lié aux métaux dans les pathologies neurodégénératives. On commence également à parler de phénomène de ferroptose, qui est une mort cellulaire liée au fer et qui pourrait être impliquée dans les dégénérescences de la MA.⁵¹

L'une des plus récentes hypothèses est l'origine bactérienne de la maladie. En effet, ces dernières années les chercheurs se sont penchés sur la bactérie *Porphyromonas gingivalis*, agent responsable de parodontite chronique. Il a été observé la présence de cette bactérie chez les patients atteints de la MA. D'après Dominy *et al.*, la bactérie serait responsable du développement de gingipaïne, une enzyme neurotoxique qui, sur un modèle animal, semble être à l'origine de la production de protéine A β . Un inhibiteur de gingipaïne appelé COR-388 a d'ailleurs été développé par Cortexyme et est en test clinique chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.⁵²⁻⁵⁴

III. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risques évitables ou non ont été identifiés depuis la découverte de la maladie. Ceux-ci sont la cause et la conséquence d'une meilleure compréhension de la maladie.

1. L'âge

L'âge est le facteur de risque le plus important. En effet plus la personne sera âgée, plus elle aura de risque de développer la MA. La prévalence en 2005 était de 3 à 5% pour les personnes âgées de plus de 65 ans à près de 32% pour les personnes âgées de plus de 80 ans. C'est un facteur très important à prendre en compte dans les stratégies de santé publique si l'on considère le vieillissement global de la population. L'amélioration de la qualité de vie va également avoir une incidence sur le vieillissement de la population dans certains pays autrefois considérés en développement, tels que la

⁴⁹ Rosini, M. *et al.* Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (7), 2821–2831.

⁵⁰ Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **2015**, 14 (4), 388–405.

⁵¹ Ayton, S. *et al.* - Iron and Ferroptosis in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, 120, 8.

⁵² Dominy, S. S. *et al.* Porphyromonas Gingivalis in Alzheimer's Disease Brains: Evidence for Disease Causation and Treatment with Small-Molecule Inhibitors. *Sci. Adv.* **2019**, 5 (1), 3333.

⁵³ Singhrao, S. K. *et al.* Assessing the Role of Porphyromonas Gingivalis in Periodontitis to Determine a Causative Relationship with Alzheimer's Disease. *J. Oral Microbiol.* **2019**, 11 (1), 1563405.

⁵⁴ Ilievski, V. *et al.* Chronic Oral Application of a Periodontal Pathogen Results in Brain Inflammation, Neurodegeneration and Amyloid Beta Production in Wild Type Mice. *PLoS ONE* **2018**, 13 (10).

Chine et l'Inde. On prédit que dans ces pays le taux de personnes atteintes par la MA pourrait être multiplié par trois d'ici 2040.⁵⁵

Hebert *et al.* estiment également qu'en 2050, près de la moitié de la population âgée de plus de 85 ans sera atteinte de MA. Le vieillissement des baby boomers (personnes nées après la seconde guerre mondiale entre 1946 et 1964) pourrait créer un réel « pic » épidémique entre 2030 et 2050. Il est donc nécessaire d'agir dès aujourd'hui afin de prévenir la maladie au maximum, ou de trouver des alternatives thérapeutiques efficaces afin d'éviter une potentielle future crise sanitaire mondiale par manque de structure et thérapeutique adaptées pour ces patients.⁵⁶

2. Le sexe

De nombreuses études mondiales ont permis de confirmer la susceptibilité des femmes à développer la MA surtout après 80 ans.⁵⁷ Cela pourrait s'expliquer par des facteurs hormonaux mais également par l'expression accrue de risques cardiovasculaires (eux même facteurs de risques dans la MA) plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Il faut cependant noter que les femmes vivant plus longtemps auront plus de risques de développer la maladie.^{58,59}

3. Les prédispositions génétiques

Bien que principalement sporadique (>90% des cas), il existe une forme héréditaire (5 à 8% des cas) de la maladie par transmission autosomique dominante.⁶⁰ Elle va toucher des personnes bien plus jeunes (45 ans contre 65 ans en moyenne dans une forme non familiale). Elle est principalement due à des mutations sur le gène APP (situé sur le chromosome 21) codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Mais cette forme familiale est également due aux mutations sur les gènes PSEN-1 (chromosome 14) et PSEN-2 (chromosome 1), gènes codant pour des protéines présénilines, qui jouent un rôle dans la régulation de l'APP.⁶¹ Les patients atteints de trisomie 21 (ou maladie de Down) sont d'ailleurs plus à risque de développer la maladie du fait de leur copie surnuméraire de ce chromosome

⁵⁵ Ferri, C. P. *et al.* Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study. *The Lancet* **2005**, 366 (9503), 2112–2117.

⁵⁶ Hebert, L. E. *et al.* Alzheimer Disease in the United States (2010–2050) Estimated Using the 2010 Census. *Neurology* **2013**, 80 (19), 1778–1783.

⁵⁷ Fratiglioni, L. *et al.* Very Old Women at Highest Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: Incidence Data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology* **1997**, 48 (1), 132–138. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.1.132>.

⁵⁸ Lerner, A. J. Women and Alzheimer's Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, 84 (6), 1830–1834.

⁵⁹ Zandi, P. P. *et al.* Hormone Replacement Therapy and Incidence of Alzheimer Disease in Older Women: The Cache County Study. *JAMA* **2002**, 288 (17), 2123–2129.

21. Certains individus n'auront cependant qu'une translocation de la partie distale du télomère du chromosome 21 et seront exempts de MA bien qu'ils expriment une trisomie partielle.^{62,63}

L'altération du gène de l'apolipoprotéine $\epsilon 4$ (APO $\epsilon 4$) notamment semble augmenter le risque de développement de la MA chez des sujets jeunes de par son implication dans la cascade amyloïde. L'APO ϵ est une protéine de transport lipidique synthétisée dans de nombreux tissus et prédispose à la MA dans 40% des cas. En effet, APO $\epsilon 4$ semble moduler l'élimination des peptides A β et promouvoir ainsi l'agrégation de ces peptides sous formes de plaques ou d'oligomères. APO $\epsilon 4$ va empêcher la réponse microgliale, les transports lipidiques, l'intégrité et plasticité des synapses, le métabolisme du glucose et la fonction cérébrovasculaire. APO $\epsilon 4$ pourrait également influencer sur l'hyperphosphorylation de Tau bien que cela reste à approfondir.^{64,65}

4. Les maladies cardiovasculaires ou métaboliques

De nombreuses études ont cherché le lien entre les démences et les maladies métaboliques telles que le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle ou encore la dyslipidémie.⁶⁶⁻⁶⁸ Certains marqueurs génétiques vont être liés à la fois à la MA mais également à des maladies cardiovasculaires, telles que APO $\epsilon 4$, bien que les mécanismes ne soient pas bien définis.⁶⁹ Il va être possible cependant d'agir contre certaines de ces maladies grâce à de simples mesures hygiéno-diététiques notamment. Un bon suivi et traitement des pathologies sous-jacentes sont alors primordiaux.

⁶⁰ Bekris, L. M. *et al.* Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, *23* (4), 213–227.

⁶¹ Ryan, N. S. *et al.* Correlating Familial Alzheimer's Disease Gene Mutations with Clinical Phenotype. *Biomark. Med.* **2010**, *4* (1), 99–112.

⁶² Lott, I. T. *et al.* Cognitive Deficits and Associated Neurological Complications in Individuals with Down's Syndrome. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (6), 623–633.

⁶³ Prasher, V. P. *et al.* Molecular Mapping of Alzheimer-Type Dementia in Down's Syndrome. *Ann. Neurol.* **1998**, *43* (3), 380–383.

⁶⁴ Yamazaki, Y. *et al.* Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Pathobiology and Targeting Strategies. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (9), 501–518.

⁶⁵ Farrer, L. A. *et al.* Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-Analysis. *JAMA* **1997**, *278* (16), 1349–1356.

⁶⁶ Rönnekaa, E. *et al.* Vascular Risk Factors and Dementia: 40-Year Follow-Up of a Population-Based Cohort. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2011**, *31* (6), 460–466.

⁶⁷ Meng, X.-F. *et al.* Midlife Vascular Risk Factors and the Risk of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *42* (4), 1295–1310.

⁶⁸ Craft, S. The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Two Roads Converged. *Arch. Neurol.* **2009**, *66* (3), 300–305.

⁶⁹ Mahley, R. W. Apolipoprotein E: From Cardiovascular Disease to Neurodegenerative Disorders. *J. Mol. Med.* **2016**, *94* (7), 739–746.

5. L'environnement.

La MA est sporadique dans 95% des cas. Cela a poussé les chercheurs à rechercher des facteurs environnementaux possibles. Depuis quelques dizaines d'années, ceux-ci sont donc de plus en plus étudiés, et aujourd'hui un lien a été fait entre la MA et :

- Un faible niveau d'éducation. Bien que le mécanisme derrière ce facteur soit incertain, plusieurs études ont montré sa corrélation avec la MA;⁷⁰
- Une mauvaise hygiène de vie, telle que la consommation d'alcool et/ou de tabac;^{71,72}
- Des altérations du microbiote pouvant contribuer à la physiopathologie de la MA ;⁷³
- La pollution, en effet, l'exposition aux particules fines, aux espèces nitrées et au monoxyde de carbone augmenterait le risque de démence;⁷⁴
- Une dépression, en effet, les personnes souffrant de cette maladie à un âge avancé seront plus à risque de développer la MA.⁷
- Les troubles du sommeil. Ils ont été liés à une augmentation de la production de peptides A β et une diminution de leur élimination.⁷⁵

6. Les traitements non médicamenteux

Ces facteurs de risques ont déjà permis l'identification de causes plus profondes de la maladie mais de nombreuses pistes restent inexploitées à l'heure actuelle. L'identification de ces facteurs de risque a également permis de mettre en évidence des stratégies d'évitement de ceux-ci ainsi que des stratégies non médicamenteuses pouvant ralentir la maladie telles que :

- La préservation des fonctions cognitives et l'autonomie en faisant travailler sa mémoire, par l'apprentissage d'une nouvelle langue ou d'un instrument de musique ,^{76,77}

⁷⁰ Evans, D. A. *et al.* Education and Other Measures of Socioeconomic Status and Risk of Incident Alzheimer Disease in a Defined Population of Older Persons. *Arch. Neurol.* **1997**, *54* (11), 1399–1405.

⁷¹ Anstey, K. J. *et al.* Alcohol Consumption as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: Meta-Analysis of Prospective Studies. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2009**, *17* (7), 542–555.

⁷² Rusanen, *et al.* A. Heavy Smoking in Midlife and Long-Term Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Arch. Intern. Med.* **2011**, *171* (4), 333–339.

⁷³ Seo, D. *et al.* The Microbiome: A Target for Alzheimer Disease? *Cell Res.* **2019**, *29* (10), 779–780.

⁷⁴ Peters, R. *et al.* Air Pollution and Dementia: A Systematic Review. *J. Alzheimers Dis.* **2019**, *70*, 145–163.

⁷⁵ Holth, J. K. *et al.* Sleep in Alzheimer's Disease—Beyond Amyloid. *Neurobiol. Sleep Circadian Rhythms* **2017**, *2*, 4–14.

⁷⁶ Stern, Y. What Is Cognitive Reserve? Theory and Research Application of the Reserve Concept. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2002**, *8* (3), 448–460.

⁷⁷ Gómez Gallego, *et al.* Music Therapy and Alzheimer's Disease: Cognitive, Psychological, and Behavioural Effects. *Neurol. Engl. Ed.* **2017**, *32* (5), 300–308.

- la pratique d'une activité physique ;^{78,79}
- Une alimentation saine de type régime méditerranéen riche en composés antioxydants ;⁸⁰
il existe d'ailleurs des compléments alimentaires aux probiotiques s'inscrivant dans la prise en charge précoce de la maladie tels que Souvenaid® développé par Nutricia (filiale de Danone).^{81,82}

IV. Les traitements médicamenteux actuels

A l'heure actuelle, il existe quatre molécules possédant une autorisation de mise sur le marché dans la maladie d'Alzheimer en Europe et en Amérique (Figure 13).

Il s'agit :

- du donépézil, un inhibiteur réversible de l'AChE ;
- de la galantamine, un inhibiteur réversible de l'AChE ;
- de la rivastigmine, un inhibiteur pseudo-irréversible de l'AChE et de la butyrylcholinestérase (BuChE) ;
- de la mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs *N*-Méthyl-*D*-Aspartate (NMDA).

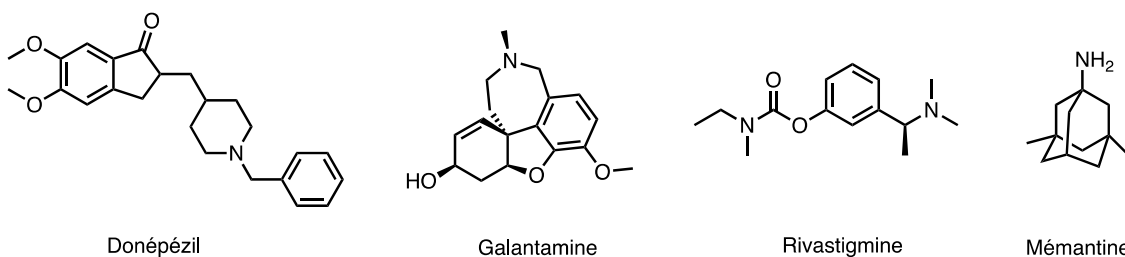


Figure 13 - Composés sur le marché en Europe et en Amérique dans le traitement de la MA

⁷⁸ Grasset, L. *et al.* Real Benefit of a Protective Factor against Dementia: Importance of Controlling for Death. Example of Sport Practice. *PLOS ONE* **2017**, *12* (4), e0174950.

⁷⁹ Santos, C. Y. *et al.* Pathophysiologic Relationship between Alzheimer's Disease, Cerebrovascular Disease, and Cardiovascular Risk: A Review and Synthesis. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* **2017**, *7*, 69–87.

⁸⁰ Shah, R. The Role of Nutrition and Diet in Alzheimer Disease: A Systematic Review. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2013**, *14* (6), 398–402.

⁸¹ Ritchie, C. W. *et al.* Souvenaid®: A New Approach to Management of Early Alzheimer's Disease. *J. Nutr. Health Aging.* **2014**, *18* (3), 291–299.

⁸² Cummings, J. *et al.* Souvenaid in the Management of Mild Cognitive Impairment: An Expert Consensus Opinion. *Alzheimers Res. Ther.* **2019**, *11* (1), 73.

Sur ces quatre molécules, trois ciblent l'AChE validant ainsi l'hypothèse cholinergique de la maladie. Concernant la mémantine, il apparaît que les patients souffrant de la MA présentent une augmentation du taux de glutamate dans le cerveau, provoquant alors une saturation des récepteurs NMDA qui mène à la mort neuronale.⁸³ La mémantine va permettre de réguler l'homéostasie du système glutamatergique en agissant en tant qu'antagoniste voltage-dépendant non compétitif.⁸⁴

Ce sont des traitements purement symptomatiques dont l'efficacité a été jugée modeste par rapport aux risques selon un rapport de la HAS publié en 2016.⁸⁵ Suite à de nombreux débats, ces molécules furent finalement remboursées en France en 2018.⁸⁶

La Chine a cependant autorisé deux autres agents que sont :

- L'huperzine A, autorisée en 1994, il s'agit d'un alcaloïde sesquiterpénique issu de plantes *Huperzia serrata* que l'on retrouve dans la pharmacopée chinoise. Cette molécule serait un inhibiteur non compétitif de l'AChE et un antagoniste des récepteurs NMDA possédant également des propriétés antioxydante et neuroprotectrice.^{87,88}
- Le GV971, un oligomannate marin autorisé en 2020. Bien que le mécanisme d'action soit encore incertain, il permettrait de reconditionner le microbiote altéré chez les patients atteints de la MA et ainsi limiter l'effet que celui-ci aurait sur la pathogenèse de la MA.^{89,90}

En l'absence de traitement efficace ou curatif, la MA reste l'une des maladies les plus étudiées aussi bien au travers des recherches sur les causes biologiques que sur les découvertes de nouveaux candidats médicaments agissant sur de nouvelles cibles.

⁸³ Cacabelos, R. *et al.* The Glutamatergic System and Neurodegeneration in Dementia: Preventive Strategies in Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **1999**, *14* (1), 3–47.

⁸⁴ Parsons, C. G. *et al.* Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic System - Too Little Activation Is Bad, Too Much Is Even Worse. *Neuropharmacology* **2007**, *53* (6), 699–723.

⁸⁵ Médicaments de la maladie d'Alzheimer : un intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale

https://www.has-sante.fr/jcms/c_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer-un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite-nationale (accessed Apr 9, 2020).

⁸⁶ Arrêté du 29 mai 2018 portant radiation de spécialités pharmaceutiques de la liste mentionnée au premier alinéa de l'article L. 162-17 du code de la sécurité sociale | Legifrance

<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/5/29/SSAS1804466A/jo/texte> (accessed Apr 9, 2020).

⁸⁷ Ma, X. *et al.* Huperzine A from Huperzia Species—An Ethnopharmacological Review. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113* (1), 15–34.

⁸⁸ Little, J. T.; Walsh, S.; Aisen, P. S. An Update on Huperzine A as a Treatment for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2008**, *17* (2), 209–215.

⁸⁹ Syed, Y. Y. Sodium Oligomannate: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (4), 441–444.

⁹⁰ Wang, X. *et al.* Sodium Oligomannate Therapeutically Remodels Gut Microbiota and Suppresses Gut Bacterial Amino Acids-Shaped Neuroinflammation to Inhibit Alzheimer's Disease Progression. *Cell Res.* **2019**, *29* (10), 787–803.

V. Les composés en essais cliniques dans la MA

De par sa complexité physiopathologique, la MA représente un véritable challenge pour la recherche. Pourtant de nombreux essais cliniques sont réalisés chaque année pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées. Cummings *et al.*, dans sa revue annuelle des essais cliniques en cours dans la MA, a présenté cette année 121 agents thérapeutiques dans 136 études résumées dans la Figure 14.⁹¹

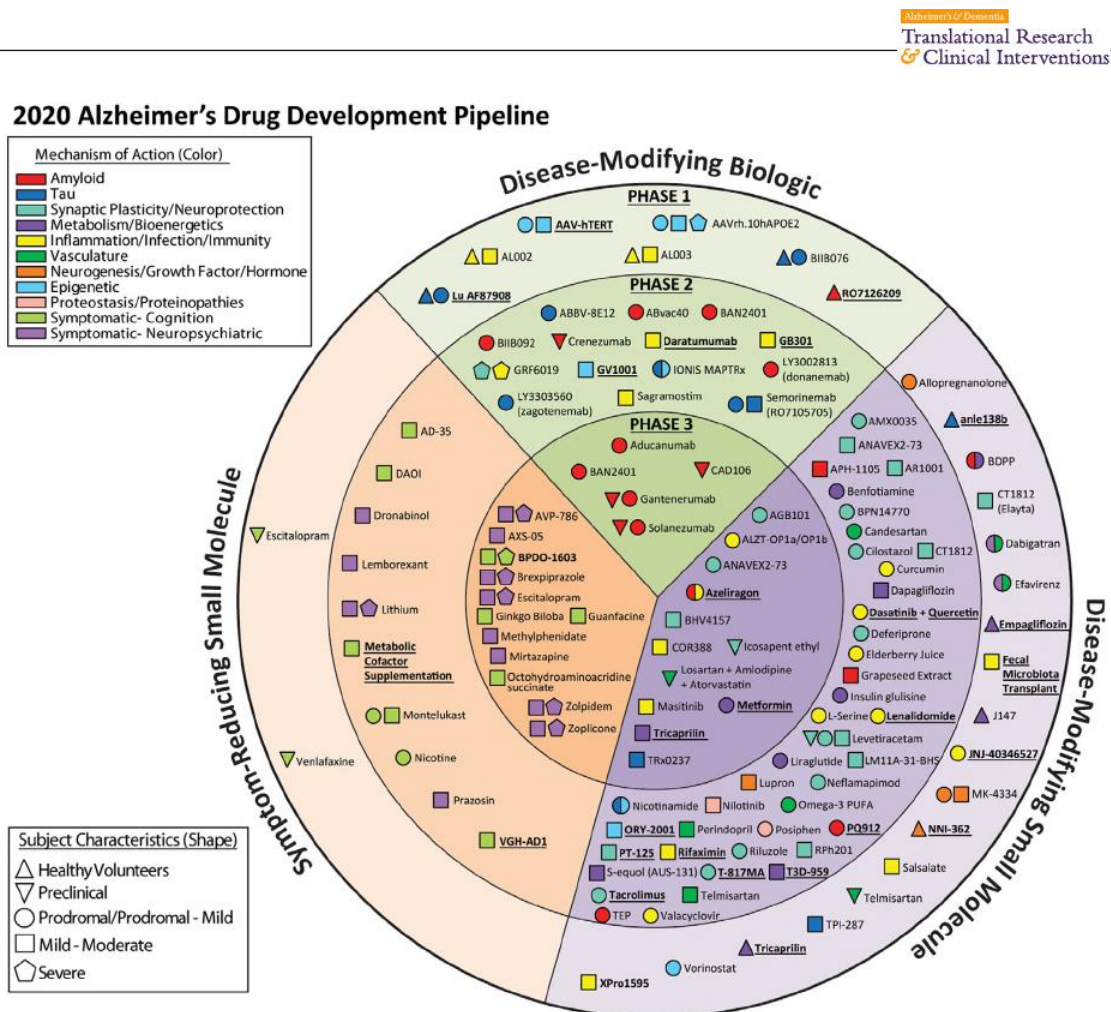


Figure 14 - Composés en essais cliniques à la date du 27 février 2020 par Cummings *et al.* Les agents soulignés sont nouveaux par rapport au pipeline de 2019.⁹¹

On va retrouver 2 grandes stratégies thérapeutiques dans ces essais cliniques :

⁹¹ Cummings, J. *et al.* Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2020. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 2020, 6 (1), e12050.

- Les molécules « disease modifying » qui vont agir sur les causes moléculaires de la maladie pour empêcher son évolution. On peut sous-diviser cette catégorie en deux entre les biomolécules et les petites molécules organiques. Cela va concerner près de 80% des agents en essais cliniques en 2020.
- Les molécules « system-reducing » qui vont chercher à traiter les symptômes de la maladie, c'est dans cette catégorie que l'on retrouvera de nombreuses molécules en repositionnement.

La majorité des molécules en essais cliniques fonctionnent selon 3 grands mécanismes d'action :

- L'élimination des agrégats de peptides A β par des immunothérapies visant directement les fragments A β grâce à des anticorps monoclonaux ou par immunisation active ou passive *via* des vaccins ;
- La limitation de formation de plaques séniles et de peptides A β , notamment au moyen d'inhibiteurs de sécrétases permettant de contrer la formation de peptides amyloïdogéniques ;
- Le blocage de l'hyperphosphorylation de Tau, de son agrégation ou de l'activation de sa dégradation.

On observe cependant depuis 5 ans une plus grande diversité de cibles dans les pipelines, avec notamment l'augmentation d'agents ciblant Tau, mais également des composés anti-inflammatoires et neuroprotecteurs.

Les travaux de cette thèse se concentrant sur la pathologie amyloïde de la MA et sur le stress oxydant, un rapide aperçu des composés ciblant les peptides A β sera présenté dans ce chapitre. Les thérapeutiques en essais cliniques sur le stress oxydant seront développées dans le Chapitre 2.

1. Agents ciblant les peptides A β

a. L'inhibition de γ -sécrétase

Lorsque l'on veut empêcher la formation de peptides A β , les premières cibles d'intérêt semblent logiquement être celles qui vont produire les peptides A β . Pour cela, les chercheurs ont tout d'abord cherché à créer des inhibiteurs de γ -sécrétase de par son implication dans la genèse de ces peptides A β (voir p11).

Le semagacestat, notamment, a été étudié dans de larges essais cliniques, mais contrairement aux essais précliniques, son utilisation a mené à une accumulation de peptides A β toxiques se traduisant en un effet délétère en clinique. Depuis, le mode d'action de cette molécule a été réévalué et d'après Tagami *et al.* il s'agirait plutôt d'un pseudo inhibiteur de γ -sécrétase, qui malgré son action inhibitrice sur la sécrétion de A β , formerait tout de même des sous-produits de γ et A β .⁹²

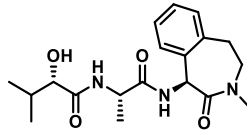


Figure 15 - Structure du semagacestat.

b. Les inhibiteurs BACE-1

Dans les cinq dernières années, les quatre différents inhibiteurs de β -sécrétase en essais cliniques ont échoué à démontrer une balance bénéfice risque favorable dans les différents essais randomisés chez des patients en stades précoces ou avancés et même chez les sujets sains à risque de développer la MA (formes familiales ou génétiques).

Par exemple, les essais sur le verubecestat ont été arrêtés par manque d'efficacité bien que les premiers résultats semblaient montrer une diminution des taux de peptides A β dans le liquide cébrospinal, il s'est avéré que cela n'a pourtant pas amélioré la cognition et la qualité de vie des patients d'un point de vue clinique.^{93,94} Certaines études ont même montré une aggravation des symptômes comparé au groupe placebo.⁹⁵ De la même manière, des résultats décevants ont aussi mené à l'abandon du lanabecestat, de l'atabecestat et de l'elenbecestat.⁹⁶

Ces échecs ont mené à la remise en cause de l'hypothèse de la cascade amyloïde notamment par Panza *et al.*⁴⁰ Cependant, les résultats encourageants des anticorps monoclonaux tels que

⁹² Tagami, S. *et al.* Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. *Cell Rep.* **2017**, 21 (1), 259–273.

⁹³ Egan, M. F. *et al.* Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378 (18), 1691–1703.

⁹⁴ Kennedy, M. E. *et al.* The BACE1 Inhibitor Verubecestat (MK-8931) Reduces CNS β -Amyloid in Animal Models and in Alzheimer's Disease Patients. *Sci. Transl. Med.* **2016**, 8 (363), 150-163.

⁹⁵ Doggrell, S. A. Lessons That Can Be Learnt from the Failure of Verubecestat in Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, 20 (17), 2095–2099.

⁹⁶ Panza, F. *et al.* Do BACE Inhibitor Failures in Alzheimer Patients Challenge the Amyloid Hypothesis of the Disease? *Expert Rev. Neurother.* **2019**, 19 (7), 599–602.

l'aducanumab contre les formes $A\beta_{1-42}$ tendent à montrer que cibler cette cause moléculaire n'est pas dénué d'intérêts comme indiqué ci-dessus.⁹⁷⁻⁹⁹

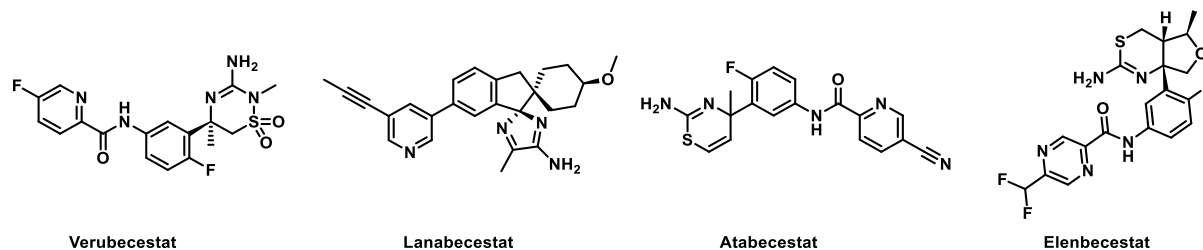


Figure 16 - Structure chimique des inhibiteurs de BACE-1 ayant échoué durant les essais cliniques.

c. Les anticorps monoclonaux, un nouvel espoir contre les peptides $A\beta$

Pas moins de trois anticorps monoclonaux sont actuellement en essais dans la MA. Parmi ceux-là on retrouve l'aducanumab. L'aducanumab est un anticorps monoclonal ciblant les peptides $A\beta_{1-42}$. Il a notamment fait parler de lui dans les médias publics cette année.⁹⁷ D'abord arrêté par faute de réponse aux différents critères énoncés en mars 2019, Biogen relança une procédure afin de réitérer des études de phase 3 en octobre 2019 auprès de la Food and Drug Administration (FDA). En effet, après une nouvelle analyse des données, celles-ci auraient montré un effet notable sur la réduction des plaques sur le groupe de patient recevant la dose la plus élevée. Si cette nouvelle étude s'avère efficace, cela pourrait être le premier succès d'une thérapie ciblant les plaques séniles et donc les peptides $A\beta$, validant alors l'hypothèse amyloïdogénique de la maladie.^{98,100}

2. Les limites des essais cliniques

Etonnamment, un certain nombre d'études cliniques visant à modifier les causes moléculaires de la maladie n'utilisent pas de biomarqueurs afin de confirmer le diagnostic, de démontrer l'engagement à la cible ou de suivre l'évolution de la MA. Par exemple, près de 47% des études de

⁹⁷ Sevigny, J. *et al.* The Antibody Aducanumab Reduces $A\beta$ Plaques in Alzheimer's Disease. *Nature* **2016**, 537 (7618), 50–56.

⁹⁸ Aducanumab : l'espoir renaît pour les patients Alzheimer. *Fondation Vaincre Alzheimer*, **2019**.

⁹⁹ Panza, F.; Lozupone, M.; Seripa, D.; Imbimbo, B. P. Amyloid- β Immunotherapy for Alzheimer Disease: Is It Now a Long Shot? *Ann. Neurol.* **2019**, 85 (3), 303–315.

¹⁰⁰ Kunkle, F. Biogen's potential new drug for Alzheimer's disease gets cautiously optimistic review following presentation <https://www.washingtonpost.com/dc-md-va/2019/12/05/biogens-potential-new-drug-alzheimers-disease-gets-cautiously-optimistic-review-following-presentation/> (accessed Apr 9, 2020).

phase 3 visant à modifier les causes de la maladie et 55% en phase 2 n'ont pas jugé nécessaire de confirmer la présence de biomarqueurs avant l'inclusion des patients dans ces études.⁹¹

De nouvelles études tendent à améliorer cela en incluant des patients en fonction de la présence de certains marqueurs biologiques, quelle que soit la maladie, comme par exemple l'essai clinique de Tsai *et al.* où la pathologie Tau a été suivie chez des patients atteints de la MA, mais également de paralysie supra nucléaire progressive ou de dégénération corticobasale.¹⁰¹

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), il n'y aurait que 170 agents en développement contre la MA, alors qu'elle en dénombre 6833 pour les tumeurs malignes et près de 433 contre le diabète. Cela reflète bien les limites actuelles des essais cliniques autour de la MA :⁹¹

- Des cibles biologiques nombreuses et peu définies, bien que chaque année de nombreux progrès soient effectués ;
- Des biomarqueurs peu utilisés par manque d'accessibilité ou de coût (voir VI : Biomarqueurs de la MA);
- Des essais cliniques souvent trop longs ; menant à un coût de développement élevé pour les promoteurs ;
- Le fort risque d'échec des différents programmes visant la MA.

VI. Biomarqueurs de la MA

Afin de suivre l'effet de ces différents agents ciblant les causes moléculaires de la MA il a été primordial de développer des marqueurs moléculaires ou biomarqueurs facilement accessibles et dosables. Un biomarqueur se définit comme un indicateur mesurable d'un état biologique ou pathologique donné.¹⁰²

Il va exister plusieurs types de biomarqueurs et de prélèvements de ceux-ci. En ce qui concerne la MA, la plupart des biomarqueurs vont être prélevés et évalués par technique immuno-enzymatique (type ELISA) ou par spectrométrie de masse (MS) dans le liquide cébrospinal (LCS). Ce LCS est en contact avec l'espace extracellulaire du cerveau et est donc potentiellement plus représentatif des

¹⁰¹ Tsai, R. M. *et al.* Reactions to Multiple Ascending Doses of the Microtubule Stabilizer TPI-287 in Patients With Alzheimer Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Corticobasal Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* **2020**, 77 (2), 215–224.

¹⁰² Budelier, M. M. *et al.* Biomarkers of Alzheimer Disease. *J. Appl. Lab. Med.* **2020**, 5 (1), 194–208.

changements biochimiques ou pathologiques qui s'y déroulent.¹⁰³ Les différents biomarqueurs vont se retrouver en plus grande concentration dans le LCS et seront alors plus facilement identifiables que dans le sang, qui est plus chargé en protéines diverses.

Cependant le LCS est prélevé par ponction lombaire, une technique invasive pouvant être douloureuse et qui n'est pas dénuée de danger et d'effets secondaires. Elle est le plus souvent utilisée en dernier recours, et ne peut alors être envisagée pour un suivi de routine de la maladie ou sur des personnes asymptomatiques.

Il existe à ce jour plusieurs biomarqueurs de la MA dosés dans le LCS des patients :

- La protéine $A\beta_{1-42}$: comme mentionné plus haut, les peptides $A\beta_{1-42}$ vont avoir tendance à former des protofibrilles plus facilement que les peptides $A\beta_{1-40}$ et donc de s'agréger en plaques séniles. Ce peptide $A\beta_{1-42}$ sera donc séquestré dans les plaques séniles et sa concentration sera moindre dans le LCS des patients atteints de la MA contrairement à la normale. On peut également mesurer le ratio entre les peptides $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ dans le LCS.¹⁰⁴
- La protéine p-tau totale ou le fragment p-tau181 : contrairement aux peptides $A\beta_{1-42}$, c'est l'augmentation de ces protéines dans le LCS qui va refléter l'état de phosphorylation de Tau et donc de la formation des enchevêtrements neurofibrillaires.^{105,106}

D'autres méthodes moins invasives peuvent également être utilisées afin de détecter la présence des différents marqueurs de la maladie comme l'imagerie à émission de positons (TEP) et la résonance magnétique (IRM).

- **L'IRM** va permettre de détecter les zones d'atrophie du cerveau, notamment au niveau de l'hippocampe qui est la zone liée à l'apprentissage et la mémoire. Les différents stades de la maladie peuvent être détectés par l'IRM mais elle ne peut suffire à poser le diagnostic. En effet, cette technique ne permet pas de mettre en évidence les causes moléculaires de la maladie que sont les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles.¹⁰⁷

¹⁰³ Hampel, H. *et al.* Development of Biomarkers to Chart All Alzheimer's Disease Stages: The Royal Road to Cutting the Therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement.* **2012**, *8* (4), 312–336.

¹⁰⁴ Janelidze, S. *et al.* CSF $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ Ratios: Better Diagnostic Markers of Alzheimer Disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2016**, *3* (3), 154–165.

¹⁰⁵ Andreasen, N. *et al.* Evaluation of CSF-Tau and CSF- $A\beta_{42}$ as Diagnostic Markers for Alzheimer Disease in Clinical Practice. *Arch. Neurol.* **2001**, *58* (3), 373–379.

¹⁰⁶ Blennow, K. *et al.* Clinical Utility of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in the Diagnosis of Early Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement.* **2015**, *11* (1), 58–69.

¹⁰⁷ Leon, M. J. D. *et al.* Imaging and CSF Studies in the Preclinical Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1097* (1), 114–145.

- **La TEP** va permettre de détecter ces différents processus biologiques. En effet cette technique repose sur l'injection d'un radio-traceur qui émettra des positons. Ces positons vont alors se dégrader en produisant des photons qui seront détectés, quantifiés et localisés. Cela permet d'obtenir la localisation et la concentration des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires.¹⁰⁸

La principale limite de ces méthodes d'imagerie va être leur coût. En effet, ces méthodes sont extrêmement coûteuses et il est alors impossible de les utiliser sur un grand nombre de personnes.^{109,110}

Les biomarqueurs sanguins, bien que peu développés à l'heure actuelle, représentent un réel intérêt en terme de coût et d'accessibilité comparé aux méthodes d'imageries ou d'analyse du LCS. Les principaux problèmes rencontrés lors des développements précoces de ces techniques étaient :

- La dégradation des protéines d'intérêt par les enzymes plasmatiques ;
- La présence des protéines d'intérêt qui pourraient provenir d'autre localisation périphérique et ne serait alors pas représentative de l'état central et donc de la MA ;
- Les anticorps périphériques pouvant interférer dans les essais immuno-enzymatiques ;
- La liaison de ces protéines d'intérêt à l'albumine ;
- La faible concentration de ces protéines qui nécessitent des tests de grande sensibilité.

Plus récemment, de nouvelles méthodes d'évaluation des marqueurs sanguins ont été développées, notamment la détection de p-tau181 par Thijssen *et al.* qui ont réussi à obtenir une bonne sensibilité à la protéine dans le plasma et faire corrélés leurs résultats avec l'imagerie TEP.^{111,112} Cette avancée pourrait révolutionner la prise en charge des patients et permettre un meilleur suivi de ceux-ci dans les essais cliniques.¹¹³

La recherche de nouveaux biomarqueurs de la MA est un domaine qui évolue rapidement. L'intérêt est porté vers une amélioration du diagnostic aussi bien chez les personnes symptomatiques que chez

¹⁰⁸ Aschenbrenner, A. J. *et al.* Influence of Tau PET, Amyloid PET, and Hippocampal Volume on Cognition in Alzheimer Disease. *Neurology* **2018**, *91* (9), 859-866.

¹⁰⁹ McMahon, P. M. *et al.* Cost-Effectiveness of Functional Imaging Tests in the Diagnosis of Alzheimer Disease. *Radiology* **2000**, *217* (1), 58-68.

¹¹⁰ Mitka, M. PET Imaging for Alzheimer Disease: Are Its Benefits Worth the Cost? *JAMA* **2013**, *309* (11), 1099-1100.

¹¹¹ Karikari, T. K. *et al.* Blood Phosphorylated Tau 181 as a Biomarker for Alzheimer's Disease: A Diagnostic Performance and Prediction Modelling Study Using Data from Four Prospective Cohorts. *Lancet Neurol.* **2020**, *19* (5), 422-433.

¹¹² Thijssen, E. H. *et al.* Diagnostic Value of Plasma Phosphorylated Tau181 in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Nat. Med.* **2020**, *26* (3), 387-397.

¹¹³ Janelidze, S. *et al.* Plasma P-Tau181 in Alzheimer's Disease: Relationship to Other Biomarkers, Differential Diagnosis, Neuropathology and Longitudinal Progression to Alzheimer's Dementia. *Nat. Med.* **2020**, *26* (3), 379-386.

les personnes asymptomatiques présentes dans les essais cliniques. Il faut tout de même rester vigilant tant qu'à leur bonne utilisation qu'à leur interprétation. Dans le cadre clinique, le diagnostic ne peut s'effectuer qu'après autopsie *post mortem*. Les marqueurs biologiques vont pouvoir aider au diagnostic et au suivi de la maladie mais ne seront pas suffisants en eux même pour déterminer la maladie ou le stade. Ces marqueurs ne sont également appropriés que dans le cadre de recherche clinique pour les personnes asymptomatiques.

VII. Conclusion

Bien que la maladie ait été découverte il y a plus de 100 ans, les alternatives thérapeutiques restent limitées à l'heure actuelle. La recherche sur les causes moléculaires continue à faire émerger de nouvelles cibles et de permettre une meilleure compréhension de celles déjà identifiées mais on ne compte toujours que quatre médicaments symptomatiques sur le marché en Europe et en Amérique. Il existe donc un réel besoin médical dans cette pathologie qui pourrait toucher plus de 100 millions de patients d'ici 2050.

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

I. Introduction :

Comme nous venons de le voir, il existe un réel besoin thérapeutique dans la MA à l'heure actuelle. L'échec des thérapeutiques ciblées envers une seule cause moléculaire a amené la notion d'approche polypharmacologique qui sera présentée dans la 3^{ème} partie de ce chapitre. Dans ce contexte, et depuis quelques années, le CERMN a su se positionner et se spécialiser dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques et diagnostiques dans le domaine des neurosciences. Ces travaux sont en particulier développés au sein de l'adressage polypharmacologie. Le laboratoire a élaboré de nouveaux composés principalement inhibiteurs d'AChE ainsi que des ligands visant le système sérotoninergique pour le traitement de maladies neurodégénératives.

Le projet de cette thèse s'inscrit alors dans la continuité des travaux du laboratoire avec la conception de nouveaux composés pléiotropes aux activités agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antioxydante. Dans ce second chapitre, les différentes cibles biologiques liées à ce projet seront ensuite présentées ainsi que leur intérêt dans la MA.

Dans un premier temps la possible implication des récepteurs 5-HT₄ dans la MA sera décrite. Les différents ligands de cette cible existant dans la littérature seront ensuite brièvement présentés avec un premier paragraphe présentant une revue de la littérature des différents brevets scientifiques relatant des ligands de ce récepteur, ainsi qu'un second paragraphe résumant la structure des principaux ligands testés cliniquement ou sur le marché.

Dans un deuxième temps, le stress oxydant ou déséquilibre radicalaire sera défini et son implication dans la MA sera présentée. Le concept de polypharmacologie et plus particulièrement de Multi-Target Directed ligand (MTDL) sera alors décrit et mis en perspective par rapport à ce projet de thèse. Enfin les objectifs et étapes clés du projet seront présentés.

II. Les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄

1. Intérêt de la cible dans la maladie d'Alzheimer

Le récepteur 5-Hydroxytryptamine 4 ou 5-HT₄ fait partie de la grande famille des récepteurs sérotoninergiques allant de 5-HT₁ à 5-HT₇. Il a été mis en évidence pour la première fois par Dumuis *et al.* en 1988.¹¹⁴ Il s'agit d'un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (RCPG) plus particulièrement G_s. Son activation provoque ainsi une cascade avec une première étape de production d'AMPc qui va ensuite aller activer l'adénylate cyclase. L'AMPc va également permettre d'activer la Protéine Kinase A qui va conduire à la fermeture des canaux potassiques au niveau des neurones concernés et provoquer leur excitabilité. Ces récepteurs sont présents dans le SNC sur les neurones cholinergiques, glutamatergiques et GABAergiques.¹¹⁵

Ces derniers sont également présents au niveau périphérique dans le tractus gastro-intestinal, urinaire, au niveau cardiovasculaire et dans le cortex surrénalien. La plupart des ligands du récepteur 5-HT₄ ont d'ailleurs été développés et mis sur le marché pour le traitement des pathologies touchant le tractus gastro-intestinal comme le montrent les composés en essais cliniques décrits dans la [Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review \(2014-present\)](#).

Au niveau du SNC, ces récepteurs vont être principalement concentrés dans le système limbique : les tubercules olfactifs, le septum, l'hippocampe ou l'amygdale ainsi que les ganglions de la base et accubens. Ils sont également présents dans la substance nigra.¹¹⁵ Ils semblent alors avoir un rôle dans les phénomènes de mémorisation et le développement cognitif. Une diminution de concentration de ces récepteurs a été observée dans la MA, ainsi que dans d'autres maladies neurodégénératives, notamment au niveau de l'hypothalamus et du cortex pré-frontal.¹¹⁶

Bien que des antagonistes sélectifs aient été développés dans le but de traiter les fibrillations atriales ou le syndrome du côlon irritable,¹¹⁷ la majorité de la recherche sur cette cible a porté sur la

¹¹⁴ Dumuis, A. *et al.* A Nonclassical 5-Hydroxytryptamine Receptor Positively Coupled with Adenylate Cyclase in the Central Nervous System. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34* (6), 880–887.

¹¹⁵ Bockaert, J. *et al.* A. 5-HT₄ Receptors: History, Molecular Pharmacology and Brain Functions. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 922–931.

¹¹⁶ Lalut, J. *et al.* Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795.

¹¹⁷ Brudeli, B *et al.* Synthesis and Pharmacological Properties of a New Hydrophilic and Orally Bioavailable 5-HT₄ Antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 629–637.

recherche d'agonistes. Dans la sphère gastro-intestinale, les agonistes vont avoir un rôle pro-kinétique en augmentant la motilité gastro-intestinale. Certains des composés de cette famille ont malheureusement été retirés du marché en raison de leur toxicité liée à un manque de sélectivité. C'est par exemple le cas du tégasérod ayant montré une forte toxicité cardiaque liée à un effet « off-target » sur les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, et 5-HT_{2B}.¹¹⁸ Le cisapride, est un autre composé de cette famille connu pour interagir avec les canaux hERG (Human Ether-à-go-go Related Gene) et induire une certaine toxicité cardiaque.¹¹⁹

2. Effets de l'activation du récepteur 5-HT₄R dans la MA

L'utilisation d'agonistes partiels de ce récepteur a été étudiée dans la MA. Ils seraient capables d'activer la voie non amyloïdogénique de prise en charge de l'APP par l'activation de l' α -sécrétase et ainsi favoriser la formation de sAPP α , un fragment neurosoluble aux propriétés neuroprotectrices (tel que vu précédemment dans la Figure 8). Le RS-67333 (Figure 17), un agoniste de référence du 5-HT₄R, a montré une diminution de la pathologie amyloïde et de neuroinflammation ainsi qu'un ralentissement du déclin cognitif chez un modèle murin de la MA, les souris 5xFAD.¹²⁰ Ces souris vont exprimer les gènes de l'APP et des PSEN-1 humains mutés.

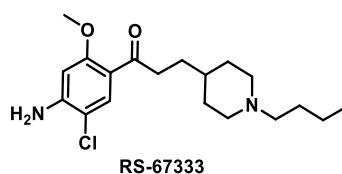


Figure 17 - Structure du RS-67333.

Plusieurs effets ont pu être mis en évidence et corrélés à l'utilisation d'agoniste tel que résumé dans la Figure 18 :

- Une augmentation de la libération de l'ACh, facilitant la transmission de l'information.¹²¹

¹¹⁸ Maeyer, J. H. D. *et al.* 5-HT₄ Receptor Agonists: Similar but Not the Same. *Neurogastroenterol. Motil.* **2008**, *20* (2), 99–112.

¹¹⁹ Kamiya, K. *et al.* Molecular Determinants of HERG Channel Block by Terfenadine and Cisapride. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108* (3), 301–307.

¹²⁰ Giannoni, P. *et al.* Early Administration of RS 67333, a Specific 5-HT₄ Receptor Agonist, Prevents Amyloidogenesis and Behavioral Deficits in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5*.

¹²¹ Consolo, S., *et al.* 5-HT₄ receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. *Neuroreport.* **1994**, *5*(10), 1230-1232.

- Une promotion de l'α-sécrétase a été observée menant à la diminution de l'action des β et γ-sécrétase sur l'APP résultant en la diminution de formation des peptides Aβ et donc des oligomères et plaques séniles.^{122,123}
- La production du fragment neurosoluble et neuroprotecteur sAPPα qui a également été retrouvé dans le LCS de souris 5xFAD après administration d'un agoniste. Bien que la cible de sAPPα ne soit pas encore résolue à l'heure actuelle, ce fragment est lié à des effets neuroprotecteurs dans différents types de lésions cérébrales telles que les attaques cerebrovasculaires ou l'ischémie cérébrale.^{124,125}
- Une réduction de l'inflammation avec une réduction de l'activation de la microglie et des astrocytes sur des modèles murins de la maladie. Cet effet pourrait être un effet indirect du fait de la diminution des plaques qui sont liées à l'inflammation ou alors un effet direct par la production d'AMPC.¹²⁶
- Des effets pro-cognitifs avec une amélioration dans l'apprentissage et la mémoire sur le modèle animal confirmé par Baranger *et al.*¹²⁷

¹²² Cho, S. *et al.* Activation of 5-HT₄ Receptors Inhibits Secretion of β-Amyloid Peptides and Increases Neuronal Survival. *Exp. Neurol.* **2007**, *203* (1), 274–278.

¹²³ Lezoualc'h, F. 5-HT₄ Receptor and Alzheimer's Disease: The Amyloid Connection. *Exp. Neurol.* **2007**, *205* (2), 325–329.

¹²⁴ Cachard-Chastel, M. *et al.* 5-HT₄ Receptor Agonists Increase SAPPα Levels in the Cortex and Hippocampus of Male C57BL/6j Mice. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150* (7), 883–892.

¹²⁵ Spilman, P. *et al.* Enhancement of SAPPα as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimer's Neurodegener. Dis.* **2015**, *1*.

¹²⁶ Park, T. *et al.* N-Docosahexaenylethanolamine Ameliorates LPS-Induced Neuroinflammation via CAMP/PKA-Dependent Signaling. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13* (1), 284.

¹²⁷ Baranger, K. *et al.* Chronic Treatments with a 5-HT₄ Receptor Agonist Decrease Amyloid Pathology in the Entorhinal Cortex and Learning and Memory Deficits in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology* **2017**, *126*, 128–141.

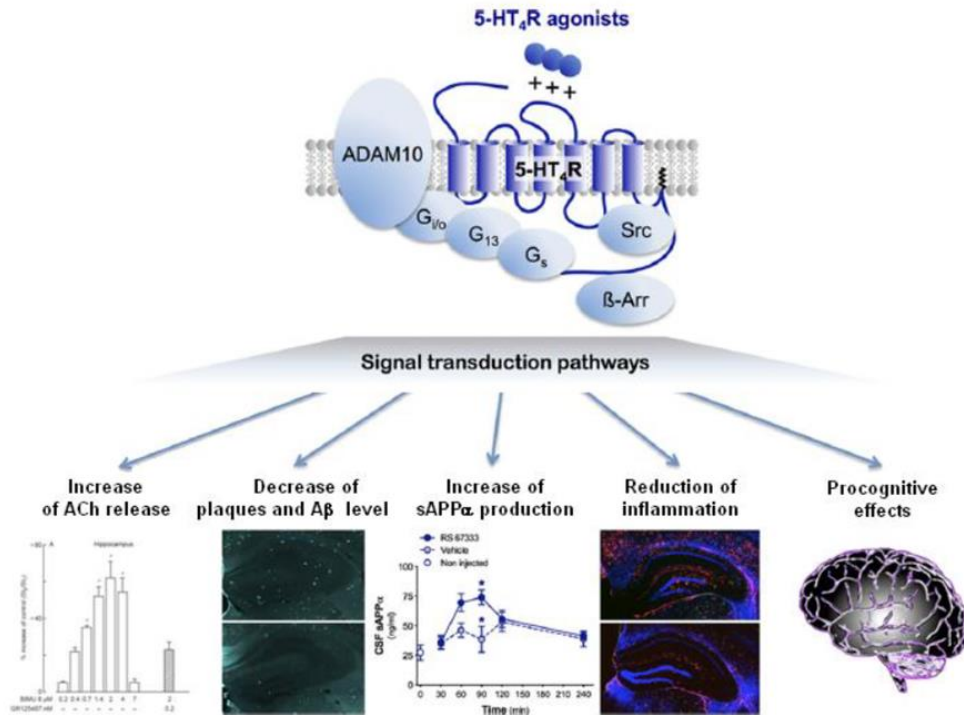


Figure 18 - Effets principaux de l'activation du 5-HT₄R dans le contexte de la MA.²¹

De par son implication dans plusieurs aspects de la maladie, cette cible ouvre alors un nouvel espoir thérapeutique pour le traitement de celle-ci. Les différents travaux récemment effectués dans la découverte de nouveaux ligands pour ce récepteur ont été résumés dans la revue de brevet suivante : Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present) écrite personnellement au cours de cette thèse et publiée par le journal Expert Opinion on Therapeutic Patents.

3. Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present)

Article highlights

- The interest of 5-HT₄R modulators have been explored in several pathologies and approved by the FDA.
- The progress in the development of 5-HT₄R modulators patented between 2014 and 2019 is reviewed.
- The exploration of multiple chemical scaffolds has led to the discovery of several potent and selective 5-HT₄R modulators.
- Several 5-HT₄R modulators are currently being evaluated in clinical trials.
- The potential therapeutic interest of 5-HT₄R modulators in combination with other drugs could lead to synergistic combined therapies.

Abstract

Introduction: Numerous chemotypes have been described over time in order to generate potent and selective 5-HT₄R ligands. Both agonists and antagonists have demonstrated their interest in several disease models. This culminates with the FDA approval of Tegaserod and Prucalopride in the recent years.

Areas covered: This review summarizes the patent applications from 2014 to present, dedicated to the use or the description of novel 5-HT₄R modulators. Several novel ligands and scaffolds have been industrially protected mainly in the field of central nervous system (CNS), pathologies as well as gastrointestinal disorders, including the combination with other drugs or for veterinary uses.

Expert opinion: The therapeutic potential of 5-HT₄R modulators has been explored for several years in animal models, but also linked to potential safety issues with initial ligands. The current use of Prucalopride in human demonstrates that its toxicity is not linked to the target and that 5-HT₄R modulators are safe in human. Therefore, an important number of studies and patents has continued in the recent years to expand the use of 5-HT₄R modulators, not only to treat gastrointestinal disorders, but also for CNS pathologies. This article details current efforts in this development.

Keywords: serotonin, 5-HT₄ receptor, central nervous system, Alzheimer, depression, gastrointestinal disorders

Introduction

The neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) plays an important role in several physiological processes in the periphery but also in the Central Nervous System (CNS) by interacting with seventeen different 5-HT receptors (5-HT₁₋₇R subtypes). Further, the modulation of 5-HT activity has been connected to different human pathologies, including migraine, depression or schizophrenia and several drugs, today in use, have been developed to interact with 5-HTs or with the serotonin transporter (SERT). The Serotonin subtype 4 receptor (5-HT₄R) was discovered in 1988 [1]. It is a Gs protein-coupled receptor (GPCR), producing Cyclic Adenosine MonoPhosphate (cAMP) by stimulation of guanylyl cyclase [2]. 5-HT₄Rs are localized in the CNS throughout the brain but also in the periphery, mainly in the heart, intestine, bladder and adrenal cortex. Based on this localization, intense research in the last decades have been conducted in order to develop 5-HT₄Rs ligands to treat memory disorders or gastrointestinal disorders.

If selective 5-HT₄R antagonists have been proposed to treat atrial fibrillation or irritable bowel syndrome (IBS) [3], most of the efforts were put to develop agonists. Agonists display potent prokinetic properties, enhance intestinal peristalsis and gastric emptying and decrease esophageal reflux, but were often linked to non-target mediated toxicity [4]. Among them, Cisapride **1** was known to interact with hERG channels (Table 1) [5]. This derivative is representative of the aminobenzamide scaffold which has been explored in a number of other compounds presented in the manuscript. Tegaserod **2** was firstly approved by the FDA in 2002 to treat the constipation associated to IBS in women [6]. Tegaserod was however withdrawn in 2007 due to cardiac adverse effects linked to prolonged QT interval. Conversely, a large cohort study "*found no evidence for an increased risk of cardiovascular ischemic events in Tegaserod users*" [7]. Tegaserod was then reintroduced in March 2019 after a complete safety review by the FDA [8]. Prucalopride **3**, a highly selective 5-HT₄R agonist, approved by the FDA in 2018 to treat chronic idiopathic constipation by enhancing colon peristalsis and increasing bowel motility, appears also to be devoid of cardiac risk [9]. This is also the case for Minesapride **4** (Fig 1) that was also proved to be devoid of any QT prolongation [10].

In the CNS, the 5-HT₄Rs are located in caudate nucleus, putamen, nucleus accumbens, globus pallidus, as well as substantia nigra [11]. Interestingly, the expression of the receptors is reduced in patients suffering from Alzheimer's disease (AD), while it seems not affected in other neurodegenerative diseases like Parkinson's disease (PD) [12]. This decrease has suggested the implication of 5-HT₄R in cognitive learning and memory processes. The procognitive effects, linked to acute administration of 5-HT₄R agonists, have been attested for a long time. The latter are thought to be mediated by modulation of neurotransmitters's release as 5-HT₄R activation increases the release of acetylcholine (ACh) [13,14], dopamine (D) [15,16] and 5-HT [17]. Moreover, 5-HT₄R agonists, such

as BIMU-1 **5** and RS 67333 **6** (Fig 1), are able to promote the "non-amyloidogenic" cleavage of the amyloid protein precursor (APP) by an α -secretase, inducing the decrease in A β production in primary neurons [18,19], the release of soluble and neuroprotective sAPP α protein [20], and the *in vivo* improvement of memory in rat [21]. Two 5-HT₄R agonists, SL 65.0155 **7** [22] and PRX 03140 (also named VRX 03011) **8** [23], have already reached the clinical phase IIb for the treatment of AD (Fig 1.) and several candidates are today under investigation in the field of neurodegenerative diseases.

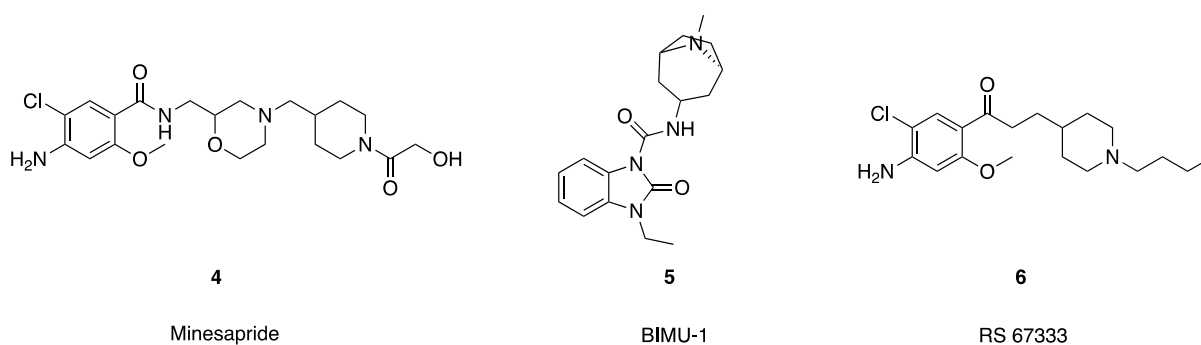


Figure 1 – structure of 5-HT₄R agonists

Interestingly the 5-HT₄R-mediated intracellular signaling, including cAMP release and phosphorylation of CREB, has proved to yield antidepressant-like effects [24]. The use of 5-HT₄R PET radiotracers has recently demonstrated a lower striatal 5-HT₄R binding in familial major depressive disorders [25]. Therefore, the interest of 5-HT₄R agonist have been investigated to treat depressive disorders [26]. Despite first negative results regarding pruclopride anti-depressant effects [27] several 5-HT₄R ligands are still investigated in clinical trials including prucalopride **3**, Revexepride **10** and PF- 04995274 **17** [26].

Over the last years, a wide variety of 5-HT₄R ligands have been evaluated in clinical trials as summarized in the following table (Table 1).

As depicted by the different structures presented above, 5-HT₄R ligands share common structural features which could be illustrated by the pharmacophore presented below on Cisapride **1** (Fig 2). Indeed, all the structures are possessing an aromatic or heteroaromatic ring core, linked by a hydrogen bond acceptor group as linker to a basic center. This basic center, generally featuring a cyclic amine, is finally substituted by a hydrophobic scaffold of large diversity.

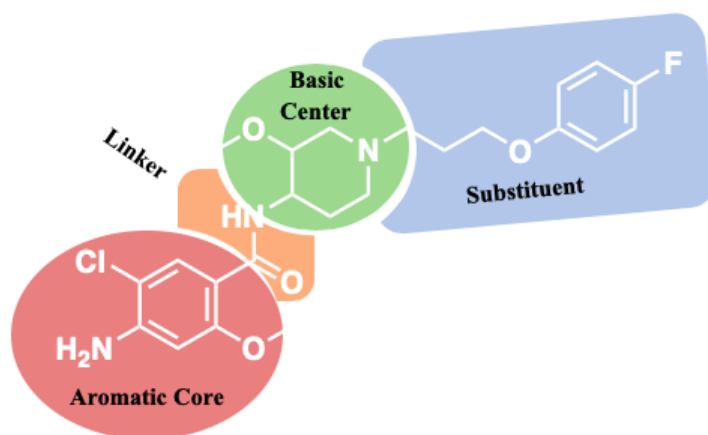


Figure 2: General structure of the 5-HT₄R ligands that entered clinical trials

In this review, we will discuss about the new patents published between 2014 and 2019 on 5-HT₄R ligands, based on new indications, new structures or novel associations of compounds.

2 Patents on new 5-HT₄R ligands (2014-2019)

2.1 New indications (or therapeutical areas)

2.1.1 Repurposing

Due to the wide variety of localizations of 5-HT₄R in the body, it is not surprising to find repurposing of well-known 5-HT₄R agonists from gastrointestinal to neurological areas. Ishii Toshiaki *et al.*, from Obihiro Chikusan University, Japan, reported in 2018 on JP2018168072 [28] the use of known 5-HT₄R agonists (Prucalopride **3**, Naronapride **9** and Velusetrag **14**) as therapeutic agents for cognitive dysfunction accompanying PD. The inventors completed the present invention by elucidating the onset mechanism of cognitive impairment associated with PD and newly discovering that 5-HT₄R agonists can be useful therapeutics for cognitive impairments associated to PD. They used PD model mice and showed that the intraperitoneal administration (IP) of Prucalopride reduced the freezing behavior, but could also improve hippocampal cAMP reduction.

Revexepride **10** (currently in clinical trial phase 2b against GERD [29,30]) and its dihydrofuran derivative were patented in 2014 [31] as neuroprotective compounds in combination with an Acetylcholinesterase (AChE) inhibitor or any other procognitive compounds, such as 5-HT₆R antagonists. Those partial agonists appear to show higher procognitive effects on an animal model in working, fear and spatial motivated memory tests than the reference Prucalopride **3** and a lower effect

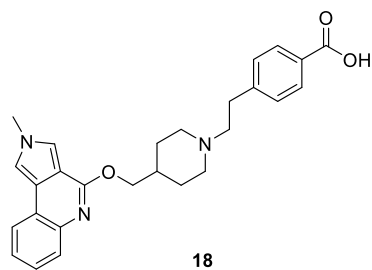
on the peripheral 5-HT₄R. This makes them particularly interesting for the treatment of neurodegenerative diseases.

To repurpose finding of 5-HT₄R agonists, Pfizer Japan patented in 2015 a trifluoroethoxy benzisoxazole derivative (RQ-10) **16** and all its salts in gastroparesis and as prokinetic agents [32–34]. This compound was previously described in 2011 with other benzisoxazole 5-HT₄R agonists that include their lead compound PF-04995274 **17** [35]. The latter was tested in clinical trial against cognitive impairment in AD [36]. During its development, it has been shown that this new trifluoroethoxy compound only showed moderate CNS permeation, but could be interesting in the peripheral system.

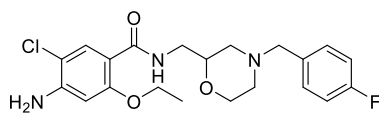
2.1.2 New indications

Even if the two main indications of 5-HT₄R ligands are the gastrointestinal diseases or cognitive impairments due to neurodegenerative diseases, some new indications seem to be investigated in the literature, as shown by the previously described clinical trial of Prucalopride **3** as an antidepressant or Tegaserod **2** for cardiac failure. On the other hand, Alisi *et al.* patented their new pyrroloquinolines as useful 5-HT₄R ligands to treat neuropathic pain (US8686147). They already patented indazole derivatives for that indication in 2006 (US7638534) [37,38]. In order to demonstrate the activity of their compounds in the treatment of chronic pain, they tested some of them (compound **18**; Figure) on the inducement of allodynia induced by ligation of the sciatic nerve in rats. It appears that the rats which received the compound could handle twice more pressure in their paw of the left hind leg than the group who receive only the vehicle, showing that those rats could handle more pain.

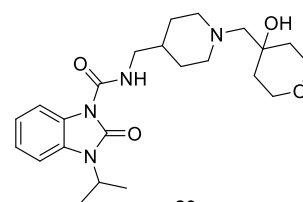
Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes



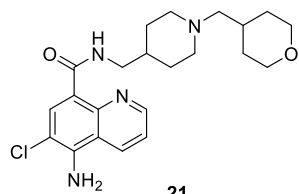
IC_{50} = 2.24 nM
US8686147



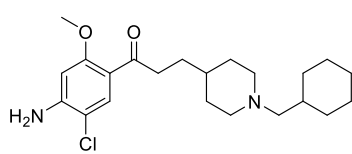
Mosapride
JP2017014113



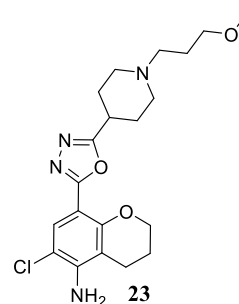
US8980922



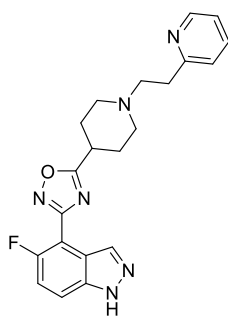
EC_{50} = 0.09 nM
 E_{Max} = 70%
WO2014147636A



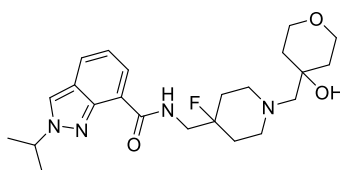
Donecopride
WO2014195593



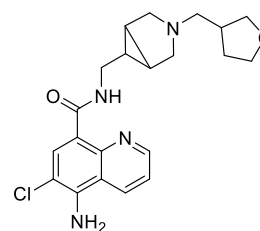
EC_{50} = 1.3 nM
WO2016128990



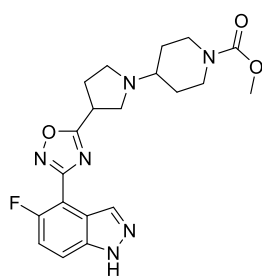
EC_{50} = 5.8 nM
WO2014092104



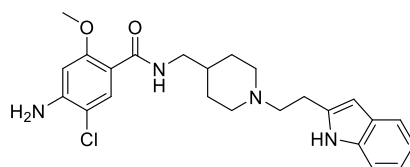
EC_{50} < 1 nM
WO2016128990



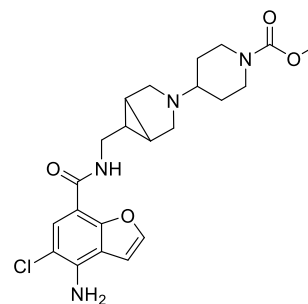
EC_{50} = 0.57 nM
WO2014147636



WO2014092104



IC_{50} = 0.002 nM
US9221790B2



WO2016128990

Figure 3- Structures of the main compounds in recent patents

2.1.3 Potential Ameliorated pharmacokinetics

Dhanoa *et al.* patented deuterated derivatives of PRX 03140 **8** in US20150080377 [39]. According to the patent, suitable modifications of certain carbon-hydrogen bonds into carbon-deuterium bonds can generate novel substituted pyridinone carboxamides with unexpected and non-obvious improvements of pharmacological, pharmacokinetic and toxicological properties in comparison to the non-isotopically enriched 5-HT₄R agonists, full agonists, inverse agonists or antagonists. The authors patented the introduction of deuterium in the compound at each available position (where there is usually a Hydrogen), and that this transformation could have a huge impact on the parameters previously cited. However, they did not perform any pharmacokinetic studies to confirm this hypothesis. [23,39–41].

2.1.4 New species

Mosapride is a 5-HT₄R agonist that acts as a prokinetic agent and is used for the treatment of gastritis, GERD, functional dyspepsia and IBS. In the veterinary field, Mosapride citrate has already been marketed as a drug for improving upper gastrointestinal motility in dogs, and an application for an approval has been filed for the improvement and reduction of gastrointestinal motility in equine constipation. In 2017, Mikami *et al.* patented the use of Mosapride for bovine digestive disease in JP2017014113 [42]. This study opens the possibility of using 5-HT₄R agonists for bovine species.

2.2 Design of new 5-HT₄R ligands

As seen in the introduction, almost all 5-HT₄R ligands follow the same general structure with first an aromatic core, connected with a linker to a basic center, then a substituent (Fig 2). The description of the new patented scaffold will be presented according to the different possibilities.

2.2.1 New scaffolds – Aromatic core

One of the main aromatic cores is the chloro-aniline one that is already well known to confer a 5-HT₄R agonist activity to compounds such as Cisapride **1** and Mosapride **19**. Therefore, it was not surprising to find patents from different companies and nationalities that explored this aromatic ring [42–45].

The development of new innovative aromatic cores led to the discovery of several bicyclic compounds possessing a benzyl ring linked to a 5 membered heterocycle (analog of the indole ring of 5-HT). Raqualia, on the model of BIMU-1 **5** [46] and PF-04995274 **17** [47], developed a new benzimidazolone compound in US8980922 [48]. Even if they described a wide variety of 5-HT₄R agonist moieties, they only claimed the compound **20** as promising compound with combining activities as ACh inducement, β -amyloid (A β production's decrease and selective 5-HT₄R agonism (over others 5-HT receptors) in mammalian subjects). They showed that direct injection of their compound into rat hip could increase ACh concentration up to 187%. The A β reduction was shown in Tg2576 mice according to the method described by Kawarabayashi *et al.* [49] and compound **20** decreased from 25% to 36% the A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ levels.

Dainippon Sumimoto Pharm patented in 2014 in WO2014092104 a lot of hetero aromatic bicyclic cores, including known indazoles and benzisoxazoles (already explored by Pfizer for example in PF-04995274) [47], but also some new innovative fragments like benzothiazoles [50].

Suven Life Science was also really active. The company patented a large variety of different indazoles compounds as seen on Table 2. They also investigated the benzofuran (from Prucalopride **3** or Revexepride **10**) as a bicyclic core. They succeeded to give to those well-known scaffolds a renew by modifying the rest of the molecule, leading to innovative compounds [40,51–53]. They were the only ones to patent, from 2014 to 2019, bicyclic 6-membered rings in US9079894 [52] and WO2016128990 [54] as chromane and dihydrobenzodioxine (also found in SL65.0155 – Sanofi 2002) [22]. They also described a new 5-aminoquinoline moiety with interesting series of compounds with more than 40 compounds out of 50 possessing nanomolar EC₅₀ on 5-HT₄R. Several compounds like **21** (Fig 3) were successfully tested in *in vivo* rodent models (rat mostly) for neurodegenerative disease (A β reduction, ACh release, brain permeation study, cortical sAPP α levels...) even if they were also patented for gastrointestinal diseases.

Concerning the tricyclic core, only Alisi *et al.* in US8686147 described their new pyrrolo quinoline compounds, such as **18** (Fig 3), as useful 5-HT₄R ligands [37]. To date, only Tegaserod possesses a tricyclic “aromatic core”. It is thus an under-represented scaffold that could be further investigated.

2.2.2 New linkers

To obtain a good affinity towards 5-HT₄R, the aromatic core is important but the linker could also play an important role by rigidifying the whole structure and thus allows a stronger interaction and a better affinity toward the receptor.

In literature, most of the time, the linker in 5-HT₄R agonists is an amide group. But some new linkers appeared in the last years as shown in the Table 3. Inspired by RS 67333 **6**, Dallemagne *et al.* were the only ones to patent a ketone linker between 2014 and 2019. Proving that the amide link is not necessary to get good activity toward 5-HT₄R, this work led to the discovery of Donecopride **23**, a dual 5-HT₄R agonist/AChE inhibitor that is in preclinical study against AD [44,55].

Among the linear linkers, we can also notice the ether group patented by Pfizer or Raqualia for PF-04995274 **17** or RQ-10 **16** (Fig 3) in WO2015174098 and WO2015178020, respectively. But Also by Alisi *et al.* in US8686147 [32,34,37].

The oxadiazolinone linker present in Capeserod **7** was a precursor cyclic linker. Since, research teams have focused their attention on finding new cyclic linkers. As such examples, Suven Life Science and Dainippon Sumimoto Pharma have described new oxadiazole links that keep the affinity toward 5-HT₄R [50–53].

One of the compound of Suven Life Science that possesses an 1,3,4-oxadiazole, SUVN-D4010 **13** is currently in clinical trial for cognitive impairment. The same company dedicated a whole patent in 2015 to those oxadiazole derivatives, as for example compound **23** (Fig 3) that has an EC₅₀ of 1.3 nM toward 5-HT₄R and good response in *in vivo* experiment in rat, such as novel object recognition task model or radial arm maze [52].

Dainippon Sumimoto Pharm developed a new series of 1,2,4-oxadiazole on his part, with compound **24** (Fig 3) as a promising agonist toward 5-HT₄R with an EC₅₀ of 5.8 nM and an activation rate of 77%. The company patented it to treat all diseases linked to 5-HT₄R, but no *in vivo* assay was described that could indicate if they planned to use this compound predominantly in neurological or gastroenterological area. [50]

2.2.3 Modulation of the basic center

The basic center of these scaffolds is an important part of the molecules. Its size, basicity and bulkiness were evaluated as well as the presence in the ring of an extra oxygen atom or its substitution by various atoms or groups. Piperidine is the basic core that is present in the large majority of the 5-HT₄R ligands described in the literature and especially in the 5-HT₄R drugs currently on the market or in clinical trial, as seen on Table 4. The distance between this basic center from the aromatic ring could play a role in the profile toward the receptor as some studies showed it [4].

Chemists have thus tried to find a potent bioisostere moiety of piperidine to diversify their structures. Cisapride **1** possesses a methoxypiperidine and Mosapride **19** has a morpholine ring. Suven Life Science, in this respect, especially described a lot of compounds with different 6-membered amino rings including piperidinol, halogeno piperidine **25** or azabicyclohexane **26** (Fig 3) [51–54].

Dainippon Sumimoto Pharm patented a lot of different basic centers of different size, from 5-membered ring such as pyrrolidine **27** (Fig 3) to 7-membered ring such as oxazepane [50]. The pyrrolidine scaffold is not often described in the literature but can be found in old patents from Yamaguchi Pharm or Kyoshin Pharm [56,57].

2.2.4 Substituents

Due to the wide variety of substituents found in the literature and in the patents, we only focused our attention on the more important ones. The substituent can be an alkyl chain from 1 to 12 carbon linked at the end to an aromatic or a non-aromatic cycle, like a cyclohexane found in compound **22** (Fig 3). In this example, the use of cyclohexane was also designed in order to target AChE as well as maintaining a good affinity toward 5-HT₄R [55].

One of the relatively new substituents that appeared in the literature after 2010, is the oxanol moiety that can be found in PF04995274 **17** or RQ-10 **16** (Pfizer and Raqualia) or in compound **20**, **25** [48,54].

Futhermore, at the image of Minesapride **4** developed by Dainippon Sumimoto Pharm, some patents described basic cores linked to an other basic one which is itself substituted by an oxane or a benzyle moiety, as seen in compound **27** [50] from the same company and compound **29** from Suven Life Science [54].

The aromatic benzyl or analogue derivatives are also found in most of the patents as they can carry a large amount of different substituents, like halogen for example in Mosapride **19**, but also nitro

group, carboxylic acid like in compound **18** or ester in compound **27** [37,42,50]. Among the aromatic group found in that position, we can also notice the presence of, pyridine in compound **24**, triazole, tetrazole, imidazole or pyrrole rings [50,58]. As shown in patent US9221790 [43], the indole derivative **28**, for example, has an IC_{50} toward the receptor of 0.002 nM and, since the reported derivatives are supposed to be used for gastroenterology purpose, they were evaluated for gastric emptying, following the method developed by Iwanaga *et al.* [59]. Compound **28** appears to improve gastric emptying of more than 10% compared to the control.

2.2.5 New structural 5HT₄R ligands

While most of the ligand for 5-HT₄R in the literature follow the same pharmacophore as described in Fig 2, Yuhan Corporation however succeeded in developing innovative pyrimidine derivatives, with a first patent in 2014 (WO2014189331) [60] where was described a series of novel bicyclic compounds containing a pyrimidine ring. Thirty compounds were described with EC_{50} below 0.1 nM, showing excellent properties as agonists toward 5-HT₄R with, for example, compound **30** (EC_{50} = 0.95 pM) (Fig 4). The latter was patented for a gastroenterological purpose but without any *in vitro* or *in vivo* study that could support this indication. In 2019, the company also patented a new process to prepare a diaminopyrimidine derivative that was previously described in patent WO2012115480A2 with an EC_{50} of 4.7 pM on 5-HT₄R [61-62].

In 2017, YH12852 was described as a novel 5-HT₄R agonist with high *in vitro* potency (EC_{50} = 4.8 pM) and selectivity (>200-19,000- fold) over other 5-HT₄Rs, other receptors, ion channels, enzymes and transporters [63]. The structure of this new potent agonist, was however not disclosed, we herein suppose that YH12852 is the compound **31** (Fig 4) that is described for optimized synthesis in the patent previously cited [62]. This compound is also patented for gastrointestinal problems, specially for the prevention or treatment of gastrointestinal dysmotility, and other diseases of the digestive system, such as GERD, constipation, IBS, indigestion, post-operative ileus, delayed gastric emptying, gastroparesis, intestinal pseudo-obstruction, drug-induced delayed transit, diabetic gastroparesis...

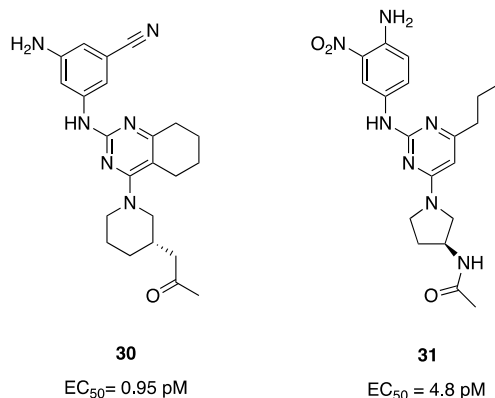


Figure 4- Compounds developed by Yuhan Pharm.

3. Conclusion

Over the last years, an intense research activity was ongoing in the development of 5-HT₄R ligands with more than 100 patents registered in the field since 2014. As described above, most of the patents deal with generic structure extension in order to protect the use of 5-HT₄R modulators to treat CNS disorders, mainly neurodegenerative diseases, but also gastrointestinal pathologies. In this context, Suven Life Science, Pfizer and Dainippon Sumimoto Pharm were particularly active to extend the protection of known structures after modulation of the aromatic core, the linker between the basic amine and its substituents. The nature of the aromatic moiety is crucial in order to maintain a good affinity but also the optimal partial agonist profile needed for the therapeutic application of these ligands [64]. A limited number of aromatic cores (monocyclic or bicyclic) were explored, including aminochlorobenzamide, indole and indazole, benzimidazolone, benzofurane or quinolone or benzisoxazole. The discovery of novel aromatic scaffolds remains a challenge in order to generate novel chemical diversity with optimal biological properties and drugability. New opportunities in terms of patentability will rely on the discovery of such innovative compromises, such as YH12852 [63].

The modulation of the other parts of the structure was also particularly explored in the recent years. The nature of the linker (amide, ketone or heteroaromatic cycle), the amine (mostly cyclic amine) and the substituents, appear particularly important in order to optimize physicochemical properties of the ligand and then their PK/PD properties. Indeed, most of the derivatives developed for gastrointestinal purpose are based on the presence of an amide linker present in the structure of Tegaserod or Cisapride (Table 1). The replacement of the amide by a ketone or an oxadiazole ring appears as an interesting strategy in order to optimize the central distribution of 5-HT₄R ligand for treatment of CNS pathologies [65,66]. It is also worth to note that novelty in terms of structures could rely in the introduction of deuterium atom in place of hydrogen on known ligands and could finally lead to an improvement in metabolic stability [39]. This active research activity would certainly lead in

the next years to an increase in the number of clinical trials investigating the effect of 5-HT₄R modulators.

4. Expert opinion

The approval of 5-HT₄R ligands, Tegaserod and Prucalopride, by the FDA is of particular importance to treat chronic idiopathic constipation in patients. It offers also great opportunity to confirm their use as safe therapeutic strategies, devoid of the suspected cardiac toxicity wrongly associated to 5-HT₄R ligand in the past [9] This situation is at the origin of an active research field attested by a large number of patents in the recent years. If 5-HT₄R agonists have been approved to treat gastrointestinal disorders, we have to mention an important number of ongoing clinical trials in the field of CNS disorders. The development of novel derivatives particularly in the field of neurodegenerative diseases, and more particularly AD, will be one of the most interesting challenges in the next years. In the difficult context of AD clinical trials, clear evidence of target engagement will be necessary. This could be possible through the identification of relevant biomarkers, such as sAPP β [67], or the development of innovative imaging agents [68].

Novel opportunities will also be offered in the exploration and identification of novel chemical scaffolds of orthosteric ligands, as well as allosteric modulators which have not been explored for the moment. The effect of those novel tools on signal transduction should be clearly defined. First, the role of the six different splice variants present in human is not yet fully understood [69]. Second, if the activation of 5-HT₄R leads ultimately to an increase of cAMP and protein kinase A (PKA) levels, it could also be followed by G-protein independent activation pathways [70]. The complete characterization of the known ligands is still needed. Finally, an increasing body of evidences confirms that 5-HT₄R activation stimulates the liberation of neuronal plasticity related proteins including AKT, CREB and BDNF and could therefore has a positive impact on neurogenesis [71].

According to this discovery, new opportunities will be offered in the application of 5-HT₄R agonists to treat novel deficiencies, including memory disorders, as well as cognition deficits [72]. Such compounds might also have a positive impact on neurogenesis in hippocampus and finally could be considered to treat depression [24]. In this case again, the development of a 5-HT₄R agonist, with optimal brain distribution, will be a major advance in the future. This possible effect on neuroregeneration offers also novel opportunities to use 5-HT₄R agonists in combination with other drugs in order to obtain a synergy of action. Such drugs could include those which could have an impact on

neurotransmitter concentration such as AChE inhibitors [73]. One challenge will remain however in the evaluation of such a combination earlier in the development, in preclinical but also in clinical trials and will surely focus the attention in the next 5 to 10 years. Finally, some opportunities will rely on the discovery of single molecules able to act simultaneously on different targets and better known as MTDL. The first examples of these pleiotropic compounds have already been identified and patented with the conjugation of 5-HT₄R activation and AChE inhibition in a unique structure [55]. Several other examples have been also disclosed with antagonist properties for 5-HT₆R [74], antioxidant properties [75] but also multiple targets [76].

References

- (1) Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, *et al.* A Nonclassical 5-Hydroxytryptamine Receptor Positively Coupled with Adenylate Cyclase in the Central Nervous System. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34* (6), 880–7.
- (2) Bockaert J, Claeysen S, Compan V, *et al.* 5-HT₄ Receptors: History, Molecular Pharmacology and Brain Functions. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 922–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.013>.
- (3) Brudeli B, Moltzau LR, Nguyen CHT, *et al.* Synthesis and Pharmacological Properties of a New Hydrophilic and Orally Bioavailable 5-HT₄ Antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 629–37. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.060>.
- (4) Bureau R, Boulouard M, Dauphin F, *et al.* Review of 5-HT₄R Ligands: State of Art and Clinical Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (5), 527–53. <https://doi.org/10.2174/156802610791111551>.
- (5) Kamiya K, Niwa R, Morishima M, *et al.* Molecular Determinants of HERG Channel Block by Terfenadine and Cisapride. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108* (3), 301–7. <https://doi.org/10.1254/jphs.08102fp>.
- (6) Cole P, Rabasseda X, Tegaserod: A Serotonin 5-HT₄ Receptor Agonist for Treatment of Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Drugs Today* **2004**, *40* (12), 1013. <https://doi.org/10.1358/dot.2004.40.12.872576>.
- (7) Loughlin J, Quinn S, Rivero E, *et al.* Tegaserod and the Risk of Cardiovascular Ischemic Events: An Observational Cohort Study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2010**, *15* (2), 151–7. <https://doi.org/10.1177/1074248409360357>.
- (8) In Brief: Tegaserod (Zelnorm) Returns. *Med. Lett. Drugs Ther.* **2019**, *61* (1571), 72.
- (9) Conlon K, Maeyer JHD, Bruce C, *et al.* Nonclinical Cardiovascular Studies of Prucalopride, a Highly Selective 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *364* (2), 156–69. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244079>.
- (10) Hamatani T, Noda N, Takagaki T, *et al.* Thorough QT/QTc Study Shows That a Novel 5-HT₄ Receptor Partial Agonist Minesapride Has No Effect on QT Prolongation. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/cpdd.778>.

- (11) Eglen RM, Wong EHF, Dumuis A, *et al.* Central 5-HT₄ Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16* (11), 391–8. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89081-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89081-1).
- (12) Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, *et al.* 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ Receptors in Post Mortem Human Brain Tissue: Distribution, Pharmacology and Effects of Neurodegenerative Diseases. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114* (5), 993–8. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13303.x>.
- (13) Consolo S, Arnaboldi S, Giorgi S, *et al.* 5-HT₄ Receptor Stimulation Facilitates Acetylcholine Release in Rat Frontal Cortex. *Neuroreport* **1994**, *5* (10), 1230–2. <https://doi.org/10.1097/00001756-199406020-00018>.
- (14) Kilbinger H, Wolf D, Effects of 5-HT₄ Receptor Stimulation on Basal and Electrically Evoked Release of Acetylcholine from Guinea-Pig Myenteric Plexus. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1992**, *345* (3), 270–5. <https://doi.org/10.1007/BF00168686>.
- (15) Lucas G, Matteo VD, Deurwaerdère PD, *et al.* Neurochemical and Electrophysiological Evidence That 5-HT₄ Receptors Exert a State-Dependent Facilitatory Control in Vivo on Nigrostriatal, but Not Mesoaccumbal, Dopaminergic Function. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *13* (5), 889–98. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01453.x>.
- (16) Steward LJ, Ge J, Stowe RL, *et al.* Ability of 5-HT₄ Receptor Ligands to Modulate Rat Striatal Dopamine Release *in vitro* and in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117* (1), 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15154.x>.
- (17) Ge J, Barnes NM, 5-HT₄ Receptor-Mediated Modulation of 5-HT Release in the Rat Hippocampus in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117* (7), 1475–80. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15309.x>.
- (18) Lezoualc’h F, 5-HT₄ Receptor and Alzheimer’s Disease: The Amyloid Connection. *Exp. Neurol.* **2007**, *205* (2), 325–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.02.001>.
- * First study describing modulation of APP processing by 5-HT₄R agonists**
- (19) Russo O, Cachard-Chastel M, Rivière C, *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New 5-HT₄ Receptor Agonists: Application as Amyloid Cascade Modulators and Potential Therapeutic Utility in Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (8), 2214–25. <https://doi.org/10.1021/jm801327q>.
- (20) Cho S, Hu Y, Activation of 5-HT₄ Receptors Inhibits Secretion of β -Amyloid Peptides and Increases Neuronal Survival. *Exp. Neurol.* **2007**, *203* (1), 274–78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.021>.
- (21) Lelong V, Lhonneur L, Dauphin F, *et al.* BIMU 1 and RS 67333, Two 5-HT₄ Receptor Agonists, Modulate Spontaneous Alternation Deficits Induced by Scopolamine in the Mouse. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2003**, *367* (6), 621–8. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0743-2>.
- (22) Moser PC, Bergis OE, Jegham S, *et al.* SL65.0155, A Novel 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Partial Agonist with Potent Cognition-Enhancing Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302* (2), 731–41. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.034249>.
- (23) Mohler EG, Shacham S, Noiman S, *et al.* VRX-03011, a Novel 5-HT₄ Agonist, Enhances Memory and Hippocampal Acetylcholine Efflux. *Neuropharmacology* **2007**, *53* (4), 563–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.06.016>.

- (24) Samuels BA, Mendez-David I, Faye C, *et al.* Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *The Neuroscientist* **2016**, 22 (1), 26–45. <https://doi.org/10.1177/1073858414561303>.
- (25) Madsen K, Torstensen E, Holst KK, *et al.* Familial Risk for Major Depression Is Associated with Lower Striatal 5-HT₄ Receptor Binding. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2015**, 18 (1). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu034>.
- (26) Murphy SE, Cates AN, De Gillespie AL, *et al.* Translating the Promise of 5HT₄ Receptor Agonists for the Treatment of Depression. *Psychol. Med.* **2020**, 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0033291720000604>.
- (27) Murphy SE, Wright LC, Browning M, *et al.* Role for 5-HT₄ Receptors in Human Learning and Memory. *Psychol. Med.* **2020**, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0033291719002836>.
- (28) Ishii T, Kinoshita K. Therapeutic agent for cognitive dysfunction accompanying parkinson disease. JP2018168072A, November 1, 2018.
- (29) Pierce D, Corcoran M, Velinova M, *et al.* A Phase 1 Randomized Study Evaluating the Effect of Omeprazole on the Pharmacokinetics of a Novel 5-Hydroxytryptamine Receptor 4 Agonist, Revexepride (SSP-002358), in Healthy Adults. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, 9, 1257–68. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S64621>.
- (30) Selective 5-HT₄ Receptor Agonist and Proton Pump Inhibitor (PPI) in Subjects With Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01472939> (accessed Mar 9, 2020).
- (31) Maeyer JHD, Schuurkes JAJ, Pro-Cognitive Compound. WO2014083003A1, June 5, 2014.
- (32) Takahashi N, Yamamoto T, Shimada K, *et al.* 5-Ht₄ Receptor Agonist for Gastroparesis. WO2015174098A1, November 19, 2015.
- (33) Takahashi N, 5-HT₄ Receptor Agonist as a Prokinetic Agent. US20140051726A1, February 20, 2014.
- (34) Numata T, Sudo M, Sun X, Benzisoxazole Derivative Salt. WO2015178020A1, November 26, 2015.
- (35) Timothy N, Sridhar D, Claire L, *et al.* Systems Pharmacology Modeling in Neuroscience: Prediction and Outcome of PF-04995274, a 5-HT₄ Partial Agonist, in a Clinical Scopolamine Impairment Trial. *Adv. Alzheimers Dis.* **2013**, 83-98. <https://doi.org/10.4236/aad.2013.23012>.
- (36) Noguchi H, Waizumi N, (R)-4-((4-((4-(Tetrahydrofuran-3-Yloxy)Benzo[d]Isoxazol-3-Yloxy)Methyl)Piperidin-1-Yl)Methyl)Tetrahydro-2h-Pyran-4-Ol, a Partial Agonist of 5-Ht₄ Receptors. WO2011101774A1, August 25, 2011.
- (37) Alisi MA, Cazzolla N, Costi R, *et al.* Compound with Serotonergic Activity, Process for Preparing It and Pharmaceutical Composition Comprising It. US8686147B2, April 1, 2014.
- (38) Guglielmotti A, Polenzani L, Alisi A, *et al.* Use of Indazole Derivatives for the Treatment of Neuropathic Pain. US7638534B2, December 29, 2009.
- (39) Dhanoa DS, Deuterium-Enriched Pyridinonecarboxamides and Derivatives. US20150080377A1, March 19, 2015.

- (40) Timmins GS, Deuterated Drugs; Where Are We Now? *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24* (10), 1067–75. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.943184>.
- (41) Johnson DE, Drummond E, Grimwood S, *et al.* The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Agonists Prucalopride and PRX-03140 Increase Acetylcholine and Histamine Levels in the Rat Prefrontal Cortex and the Power of Stimulated Hippocampal θ Oscillations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341* (3), 681–91. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192351>.
- (42) Mikami S, Uematsu M, Agent for preventing or treating agent bovine gastrointestinal disease by mosapride citrate. JP2017014113A, January 19, 2017.
- (43) Kim SH, Im WB, Choi SH, *et al.* Benzamide Derivatives. US9221790B2, December 29, 2015.
- (44) Dallemagne P, Rochais C, Lecoutey C, *et al.* Composés inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et agonistes des récepteurs serotoninergiques 5HT₄, à effet promnesiant, leurs procédés de préparation et compositions pharmaceutiques les contenant. WO2014195593A2, December 11, 2014.

*** The only patent in the 2014–2019 period describing innovative 5-HT₄R ligands with AChE inhibition properties**

- (45) Cheng L, Riggs-Sauthier J, Anand NK, Oligomer-Containing Benzamide-Based Compounds. WO2014043707A1, March 20, 2014.
- (46) Ghelardini C, Galeotti N, Casamenti F, *et al.* Central Cholinergic Antinociception Induced by 5HT₄ Agonists: BIMU 1 and BIMU 8. *Life Sci.* **1996**, *58* (25), 2297–309. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00230-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00230-5).
- (47) Brodney MA, Johnson DE, Sawant-Basak A, *et al.* Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–54. <https://doi.org/10.1021/jm300953p>.
- (48) Ohshiro H, Fujiuchi A, Take Y, 5-HT₄ Receptor Agonists for the Treatment of Dementia. US8980922B2, March 17, 2015.
- (49) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, *et al.* Age-Dependent Changes in Brain, CSF, and Plasma Amyloid β Protein in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21* (2), 372–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-02-00372.2001>.
- (50) Ikeda J, Nakamura T, Otaka H, Oxadiazole derivative and pharmaceutical use of same. WO2014092104A1, June 19, 2014.

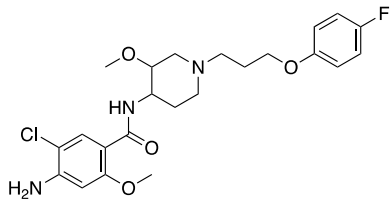
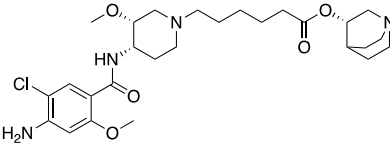
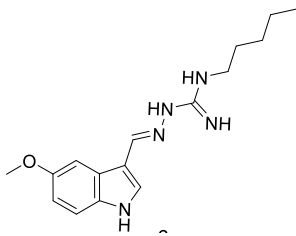
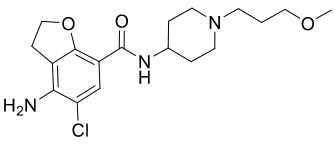
*** A complete patent in term of innovation and diversity of aromatic core, basic center and substituents.**

- (51) Nirogi R, Mohammed AR, Shinde AK, *et al.* Indazole Compounds as 5-Ht₄ Receptor Agonists. WO2015092804A1, June 25, 2015.
- (52) Nirogi R, Mohammed AR, Yarlagadda S, *et al.* Heteroaryl Compounds as 5-HT₄ Receptor Ligands. US9079894B2, July 14, 2015..
- (53) Nirogi R, Mohammed AR, Jasti V, Process for Large Scale Production of 1-Isopropyl-3-[5- [1-(3-Methoxypropyl) Piperidin-4-Yl]-[1,3,4]Oxadiazol-2-Yl]- 1h-Indazole Oxalate. WO2016027277A1, February 25, 2016.

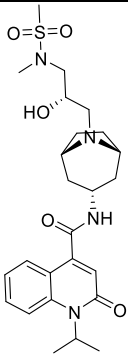
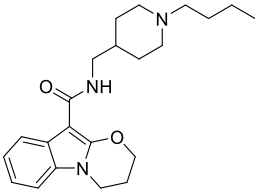
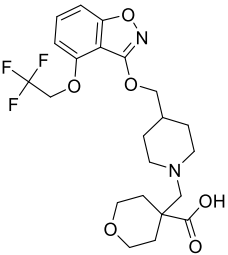
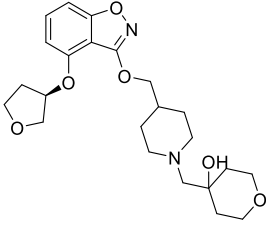
- (54) Nirogi R, Shinde AK, Mohammed AR, *et al.* Amide Compounds as 5-HT₄ Receptor Agonists. WO2016128990A1, August 18, 2016.
- (55) Lecoutey C, Hedou D, Freret T, *et al.* Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), E3825–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111>.
- (56) Suzuki T, Imanishi N, Itahana H, *et al.* Novel benzamide derivative and medicinal composition containing the same. WO1995018104A1, July 6, 1995.
- (57) Takadoi M, Kobayashi F, Sekiguchi H, Novel benzamide derivatives. WO1997010207A1, March 20, 1997.
- (58) Nirogi R, Shinde AK, Jasti V, 5-Amino-Quinoline-8-Carboxamide Derivatives as 5-HT₄ Receptor Agonists. WO2014147636A1, September 25, 2014.
- (59) Iwanaga Y, Miyashita N, Mizutani F, *et al.* Stimulatory Effect of N-[4-[2-(Dimethylamino)-Ethoxy]Benzyl]-3, 4-Dimethoxybenzamide Hydrochloride (HSR-803) on Normal and Delayed Gastrointestinal Propulsion. *Jpn. J. Pharmacol.* **1991**, *56* (3), 261–9. <https://doi.org/10.1254/jjp.56.261>.
- (60) Sim JY, Cha MH, Yoon YA, *et al.* Bicyclic derivative containing pyrimidine ring, and preparation method therefor. WO2014189331A1, November 27, 2014.
- *The only patent in 2014-2019 period describing innovative pharmacophore for 5-HT₄R ligands**
- (61) Khoo JH, Lee DB, Lee JS, *et al.* Novel Processes for Preparing a Diaminopyrimidine Derivative or Acid Addition Salt Thereof. WO2019221522A1, November 21, 2019.
- (62) Ahn KK, Cha MH, Jung EJ, *et al.* Diaminopyrimidine Derivatives and Processes for the Preparation Thereof. WO2012115480A2, August 30, 2012.
- (63) Hussain Z, Lee YJ, Yang, H, *et al.* H. YH12852, a Potent and Highly Selective 5-HT₄ Receptor Agonist, Significantly Improves Both Upper and Lower Gastrointestinal Motility in a Guinea Pig Model of Postoperative Ileus. *Neurogastroenterol. Motil.* **2017**, *29* (10), e13094. <https://doi.org/10.1111/nmo.13094>.
- (64) Lalut J, Payan H, Davis A, *et al.* C. Rational Design of Novel Benzisoxazole Derivatives with Acetylcholinesterase Inhibitory and Serotonergic 5-HT₄ Receptors Activities for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59805-7>.
- (65) Nirogi R, Mohammed AR, Shinde AK, *et al.* Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Preclinical Evaluation of Heteroaromatic Amides and 1,3,4-Oxadiazole Derivatives as 5-HT₄ Receptor Partial Agonists. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (11), 4993–5008. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00457>.
- (66) Rochais C, Lecoutey C, Hamidouche K, *et al.* Donecopride, a Swiss Army Knife with Potential against Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2020**. <https://doi.org/10.1111/bph.14964>.
- (67) Giannoni P, Gaven F, De Bundel D, *et al.* Early Administration of RS 67333, a Specific 5-HT₄ Receptor Agonist, Prevents Amyloidogenesis and Behavioral Deficits in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00096>.

- (68) Dileep Kumar JS, John Mann J, PET Tracers for Serotonin Receptors and Their Applications. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2014**, *14* (2), 96–112.
- (69) Claeysen S, Sebben M, Becamel C, *et al.* Novel Brain-Specific 5-HT₄ Receptor Splice Variants Show Marked Constitutive Activity: Role of the C-Terminal Intracellular Domain. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55* (5), 910–20.
- (70) Bockaert J, Claeysen S, Compan V, *et al.* 5-HT₄ Receptors, a Place in the Sun: Act Two. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11* (1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.01.012>.
- (71) Pascual-Brazo J, Castro E, Díaz Á, *et al.* Modulation of Neuroplasticity Pathways and Antidepressant-like Behavioural Responses Following the Short-Term (3 and 7 Days) Administration of the 5-HT₄ Receptor Agonist RS67333. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2012**, *15* (5), 631–43. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000782>.
- (72) Hagen H, Manahan-Vaughan D, The Serotonergic 5-HT₄ Receptor: A Unique Modulator of Hippocampal Synaptic Information Processing and Cognition. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2017**, *138*, 145–53. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.014>.
- (73) Freret T, Bouet V, Quiedeville A, *et al.* Synergistic Effect of Acetylcholinesterase Inhibition (Donepezil) and 5-HT₄ Receptor Activation (RS67333) on Object Recognition in Mice. *Behav. Brain Res.* **2012**, *230* (1), 304–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.012>.
- (74) Yahiaoui S, Hamidouche K, Ballandonne C, *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.048>.
- (75) Lanthier C, Payan H, Liparulo I, *et al.* Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT₄ Receptors with *in cellulo* Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>.
- (76) Hatat B, Yahiaoui S, Lecoutey C, *et al.* A Novel *in Vivo* Anti-Amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT₆R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00148>

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

Compound company	Structure	Indication	Development phase status	Ref
Cisapride	 <p style="text-align: center;">1</p>	Gastro oesophageal reflux (GERD)	Phase 4	NCT01281553 Terminated
ATI-7505 (or Naronapride) Aryx therapeutics	 <p style="text-align: center;">9</p>	Post prandial distress syndrome Chronic constipation	Phase 2 Phase 2	NCT00630370 Terminated NCT00501241 terminated
Tegaserod Novartis	 <p style="text-align: center;">2</p>	GERDI	Phase 1 and 2	NCT01094821 Completed
Prucalopride Shire	 <p style="text-align: center;">3</p>	GERD Constipation	Phase 3 and 4 Phase 3	NCT03279341 Completed NCT04190173 Recruiting NCT03676374 Recruiting NCT03244553 Recruiting NCT00139568 Completed

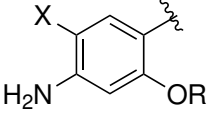
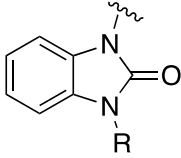
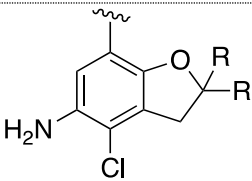
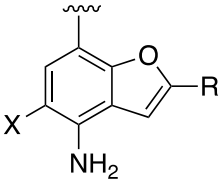
Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

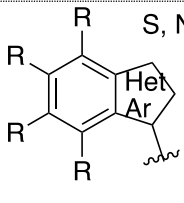
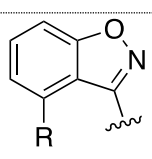
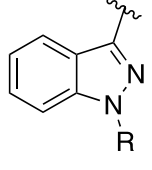
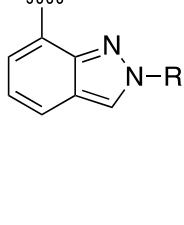
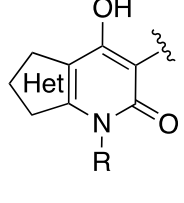
	8	Chronic constipation	Phase 2	NCT00391820 completed
<i>TD-5108 or Velusetrag</i> <i>Theravance Pharma</i>	 14	Heart failure	Phase 2	NCT00421746 completed
<i>Piboserod</i> <i>Biomedisinsk Innovasjon</i>	 15	GERD	Phase 2b	NCT01472939 completed
<i>RQ-00000010</i> <i>Raqualia (Pfizer)</i>	 16	Cognitive impairment in AD	Phase 1	NCT01173757 completed
<i>PF- 04995274</i> <i>Pfizer</i>	 17	Depression	Phase 1	NCT03515733 Recruiting NCT03516604 Recruiting
<i>YH12852</i>	Not disclosed	Gastrointestinal disorder	Phase 1/2	NCT03381703 Completed NCT02538367 Completed

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

<i>Yuhan corporation</i>	Gastrointestinal disorder	Phase 1	NCT01870674
	Dyspeptia	Phase 2	NCT02567578 Suspended

Table 1 - 5-HT₄R ligands in clinical trials

Aromatic ring		Patent N°	Example
		Author or company	
Monocyclic		<p>US9221790 [43] <i>Dong A pharm.</i></p> <p>WO2014195593 [44] <i>Dallemagne et al.</i></p> <p>JP2017014113 [42] <i>Mikami et al.</i></p> <p>WO2014043707 [45] <i>Nektar Therapeutics</i></p>	<p>1 Cisapride*</p> <p>4 Minesapride</p> <p>6 RS67333</p> <p>9 Naronapride *</p> <p>19 Mosapride</p> <p>22 Donecopride</p> <p>28</p>
Bicyclic	6-membered ring linked to 5-membered ring		<p>US8980922 [48] <i>Raqualia</i></p> <p>12 PF-00885706 *</p> <p>20</p>
			<p>WO2014083003 [31] <i>Shire</i></p> <p>US9079894 [52]</p> <p>WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i></p> <p>3 Prucalopride *</p> <p>10 Revexepride *</p>
			<p>WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i></p> <p>29</p>

 <p>S, N or O</p>	<p>WO2014092104 [50] <i>Dainippon</i> <i>Sumimoto Pharm.</i></p>	<p>11 TD-8954* 24 27</p>
	<p>WO2015174098 [32] WO2015178020 [34] <i>Raqualia</i> WO2014092104 [50] <i>Dainippon</i> <i>Sumimoto Pharm.</i></p>	<p>16 RQ-10* 17 PF-04995274*</p>
	<p>WO201627277 [53] US9079894 [52] <i>Suven Life Science</i></p>	<p>13 SUVN-D4010*</p>
	<p>WO2015092804 [51] <i>Suven Life Science</i></p>	<p>25</p>
	<p>US20150080377 [39] <i>Dhanoa et al.</i></p>	<p>8 PRX-03140*</p>

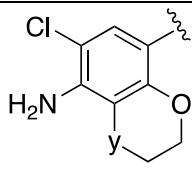
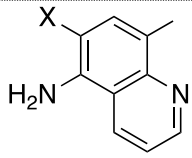
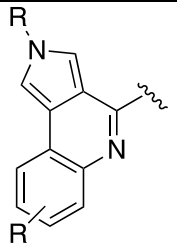
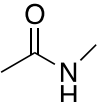


Bicyclic 6-membered rings	 <p>Y = O or CH₂</p>	<p>US9079894 [52] WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i></p>	<p>7 SL65.0155 * 23</p>
		<p>WO2014147636 [58] <i>Suven Life Science</i></p>	<p>26 21</p>
Tricyclic		<p><i>US8686147</i> [37] <i>Alisi et al.</i></p>	<p>18</p>

Table 2 - Summary of Aromatic core found in the patents. * Compound in clinical trial

Linker	Patent N°	Example
Linear	Amide 	1 Cisapride 3 Prucalopride* 4 Minesapride 5 BIMU-1 8 PRX- 03140* 9 Naronapride* 10 Revexepride* 11 TD-8954* 12 PF-00885706* 14 Velusetrag* 15 Piboserod* 19 Mosapride 20 21 25 26 28 29
	Ketone 	6 RS 67333 22 Donecopride
	Ether 	16 RQ-10* 17 PF- 04995274* 18
Cycle	1,3,4-oxadiazole,	13 SUVN-D4010 *

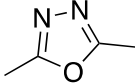
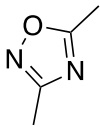
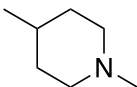
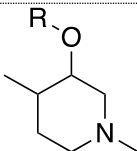
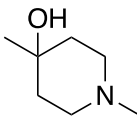
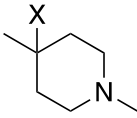
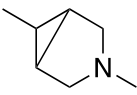
		<p>WO201627277 [53] US9079894 [52] <i>Suven Life Science</i></p>	<p>23</p>
	<p>1, 2, 4-oxadiazole</p> 	<p>WO2014092104 [50] <i>Dainippon Sumimoto Pharm.</i></p>	<p>24 27</p>

Table 3 -Summary of linkers found in patents. * Compound in clinical trial

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

Basic Core		Patent N°	Example
6 membered		US8980922 [48] <i>Raqualia</i>	Prucalopride* 6 RS 67333
		US20150080377 [39] <i>Dhanoa et al.</i>	7 Capeserod* 8 PRX 03140*
		WO2014195593 [44] <i>Dallemagne et al.</i>	11 TD8954* 12 PF-00885706*
		WO2015174098 [32] <i>Raqualia</i>	13 SUVN-D4010* 15 Piboserod*
		US9221790 [43] <i>Dong A pharm.</i>	16 RQ-10* 17 PF- 04995274*
		US8686147 [37] <i>Alisi et al.</i>	18 20
		WO2015092804 [51] <i>Suven Life Science</i>	21 22
		WO2014092104 [50] <i>Dainippon Sumimoto Pharm.</i>	23 24
			28
		WO2014083003 [31] <i>Shire</i>	1 Cisapride * 9 Naronapride * 10 Revexepride
		WO2014147636 [58] WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i>	
		WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i>	25
		WO2015092804 [51] WO2014147636 [58] WO2016128990 [54] <i>Suven Life Science</i>	26 29

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

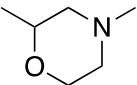
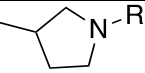
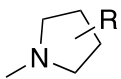
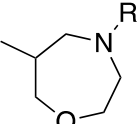
		JP2017014113 [42] <i>Mikami et al.</i> WO2015092804 [51] <i>Suven Life Science</i>	4 Minesapride 19 Mosapride
<i>5 membered</i>	 	WO2014092104 [50] <i>Dainippon Sumimoto Pharm.</i>	27
<i>7 membered</i>		WO2014092104 [50] <i>Dainippon Sumimoto Pharm.</i>	

Table 4 - Summary of the different basic center found in patents. * Compound in clinical trial

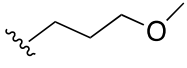
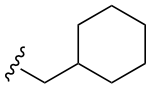
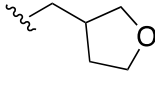
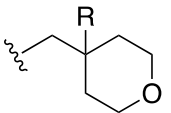
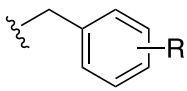
<i>Substituent</i>		<i>Patent N°</i>	<i>Example</i>
<i>Methoxybutane</i>		WO2014083003 [31] <i>Shire</i> WO201627277 [53] <i>Suven Life Science</i>	3 Prucalopride* 13 SUVN D4010* 23
<i>Cyclo alkyl</i>		WO2014195593 [44] <i>Dallemagne et al.</i>	22
<i>Furan</i>		WO2014147636 [58] <i>Suven Life Science</i>	26
<i>Oxane</i>	 R= OH,COOH or H	US8980922 [48] <i>Raqualia</i> WO2015092804 [51] WO2014147636 [58] <i>Suven Life Science</i>	16 RQ10 * 17 PF-04995274 * 21 20 25
<i>Benzene</i>		JP2017014113 [42] <i>Mikami et al.</i> US8686147 [37] <i>Alisi et al.</i> WO2015092804 [51] <i>Suven Life Science</i>	1 Cisapride * 7 Capeserod * 18 19 Mosapride
<i>Hetero aromatic ring</i>	Pyrimidine, triazole, tetrazole, indole, imidazole etc...	US9221790 [43] <i>Dong A pharm.</i>	24 28

Table 1 – Summary of the different substituents found in patents; * Compound in clinical trial

4. Résumé des principales structures agonistes des récepteurs 5-HT₄R

a. Pharmacophore des ligands 5-HT₄R

Les ligands des 5-HT₄R en essais cliniques tels que décrits dans la revue précédente présentent une organisation structurale chimique semblable. En effet tel que le montre la Figure 19 avec le cisapride, tous ces composés possèdent un noyau aromatique, lié à un centre basique par un linker puis un substituant pourra être retrouvé en partie proximale de la molécule attaché directement au centre basique.

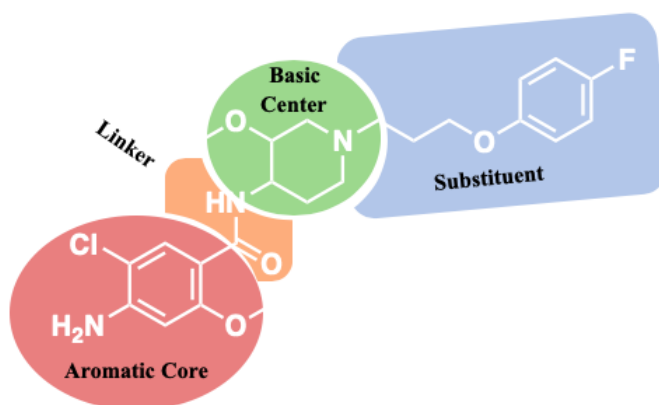


Figure 19 - Structure générale des ligands 5HT₄R.¹²⁸

b. Modulation du noyau aromatique

La modulation du noyau aromatique étant primordiale dans ce projet de thèse, les différents composés de la littérature seront présentés et organisés en fonction de leur noyau aromatique. Par la suite, certains linkers seront détaillés également. Les différents centres basiques sont évoqués dans la publication mais ne seront pas détaillés ici. Enfin la partie substituant ne sera également pas développée ici à cause de la grande variété de substituants observés chez les ligands du récepteur montrant alors la grande variabilité permise en cette position.

¹²⁸ Lanthier, C. *et al.* Therapeutic Modulators of the Serotonin 5-HT₄ Receptor: A Patent Review (2014-Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (7), 495–508.

i. Les Aminochlorobenzènes

L'une des premières grandes séries chimiques retrouvées dans les ligands du récepteur 5-HT₄R sont les dérivés aminochlorobenzène. Ces composés sont issus historiquement du métoclopramide un anti émétique antagoniste des récepteurs dopaminergiques D₃ qui s'est avéré plus tard être également un agoniste des récepteurs 5-HT₄. C'est dans cette famille chimique que l'on retrouve différents agonistes de référence tel que le cisapride, le mosapride et le prucalopride, tous trois utilisés dans le traitement de pathologies gastrointestinales. Le prucalopride, un puissant agoniste mis sur le marché en 2018 est également en essais cliniques contre la dépression et semble être dénué d'effets indésirables cardiotoxiques qui avaient poussé au retrait du cisapride comme énoncé dans l'introduction.¹²⁹

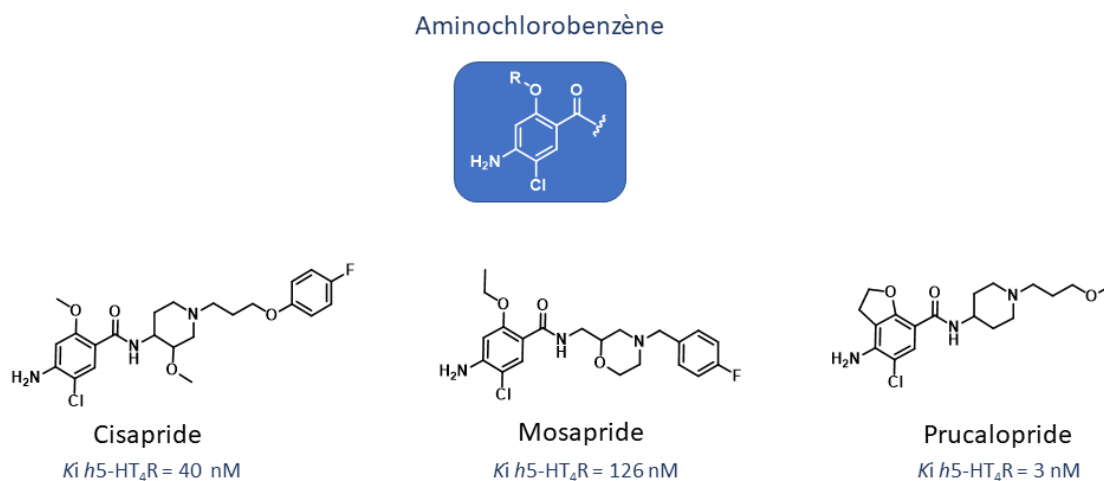


Figure 20 - Structures des composés de la famille des aminochlorobenzène.

ii. Les pyridinones

Les isopropylpyridinones (Figure 21) sont des motifs chimiques que l'on retrouve chez certains agonistes des récepteurs 5-HT₄ tel que le PRX-03140 ou encore le velusetrag. Le PRX-03140 est un agoniste sélectif des 5-HT₄R. Il a été développé par Epix pharmaceutical dans le cadre de la MA, mais est également évalué dans les maladies gastro-intestinales.¹³⁰

¹²⁹ Conlon, K. *et al.* Nonclinical Cardiovascular Studies of Prucalopride, a Highly Selective 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, 364 (2), 156–169.

¹³⁰ Johnson, D. E. *et al.* The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Agonists Prucalopride and PRX-03140 Increase Acetylcholine and Histamine Levels in the Rat Prefrontal Cortex and the Power of Stimulated Hippocampal θ Oscillations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, 341 (3), 681–691.

Le velusetrag est un second composé possédant cet isopropylpyridinone, il est étudié dans les pathologies gastro-intestinales, mais celui-ci n'est pas sélectif du récepteur 5-HT₄, en effet il semblerait également affin pour les récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃ comme le cisapride.

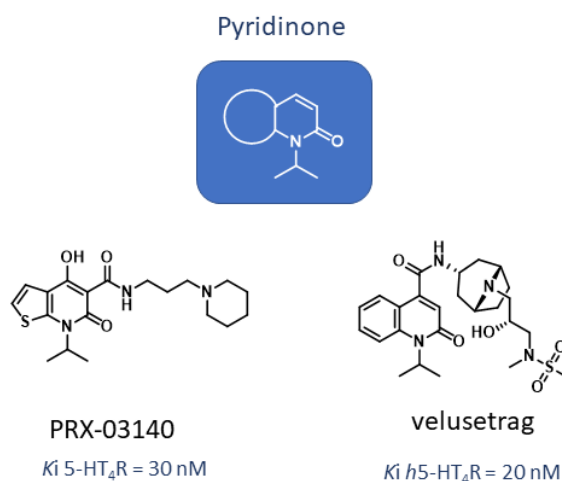


Figure 21 - Structures des composés de la famille pyridinone.

iii. Les benzazoles

Outre les aminochlorobenzènes et les pyridinones, une troisième grande famille de dérivés est très représentée dans la recherche autour du récepteur 5-HT₄, il s'agit des benzazoles. Ce sont des bioisostères de l'indole, un motif chimique retrouvé dans la sérotonine, le ligand naturel du récepteur 5-HT₄.

Dans cette catégorie on va tout d'abord retrouver les dihydrobenzodiazolones. Ces motifs chimiques sont représentés dans les composés tels que BIMU-1 et BIMU-8. Le BIMU-8 est principalement utilisé pour contrer les dépressions respiratoires induites par les opioïdes mais son utilisation sur des modèles murins de la MA semblent indiquer des propriétés pro-cognitives.¹³¹⁻

133

¹³¹ Ghelardini, C. *et al.* Central Cholinergic Antinociception Induced by 5HT₄ Agonists: BIMU 1 and BIMU 8. *Life Sci.* **1996**, *58* (25), 2297–2309.

¹³² Meneses, A. *et al.* Effects of 5-HT₄ Receptor Agonists and Antagonists in Learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *56* (3), 347–351.

¹³³ Wang, X. *et al.* 5-Hydroxytryptamine 1A/7 and 4α Receptors Differentially Prevent Opioid-Induced Inhibition of Brain Stem Cardiorespiratory Function. *Hypertension* **2007**, *50* (2), 368–376.

Les indazoles sont une seconde série de composés très présents et largement décrits par Suven Life Science au cours des dernières années.^{134,135} Leur composé phare, le SUVN-D4010 est actuellement en essai clinique dans le cadre de la MA.

La troisième sous-famille est représentée par les benzisoxazoles développés par Pfizer principalement. Le PF-04995274 a été décrit par Brodney *et al.* comme étant l'un des plus puissants agonistes des 5-HT₄R. Il est actuellement en essais cliniques pour des pathologies gastro-intestinales et contre la dépression.¹³⁶ Un analogue de celui-ci, le RQ-10 possédant un trifluoroéthoxy à la place du groupement tétrahydrofurane, a également été évalué en phase 1 dans la MA.^{137,138}

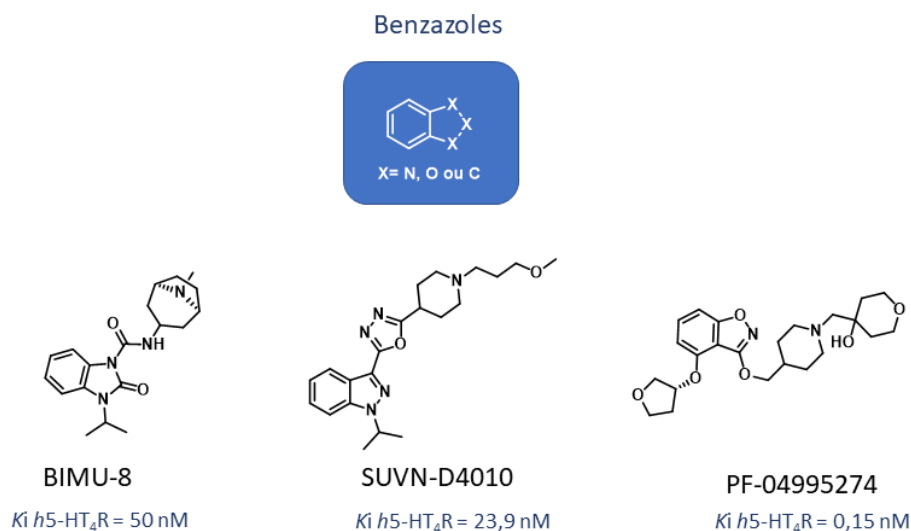


Figure 22 - Structures des composés de la famille des benzazoles.

c. Etude des linkers

Plusieurs types de linker ont été développés au cours des années. Les trois principaux linkers utilisés sont ainsi représentés dans chacun des composés décrit dans la Figure 22 ci-dessus. Le linker

¹³⁴ Nirogi, R. *et al.* Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Preclinical Evaluation of Heteroaromatic Amides and 1,3,4-Oxadiazole Derivatives as 5-HT₄ Receptor Partial Agonists. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (11), 4993–5008.

¹³⁵ Nirogi, R. *et al.* Indazole Compounds as 5-HT₄ Receptor Agonists. WO2015092804A1, June 25, 2015.

¹³⁶ Brodney, M. A. *et al.* Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–9254.

¹³⁷ McKinnell, R. M. *et al.* A Multivalent Approach to the Design and Discovery of Orally Efficacious 5-HT₄ Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (17), 5330–5343.

¹³⁸ Yamamoto, T. *et al.* Mo2080 First-in-Human Study of the Novel 5-HT₄ Agonist, RQ-00000010, Demonstrated Acceleration of Gastric Emptying Following Single and Multiple Oral Administration to Healthy Human Subjects. *Gastroenterology* **2013**, *144* (5), S-736.

amide représenté ici dans le BIMU-8 est le linker le plus communément utilisé. On le retrouve dans la majorité des structures agonistes ou antagonistes des 5-HT₄R. Sur les huit structures présentées dans cette partie, six possèdent ce motif.

Le linker cétone retrouvé du RS-67333 (Figure 17) semble être un bon substitut à cette liaison amide, tout en permettant de garder une bonne affinité envers le récepteur. La liaison éther représentée par le composé PF-04995274 est un peu moins commune mais est tout de même présente dans plusieurs composés de la famille des benzisoxazoles.

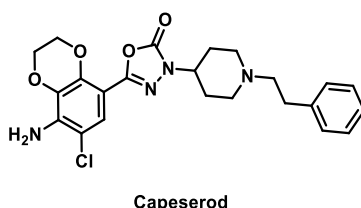


Figure 23 - Structure du capeserod.

Des linkers cycliques ont commencé à émerger avec la découverte du capeserod et son linker oxadiazolinone. Depuis, Nirogi *et al.* ont largement développé de nouveaux linkers de type oxadiazole permettant de rigidifier la structure tout en maintenant une bonne affinité envers le récepteur 5-HT₄ comme le montre le SUVN-D4010.¹³⁴

d. Etude pharmacophorique du profil

Il existe quelques différences pharmacophoriques entre les agonistes et les antagonistes comme l'ont décrit Bureau *et al.* en 2010.¹³⁹ Cependant ces différences étaient mineures, en effet, seule la différence de distance entre le noyau aromatique, le linker et le centre basique semblait différencier les deux profils. Depuis, certains composés reconnus à l'époque comme antagonistes des récepteurs 5-HT₄ se sont révélés être finalement agonistes partiels du récepteur troublant un peu plus la frontière entre les deux types de composés. A ce jour, les différences de profil ne peuvent donc pas s'expliquer par les modèles pharmacophoriques établis. Une exploration expérimentale se révélera donc nécessaire lors du développement de nos futurs dérivés.

¹³⁹ Bureau, R. *et al.* Review of 5-HT₄R Ligands: State of Art and Clinical Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (5), 527–553.

III. Le stress oxydant ou déséquilibre radicalaire

1. Définition

Le stress est une réponse non spécifique de l'organisme à toute sollicitation selon Hans Selye.¹⁴⁰ Le stress oxydant (SO) se définit comme un déséquilibre entre la présence d'espèces oxydantes radicalaires et leur prise en charge par les systèmes biologiques qui seront incapables de stabiliser les intermédiaires réactifs ou de réparer les dommages que ces espèces peuvent causer tels que les dommages oxydants, sur les biomolécules. On lui préférera aujourd'hui, le terme plus générique de déséquilibre radicalaire (DR).

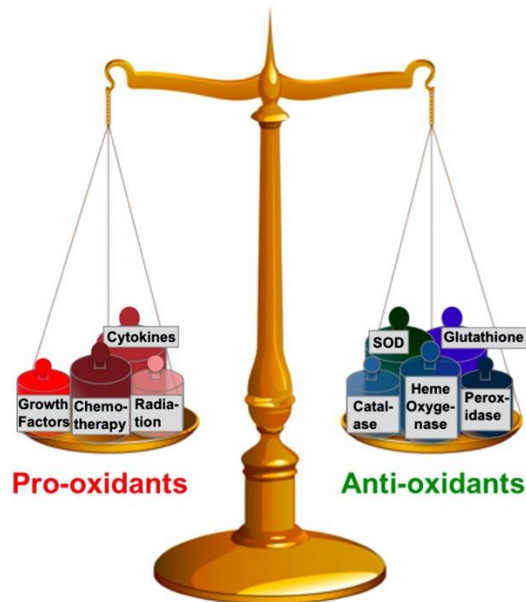


Figure 24 - balance entre les phénomènes pro-oxydants et les mécanismes anti-oxydants.¹⁴¹¹⁴¹

La matière est constituée d'atomes. Les atomes sont constitués d'un noyau autour duquel gravitent des particules chargées négativement que sont les électrons. Dans les couches électroniques externes, les électrons vont s'appareiller par paire pour former des doublets électroniques. Dans le cas des espèces radicalaires, il existe des électrons dans cette couche externe qui seront non appariés. Ceux-ci vont alors arracher des électrons plus ou moins disponibles chez d'autres molécules afin de se stabiliser entraînant au passage des dégâts cellulaires, notamment sur l'ADN. Ces espèces seront alors particulièrement réactives et instables. Les radicaux libres sont fabriqués par la cellule dans des

¹⁴⁰ Selye, H. Stress without Distress. In *Psychopathology of Human Adaptation*; Serban, G., Ed.; Springer US: Boston, MA, **1976**; 137–146.

¹⁴¹ Reuter, S. *et al.* Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49* (11), 1603–1616.

conditions endogènes en tant que messagers. Mais ils peuvent également être produits lorsque le corps est en présence de substances exogènes telles que le tabac, les polluants ou la présence d'ultraviolets.

Il va exister plusieurs grandes familles d'espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant que nous allons lister dans les paragraphes suivants.

2. Les espèces radicalaires

a. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais)

Afin de communiquer, les cellules aérobies ont su produire des messagers, les espèces réactives de l'oxygène (EROs). Elles sont initialement neutralisées immédiatement par des antioxydants une fois le message délivré dans les conditions physiologiques. Ces espèces vont être produites dans le cœur énergétique de la cellule : la mitochondrie.

Les EROs vont regrouper les espèces radicalaires suivantes :

- L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$
- Le radical hydroxyperoxyde HO_2^{\bullet}
- Le radical hydroxyde $^{\bullet}OH$
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2
- L'acide hypochlorite $HOCl$

A pH physiologique, le radical hydroxyperoxyde HO_2^{\bullet} va se dissocier pour former un radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Ce radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ est une espèce réactive qui va être responsable de la formation d'autres EROs soit par action directe soit par des mécanismes d'actions médiés par des enzymes ou des métaux.

Le radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ peut aussi être détoxifié sous forme d' H_2O_2 (voie bleu Figure 18) grâce à une réaction de dismutation de type Heber-Weiss sous l'action d'une métalloprotéine, la superoxyde dismutase (SOD).¹⁴² La dismutation est une réaction chimique dans laquelle l'espèce en

jeu joue à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur. Le radical hydroxyde $\cdot\text{OH}$ pourra ensuite être transformé en H_2O par une catalase.

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , va pouvoir oxyder, notamment les protéines possédant des groupements thiols, cependant c'est lorsque celui-ci réagit avec des ions métalliques tel que Fe^{2+} qu'il est le plus délétère car c'est la réaction de Fenton qui va prédominer formant alors du Fe^{3+} et des radicaux hydroxyde $\cdot\text{OH}$.¹⁴³

Le radical hydroxyde $\cdot\text{OH}$ a une demi vie très courte, il s'agit du radical le plus réactif et le plus délétère pour les biomolécules. De par son important potentiel Redox, il va oxyder de nombreuses biomolécules telles que les lipides, les protéines, l'ADN...¹⁴⁴

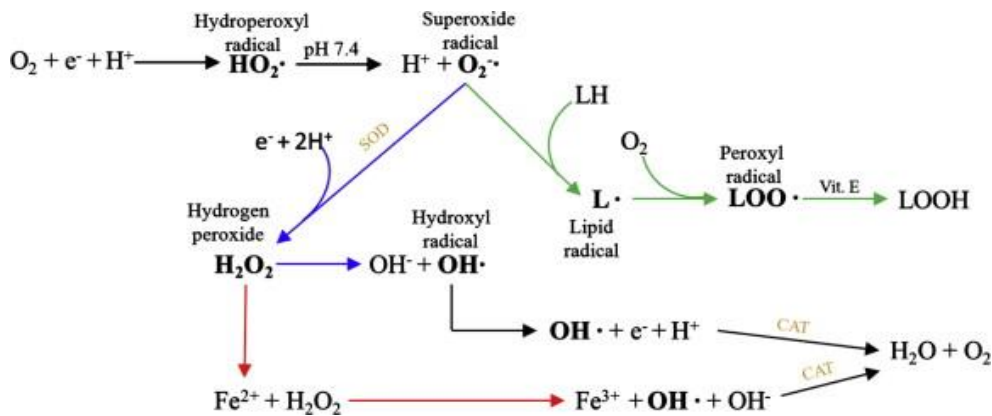


Figure 25 - Schéma résumant la formation des EROs, flèche verte représentant la peroxydation des lipides, en bleu les réactions de type Haber Weiss et en rouge les réactions de Fenton. En gras les molécules radicalaires ou oxydantes, SOD (superoxyde dismutase), CAT (Catalases).¹⁴⁵

b. Les espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS en anglais)

Il va exister d'autres espèces radicalaires que celles de l'oxygène. On va alors retrouver deux espèces prépondérantes dans cette catégorie.

- Le radical nitroxyde NO^\cdot , est un messager cellulaire produit par l'enzyme NO-synthase (NOS) ;

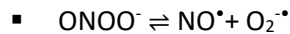
¹⁴² Haber, F. *et al.* Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* **1932**, 20 (51), 948–950.

¹⁴³ Koppenol, W. H. The Centennial of the Fenton Reaction. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, 15 (6), 645–651.

¹⁴⁴ Devasagayam, T.; Tilak, J.; Bloor, K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **2004**, 52, 12.

¹⁴⁵ Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 51, 15–25.

- Et le peroxydinitrite ONOO^- , celui-ci provient de la réaction du nitroxyde avec le radical hyperoxyde.



c. Les espèces réactives du soufre (ERS ou RSS en anglais)

Il existe une dernière source d'espèce radicalaire, non naturellement formée dans nos cellules mais apportée par l'alimentation, l'environnement ou formée par la réaction de EROs avec des thiols. Il s'agit des espèces radicalaires du soufre.¹⁴⁶

Comme décrit dans la Figure 20, d'après l'hypothèse de Giles *et al.* sous l'action des oxydants, les thiols **A** vont former des disulfures **B** qui peuvent à leur tour aboutir à :

- De l'oxyde-S-disulfure **C**
- Du dioxyde-S-disulfure **D**

Ces deux espèces peuvent alors s'oxyder sous forme de pont disulfure, plus facilement clivable mais produisant dans un même temps des acides sulfénique ou sulfonique.¹⁴⁷

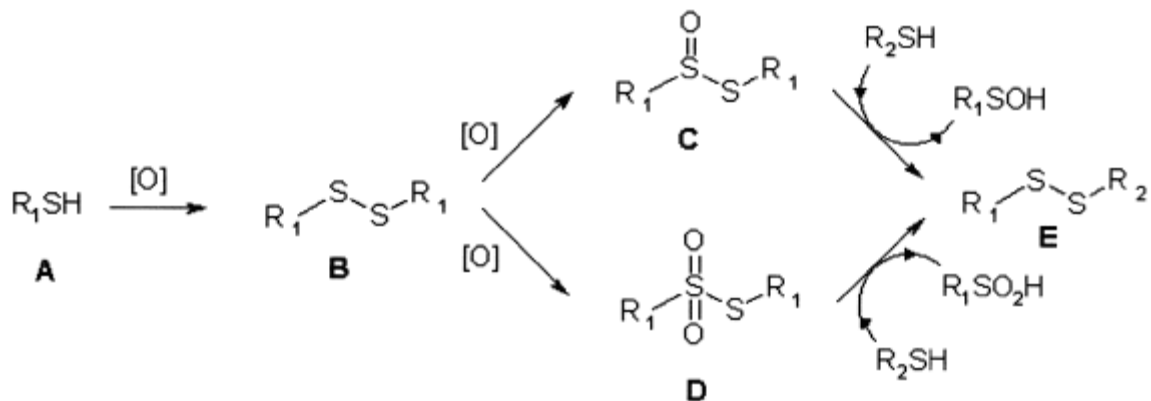


Figure 26 –Oxydation des thiols en présence d'oxydants.¹⁴⁷

La formation des ERS n'est cependant pas encore tout à fait définie à l'heure actuelle, les oxydes de disulfure semblent cependant interagir avec les métallothionéines, des enzymes impliquées dans l'homéostasie du zinc et pourraient ainsi agir sur le stress oxydant en amplifiant la perturbation de l'homéostasie métallique au niveau cérébral.

3. Effet du stress oxydant sur l'organisme

¹⁴⁶ Lü, J.-M. *et al.* Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (4), 840–860.

¹⁴⁷ Giles, G. I. *et al.* Hypothesis: The Role of Reactive Sulfur Species in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31* (10), 1279–1283.

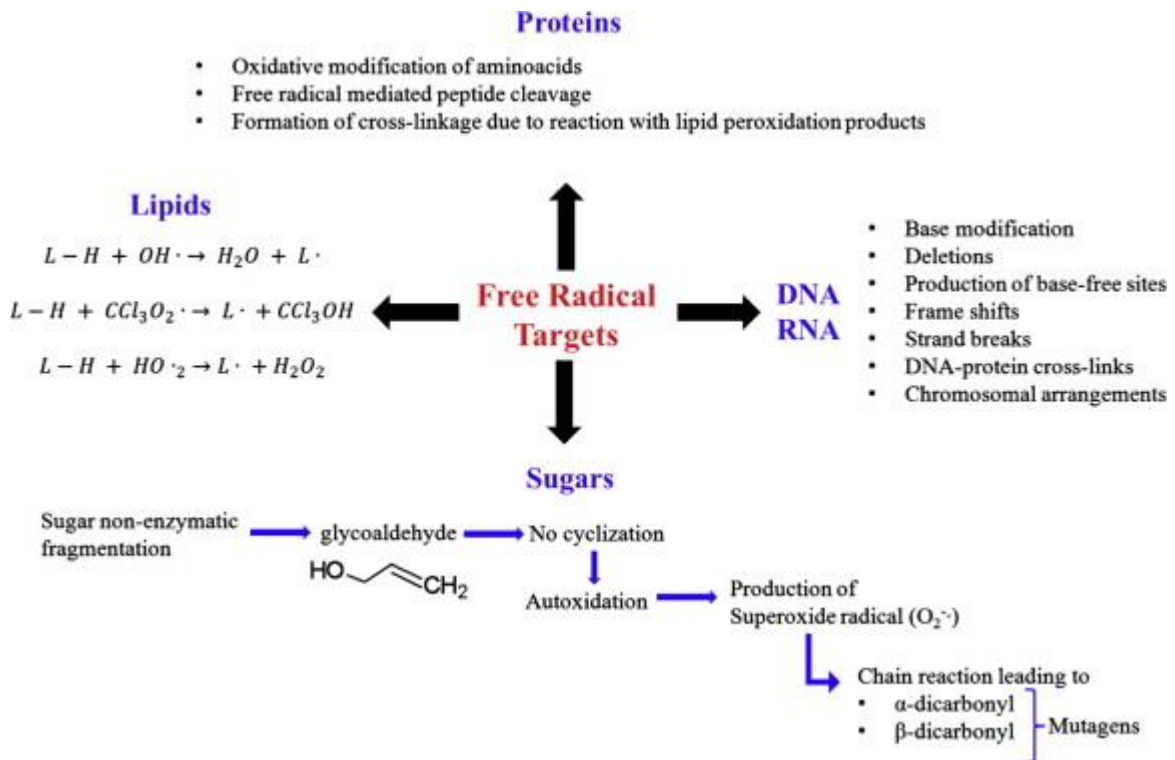


Figure 27 - Cibles des radicaux libres.¹⁴⁵

Les radicaux sont des espèces qui vont être produites naturellement au sein de la mitochondrie grâce à la Xanthine oxydase (XO), les peroxysomes, les processus inflammatoires, la phagocytose, les voies de l'acide arachidonique, ou encore l'exercice physique...

Les quatre principales cibles des radicaux libres vont être les protéines, les lipides, les acides nucléiques (ADN et ARN) et les sucres.

Les protéines sont l'une des premières cibles des radicaux libres. Ceux-ci vont attaquer les acides aminés (AA) soufrés comme la cystéine, la méthionine ou d'autres tels que la tyrosine. En oxydant ces AA, ces réactions vont alors aboutir à leur carbonylation et ainsi les dénaturer. Dans le contexte de la MA, on retrouve ce phénomène d'oxydation protéique particulièrement dans les zones riches en peptides $A\beta_{1-42}$.^{148,149} Ils peuvent également engendrer des clivages entre les différents peptides constituants protéiques ou encore favoriser des liaisons avec les produits radicalaires lipidiques.

¹⁴⁸ Hensley, K. *et al.* Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *J. Neurochem.* **1995**, 65 (5), 2146–2156.

¹⁴⁹ Yatin, S. M. *et al.* Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid β -Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production. *J. Alzheimers Dis.* **2000**, 2 (2), 123–131.

Les lipides, et particulièrement les lipides insaturés sont également des cibles de choix pour les radicaux libres. Il va exister un phénomène de peroxydation radicalaire qui va suivre plusieurs étapes :¹⁵⁰

- La première étape consiste en **l'initiation**, avec l'attaque d'un radical venant arracher l'hydrogène en α de l'insaturation ;
- Le lipide va alors prendre en charge le radical, et afin de se stabiliser, se réarrangera ce qui aura pour effet de diffuser le radical sur un autre lipide, c'est ce qu'on appelle la **propagation** ;
- Cela va alors engendrer l'étape finale de **peroxydation** avec la formation d'hydroxy peroxyde lipidiques, qui en présence de métaux formeront des radicaux hydroxyde, qui eux même vont aller attaquer d'autres lipides.

Ces attaques sur les lipides vont alors avoir comme conséquences importantes de perturber les membranes cellulaires, qui peuvent alors se rigidifier et ainsi bloquer des récepteurs ou enzymes transmembranaires. Cela va aussi amener la formation de nombreux sous-produits dérivés d'aldéhyde tels que les alcènes α,β insaturés comme le malondialdéhyde (MDA), le 4 hydroxy-2-nonéol (HNE) et l'acroléine. Chez les patients atteints de la MA, l'acroléine, qui est très réactive, est d'ailleurs présente dans des concentrations élevées dans l'hypothalamus et le cortex temporal, deux régions où le DR est élevé.¹⁵¹

Les troisièmes cibles principales des radicaux libres sont les bases nucléiques formant l'ADN et l'ARN. L'oxydation de ces bases peut être à l'origine de mutations génétiques, de délétion ou modification de base, de coupure des doubles hélices, des liaisons entre les brins d'ADN voire entre ADN et protéines.¹⁵²

La dernière cible sont les sucres. La formation de radicaux pendant la glycation pourrait contribuer à des dommages glyco-oxydants. En effet dans les premières étapes de la glycosylation, les sucres vont se fragmenter en petites espèces telles que les glyco-aldéhydes, qui seront alors sujet à l'auto-oxydation et à terme à la formation de radicaux superoxydes.

¹⁵⁰ Gilbert, T. *et al.* Stress oxydant et maladie d'Alzheimer. In *Traité sur la maladie d'Alzheimer*; Vellas, B., Robert, P., Eds.; Springer: Paris, 2013; 175–194.

¹⁵¹ Singh, M. *et al.* Role of By-Products of Lipid Oxidation in Alzheimer's Disease Brain: A Focus on Acrolein. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21* (3), 741–756.

¹⁵² Lovell, M. A. *et al.* Oxidative DNA Damage in Mild Cognitive Impairment and Late-Stage Alzheimer's Disease. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7497–7504.

Le cerveau est un organe extrêmement sensible au DR, en effet celui-ci est riche en acides gras polyinsaturés et en métaux tels que le fer, avide en oxygène mais relativement pauvre en défense antioxydante.^{153,154}

4. Les antioxydants

Afin de combattre le stress oxydant et l'excès d'espèces réactives, la nature a mis à disposition des molécules capables d'agir contre ce phénomène, que l'on appelle communément des antioxydants.

Il va exister plusieurs niveaux de défense, le premier est constitué par les enzymes antioxydantes situées au cœur des cellules. On retrouve alors dans cette catégorie :

- Les superoxyde dismutases (SOD)
- La glutathion peroxydase (Gpx)
- Les glucodextrines
- Les thiorédoxines
- Et les catalases (CAS)

Certaines protéines non enzymatiques peuvent également jouer un rôle dans la régulation du DR en séquestrant les métaux. Pour le fer, impliqué dans les réactions de Fenton, il va exister la transferrine, la ferritine ou encore la lactoferrine présentes dans le sang, pour le cuivre, la céruloplasmine (ou ferroxidase) ainsi que l'albumine pourront jouer ce rôle et pour les autres ions métalliques, des métallothionéines seront présentes.

En plus de ces enzymes antioxydantes il va exister des substances de bas poids moléculaires endogènes ou apportées par l'alimentation qui vont également aider à réguler le taux de radicaux libres. C'est le cas entre autre du glutathion, de l'acide urique, de la bilirubine, de l'acide lipoïque, du coenzyme Q10, des vitamines E et C, des caroténoïdes et des polyphénols flavonoïdes...

La diminution des défenses enzymatiques et antioxydantes telle que décrite ci-dessus a été observée dans la MA. Le DR observé dans la maladie n'est donc pas seulement lié à une surproduction

¹⁵³ Markesbery, W. R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 23 (1), 134–147.

¹⁵⁴ Sultana, R. *et al.* A. Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, 19 (1), 341–353.

de ces espèces oxydantes mais bien à un mécanisme plus complexe menant à la diminution globale des défenses antioxydantes provoquant un déséquilibre de la balance vers la surcharge radicalaire.^{155,156}

a. Mécanisme d'action des antioxydants

Il existe plusieurs type d'antioxydants :

- Les antioxydants dits de sacrifice : ceux-ci vont capturer les espèces réactives par réaction de réduction ou d'addition comme par exemple l'ascorbate ou acide ascorbique (qui n'est autre que la vitamine C).
- Les antioxydants « scavenger » des espèces réactives formées, qui sont des espèces qui vont piéger les radicaux libres.
- Les antioxydants par inhibition de production d'espèces réactives, qui vont agir en amont de la production de ces espèces en agissant sur les voies de signalisations.

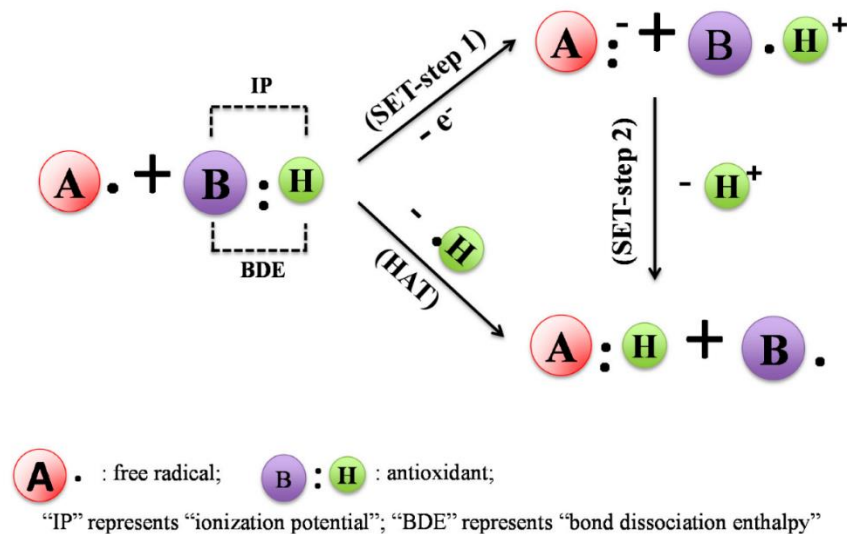


Figure 28 - Mécanisme d'action des antioxydants¹⁵⁷

Pour les antioxydants de type sacrificiels, qui représentent une grande partie des antioxydants apportés par l'alimentation, ceux-ci vont réagir selon deux grands types de mécanisme :

¹⁵⁵ Kim, T.-S. *et al.* Decreased Plasma Antioxidants in Patients with Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2006**, 21 (4), 344–348.

¹⁵⁶ Perry, G., *et al.* Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. and Biotech.*, **2002**, 2, 120 -123.

¹⁵⁷ Liang, N. *et al.* Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods That Define Mechanisms of Action. *Molecules* **2014**, 19 (11), 19180–19208.

- Le mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène ou HAT : il s'agit d'un mouvement concerté entre un proton et un électron en une seule étape cinétique comme le montre la Figure 28. Ici, le radical libre va venir arracher un atome d'hydrogène à l'antioxydant. Celui-ci, en réponse, va devenir un radical qui sera beaucoup plus stable et s'inactivera alors. L'enthalpie de dissociation est un paramètre important pour ce type d'antioxydant.
- Le mécanisme par transfert d'électron ou ET : un électron libre va être généré lors de l'action d'un nucléophile sur son substrat, cela va alors produire un intermédiaire radicalaire. Ici, l'antioxydant va mettre à disposition un de ses électrons à l'espèce radicalaire et se transformer lui-même en cation radicalaire. Le potentiel d'ionisation est très important pour les espèces antioxydantes utilisant ce mécanisme.

Il est cependant intéressant de noter que certains antioxydants pourront posséder les deux types de mécanisme, il est alors très compliqué de les différencier car ils se produisent en même temps. Pour déterminer la prépondérance d'un produit pour un mécanisme ou un autre il va exister différents essais *in vitro* dont certains utilisés au cours du projet de recherche seront présentés par la suite.

5. Déséquilibre radicalaire et MA

Le DR est un phénomène impliqué dans le vieillissement cellulaire et l'apoptose. De nombreux facteurs de risque connus de la MA, tels que l'hypertension artérielle, le diabète, les dyslipidémies ou les traumatismes cérébraux, sont d'ailleurs également liés à une augmentation de production des espèces radicalaires ou à une diminution de l'activité antioxydante endogène. Dans la MA, il va exister des anomalies de fonction et de morphologie de la mitochondrie. On observe pareillement des altérations du génome mitochondrial et des enzymes clés du métabolisme énergétique dans les formes génétiques. Cela va alors amener l'organisme à surproduire des EROs, ce qui aura comme conséquence de diminuer l'expression ou l'activité d'enzymes mitochondriales impliquées dans le métabolisme énergétique et ainsi de déséquilibrer encore plus l'équilibre oxydant de la cellule.¹⁵⁸

a. Déséquilibre radicalaire et pathologie amyloïde

¹⁵⁸ Domenico, F. D. *et al.* A. Strategy to Reduce Free Radical Species in Alzheimer's Disease: An Update of Selected Antioxidants. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15* (1), 19–40.

i. Coordination des peptides A β avec les ions métalliques

Les ions métalliques sont présents naturellement dans le corps et le cerveau. Ils ont pour principal rôle de catalyser des réactions au sein des sites actifs de diverses enzymes et peuvent être impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Dans la MA, l'homéostasie des ions métalliques est perturbée provoquant alors la surconcentration de certains de ces ions métalliques tel que le Cu ou le Zn à des doses supérieures à trois fois la dose physiologique.^{159,160} On retrouve par ailleurs le Cu, Le Zn et le Fe en forte concentration dans les plaques séniles.¹⁶¹

Ces métaux vont catalyser les réactions de Fenton et de Haber-Weiss et ainsi être impliqués dans la formation d'ERO. (voir paragraphe Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) Dans la MA, ces ions métalliques sont coordonnés avec les peptides A β pour former Cu-A β ou Fe-A β . On sait que le Zn se coordonne également avec les peptides A β cependant, à l'heure actuelle, les effets de cette coordination ne sont pas clairs. Le fer provenant de la ferritine va se lier au peptide A β sous forme de Fe(II) et va ainsi participer à la formation d'ERO.

ii. Oligomères A β

D'après certaines hypothèses, le DR induit par A β serait la conséquence principale de l'accumulation des A β os tels que décrit dans la Figure 10. Les oligomères sont capables de passer dans la bicouche lipidique là où ils pourraient alors former des hélices α et commencer à catalyser la production d'ERO ayant pour conséquences de provoquer la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines.^{31,33}

Certaines études sur des modèles murins ont par ailleurs confirmé le lien entre A β et DR en suggérant l'implication de la méthionine 35 des peptides A β dans le mécanisme oxydant observé. Cela menant à des liaisons entre protéines et à l'agrégation en peptides A β . Ce mécanisme aurait également un rôle à jouer dans l'agrégation de Tau et d'autres protéines du cytosquelette.¹⁶²

¹⁵⁹ Maynard, C. J. *et al.* Metals and Amyloid- β in Alzheimer's Disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86* (3), 147–159.

¹⁶⁰ Kozlowski, H. *et al.* Copper, Zinc and Iron in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's, Parkinson's and Prion Diseases). *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19), 2129–2141.

¹⁶¹ Lovell, M. A. *et al.* Copper, Iron and Zinc in Alzheimer's Disease Senile Plaques. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158* (1), 47–52.

¹⁶² Butterfield, D. A. *et al.* The Critical Role of Methionine 35 in Alzheimer's Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1703* (2), 149–156.

b. Déséquilibre radicalaire et dysfonction mitochondriale

Les mitochondries sont primordiales à la survie humaine, elles sont au centre du métabolisme cellulaire et de la production d'énergie de celle-ci. De nombreux articles de la littérature scientifique relatent le lien entre le DR et les dysfonctionnements mitochondriaux menant à la surproduction d'EROs.^{163–165}

La chaîne respiratoire de la mitochondrie est responsable de la majorité de la production en EROs ainsi que de leur détoxification dans la cellule. Cela la rend extrêmement vulnérable à un potentiel DR. Avec l'âge, la production de radicaux libres augmente naturellement provoquant ainsi des anomalies de fonction et une altération de la membrane mitochondriale où se trouve la majorité des enzymes antioxydantes. Cette membrane mitochondriale va alors elle-même s'engager dans un phénomène de peroxydation des lipides alimentant le DR.^{163,164,166}

De nombreuses anomalies mitochondriales et métaboliques ont été identifiées dans les neurones de patients atteints de la MA en comparaison avec des personnes âgées non pathologiques, avec notamment une augmentation des EROs et une réduction du stockage d'énergie, induisant alors un processus neurodégénératif.^{167–169}

c. Déséquilibre radicalaire et homéostasie des métaux

La dérégulation de l'homéostasie des métaux de transition tel que le Cuivre, le Zinc et le fer peut également aboutir à des effets neurotoxiques médiés par les radicaux libres mais aussi par leur complexation avec les peptides A β par exemple. Fe(II) et Cu(I) peuvent notamment directement interagir avec le peroxyde d'hydrogène et catalyser la production de \cdot OH un des radicaux les plus

¹⁶³ Ferreiro, E. *et al.* Mitochondrial-and Endoplasmic Reticulum-Associated Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Biomarkers. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, doi :10.1155/2012/735206.

¹⁶⁴ Mancuso, M. *et al.* Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *10* (1), 59–73.

¹⁶⁵ Ohta, S. *et al.* Dysfunction of Mitochondria and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: On Defects in the Cytochrome c Oxidase Complex and Aldehyde Detoxification. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *9* (2), 155–166.

¹⁶⁶ Lanzillotta, C. *et al.* Targeting Mitochondria in Alzheimer Disease: Rationale and Perspectives. *CNS Drugs* **2019**, *33* (10), 957–969.

¹⁶⁷ Aa, S. *et al.* Mitochondrial Abnormalities in Cortical Dendrites from Patients with Alzheimer's Disease. *J. Submicrosc. Cytol.* **1985**, *17* (3), 459–464.

¹⁶⁸ Hirai, K. *et al.* Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21* (9), 3017–3023.

¹⁶⁹ Saraiva, A. A. *et al.* Mitochondrial Abnormalities in Cortical Dendrites from Patients with Alzheimer's Disease. *J. Submicrosc. Cytol.* **1985**, *17* (3), 459–464.

réactif. La présence de Cu, Zn et Fe au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale, zones cérébrales particulièrement touchées par la MA, a par ailleurs été démontrée confirmant l'implication de ces métaux dans la physiopathologie de la MA.¹⁷⁰⁻¹⁷³

d. Déséquilibre radicalaire et neuroinflammation

La neuroinflammation est un phénomène qui a émergé ces dernières années comme participant grandement à la mise en place de la MA. Ce phénomène va dépendre principalement de l'activation de la microglie et des astrocytes ainsi que de l'augmentation du taux de médiateurs de l'inflammation tels que les IL-1 β , TNF- α , TGF β .^{50,174}

L'activation des cellules cytotoxiques de la microglie et l'augmentation des cytokines pro inflammatoires peuvent engendrer une surproduction des EROs. Le statut redox des cellules module la concentration et production des cytokines par des processus de signalisation, qui sont des médiateurs impliqués dans les phénomènes de stress oxydant, de la neuroinflammation et de la neurodégénération. Le DR lui de son côté, provoque également une augmentation de production des cytokines. Ces deux phénomènes de neuroinflammation et de DR sont alors étroitement liés dans un cercle vicieux autoalimentant la neurodégénération observée dans la MA.^{175,176}

e. Rôle central du déséquilibre radicalaire

En prenant tout cela en considération, le DR semble être responsable en partie ou au moins lié de manière collatérale à plusieurs processus biologiques impliqués dans le MA tel que l'A β , les dysfonctions mitochondriales, la dyshoméostasie des métaux et la neuroinflammation.

L'accumulation de A β et Tau est liée à l'augmentation de la production d'ERO ce qui provoque un cercle vicieux et engendrer une plus grande neurotoxicité de ces protéines tout en amplifiant et

¹⁷⁰ Zhao, Y. *et al.* Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013.

¹⁷¹ Deibel, M. A. *et al.* Copper, Iron, and Zinc Imbalances in Severely Degenerated Brain Regions in Alzheimer's Disease: Possible Relation to Oxidative Stress. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *143* (1), 137–142.

¹⁷² Budimir, A. Metal Ions, Alzheimer's Disease and Chelation Therapy. *Acta Pharm.* **2011**, *61* (1), 1–14.

¹⁷³ Huang, X. *et al.* The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. *Biochemistry* **1999**, *38* (24), 7609–7616.

¹⁷⁴ Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer Disease: Driving Force, Bystander or Beneficial Response? *Nat. Med.* **2006**, *12* (9), 1005–1015.

¹⁷⁵ Heppner, F. L. *et al.* Immune Attack: The Role of Inflammation in Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, *16* (6), 358–372.

¹⁷⁶ Von Bernhardi, R. Glial Cell Dysregulation: A New Perspective on Alzheimer Disease. *Neurotox. Res.* **2007**, *12* (4), 215–232.

propageant la MA. On ne sait pas encore s'il s'agit d'un évènement primaire ou secondaire, ce que l'on sait cependant c'est que le DR ou SO est incontournable dans la MA comme le montre la Figure 29.

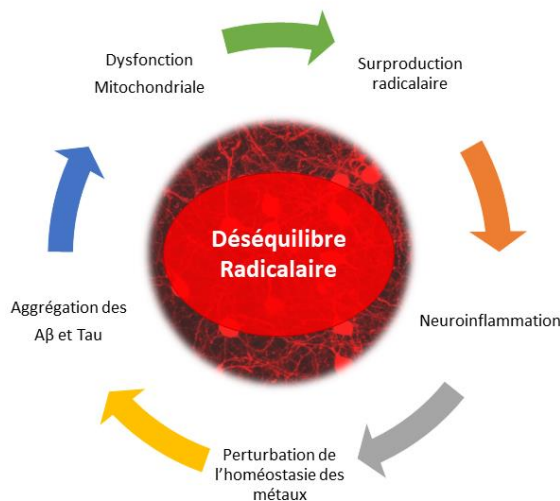


Figure 29 - Interconnexions entre DR et les facteurs clés dans la MA

La réduction de ce DR, de par la réduction des EROs notamment, pourrait alors permettre de retarder l'apparition ou l'avancée de la maladie en agissant sur toutes les cascades physiopathologiques.

6. Les antioxydants comme stratégie thérapeutique dans la MA

De nombreux tests cellulaires et pré-cliniques ont été réalisés ces dernières années dans le but d'étudier l'effet des différents antioxydants sur le DR généré dans la MA. Les principales molécules étudiées et leurs effets ont été résumés dans le Tableau 1 suivant.

Composé	Structure	Effet principaux sur le DR	Ref
N-acétylcystéine	<chem>CC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)O</chem>	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la formation de glutathion • Réduit la peroxydation des protéines • Protection contre l'apoptose • Réduction de la toxicité des aβ 	177-179
Vitamine E	<chem>CC1=C(C)C(C)=C(C)C1O[C@H]2CC[C@@H](CCCC(C)C)[C@H]2C</chem>	<ul style="list-style-type: none"> • Réduit la peroxydation des lipides • Réduit l'oxydation des lipoprotéines 	149,180

Chapitre 2 : Conception de composés pléiotropes

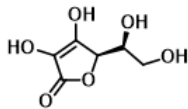
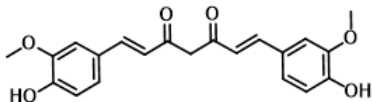
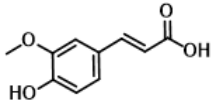
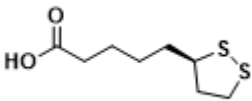
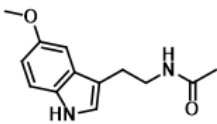
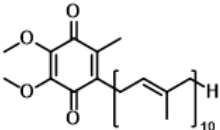
		<ul style="list-style-type: none"> • Réduit la production d'ERO 	
Vitamine C		<ul style="list-style-type: none"> • Empêche l'augmentation du Ca intracellulaire induit par Aβ • Piège les EROs 	181,182
Curcumine		<ul style="list-style-type: none"> • Piège les EROs et inhibe leur formation • Protège de la peroxydation des lipides, et de l'ADN • Augmentent les défenses enzymatiques • Possède des propriétés anti-inflammatoires 	183-185
Acide Férulique		<ul style="list-style-type: none"> • Piège les EROs • Réduit IL-1β (médiateur de l'inflammation) • Réduit la formation de Aβ, ainsi que leur dépôt • Améliore les propriétés cognitives chez le modèle murin 	186-189
Acide Lipoïque		<ul style="list-style-type: none"> • Améliore les propriétés cognitives chez le modèle murin • Diminue le SO mitochondrial 	190-192
Mélatonine		<ul style="list-style-type: none"> • Empêche la peroxydation des lipides • Empêche l'augmentation du Ca intracellulaire induit par Aβ • Induit des défenses enzymatiques antioxydantes 	193-195
Coenzyme Q10		<ul style="list-style-type: none"> • Réduit la production de ROS mitochondrial • Diminue les dépôts Aβ et de leur production • Réduit la neuroinflammation sur modèle murin • Améliore les fonctions cognitives sur des modèles murins 	196-199

Tableau 1 - Récapitulatif des principaux antioxydants étudiés dans la MA et leurs principaux effets

Bien qu'ils aient été l'objet de nombreux essais précliniques et qu'ils aient montré des effets prometteurs sur des modèles cellulaires ou murin, à ce jour, aucun antioxydant n'a été mis sur le marché contre la MA. En effet la majorité des antioxydants étudiés n'ont pas réussi à montrer une réelle efficacité sur les patients atteints de la MA durant les essais cliniques, cependant cela pourrait être en partie à cause du faible passage de ces molécules dans le SNC due à leur forte polarité.

-
- ¹⁷⁷ Kerkick, C. *et al.* The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2005**, *2* (2), 38.
- ¹⁷⁸ Dodd, S. *et al.* N-Acetylcysteine for Antioxidant Therapy: Pharmacology and Clinical Utility. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8* (12), 1955–1962.
- ¹⁷⁹ Zhu, X. *et al.* Mitochondrial Abnormalities and Oxidative Imbalance in Alzheimer Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *9* (2), 147–153.
- ¹⁸⁰ Sung, S. *et al.* Early Vitamin E Supplementation in Young but Not Aged Mice Reduces A β Levels and Amyloid Deposition in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *FASEB J.* **2004**, *18* (2), 323–325.
- ¹⁸¹ Yallampalli, S. *et al.* Ascorbic Acid Prevents β -Amyloid-Induced Intracellular Calcium Increase and Cell Death in PC12 Cells. *Neurosci. Lett.* **1998**, *251* (2), 105–108.
- ¹⁸² Montilla-López, P. *et al.* Comparison of Melatonin versus Vitamin C on Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Alzheimer's Disease Induced by Okadaic Acid in Neuroblastoma Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *451* (3), 237–243.
- ¹⁸³ Belkacemi, A. *et al.* Challenges Associated with Curcumin Therapy in Alzheimer Disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*.
- ¹⁸⁴ Sreejayan; Rao, M. N. A. Curcuminoids as Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46* (12), 1013–1016.
- ¹⁸⁵ Strimpakos, A. S. *et al.* Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *10* (3), 511–546.
- ¹⁸⁶ Mori, T. *et al.* Ferulic Acid Is a Nutraceutical β -Secretase Modulator That Improves Behavioral Impairment and Alzheimer-like Pathology in Transgenic Mice. *PLOS ONE* **2013**, *8* (2), e55774.
- ¹⁸⁷ Srinivasan, M *et al.* Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2007**, *40* (2), 92–100.
- ¹⁸⁸ Yan, J.-J. *et al.* Protective Effects of Ferulic Acid in Amyloid Precursor Protein Plus Presenilin-1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36* (1), 140–143.
- ¹⁸⁹ Sgarbossa, A *et al.* Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients* **2015**, *7* (7), 5764–5782.
- ¹⁹⁰ Moreira, P. I. *et al.* Lipoic Acid and N-Acetyl Cysteine Decrease Mitochondrial-Related Oxidative Stress in Alzheimer Disease Patient Fibroblasts. *J. Alzheimers Dis.* **2007**, *12* (2), 195–206.
- ¹⁹¹ Packer, L. *et al.* Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19* (2), 227–250.
- ¹⁹² Zhang, Y.-H. *et al.* α -Lipoic Acid Improves Abnormal Behavior by Mitigation of Oxidative Stress, Inflammation, Ferroptosis, and Tauopathy in P301S Tau Transgenic Mice. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 535–548.
- ¹⁹³ Dp, C. *et al.* The Use of Melatonin in Alzheimer's Disease. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2002**, *23* Suppl 1, 20–23.
- ¹⁹⁴ Reiter, R. J. *et al.* Melatonin as a Pharmacological Agent against Neuronal Loss in Experimental Models of Huntington's Disease, Alzheimer's Disease and Parkinsonism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *890* (1), 471–485.
- ¹⁹⁵ Olcese, J. M. *et al.* Protection against Cognitive Deficits and Markers of Neurodegeneration by Long-Term Oral Administration of Melatonin in a Transgenic Model of Alzheimer Disease. *J. Pineal Res.* **2009**, *47* (1), 82–96.
- ¹⁹⁶ Dumont, M *et al.* Coenzyme Q10 Decreases Amyloid Pathology and Improves Behavior in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *27* (1), 211–223.
- ¹⁹⁷ Spindler, M *et al.* Coenzyme Q10 Effects in Neurodegenerative Disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2009**, *5*, 597.
- ¹⁹⁸ Yang, X. *et al.* Coenzyme Q10 Reduces β -Amyloid Plaque in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *41* (1), 110–113.
- ¹⁹⁹ Young, A. J. *et al.* Coenzyme Q10: A Review of Its Promise as a Neuroprotectant. *CNS Spectr.* **2007**, *12* (1), 62–68.

IV. La stratégie polypharmacologique

1. Introduction

Comme décrit précédemment, la maladie d'Alzheimer est une maladie à la fois complexe et multifactorielle. Les différentes thérapies ne visant qu'une seule cause moléculaire de la maladie au travers d'une seule cible semblent être au mieux inefficaces ou au pire mener à l'aggravation de l'état cognitif des patients.²⁰⁰

Dans les démarches traditionnelles de chimie thérapeutique, on identifie une cible pour laquelle on cherche un composé actif. C'est un paradigme qui est encore très utilisé en chimie thérapeutique à l'heure actuelle et qui a permis d'obtenir de nombreux médicaments sur le marché.

Bien que certaines molécules aient été conçues pour n'interagir qu'avec une seule cible, de par la complexité du corps humain, il est alors possible d'imaginer que celle-ci puisse interagir à d'autres niveaux. Par exemple, l'imatinib développé comme un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase liée à BCR-ABL, s'avère également inhiber la protéine kinase C-ABL dans les cellules non tumorales. Ces deux activités conjointes peuvent expliquer en elles mêmes l'efficacité de cette molécule dans les leucémies myéloïdes chroniques.²⁰²

2. Définition

La polypharmacologie concerne l'utilisation d'agents thérapeutiques pour agir sur plusieurs cibles ou voies de signalisations. Elle peut être divisé en deux grand types de stratégies :²⁰³

- La première est la combinaison de plusieurs agents thérapeutiques distincts, à co-administrer afin d'obtenir un effet synergique des deux composés ; elle peut se subdiviser en 2 grandes classes :

²⁰⁰ Mehta, D. *et al.* Why Do Trials for Alzheimer's Disease Drugs Keep Failing? A Discontinued Drug Perspective for 2010-2015. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26* (6), 735–739.

²⁰¹ Valeur, E. *et al.* New Modalities, Technologies, and Partnerships in Probe and Lead Generation: Enabling a Mode-of-Action Centric Paradigm. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (20), 9004–9029.

²⁰² Capdeville, R. *et al.* Glivec (STI571, Imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 493–502.

²⁰³ Morphy, R. *et al.* The Physicochemical Challenges of Designing Multiple Ligands. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (16), 4961–4970.

- La co-administration de molécules distinctes (A) : chacune des molécules va posséder son dosage et sa forme galénique qui lui est propre.
- La co-administration au sein d'une même forme galénique (B) : les deux molécules vont être formulées ensemble. Par exemple, en 2014 la FDA a autorisé la mise sur le marché de la co-administration du donépézil et de la mémantine sous une seule forme galénique au nom de Namzaric®.²⁰⁴
- Le deuxième est l'utilisation d'une molécule ciblant plusieurs cibles (C). Ce concept de polypharmacologie suggère qu'une molécule sera plus efficace si elle agit sur plusieurs cibles simultanément.

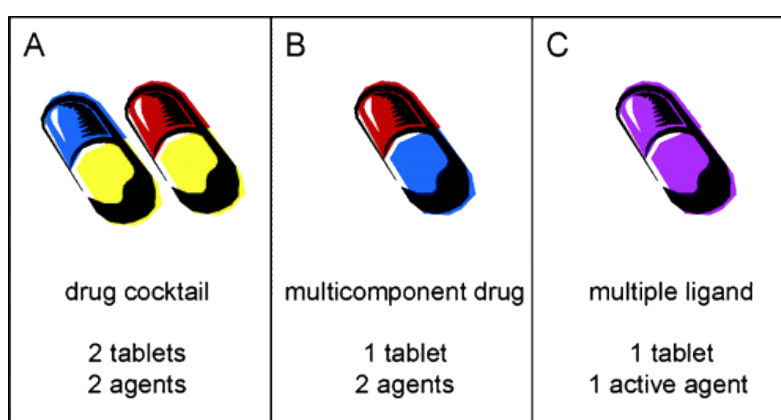


Figure 30 - Stratégies polypharmacologiques possibles d'après Morphy *et al.*²⁰³

La co-administration de composés va cependant présenter quelques limites. En effet, chez les patients atteints de la MA, la co administration de deux comprimés peut résulter en un risque accru de défaut d'observance, de plus des problèmes d'interaction entre les deux molécules peuvent survenir et induire une augmentation de la toxicité. De même pour les molécules formulées sous une seule entité galénique il existe des risques d'incompatibilité chimique entre les deux molécules empêchant leur formulation commune ainsi que les mêmes problèmes d'iatrogénie que pour l'association de molécules. L'utilisation d'une seule et même molécule agissant sur plusieurs cibles permet alors de s'affranchir de ces différentes limites.²⁰⁵

²⁰⁴ Deardorff, W. J. *et al.* A Fixed-Dose Combination of Memantine Extended-Release and Donepezil in the Treatment of Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 3267–3279.

²⁰⁵ Albertini, C. *et al.* From Combinations to Multitarget-directed Ligands: A Continuum in Alzheimer's Disease Polypharmacology. *Med. Res. Rev.* **2020**.

Une fois les cibles sélectionnées, il va exister plusieurs approches de conception des MTDL.

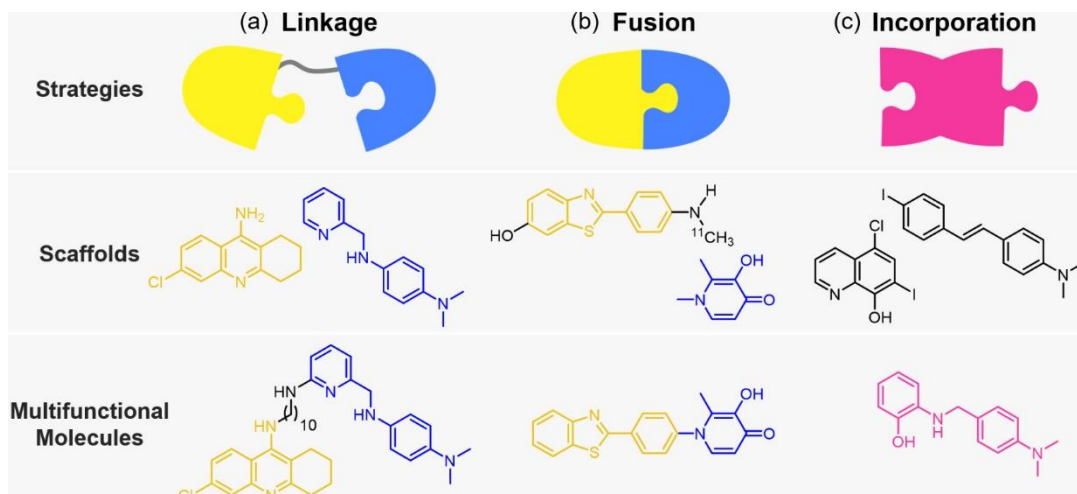


Figure 31 - Stratégies de développement de MTDLs.²⁰⁶

- La liaison : deux molécules distinctes ne possédant pas d'analogie structurale vont simplement être reliées l'une à l'autre par l'ajout d'un linker de taille variable. Dans l'exemple Figure 31 (a), on voit bien l'exemple de liaison entre la chlorotacrine, un inhibiteur d'AChE et L2-b, un modulateur de l'agrégation Aβ. L'ajout du linker permet une certaine flexibilité permettant aux deux composés d'interagir avec leur cible plus aisément.
- La fusion : les deux molécules vont être reliées l'une à l'autre en mettant en commun certains atomes sans la présence de linker. Cela permet l'obtention de molécules de plus faible poids moléculaire et ainsi d'améliorer la biodisponibilité du composé final. Cependant les deux cibles doivent pouvoir accepter une certaine variabilité chimique, ce qui n'est pas le cas pour toutes les cibles. Dans l'exemple Figure 31 (b), le C-PIB, un marqueur des plaques Aβ est couplé avec le déferiprone, un chélateur de fer.
- L'incorporation : l'incorporation est possible lorsque les cibles choisies possèdent une certaine homologie de leurs sites d'interaction avec leurs ligands. Cette homologie doit permettre de créer un compromis entre les deux molécules d'intérêt. Cela permet également d'obtenir des composés de plus petit poids moléculaire ou de plus faible polarité permettant d'améliorer l'absorption ou le passage des barrières physiologiques. Dans l'exemple Figure 31 (c), le para-iodo-distilbène a été incorporé au clioquinol permettant l'obtention d'une nouvelle molécule.

²⁰⁶ Savelieff, M. G. *et al.* Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1221–1322.

C'est en 2008 que Cavalli, Bolognesi *et al.* ont amené la notion de polypharmacologie dans les maladies neurodégénérative en introduisant la notion de **Multi-target directed ligand** ou MTDL. Ces composés appartenant à cette deuxième stratégie de polypharmacologie, sont des agents qui vont être conçus pour interagir avec une ou plusieurs cibles distinctes.²⁰⁷

3. Travaux de l'axe polypharmacologique du laboratoire

L'axe polypharmacologique est depuis de nombreuses années développé au laboratoire. L'un des projets les plus aboutis est la découverte du donécopride dans le cadre du traitement de la MA.

a. MTDL à activité agoniste 5-HT₄/ inhibiteur d'AChE

Ce projet est né de l'association des cibles que sont l'AChE et le récepteur 5-HT₄. En effet, des études préliminaires réalisées par Freret *et al.* ont permis de montrer que la co-administration du composé RS-67333 (0.3 mg/kg et 1mg/kg) et du donépézil (1 mg/kg) permettait une amélioration de la mémoire épisodique chez la souris alors qu'à ces même doses les produits seuls ne produisent pas d'effet thérapeutique. Cet effet était inversé lors de l'administration de GR125487, un antagoniste des récepteurs 5-HT₄ démontrant ainsi l'effet synergique entre les deux modes d'action.

De par leur analogie structurale, différents composés ont ainsi été conçus de manière à garder la partie aminochlorobenzophénone du RS-67333 ainsi que la partie pipéridine sur laquelle des substituants de nature à inhiber l'AChE seraient installés. Cela a permis l'obtention d'une première série de nouveaux dérivés. De précédents travaux par Lecoutey *et al.* sur des composés possédant un noyau aromatique pyrrolothiénopyrazine avaient déjà montré une inhibition de l'AChE sur le composé où le benzyle proximal avait été remplacé par un cyclohexyle.²⁰⁸ Cette même stratégie a été appliquée ici, en remplaçant le benzyle du donépézil par un groupement cyclohexyle afin d'obtenir le donécopride (Figure 32).

²⁰⁷ Cavalli, A. *et al.* Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (3), 347–372.

²⁰⁸ Lecoutey, C. *et al.* Synthesis of Dual AChE/5-HT₄ Receptor Multi-Target Directed Ligands. *Med. Chem. Comm.* **2012**, 3 (5), 627–634.

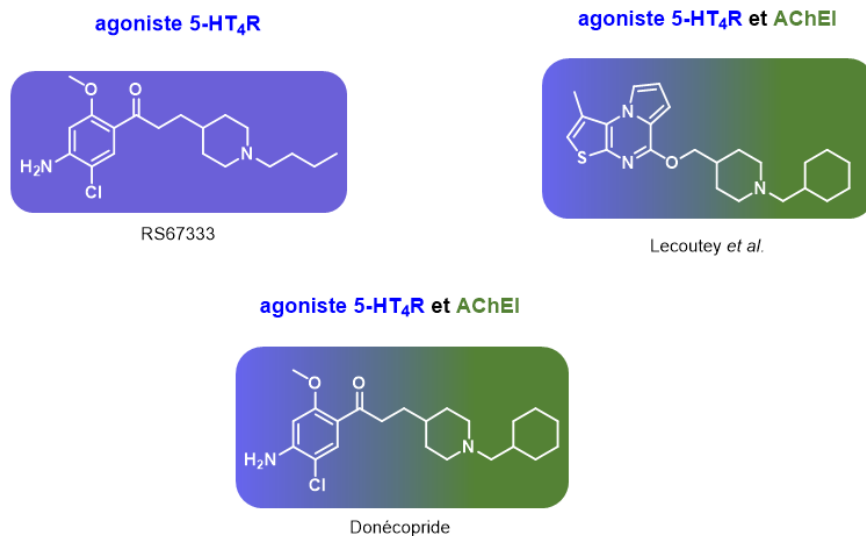


Figure 32 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/inhibiteur AChE.

En comparaison avec les autres composés synthétisés, le donécopride a été le meilleur compromis, en effet celui-ci est très puissant sur les deux cibles et possède un K_i de 7,1 nM sur 5-HT₄R ainsi qu'une IC_{50} de 16 nM pour l'AChE. Les études ont confirmé son profil agoniste du 5-HT₄R ainsi qu'inhibiteur non compétitif de l'AChE. Celui-ci a donc été testé sur deux modèles murins à des doses de 1 à 9 mg par kg.^{209,210} Les résultats ont montré une synergie d'action du donécopride comparé au RS-67333 et au donépézil. Ce composé a montré un large éventail d'effets thérapeutiques, tels que des effets anti-amnésiques, une diminution des dépôts amyloïdes cérébraux, un effet neuroprotecteur et un effet neurotrophique en favorisant la formation de nouvelles synapses.²¹¹

Des études de docking ont été réalisées sur le donécopride afin de mieux comprendre ses interactions avec le récepteur 5-HT₄. On observe alors que l'aniline forme une liaison hydrogène avec la sérine 197, la cétone forme une liaison de type électrostatique avec la thréonine 104 et l'azote basique de la pipéridine forme une liaison hydrogène avec l'acide aspartique 100. Des phénomènes de π -stacking semblent également jouer un rôle dans la liaison du donécopride à sa cible.²¹² On peut également voir que la partie proximale de la molécule semble dénuée d'interaction avec le récepteur,

²⁰⁹ Lecoutey, C. *et al.* Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), 3825–3830.

²¹⁰ Rochais, C. *et al.* Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3172–3187.

²¹¹ Rochais, C. *et al.* Donecopride, a Swiss Army Knife with Potential against Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (9), 1988–2005.

laissant alors une ouverture quant à la substitution de la pipéridine par différents groupements chimiques.

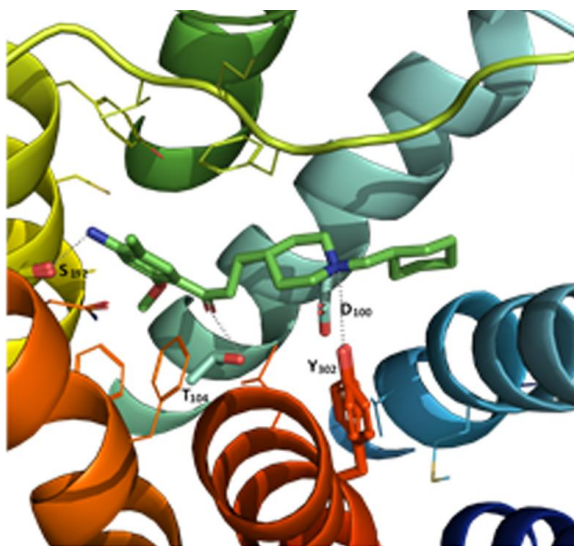


Figure 33 - Positionnement du donécopride au sein du récepteur 5-HT₄ issu d'étude de docking.²¹²

Cette liberté dans la modulation du substituant de la pipéridine a permis le développement de nouveaux axes de recherche avec notamment la création de MTDL à la fois agonistes des récepteurs 5-HT₄ et antagonistes des récepteurs 5-HT₆ qui seront développés par la suite.

b. MTDL à activité agoniste 5-HT₄/ antagoniste 5-HT₆

L'action des agonistes envers le récepteur 5-HT₄ a été étudiée précédemment, mais il existe d'autres récepteurs sérotoninergiques d'intérêt dans la MA. C'est le cas des récepteurs 5-HT₆. Ils sont impliqués dans les phénomènes d'apprentissage, de mémorisation mais également dans la dépression et l'anxiété qui sont des facteurs de risque connus de la MA. Il s'agit d'un RCPG couplé à une protéine Gs comme le récepteur 5-HT₄. Son activation mène cependant à la diminution de l'influx cholinergique.^{213,214} A l'inverse, sa désactivation grâce à un antagoniste va permettre une augmentation de production d'ACh ce qui aura pour effet de stimuler les effets procognitifs mais également de mieux contrôler l'humeur avec des effets antidépresseurs et anxiolytiques.²¹

²¹² Lalut, J. *et al.* Rational Design of Novel Benzisoxazole Derivatives with Acetylcholinesterase Inhibitory and Serotonergic 5-HT₄ Receptors Activities for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–11.

²¹³ Lalut, J. *et al.* Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795.

²¹⁴ Ramirez, M. J. 5-HT₆ Receptors and Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2013**, *5* (2), 15.

Cette stratégie (Figure 34) a été appliquée avec succès par Yahiaoui *et al.* et le développement des premiers composés visant deux récepteurs sérotoninergiques en exprimant un profil différent a été menée à bien. Le hit obtenu dans ce projet était très puissant envers le récepteur 5-HT₄ avec un K_i de 5,3 nM mais plus modérément actif avec une IC₅₀ de 219 nM sur 5-HT₆R. Ce composé a été conçu de telle manière à lier un motif antagoniste des récepteurs 5HT₆ inspiré du SB-271046, un antagoniste de référence de ce récepteur à un motif agoniste 5-HT₄ grâce à un linker éthylamine qui n'a alors démontré aucune incidence sur l'activité envers le récepteur 5-HT₄ et permettait de garder la basicité de l'azote de la pipéridine. Ce composé a été évalué sur un modèle *in vivo* en montrant des effets anti-amnésiques à la dose de 1 mg/kg²¹⁵

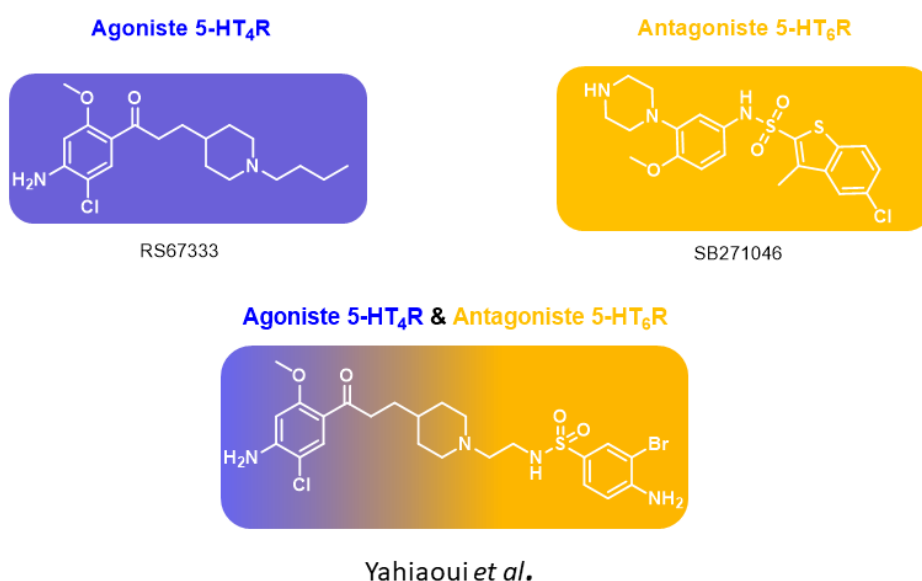


Figure 34 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/antagoniste 5-HT₆.

c. Développement de MTDL triple action : projet TRIAD

Suite à ces résultats encourageants, une nouvelle série de composés a été imaginée combinant les trois actions précédemment décrites, l'agonisme envers 5-HT₄R, l'antagonisme envers 5-HT₆R et l'inhibition de l'AChE. Ces travaux ont mené à la découverte du composé pléiotrope représenté Figure 35 décrit par Hatat *et al.* en 2019.²¹⁶

²¹⁵ Yahiaoui, S. *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–293.

²¹⁶ Hatat, B. *et al.* A Novel *In Vivo* Anti-Amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT₆R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*.

Ce composé sous sa forme de fumarate s'est avéré être le meilleur compromis pour les trois activités ciblées, avec un K_i 5-HT₄R de 210 nM, un K_i de 219 nM sur 5-HT₆R et une IC₅₀ de 33,7 nM pour l'AChE. Il a alors été évalué dans un modèle *in vivo* de la MA, et les résultats obtenus indiquent une absence de toxicité jusqu'à la dose élevée de 100 mg/kg.²¹⁶ Un effet anti-amnésique dans le test de déficience induit par la scopolamine a été observé à la dose 0,3 mg/kg rappelant les résultats obtenus par le donépéride.²¹⁰

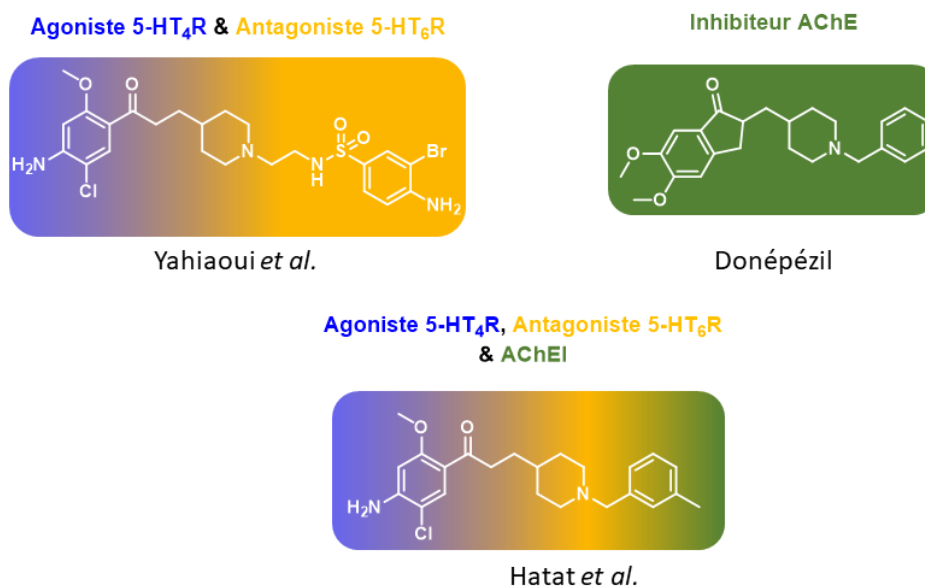


Figure 35 - Stratégie de développement de MTDL à action agoniste 5-HT₄/inhibiteur AChE/ antagoniste 5-HT₆.

Un lien entre ce projet TRIAD et le projet de cette thèse a été réalisé et ses résultats seront présentés dans l'article 3 en annexe avec notamment le développement des composés au motif proximal bromo-phénol.

d. Développement de MTDL prodrogues : inhibiteur l'AChE et agoniste des 5-HT₄R

Dans la continuité de ces premiers travaux, une nouvelle stratégie de développement de prodrogues multi-cibles est apparue au travers des travaux de thèse de François-Xavier Toublet. Comme décrits dans la Figure 36, un motif carbamate a été greffé à une molécule donnée, celui-ci permettant alors d'améliorer le passage de la BHE tout en ayant une affinité pour l'AChE. Le carbamate est un groupement hydrolysé par l'AChE, cela va alors permettre le relargage de la molécule d'intérêt

à propriété pléiotrope à la fois agoniste des récepteur 5-HT₄ et inhibiteur réversible des sites périphérique et catalytique de l'AChE.²¹⁷

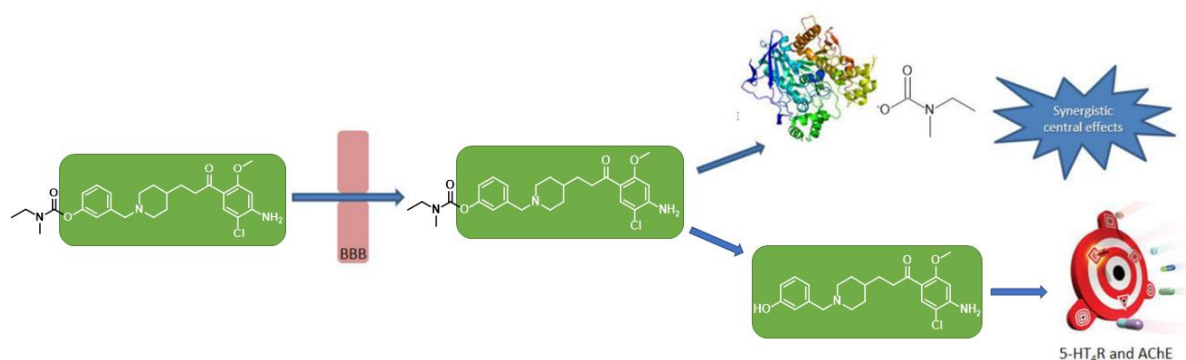


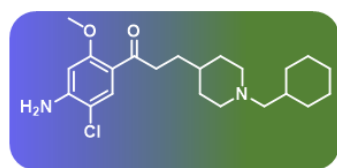
Figure 36 - Concept de la prodrogue multi-cible d'après Toublert *et al.*²¹⁷

Cette nouvelle stratégie a permis l'obtention des composés décrits dans la Figure 36, analogues structuraux entre le donécopride et la rivastigmine, deux inhibiteurs de l'AChE. Les composés carbamoylé et phénolique sous leurs formes de fumarate ont été évalués premièrement sur des essais *in vitro* permettant de valider leur interaction à leur cible. Le composé prodrogue carbamoylé a alors démontré une IC₅₀ de 6,1 μM sur l'AChE ainsi qu'une faible interaction pour le récepteur 5-HT₄. Le composé phénolique, lui, s'est avéré être très puissant envers 5-HT₄R avec un K_i de 6,9 nM et une IC₅₀ de 72 nM sur l'AChE. Les profils pharmacologiques ont alors été étudiés permettant de confirmer le profil agoniste du composé phénolique sur 5-HT₄R et inhibiteur réversible envers l'AChE pour les composés phénolique et carbamoylé. De plus le passage de la BHE du composé carbamoylé a été évalué au travers un test de passage de membrane artificielle avec un Log Pe de -4,39 (Pe représentant le coefficient effectif de perméabilité après test PAMPA). Celui-ci est proche de celui retrouvé avec la cortisone (Log Pe= -4,84), un composé ayant une bonne perméabilité de la BHE.

Des tests sur modèle *in vivo* murin ont alors été réalisés avec le composé carbamoylé montrant des propriétés anti-amnésiques sur les deux modèles murins dont le déficit cognitif a été provoqué par la scopolamine ou par MK801. Ces premiers résultats encourageants ont permis de valider la preuve de concept notamment sur le relargage du composé phénolique à partir du carbamate.

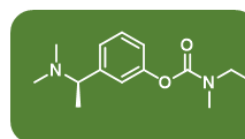
²¹⁷ Toublert, F.-X. *et al.* Inhibiting Acetylcholinesterase to Activate Pleiotropic Prodrugs with Therapeutic Interest in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2786.

agoniste 5-HT₄R et AChEI



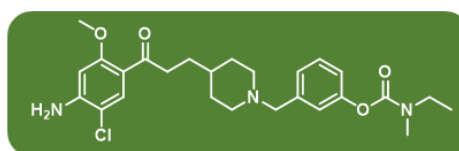
Donécopride

AChEI

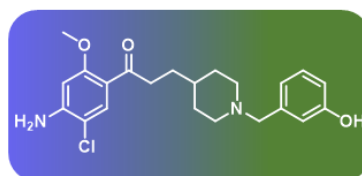


Rivastigmine

Prodrogue AChEI



agoniste 5-HT₄R et AChEI



Toubllet *et al.*

Figure 37 - Composés prodrogues multi-cibles développés par Toubllet *et al.*

4. Les composés polypharmacologiques à propriétés antioxydantes

Comme établi dans la partie III. Le stress oxydant ou déséquilibre radicalaire, celui-ci va jouer un rôle central dans la MA en étant impliqué dans plusieurs processus physiopathologiques de la maladie. Assez logiquement, lier une action antioxydante à une autre cause moléculaire de la maladie pourrait donc permettre d'obtenir un effet synergique. De plus, les antioxydants seuls sont souvent des composés polaires n'étant pas forcément compatibles avec le passage des barrières (intestinale ou BHE) et se sont ainsi montrés décevants dans les essais cliniques.²¹⁸ Des stratégies de couplage à d'autres structures plus lipophiles sont alors apparues comme un moyen d'amener ces composés dans le SNC tout en agissant sur une autre cible. Ce paragraphe ne présentera que quelques exemples afin d'expliquer la stratégie menée au sein de ces travaux de thèse, il existe cependant des revues plus exhaustives présentant les MTDLs aux motifs antioxydants dans la littérature.^{206,219}

²¹⁸ Persson, T. *et al.* Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 2014, 427318.

²¹⁹ Ismaili, L. *et al.* Multitarget-Directed Antioxidants as Therapeutic Agents: Putting the Focus on the Oxidative Stress. In *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*; Decker, M., Ed.; Elsevier, **2017**; 5–46.

a. Découverte de la mémoquine

La mémoquine a été développée et décrite par Bolognesi *et al.* en 2009. Elle est l'analogue structural de deux composés, la caproctamine et l'idebenone un dérivé du coenzyme Q10. La caproctamine est un inhibiteur de l'AChE ainsi qu'un antagoniste des récepteurs muscariniques M2. Ces deux actions permettent alors à ce composé de favoriser la production de l'ACh et ainsi d'avoir des effets pro-cognitifs. Sa structure dimérique et flexible est un atout majeur permettant à ce composé d'inhiber le site catalytique et périphérique de l'AChE, empêchant alors ce dernier d'interagir avec A β et de favoriser la formation de fibrilles.^{220,221} L'idebenone est un dérivé du coenzyme Q10, un puissant antioxydant déjà étudié pour ses propriétés dans la MA. En lui-même il n'est pas actif, mais dans le milieu physiologique il va être pris en charge par la NAD(P)H déshydrogénase (NQO1) qui va alors réduire la quinone en hydroxyquinone, qui elle, est antioxydante. Les NQO1 sont augmentées dans la MA, permettant alors de potentialiser l'action de ce composé dans les zones où la maladie est la plus exprimée.²²²

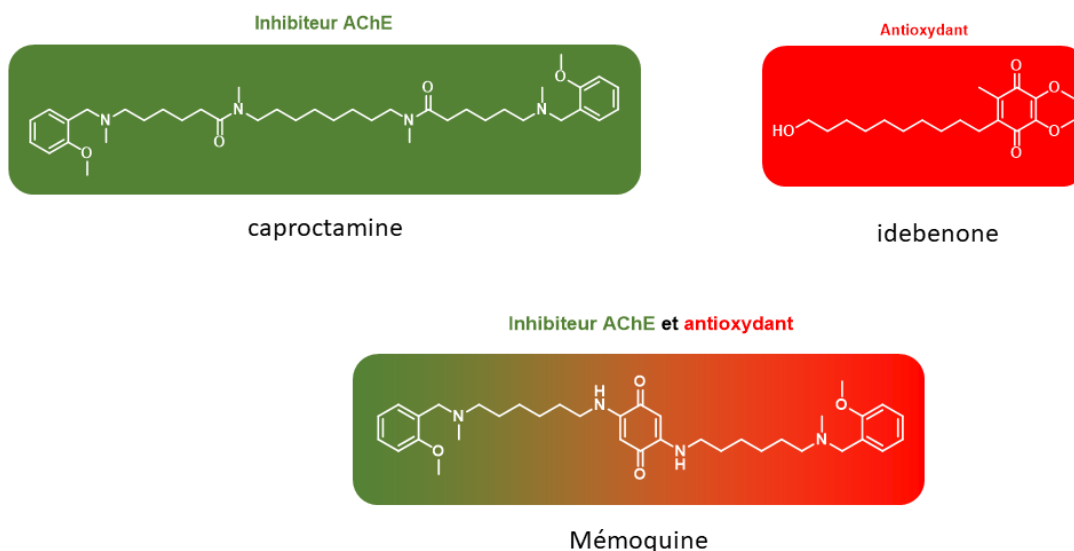


Figure 38 - Développement de la mémoquine.

La mémoquine, analogue structural de ces deux structures, a montré des effets très intéressants sur des modèles murins de la MA tels qu'une amélioration de la transmission

²²⁰ Castro, A. *et al.* Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in Treatment of Alzheimer's Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, 1 (3), 267–272.

²²¹ Melchiorre, C. *et al.* Acetylcholinesterase Noncovalent Inhibitors Based on a Polyamine Backbone for Potential Use against Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (22), 4186–4189.

²²² Raina, A. K. *et al.* Quinone Reductase (NQO1), a Sensitive Redox Indicator, Is Increased in Alzheimer's Disease. *Redox Rep.* **1999**, 4 (1–2), 23–27.

cholinergique, la diminution de formation et d'agrégation des plaques A β ainsi que la diminution d'hyperphosphorylation de Tau chez des souris âgées. Cette molécule a également de bonnes propriétés physicochimiques avec une bonne biodisponibilité orale, un passage de la BHE et un profil de sécurité favorable pour des essais précliniques. Elle possède un K_i de 2,6 nM pour l'AChE, et s'est même avérée active sur BACE-1 avec une IC₅₀ de 108 nM.

b. Analogue mémoquine/acide lipoïque

Après la découverte de la mémoquine, Bolognesi *et al.* ont également travaillé sur de nouveaux MTDLs possédant l'acide lipoïque. L'acide lipoïque est un puissant antioxydant mitochondrial dont l'utilité dans la MA a déjà décrite dans la partie Les antioxydants comme stratégie thérapeutique dans la MA.²²³

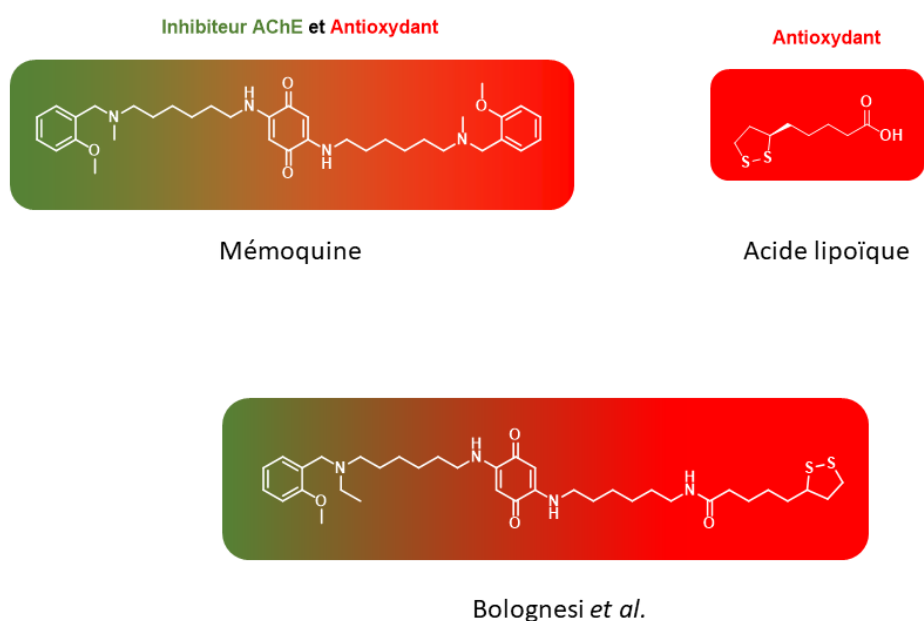


Figure 39- Développement d'analogues mémoquine/acide lipoïque

Bien que dans cet exemple, la puissance entre AChE et BuChE ait été largement réduite du fait de la perte du second azote basique engagé dans une liaison amide avec l'acide lipoïque, ce composé a montré des propriétés antioxydantes et de neuroprotection assez intéressantes sur des tests

²²³ Bolognesi, M. L. *et al.* Toward a Rational Design of Multitarget-Directed Antioxidants: Merging Memoquin and Lipoic Acid Molecular Frameworks. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (23), 7883–7886.

cellulaires supérieures à celles obtenues avec la mémoquine seule, qui possédait déjà une capacité antioxydante de par la présence du noyau hydroxyquinone nécessitant l'activation par NQO1.

c. Dérivé tacrine/CR-6

Plus récemment Pérez-Areales *et al.* ont conçu un nouveau dérivé MTDL agissant sur de nombreuses cibles limitant la pathologie amyloïde ainsi que le SO. Ces composés sont des dérivés de l'antioxydant polaire CR-6 (7-méthoxy-2,2-diméthylchroman-6-ol) et de la 6-chlorotacrine un inhibiteur lipophile aux multiples effets *in vitro* (notamment inhibiteur de l'AChE et de BuChE), de BACE-1 et de l'agrégation de A β ₁₋₄₂ et Tau). L'association permettant alors aux nouveaux composés de passer les barrières biologiques dont la BHE. Ce composé possède une IC₅₀ de 3,7 nM sur l'AChE et de 170 nM sur la BuChE, ainsi qu'une IC₅₀ de 19,1 μ M sur le test DPPH. Des études *in vitro* sur des modèles murins de la MA ont permis d'observer des effets d'amélioration de la mémoire et de réduction de la pathologie amyloïde ainsi que du SO.²²⁴

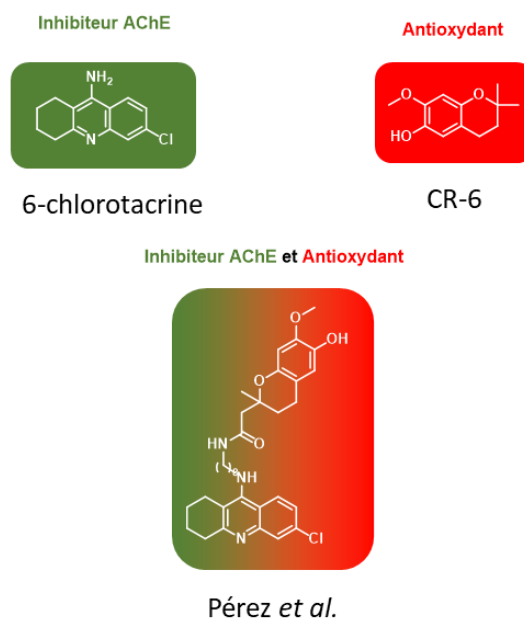


Figure 40 - Développement du MTDL AChE/CR-6.

²²⁴ Pérez-Areales, F. J. *et al.* Centrally Active Multitarget Anti-Alzheimer Agents Derived from the Antioxidant Lead CR-6. *J. Med. Chem.* **2020**.

d. Dérivé co-drogue tacrine/silibinine

La tacrine est le premier inhibiteur de l'AChE mis sur le marché dans la MA. Elle a cependant été retirée du marché suite à des effets indésirables hépatotoxiques. C'est un motif chimique que l'on retrouve énormément dans la conception de MTDL à visée anti-Alzheimer. En effet ce petit fragment lipophile permet d'ajouter une action inhibitrice d'AChE à un composé multi-cible qui pourra alors être dénué d'hépatotoxicité de par sa modulation. Chen *et al.* ont décidé de coupler ce petit groupement lipophile à la silibinine B, un dérivé naturel polyphénolique issu de *Carduus marianus* qui est antioxydant et hépatoprotecteur.²²⁵ La combinaison de l'hexaméthylène tacrine avec la silibinine B grâce à un linker de type acide succinique a permis l'obtention d'un nouveau composé innovant passant la BHE. Celui-ci, un peu à la manière des composés pro-drogues développés par Toublet *et al.* va posséder un linker labile qui, lorsqu'il sera clivé enzymatiquement dans le SNC libérera deux composés : la silibinine B d'un côté et la tacrine hémisuccinimide de l'autre (Figure 41).

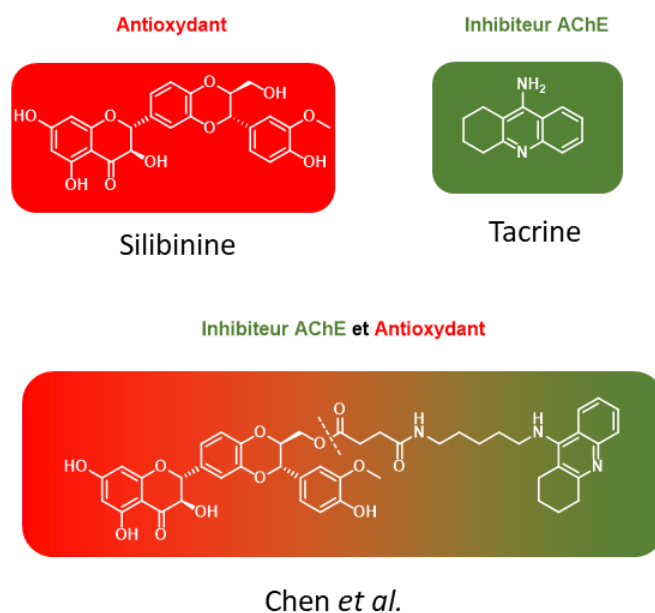


Figure 41 - Conception d'un analogue tacrine/silibiline.

Ce composé a été testé sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*. Il s'avère être un puissant inhibiteur de l'AChE avec une IC_{50} de 53,9 nM et de la BuChE avec une IC_{50} de 49,7 nM ainsi qu'une hépatotoxicité largement réduite par rapport à la tacrine. Un test de neuroprotection sur cellule HT-22, après induction de stress oxydant par du glutamate, a été réalisé (ce test est présenté dans la partie

²²⁵ Chen, X. *et al.* Tacrine-Silibinin Codrug Shows Neuro- and Hepatoprotective Effects in Vitro and Pro-Cognitive and Hepatoprotective Effects in Vivo. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (11), 5231–5242.

projet) avec de bons résultats. De plus sur un modèle de déclin cognitif murin cette molécule a été aussi puissante que la tacrine à inverser la dysfonction mémorielle.

e. Dérivé tacrine/acide férulique/mélatonine

Dans la lignée des composés dérivés de la tacrine, Benchekroun *et al.* ont décrit un hybride entre la tacrine et deux antioxydants, l'acide férulique et la mélatonine. Des analogues tacrine/mélatonine avait déjà été découverts, l'idée était donc de coupler un deuxième motif antioxydant afin de potentialiser cette action. Cette étude a permis la découverte du composé hybride (Figure 42) possédant :

- des propriétés antioxydantes, un score ORAC de 9,11 fois le trolox ;
- une inhibition des cholinestérases avec une IC₅₀ de 1290 nM sur AChE et 234 nM sur BuChE ;
- une hépatotoxicité réduite par rapport à la tacrine seule ;
- un passage probable de la BHE ;
- ainsi qu'une capacité neuroprotectrice sur les cellules SH-SY5Y contre les attaques de H₂O₂ ainsi que par l'activation de la voie transcriptionnelle Nrf2.

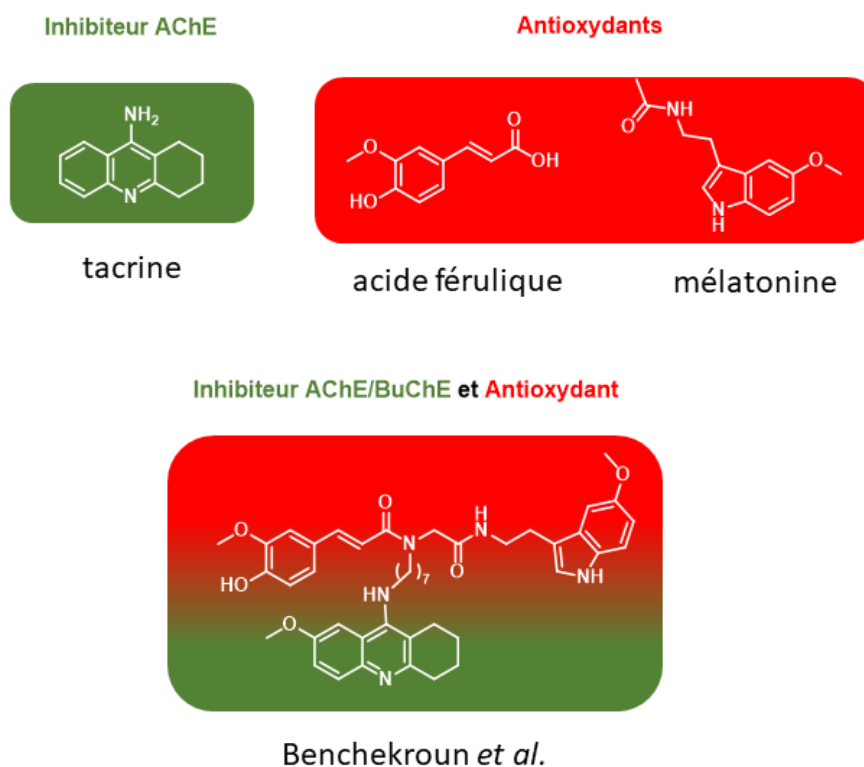


Figure 42 - Conception d'un analogue tacrine/acide férulique/mélatonine.

f. Conclusion

Bien que cette partie ne soit pas exhaustive, la stratégie de liaison de motifs antioxydant semble une stratégie prometteuse obtenant de bons résultats sur les modèles cellulaires et murins. Le SO jouant un rôle central dans la MA, coupler une activité antioxydante à une autre cible physiopathologique de la MA permet d'avoir des effets synergiques. A l'heure actuelle, les stratégies MTDLs impliquant les antioxydants ont principalement porté sur des activités inhibitrices d'AChE et BuChE avec l'ajout de motifs de type tacrine notamment. De par l'expertise du laboratoire dans le développement de MTDLs visant le récepteur 5-HT₄, le projet de cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces précédents travaux afin de développer les premiers MTDLs à activité antioxydante et agoniste des récepteurs 5-HT₄R.

V. Objectifs et étapes du projet

1. Objectifs globaux

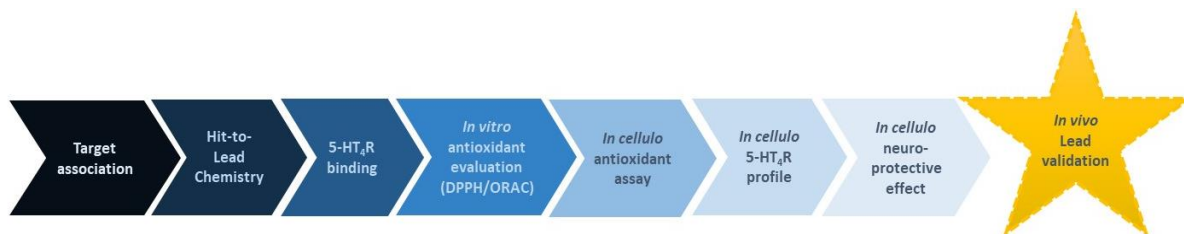


Figure 43- Etapes clés du projet

L'objectif principal de cette thèse repose sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de composés innovants en suivant les différentes étapes détaillées dans la Figure 43.

Le projet est né de l'association des deux cibles développées précédemment, à savoir le stress oxydant et les récepteurs 5-HT₄. Une première phase de chimie Hit-to-lead sera ainsi réalisée dans la continuité des travaux du laboratoire. Comme on le voit dans la Figure 44, les composés ont été conçus de façon à posséder une première partie agoniste des récepteurs 5-HT₄ avec le développement de deux grandes familles chimiques : les aminochlorobenzophénones et les benzisoxazoles. Ces premiers motifs seront alors reliés à une pipéridine centrale (nécessaire elle-même à l'activité envers le récepteur 5-HT₄) qui va porter un certain nombre de substituants aux propriétés antioxydantes tels que l'acide lipoïque, l'acide férulique ou des polyphénols.

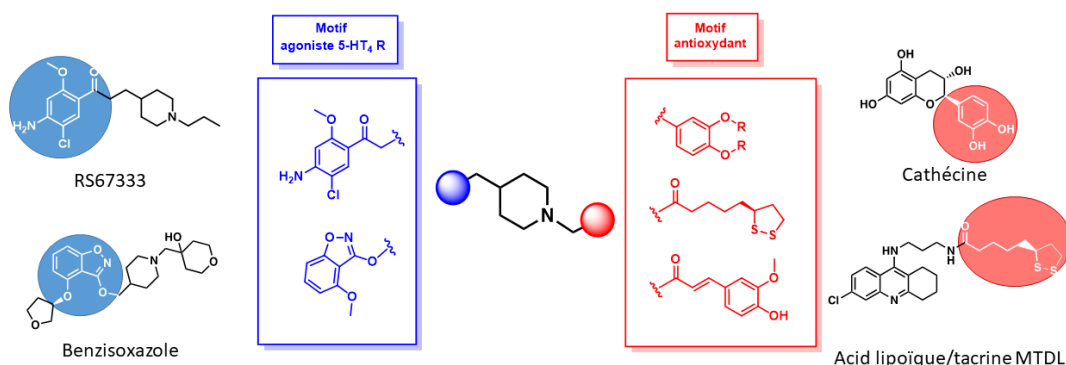


Figure 44- Conception des premières séries

Après une première phase de chimie Hit-to-Lead, les différents composés feront ensuite l'objet d'une étude d'évaluation biologique *in vitro* afin d'évaluer leur affinité, leur profil pour le récepteur 5-HT₄ et leurs capacités antioxydantes.

Plus particulièrement il s'agira d'obtenir des composés exprimant à la fois :

- Une affinité pour le récepteur 5-HT₄ (test de binding, $K_i < 15$ nM, contrôle sérotonine) ;
- Un profil agoniste pour le récepteur 5-HT₄ (test cellulaire, production d'AMPC > 15%) ;
- Un effet antioxydant sur les tests *in vitro* et/ou *in cellulo*
 - o Test DPPH, avec une $IC_{50} < 100$ μ M
 - o Test ORAC, avec un score d'au moins deux fois le score du trolox
 - o % d'EROs produites *in cellulo* par *t*-BuOOH en présence de l'espèce antioxydante <50% à 10 μ M,
- Un effet neuroprotecteur *in cellulo*,
- Une absence de toxicité neuronale à une concentration de 10 μ M (lignée cellulaire SH-SY5Y et HT-22),
- Une absence de toxicité au niveau hépatique à une concentration de 20 μ M (lignée cellulaire HepG2),
- Une drugabilité satisfaisante (hydrosolubilité, passage de BHE...).

L'objectif final de cette étude sera de sélectionner le meilleur candidat parmi les composés « hit » afin d'améliorer les capacités cognitives et de réduire la pathologie amyloïde sur divers modèles animaux.

2. Test *in vitro* sélectionnés et effectués sur ce projet

Plusieurs tests *in vitro* et *in cellulo* ont été réalisés au cours de ce projet dont les résultats seront présentés dans les publications. Cette partie sera donc consacrée à leur présentation.

a. Affinité envers le récepteur 5-HT₄

La cible principale des composés étant le récepteur 5-HT₄, le test d'affinité envers le récepteur est le test le plus important. Il permet de ne sélectionner que les produits les plus affins. Tous les composés

synthétisés au cours de cette thèse ont été testés par Audrey Davis au sein du laboratoire selon la méthode décrite initialement par Grossman *et al.*²²⁶

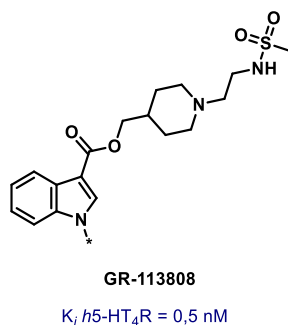


Figure 45 - Structure du GR-113808 ; * indique la position du radiomarquage au tritium.

Cette méthode consiste en la mesure du déplacement d'un ligand radioactif par le composé sélectionné, il s'agit donc d'un test de compétition. Le ligand radioactif utilisé est le [³H]GR-113808 (Figure 45), un antagoniste puissant et sélectif des récepteurs 5-HT₄ utilisé comme marqueur cérébral spécifique. Des membranes exprimant le récepteur 5-HT₄ sont utilisées et incubées à 25°C en présence du ligand radioactif et du composé sélectionné à différentes concentrations. Le taux d'occupation du récepteur par le ligand radioactif est ensuite calculé à chaque concentration. Pour les composés les plus puissants (> 40% d'inhibition à une concentration de 10⁻⁸M), une constante d'affinité (K_i) a été calculée à partir de cinq points sur la courbe d'inhibition.

b. Tests d'évaluation de capacité antioxydante

Plusieurs tests antioxydants existent à l'heure actuelle afin d'évaluer la capacité antioxydante des différents composés. Ils vont fonctionner en suivant plusieurs mécanismes expliqués brièvement dans la partie précédente. Ces tests ont été sélectionnés de par leur complémentarité ainsi que la facilité de leur mise en place au sein du laboratoire. Ils ont été réalisés, en partie, par moi-même au cours de cette thèse ainsi que par le Dr Marc Since et son équipe.

i. Test ORAC

Afin de quantifier la capacité antioxydante de nos composés, un test de capacité d'absorbance des radicaux oxygénés ou ORAC a été sélectionné et réalisé avec la fluorescéine en tant que sonde

²²⁶ Grossman, C. J. *et al.* Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-Pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, 109 (3), 618–624.

fluorescente. Ce test développé par Glazer et Ghiselli dans les années 90, permet principalement d'évaluer les composés ayant un mécanisme antioxydant par HAT (transfert d'atome d'hydrogène).^{227,228}

Pour cela on utilise l'APPH (ou 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Celui-ci va se décomposer en solution à 37°C pour former des radicaux libres réagissant avec l'oxygène présent en solution aqueuse. Les radicaux OH• sont alors capables de réagir et de dégrader la fluorescéine ce qui diminuera sa fluorescence. Lors de l'ajout d'une espèce antioxydante, la dégradation de la fluorescéine va être retardée du fait de la compétition avec les radicaux dérivés de l'APPH.

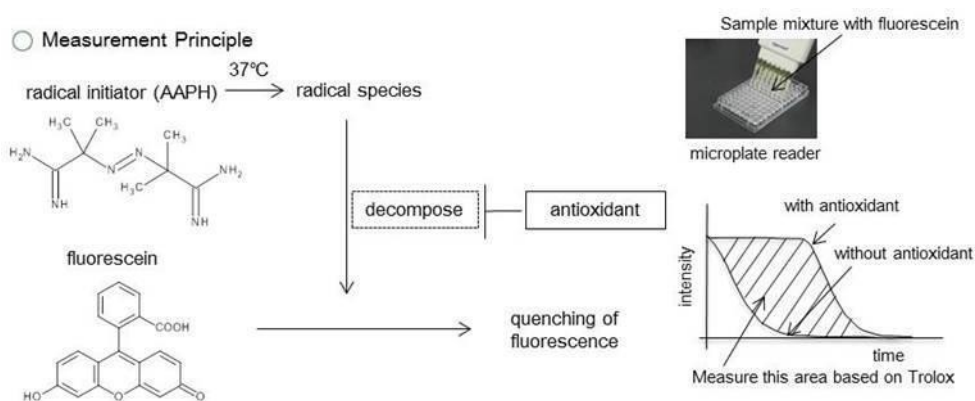


Figure 46- Principe du test ORAC²²⁹

La diminution de la fluorescence est alors observée après mesure de l'absorbance des différentes solutions en fonction du temps. Les aires sous les courbes obtenues avec l'antioxydant testé sont alors comparées aux aires sous les courbes obtenues avec l'antioxydant de référence, le trolox. Le résultat est donc exprimé sous forme de score ORAC en $\mu\text{M}_{\text{composé}}/\mu\text{M}_{\text{trolox}}$.

ii. Test DPPH

Ce test complémentaire au test ORAC permet de mettre en évidence le deuxième grand mécanisme des antioxydants à savoir le transfert d'électron (ET). Ce test est réalisé dans un solvant

²²⁷ Glazer, A. N. [14] Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. In *Methods in Enzymology; Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*; Academic Press, **1990**; Vol. 186, pp 161–168.

²²⁸ Ghiselli, A. *et al.* A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (1), 29–36.

²²⁹ H-ORAC Activity Assay Kit | [Analytical Chemistry]Products | Laboratory Chemicals-FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation <https://laBuChEm-wako.fujifilm.com/us/category/00420.html> (accessed Sep 27, 2020).

organique tel que l'éthanol. Il a été décrit initialement par Blois *et al.* en 1958.²³⁰ Le protocole utilisé ici est inspiré de ceux que l'on retrouve dans la littérature plus récente.^{231,232}

Le DPPH ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl est un composé radicalaire stable de couleur violet foncé qui en présence d'un antioxydant va être réduit en un composé de couleur jaune pâle comme on le voit Figure 47.

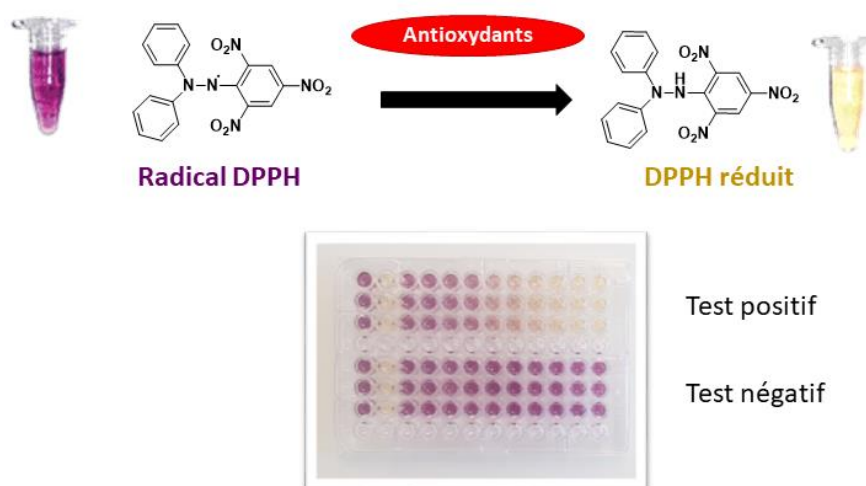


Figure 47 - Principe du test DPPH

Les composés antioxydants ont donc été analysés à différentes concentrations (allant de 1 μM à 250 μM) sur une plaque de 96 puits. La lecture des différents puits est réalisée au spectrophotomètre Synergy à la longueur d'onde de 517 nm.

Tout d'abord, l'absorbance spécifique du DPPH est calculée en soustrayant l'absorbance basale des composés dans les solutions aux différentes concentrations. L'effet maximum est calculé en utilisant une dose élevée de trolox (375 μM) permettant d'obtenir l' IC_{50} absolue. L' IC_{50} des composés à 120 min est par la suite calculée en utilisant une régression linéaire ou non linéaire ($R^2 > 0.98$) à partir des courbes dose-effet. En général les témoins positifs, tels que le trolox ou la quercétine, atteignent leur capacité antioxydante maximale assez rapidement (<5 min) alors que les composés développés au long de cette thèse mettront plutôt 30 min pour atteindre cette phase de plateau.

²³⁰ Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181* (4617), 1199–1200.

²³¹ Apak, R. *et al.* Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85* (5), 957–998.

²³² Schaich, K. M. *et al.* Hurdles and Pitfalls in Measuring Antioxidant Efficacy: A Critical Evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC Assays. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 111–125.

Ces premiers tests *in vitro* nous ont permis d'établir un premier profil antioxydant des différentes molécules synthétisées. Le stress oxydant retrouvé dans la MA étant un peu plus complexe et faisant intervenir des mécanismes cellulaires, des essais complémentaires sur cellules ont été nécessaires afin de valider les capacités antioxydantes des composés sélectionnés.

3. Tests *in cellulo*

Comme annoncé précédemment, les premiers tests *in vitro* nous ont permis de sélectionner les composés ayant de potentielles actions antioxydantes ainsi que de vérifier le potentiel non antioxydant des précurseurs. Cela nous a alors permis d'identifier des motifs chimiques aux capacités antioxydantes et de s'assurer que les motifs hétérocycliques nécessaires à l'activité 5-HT₄R n'étaient pas elles-mêmes responsables de ces phénomènes.

a. Test de profil envers 5 HT₄R

Le profil pharmacologique des différents produits synthétisés au cours de cette thèse a été évalué grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Sylvie Claeysen de l'Institut de Génomique Fonctionnelle à Montpellier. Comme décrit précédemment les profils agonistes des récepteurs 5-HT₄ sont primordiaux pour obtenir des effets intéressants dans la MA. Le profil des composés a donc été étudié sur des récepteurs humanisés 5-HT₄ exprimés par des cellules COS-7 préalablement transfectés.

Lors de l'activation du récepteur, celui-ci va libérer de l'adénosine mono phosphate cyclique ou AMPc. C'est ce messager intracellulaire qui sera quantifié dans ce test. Pour se faire, les molécules d'intérêts vont être injectées 24h après la transfection et incubées à différentes concentrations avec les cellules pendant 10 min à 37°C. Les cellules sont par la suite lysées et le taux d'AMPc est dosé. Ce taux d'AMPc est ensuite quantifié par le kit cAMP Dynamic par Cisbio bioassays. Le pourcentage d'AMPc produit est comparé à un témoin, la sérotonine, le ligand endogène des 5-HT₄R et comparé au RS-67333 l'agoniste de référence.

b. Test d'induction du stress oxydant

J'ai eu la chance de réaliser un échange de 3 mois au sein du département pharmacie et biotechnologie du Pr Maria-Laura Bolognesi de l'Université de Bologne en Italie, financé par le COST action MuTaLig. Cette échange européen m'a notamment permis de réaliser des expériences *in cellulo* d'induction de stress oxydant décrit dans ce paragraphe sous les précieux conseils du Pr Christian Bergamini et de sa doctorante Irene Liparulo.

Le test d'induction de stress oxydant a été réalisé sur des cellules de type SH-SY5Y qui sont des cellules de neuroblastomes, un modèle cellulaire utilisé dans la recherche sur les maladies neurodégénératives principalement. Afin d'évaluer le stress oxydant, la méthode de Wang *et al.* a été utilisée avec l'aide du H₂DCFDA (diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine) comme sonde fluorescente.²³³ Cette sonde va subir une diffusion passive et ainsi passer les membranes. Une fois dans le compartiment intracellulaire, des estérases vont la prendre en charge et l'hydrolyser en H₂DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescéine), un composé non fluorescent qui sera piégé dans le compartiment intracellulaire. Ce dernier composé pourra subir des réactions d'oxydations en présence d'ERO pour former l'espèce fluorescente DCF (2',7'-dichlorofluorescéine) qui est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre aux longueurs d'ondes de 485 nm pour l'excitation et 535 nm pour l'émission. Dans le cadre de ce test cellulaire, le stress oxydant est généré par l'ajout de *tert*-butylperoxyde (*t*-BuOOH).

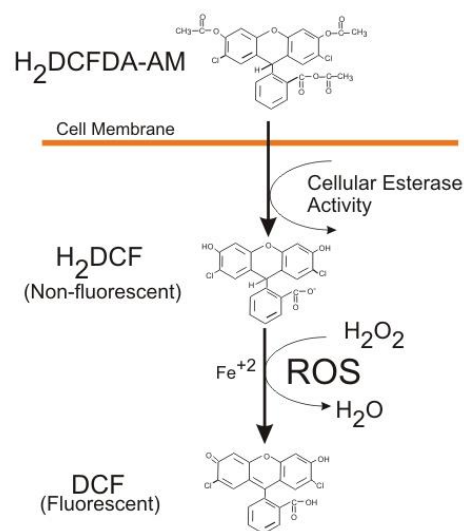


Figure 48 - Principe de l'utilisation de la sonde fluorescente H₂DCFDA.²³⁴

²³³ Wang, H. *et al.* Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. *Mention of a Trade Name, Proprietary Product, or Specific Equipment Does Not Constitute a Guarantee by the United States Department of Agriculture and Does Not Imply Its Approval to the Exclusion of Other Products That May Be Suitable. Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27 (5), 612–616.

²³⁴ Held, P. *et al.* Using BioTek's Synergy™ HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells. *BioTechniques* **2009**, 46 (1), 61–62.

c. Test de neuroprotection

Les tests de neuroprotection ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire du Pr Michael Decker de l'université de Würzburg en Allemagne.

Afin d'évaluer le pouvoir neuroprotecteur des composés sélectionnés, le test a été réalisé sur des cellules HT-22. Il s'agit d'une lignée cellulaire neuronale dérivée d'un hippocampe murin et sensible au glutamate. Celles-ci vont présenter un défaut de récepteur ionotrope au glutamate, provoquant ainsi une forte concentration en glutamate extracellulaire qui peut alors inhiber le transport de la cystine (forme oxydée de la cystéine) au travers de l'antiport cystine/glutamate.²³⁵ Cela mène alors à une augmentation du taux de cystéine intracellulaire, directement corrélé à une diminution de glutathion, ce qui induit l'accumulation des EROs, provoquant des dommages liés au stress oxydant généré. Ce test permet donc de mettre en évidence les composés antioxydants dans un contexte neuronal de stress oxydant dû aux diminutions des défenses antioxydantes.²³⁶ Les composés ont donc été incubés avec les cellules et du glutamate à 37°C pendant 24h sous différentes concentrations (de 1 à 25 µM). Le témoin positif dans ce test est la quercétine. Après cette incubation, la viabilité cellulaire est déterminée grâce à un test MTT détaillé ci-dessous.

d. Test MTT

Le test MTT est un test de viabilité cellulaire, il permet, grâce à une sonde colorée de déterminer le taux de survie cellulaire au fond d'un puits donné. Ce test a été utilisé afin de déterminer l'effet neuroprotecteur des composés, mais il a également été utilisé en tant que test de toxicité afin de vérifier l'absence de toxicité intrinsèque des composés envers les cellules SH-SY5Y et HT-22.

²³⁵ Murphy, T. H. *et al.* Glutamate Toxicity in a Neuronal Cell Line Involves Inhibition of Cystine Transport Leading to Oxidative Stress. *Neuron* **1989**, 2 (6), 1547–1558.

²³⁶ Schramm, S. *et al.* Regioselective Synthesis of 7-O-Esters of the Flavonolignan Silibinin and SARs Lead to Compounds with Overadditive Neuroprotective Effects. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 146, 93–107.

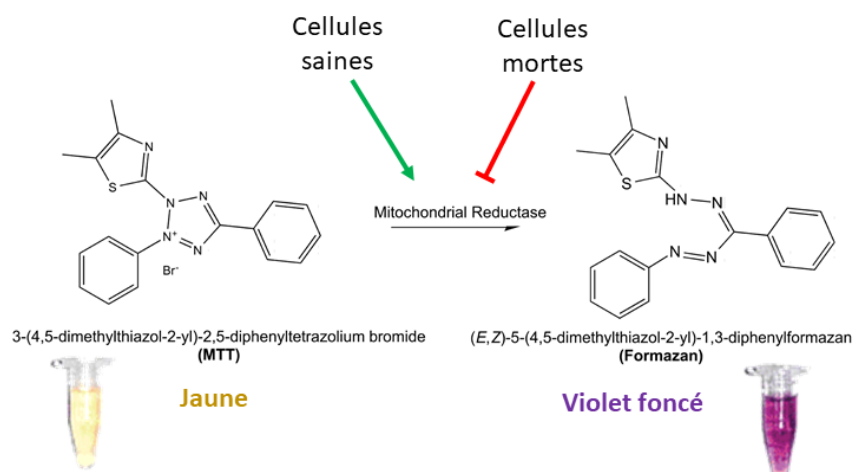


Figure 49 - Principe des tests MTT de viabilité cellulaire

Ce test se base sur la conversion du MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényle tetrazolium), de couleur jaune, en cristaux de formazan ayant la couleur caractéristique violette, par les cellules saines grâce aux réductases mitochondriales. Lorsque la cellule est morte, les réductases mitochondriales ne vont pas pouvoir agir, il n’y aura donc pas de formation de formazan et l’on pourra en déduire la cytotoxicité de certains composés. Ce test se réalise dans des plaques 96 puits grâce à un spectrophotomètre analysant l’absorption des différents puits à la longueur d’onde de 540 nm correspondant à la longueur d’onde nécessaire pour détecter la présence de formazan. L’absorption obtenue sera directement corrélée à la fonction mitochondriale et ainsi à la viabilité cellulaire.²³⁷

VI. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de présenter le projet avec une première partie concentrée sur le récepteur 5-HT₄ et son implication dans la MA, une deuxième partie présentant le stress oxydant ou DR et son implication dans la MA ainsi qu’une troisième partie sur la conception de ligands multi-cibles. Une dernière partie a permis de présenter le projet ainsi que ses étapes clés et les tests réalisés. Les principaux résultats seront présentés dans le chapitre suivant sous la forme de deux articles scientifiques et d’une dernière partie détaillant les travaux non publiés pour le moment.

²³⁷ Van Meerloo, J. *et al.* Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; Cree, I. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2011**; 237–245.

Chapitre 3 : Travaux personnels

I. Article 1: Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's Disease.

1. Introduction

Le premier article de cette thèse présente les différentes modulations effectuées autour du noyau chloroaminobenzophénone. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans la continuité des travaux du laboratoire concernant le développement de MTDL visant notamment le récepteur 5-HT₄. En effet, comme montré dans le chapitre précédent, ce motif aromatique a été au centre de divers projets et a conduit à la conception de ligands pléiotropes visant l'ACHé ou le récepteur 5-HT₆, prouvant ainsi la grande diversité de substituants possibles dans la partie proximale de ces molécules.

Ce chapitre sera structuré de la manière suivante, une première partie contenant l'article, suivi d'un résumé des principaux résultats. Dans une troisième partie sera développée la synthèse des différents fragments antioxydants ainsi que les projets annexes développés autour de cette première famille chimique. Enfin une conclusion du chapitre fera état des différentes perspectives possibles.

Dû à la numérotation des composés imposée par les différentes publications, un code couleur a été mis en place pour plus de simplicité. Dans les parties de thèse suivantes, les composés relatifs à l'article 1 seront ainsi représentés par des chiffres en gras de couleur **bleu foncé**, ceux de l'article 2 seront représentés de la même manière en couleur **rouge** alors que les composés et fragments non décrits dans ces deux articles seront représentés en **noir**.

2. Article

Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's disease

Caroline Lanthier,¹ Hugo Payan,² Irene Liparulo,³ Bérénice Hatat,^{1, 2} Cédric Lecoutey,¹ Marc Since,¹ Audrey Davis,¹ Christian Bergamini,³ Sylvie Claeysen,² Patrick Dallemagne,¹ Maria-Laura Bolognesi,³ Christophe Rochais^{1*}

¹ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

² IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

³ Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum – University of Bologna, I-40126 Bologna, Italy

ABSTRACT

Facing the complexity of Alzheimer's disease (AD), it is now currently admitted that a therapeutic pleiotropic intervention is needed to alter its progression. Among the major hallmarks of the disease, the amyloid pathology and the oxidative stress are closely related. We propose in this study to develop original Multi-Target Directed Ligands (MTDL) able to impact at the same time A β protein accumulation and toxicity of Reactive Oxygen Species (ROS) in neuronal cells. Such MTDL were obtained by linking on a central piperidine two scaffolds of interest: a typical aminochlorobenzophenone present in numerous 5-HT₄R agonists, and diverse antioxidant chemotypes. Interestingly the most active compound **9g** possesses K_i of 12.7 nM toward 5-HT₄R and an antioxidant activity *in vitro* and *in cellulo*.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and affects more than 50 million people worldwide.¹ More than a century after its discovery, AD is now characterized by synaptic dysfunction and synapse loss correlated with cognitive decline.² These dysfunctions are supposed to be due to the presence of two peptide deposits in and around neuronal cells. The accumulation and aggregation of A β peptide is at the origin of the amyloid pathology whereas the neurofibrillary tangles are mainly composed of phosphorylated tau protein.³ These lesions are generally associated with mitochondria dysfunction, an increase inflammatory response and the presence of oxidative stress.⁴ The latter was further particularly linked to the presence of amyloid aggregates which can produce Reactive Oxygen Species (ROS) in the presence of metal ions and which ultimately leads to neuronal cell death.⁵ The control of ROS production is therefore of particular interest in the prevention or the treatment of AD.

Despite these progresses, the discovery and development of treatments with disease-modifying effect on AD remain one of the greatest challenges in drug discovery.⁶ After numerous failures in clinical trials with compounds targeting mainly amyloid⁷ or tau pathologies,⁸ it is now currently admitted that a pleiotropic approach is needed for this multifactorial neurodegenerative disease.⁹ In order to impact several biological targets at the same time, single pleiotropic compounds, known as Multi-Target Directed Ligands (MTDLs),^{10,11,12} have been developed during the last decade. Among them, many examples include compounds able to act on oxidative stress and on another target.^{13,14,15} On the other hand, many examples have been described in order to limit amyloid pathology with numerous examples of MTDL acting on β -secretase inhibition,¹⁶ or inhibiting A β aggregation.¹⁴ In addition to those classical targets, the serotonergic system appears of particular interest, notably *via* the modulation of 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors.^{17,18} The activation of 5-HT₄ receptors (5-HT₄R) with partial agonists, such as RS67333, is of particular interest as it can promote the non-amyloidogenic cleavage of Amyloid Protein Precursor (APP) and subsequently decrease the amyloid load in AD transgenic mice models.^{19,20} In this context, we have in the past modulated the structure of RS67333 in order to introduce another target of choice for the treatment of AD such as acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity^{21,22} or 5-HT₆R antagonism.²³ This two studies demonstrated that the replacement of the butyl chain of RS67333 by diverse alky moieties has limited impact on both the affinity and the pharmacological profile towards 5-HT₄R. A similar strategy has been recently followed in order to generate 5-HT₆R antagonist bearing antioxidant activities.²⁴

In this context, we would like to assess the possibility to introduce, on the central piperidine ring of the targeted structures (Figure 1), various chemical moieties known to exhibit antioxidant activities. We postulate that such MTDL would be of particular interest combining, for the first time in a unique compound, antioxidant properties as well as 5-HT₄R agonism. Several antioxidant scaffolds were chosen for this proof of concept: polyphenol,²⁵ hydroxycinnamic acid²⁶ and lipoic acid.²⁷ Following this strategy the two pharmacophore will be connected through a permanent linker in order to optimize the central distribution of the antioxidant moiety. Indeed, the presence of the piperidine as a linker appear essential for the 5-HT₄R activity and the generated compounds could possess physicochemical properties for CNS application.

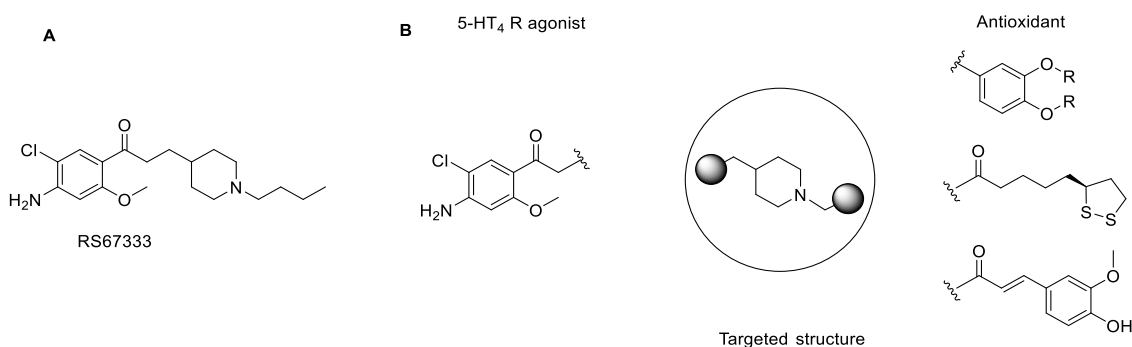


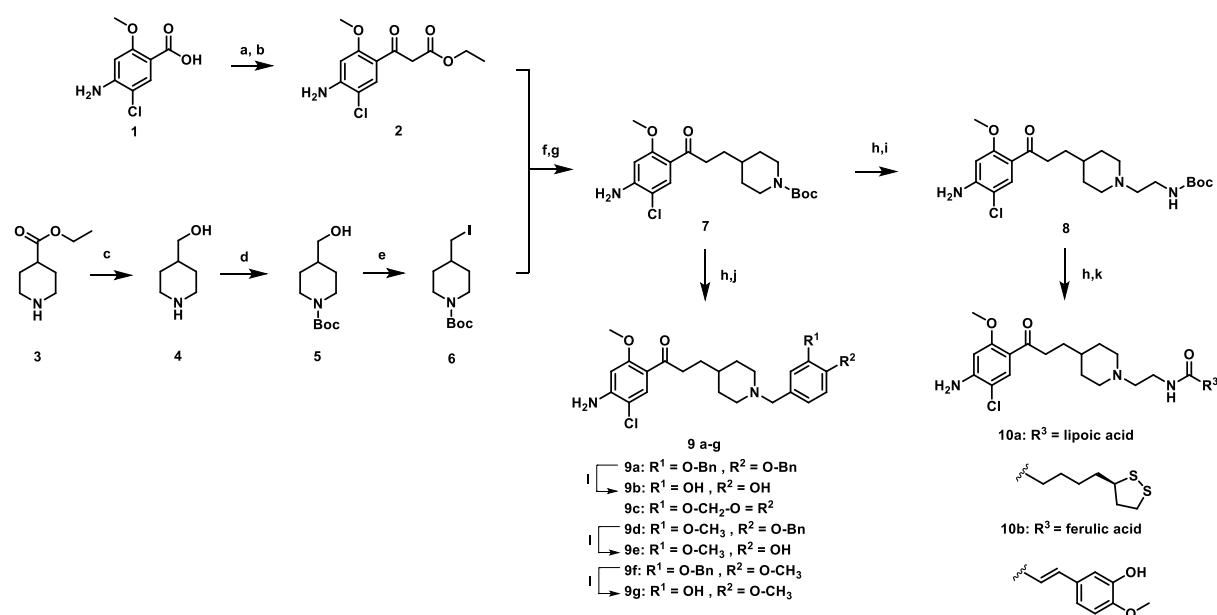
Figure 1. Chemical structure of RS67333 **A** and targeted structure of the MTDL **B**. The influence of these substitutions on 5-HT₄R affinity and the antioxidant activity of the resulting compounds could thus be assessed *in vitro* and *in cellulo*.

Results

Chemistry

According to our previous chemical studies, the precursor **7** appears as a central scaffold in the synthesis of RS67333.^{22,23} Compound **7** was synthesized in a three-step sequence through formation of a β -keto ester **2** by reaction between acid **1**, activated *in situ* with CDI, and potassium 3-ethoxy-3-oxopropanoate.^{28,29} Subsequent alkylation with a previously synthesized piperidine chain **6**, and followed by reaction with KOH in an EtOH/H₂O mixture provided a saponification-decarboxylation reaction to afford **7**.²² From this precursor **7**, different moieties were linked, such as catechol, vanillin or isovanillin widely known for their antioxidant properties.^{30,31} The first compounds **9a**, **9c**, **9d**, and **9f** were obtained by alkylation with the corresponding bromobenzyl derivatives at rt. A final debenzylation step was performed with HBr 33% in solution in acetic acid at 0°C to obtain free alcohols derivatives **9b**, **9e**, and **9g** respectively.

Scheme 1. Synthesis of the final derivatives 9-10



^aReagents, conditions: (a) CDI, THF; (b) KO₂CCH₂CO₂Et, MgCl₂, THF, 40°C; (c) LiAlH₄, Et₂O, reflux; (d) (Boc)₂O, DCM; (e) PPh₃, I₂, Imidazole, THF; (f) K₂CO₃, DMF; (g) KOH, EtOH/H₂O; (h) TFA, DCM; (i) tert-butyl N-(2-bromoethyl)carbamate, K₂CO₃, ACN; (j) Bromobenzylalcohol, K₂CO₃, DCM; (k) EDCl, HOBT, TEA, 0°C to rt, in the dark; (l) HBr 33% in AcOH, DCM, 0°C.

The second goal was to link ferulic and lipoic acid (LA) described as powerful antioxidants in the literature.^{32,33,34} In order to link LA and ferulic acid while maintaining the basicity of the nitrogen of the piperidine, an ethylamine linker was added. According to literature,²³ an ethylamine linker has no influence on the 5-HT₄R affinity and allowed the availability of a free terminal amine for peptidic coupling. Once the intermediate **8** was obtained, several coupling reactions were performed with EDCl,

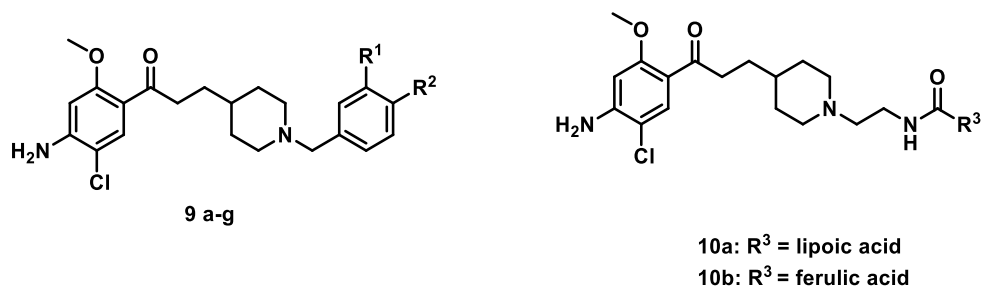
HOBt as activators, to synthesize coupled products **10a** and **10b**. Due to the sensitivity of LA to air, light, and heat, reactions were performed in dry, cold and dark conditions.

***In vitro* evaluation**

As previously mentioned, the main goal of our study was to discover a hit that will have sufficient antioxidant properties, as well as a good affinity toward 5-HT₄R. All the synthesized compounds were tested on 5-HT₄R according to the Grossman *et al* method.³⁵ The affinity toward the receptor was evaluated using a displacement assay of the tritiated ligand [³H]-GR113808, a specific and highly potent 5-HT₄R antagonist used to label specific binding sites in human brain.

Those compounds were also developed for their antioxidant properties and preliminary antioxidant *in vitro* test was also performed. Our attention was focused on two tests, DPPH, and ORAC.³⁶ The ORAC_{Fl} assay was conducted in an aqueous medium according to well-described procedure. It evaluates the antioxidant activity via a Hydrogen Atom Transfert (HAT) mechanism. Calculating the AUC of the fluorescence decrease for 1.5 hours, quantitative and kinetic aspects are both taken into account. Here, phenol gifted compounds showed a moderate antioxidant activity compared with a TEAC ranged between Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid), the reference, and quercetin (Table 1), a natural polyphenol antioxidant. The DPPH assay was performed in an organic solvent and enabled the evaluation of antioxidant activity following a Single-Electron-Transfer (SET) mechanism. According to recent literature, our initial procedure was completed here by slight modifications to ensure a complete evaluation of our compounds. First calculation of the specific absorbance of DPPH subtracting the absorbance of others components in the solution was realized. The maximum effect was normalized using a high dose of Trolox[®] (375 μM) to get the absolute EC₅₀.³⁷ The kinetic analysis to reach the plateau of % DPPH RSA at infinite time was determined and EC₅₀ were calculated using linear or non-linear regression ($R^2 > 0.98$) from the dose-effect curves.

In these conditions, Trolox[®] and quercetine reached their maximal antioxidant activity very quickly (immediately and few minutes respectively) compared to other active compounds ($T_{1/2}$ about 30 min). Their dose-effect curve was a linear ($R^2 > 0.99$). In our phenol series, when DPPH EC₅₀ was calculable, EC₅₀ values obtained after 120 min were very spread from 19.6 to >250 μM, varying as a terminal chemical pattern.

Table 1. Binding to *h5-HT₄R* and *in vitro* antioxidant activities of final derivatives


Cmpd	R ¹	R ²	R ³	cLogP [*]	<i>h5-HT₄R</i>				<i>DPPH</i>	<i>ORAC</i>
					% inhibition at 10 ⁻⁸ M	% inhibition at 10 ⁻⁶ M	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ at 120 min (μM)	(μM _{comp} ound / μM Trolox [®])
9a	OBn	OBn	-	6.78	3%	89%	-	-	>250	< 0.2
9b	OH	OH	-	3.48	76%	100%	5.9 ± 0.7	7.5 ± 0.7	19.6 ± 0.8	3.40 ± 0.02
9c		O-CH ₂ -O	-	3.84	22%	100%	-	-	>250	< 0.2
9d	OCH ₃	OBn	-	5.55	0%	97%	-	-	>250	< 0.2
9e	OCH ₃	OH	-	3.92	7%	95%	-	-	180.3 ± 25.5	3.88 ± 0.55
9f	O-Bn	OCH ₃	-	5.62	7%	88%	-	-	>250	< 0.2
9g	OH	OCH ₃	-	3.94	64%	100%	12.7 ± 2.1	14.5 ± 5.8	85.5 ± 2.0	3.41 ± 0.59
10a	-	-	Lipoic acid	4.98	26%	99%	-	-	>250	0.76 ± 0.11
10b	-	-	Ferulic acid	3.65	39%	100%	101 ± 8.0	101 ± 3.6	45.5 ± 2.0	1.47 ± 0.25
Serotonin	-	-	-	-	0%	65%	246 ± 31	323 ± 25	-	-
Trolox	-	-	-	-	-	-	-	-	22.9 ± 0.9	1
Quercetin	-	-	-	-	-	-	-	-	9.3 ± 1.5	6.50 ± 0.73

* calculated logP with ALOGPS 2.1.

***In cellulo* evaluation**

The pharmacological profile of the selected compounds was assayed towards h5-HT₄R transiently expressed in COS-7 cells (Figure 2). Three compounds behaved as partial agonists of the receptor with EC₅₀ of 2.8 ± 1.3 nM, 1.4 ± 0.8 nM and 4.5 ± 2.1 nM for **9b**, **9g** and **10b**, respectively (Figure 4). Compound **10a** also behaved as a partial agonist of the 5-HT₄R, but its irregular profile suggested that it may engage other targets in the COS-7 and no clear pharmacological profile was established. Compound **10b** presented an E_{max} of $47 \pm 8\%$ that is similar to the one of RS67333, the 5-HT₄R agonist of reference. Compounds **9b** and **9g** showed greater efficacy than the reference to induce cAMP production with E_{max} of $72 \pm 10\%$ and $57 \pm 3\%$, respectively.

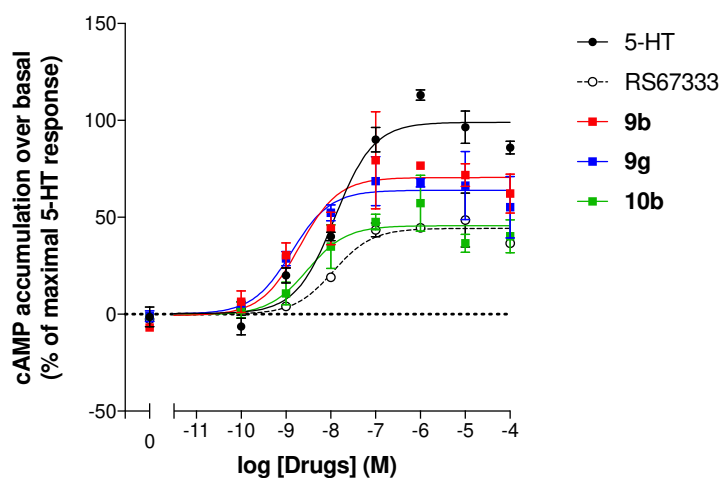


Figure 2. Determination of the 5-HT₄R pharmacological profiles for compounds **9b**, **9g** and **10b**, by quantification of cAMP accumulation. The agonism activity of the compounds was determined with serotonin (5-HT) and the partial agonist RS67333 as references. Data presented are the mean of three independent experiments performed in duplicate.

The first *in vitro* antioxidant assays allowed us to select **9b**, **9g**, **10a-b**, to complete their antioxidant evaluation in a cellular context. To define the suitable concentration, the cytotoxicity of **9b**, **9g**, **10a-b** was determined by MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) assay³⁸ in a neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. As seen on Figure 3, treatment of the cells with compounds **9b**, **9g**, **10a** (0.5 to 10 μ M) did not show cytotoxicity. A little decrease of 12% of viability compared to control cells was seen with compound **10b**. While at a dose of 50 μ M all compounds seem to show a small cytotoxicity with a decreasing of 37%, 40%, 48%, 68% for **9b**, **9g**, **10a**, **10b** respectively. Therefore, a single dose of 10 μ M was chosen to perform the *in cellulo* antioxidant assay.

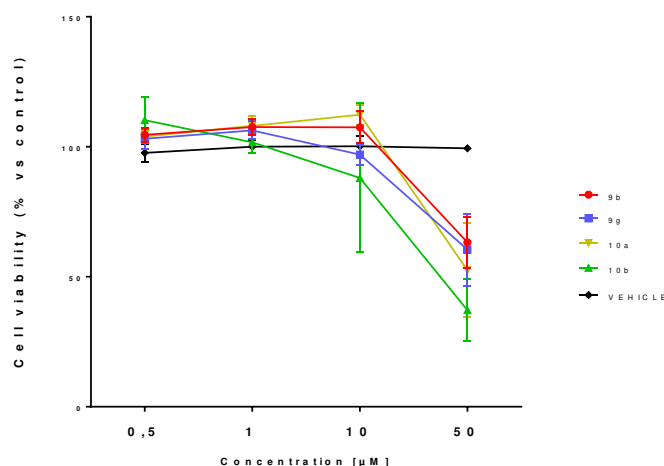


Figure 3. Cell viability determined by MTT assay. Cells were grown into 96-well plates and treated with **9b**, **9g**, **10a** and **10b** for 24 hours at the concentration of 0.5, 1, 10 and 50 µM or vehicle (DMSO). Data are presented as percentage of viable cells in comparison with vehicle treated controls. Error bars indicate ± SEM.

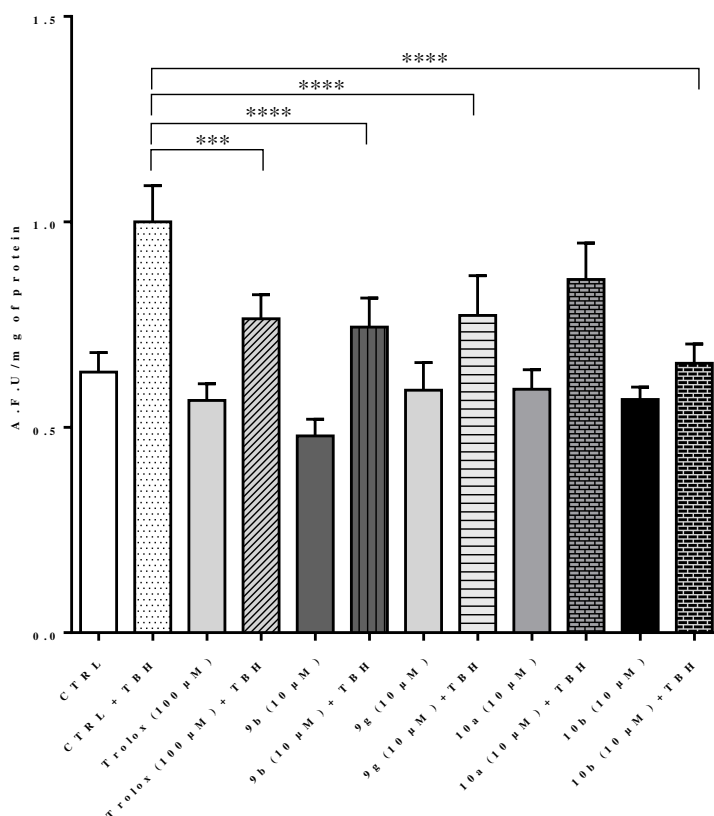


Figure 4. Reactive oxygen species determination in live SH-SY5Y cells. Cells were grown in 96 wells plates and incubated for 24 hours with compounds **9b**, **9g**, **10a** and **10b**, Trolox or vehicle (CTRL). Oxidative stress was induced by treating the cells with 100µM TBH for 30 minutes and detected by staining the cells with the fluorogenic probe H2DCF-DA. Data are presented as Arbitrary Fluorescence Units normalized on protein content measured by Lowry method. Error bars indicate ± SEM. *** P < 0.001, **** P < 0.0001

The antioxidant activity of selected compounds was evaluated on live SH-SY5Y cells using the fluorogenic probe H₂DCFDA. The cell-permeant H₂DCFDA passively diffuses into cells and is retained in the intracellular level after cleavage by intracellular esterases. Upon oxidation by ROS, the nonfluorescent H₂DCF is converted to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) as described by Wang in 1999.³⁹ The level of oxidative stress is directly correlated with the intensity of DCF fluorescence.

To evaluate the antioxidant activity, cells were incubated for 24 hours with the selected compounds, Trolox or vehicle, then the oxidative stress was induced by 30 minutes treatment with *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH or TBH). After this time, cells were incubated with the H₂DCFDA probe for 30 minutes and the fluorescence intensity was normalized on protein content (Figure 4)

Discussion

We have demonstrated in our previous study²² that the introduction of a non-substituted benzyl group instead of the butyl group present in RS67333 has little impact on affinity towards the 5-HT₄R and on Acetylcholinesterase inhibition. Based on these results a first series of hydroxyl or methoxy substituted benzylated derivatives was generated. We have demonstrated in a previous study that the replacement of the butyl substituent of the piperidine of RS67333 by benzyl or methylenecyclohexyl moiety lead to potent AChE inhibitors with good physicochemical properties and in vivo promnesiant activities.²² In order to verify the impact of these modulations on drugability parameters cLogP were determined. If the protected benzylated compounds **9a**, **9d** and **9f** appears particularly lipophilic all final compounds are compatible with optimal CNS parameters.⁴⁰ If benzyl piperidine scaffold are well known pharmacophore for cholinesterase interaction,⁴¹ we have verified that the RS67333 analogs were selective towards butyrylcholinesterase.²² Docking studies in AChE binding site revealed that the orientation of those ligands was closed to Donepezil and reproduced its interactions. In particular, the benzyl moiety is located at the bottom of the aromatic gorge of AChE and engaged in a hydrophobic interaction with Trp86. We postulate that the introduction of polar or bulky substituents on the benzyl group of our final compounds will be detrimental for their activities. In order to verify this hypothesis all final compounds **9a-g** and **10a-b** were evaluated as inhibitors of human AChE. As expected, these modulations were particularly detrimental for the affinity of the ligands towards AChE (See Table S1 in supporting information). Concerning the impact of these modulations on 5-HT₄R activity as shown in Table 1, all compounds exhibited good inhibition rates at 10⁻⁶ M. However, the benzyl protecting group present on the scaffold of compounds **9a**, **9d** and **9f** has detrimental impact on affinity towards 5-HT₄R receptors probably due to its steric hindrance. On the contrary, smaller substituents lead to enhanced

activity. In this assay only **9b**, **9g**, and **10b** exhibited more than 35% of inhibition rate at 10^{-8} M allowing us to calculate further data such as IC_{50} and K_i . Surprisingly the vanillin derivative **9e** showed a decreased potency compared to the isovanillin analog **9g**. On the contrary, **9b** and **9g** are really promising with K_i values under 15 nM. According to our hypothesis, compounds **9b**, **9g** and **10b** behave as partial agonist for the 5-HT₄R, the first two being able to induce cAMP production with a greater efficiency than the reference RS67333 (Figure 2).

All compounds were then engaged in two complementary *in vitro* antioxidant biological assays. In the DPPH assay, a SET mechanism test, hydroxylated compounds **9b**, **9e**, **9g** and **10b** were the only one to exert antioxidant activity, the catechol **9b** being the most potent. In this assay, the liponic acid derivative **10a** did show limited antioxidant activity. In the ORAC evaluation, the antioxidant activities of all compounds were compared to Trolox[®], a widely used antioxidant reference compound. The same compounds **9b**, **9e** and **9g** appeared to be 3-fold more potent than Trolox[®], whereas ferulic derivative **10g** demonstrated similar activity than the reference. Both test confirm that the *in vitro* activity is clearly linked to the introduction of a phenol group as all benzylated compounds are inactive in this assay.

Based on the results we have chosen to test the *in cellulo* antioxidant activity of these compounds **9b**, **9g**, **10a** and **10b**. Compound **9e** was not selected because of its lower affinity towards 5-HT₄R. As already demonstrated for prucalopride, another 5-HT₄R agonist, we have chosen to evaluate this antioxidant and neuroprotective activities in SH-SY5Y neuroblastoma cell line.⁴² Liponic acid antioxidant activity is dependent of mitochondrial activity⁴³ and therefore cannot be highlighted by an *in vitro* assay. For that reason, **10a** was also selected despite no sign of *in vitro* antioxidant effect.

A non-toxic dose of 10 μ M was chosen for the *in cellulo* antioxidant activity assay, after a general MTT viability assay. Oxidative stress was generated using TBH and the ability of the compounds to limit ROS induction was compared with the well known antioxidant compound Trolox[®].

Trolox[®] was used at 100 μ M and, as expected, exerts a significant reduction of ROS production. Used at a concentration of 10 μ M in this assay, compounds **9b**, **9g** and **10b** used at a concentration of 10 μ M significantly decreased ROS production by at least 50% compared to the control group. However, no activity was obtained in this assay with the liponic acid substituted compound **10a**.

These results are in accordance with the pharmacological profile of the compounds on 5-HT₄R, towards which no clear profile was established for compound **10a**. The three other compounds demonstrated clear agonism toward the receptor with the catechol substituted compound **9b** and the isovanillin substituted compound **9g** being interesting candidates to further *in vivo* evaluation.

Conclusion

This study demonstrates for the time the possibility to generate a series of potent 5-HT₄R ligands with promising antioxidant activity. Among them compound **9g** appears as the best compromise with a *K_i* of 12.7 nM toward 5-HT₄R and an antioxidant activity *in cellulo*. If the balance of activity between the *in cellulo* or *in vitro* antioxidant assay (micro molar range) and the *in vitro* assay for 5-HT₄R affinity (nanomolar range) might be improved, these series of compound show great promises in more challenging models. In the experiment, the amount of oxidative stress needs to be high enough to be visible with DCF-DA. In the brain, the level of oxidative stress caused by AD is not properly quantified and is lower than the one induced by t-BuOOH. On the base of the obtained data, it seems plausible that, with a suitable pharmacokinetic and a proper Blood Brain Barrier crossing according to its adequate LogP, **9g** could have an antioxidant effect at a nanomolar concentration and will be tested in a near future in preclinical animal models of AD.

Experimental section

Chemistry. All commercially available compounds were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart melting point apparatus (SMP50). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F₂₅₄ on aluminium plates (Merck) and visualized with UV light (254 nm). Flash chromatography was conducted on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 60 (40-63 μ m). Column size and flow rate followed the manufacturer's recommendations. NMR spectra were recorded at 295K, at 400 or 500 MHz (Bruker Avance III 400/500 MHz) for ¹H NMR and at 100 or 126 MHz for ¹³C NMR in chloroform-*d*, methanol-*d*₄ or DMSO-*d*₆ with chemical shifts (δ) given in parts per million (ppm) relative to TMS as internal standard and recorded. The following abbreviations are used to describe peak splitting patterns when appropriate: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet. Coupling constants *J* are reported in hertz units (Hz). Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer and are reported in terms of frequency of absorption (cm⁻¹) using KBr discs. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray (ESI, sampling cone 50V, capillary 0.3kV) on a Xevo G2-XS QToF WATERS mass spectrometer. LC-MS (ESI) analyses were realized with Waters Alliance 2695 as separating module using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H₂O, B = CH₃CN; each containing HCOOH : 0.1 %; column XBridge BEH C18 2.5 μ m/3.0 x 50 mm; flow rate 0.8 mL/min). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI. Mass spectrum data are reported as *m/z* .

General procedure for deprotection/alkylation of the piperidine moiety A

To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 eq.) was dissolved in DCM or ACN (10 mL/mmol) and bromo-benzyl-alcohol derivatives (1.1-1.5 eq.) and K₂CO₃ (10.0 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at RT or 70°C depending on the product for 2-72h, then concentrated *under vacuum*. The crude was directly purified by chromatography on silica gel column and concentrated under reduced pressure to afford alkylated compound (isolated yields).

The general procedure to obtain unprotected catechol B

Appropriate benzylated product (1 eq) was stirred in bromhydric acid 33 % diluted in acetic acid (10 mL.mmol⁻¹, 0.10M) and DCM (50 mL.mmol⁻¹, 0.02M) at 0°C for 1 to 4h. The mixture was evaporated *under vacuum* at rt. Then the crude was directly purified on silica gel column (DCM/MeOH; from 100:0 to 80:20).

Ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (2)

To a solution of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (5.00 g, 24.8 mmol, 1.0 eq.) in THF (200 mL, 0.12 M) was added CDI (4.42 g, 27.3 mmol, 1.1 eq.) portionwise. The mixture was stirred at rt for 4h. Then, ethyl potassium malonate (5.06 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) and MgCl₂ (2.83 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) were added portionwisely. The resulting mixture was stirred 16 h at 40°C.

Solvent was evaporated under vacuum. The residue was diluted with water and then extracted with DCM three times. Organics layers were combined and washed with NaHCO₃ sat. solution, then brine, and dried over MgSO₄. Solvent was evaporated under vacuum to afford a crude product which was

purified on silica gel column (CHex/EtOAc from 100:0 to 60:40). The compound was obtained as a light yellow powder (3.76 g, 60% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.92 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.55 (s, 2H), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 189.6, 168.6, 159.9, 148.7, 132.5, 117.3, 111.7, 97.0, 60.8, 55.4, 50.5, 14.2 MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272.51; IR (neat, cm^{-1}) ν 3463, 3363, 3223, 2983, 1725, 1648, 1622, 1573, 1479, 1457 1326, 1220, 837, 654 Mp 117°C. Spectral and analytical data matched with literature.²¹

(piperidin-4-yl)methanol (4)

To a solution of ethyl isonipecotate (2 mL, 13.0 mmol, 1.0 eq.) in Et_2O (150 mL) was added portion-wise LiAlH_4 (1.48 g, 39.0 mmol, 3.0 eq.) at 0°C and the reaction mixture was refluxed for 7h. The mixture was then cooled to 0°C and the reaction was then slowly quenched with 1.5 mL of water, 1.5 mL of 15% NaOH solution followed by 4.5 mL of water to afford a granular inorganic precipitate. The white solid was filtered and washed several times with EtOAc. Evaporation of the filtrate under reduced pressure provided 1.38 g (92% yield) of compound (1) as a colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.45 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.59 (dt, $J = 12.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.71 (m, 2H), 1.60-1.55 (m, 1H), 1.17-1.07 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 66.9, 45.9 (2C), 38.8, 29.7 (2C); IR (neat, cm^{-1}) ν 3369, 2923, 2855, 1636, 1531, 1425, 1266, 1036. Spectral and analytical data matched with literature.⁴⁴

Tert-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (5)

To a solution of (1) (1.14 g, 9.96 mmol, 1.0 eq.) in DCM (40 mL) was added di-tert-butylidicarbonate (2.39 g, 10.9 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 15h at rt. The mixture was then diluted with water and the aqueous layer was extracted several times with DCM. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated *under vacuum*. The crude product was purified by chromatography on silica gel column (cHex/EtOAc, gradient 100:0 to 70:30) to give 1.34 g (62% yield) of compound (2) as white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.10 (m, 2H), 3.48 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H) 2.68 (m, 2H), 1.80 (br s, 1H, OH), 1.69 (m, 2H), 1.63 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.12 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 155.0, 79.5, 67.6, 43.9 (2C), 38.9, 28.7 (2C), 28.6 (3C); MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 216.47; $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$ 116.47; $[\text{M}-t\text{-butyl}+\text{H}]^+$ 160.47; IR (neat, cm^{-1}) ν 3470, 2926, 2859, 1672, 1422, 1168, 1045, 572; Mp 85°C.

Tert-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate (6)

To a solution of (2) (2.25 g, 10.5 mmol, 1.0 eq.), imidazole (858 mg, 12.6 mmol, 1.2 eq.) and triphenylphosphine (3.30 g, 12.6 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) was added drop-wise a solution of iodine (3.20 g, 12.6 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt for 14h. The mixture was quenched with a saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 , and concentrated *under vacuum*. The crude was several times diluted with cold Et_2O , and white crystals were filtered. After concentration of filtrate *under vacuum*, 3.13 g of the compound (3) was obtained as a colorless oil (92% yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.11 (m, 2H), 3.10 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.68 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.64-1.61 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.19-1.09 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 154.6, 79.5, 43.4 (2C), 38.6, 32.5 (2C), 28.4 (3C), 13.5; IR (neat, cm^{-1}) ν 2975, 2932, 2850, 1692, 1422, 1243, 1157, 965. Spectral and analytical data matched with literature.⁴⁵

Tert-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (7)

To a solution of ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (**4**) (3.14 g, 11.6 mmol, 1.0 eq.) in DMF (30 mL) and *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate (**3**) (4.14 g, 12.7 mmol, 1.1 eq.) was added K₂CO₃ (3.19 g, 23.10 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred 72h at rt. The reaction mixture was diluted with water, and product was extracted with EtOAc. Combined organic layers were washed with water and brine and then dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave a crude mixture which was directly dissolved in EtOH (500 mL), H₂O (100 mL) and KOH (3.23 g, 57.5 mmol, 5.5 eq.) were added. The reaction mixture was refluxed for 3h, EtOH was evaporated. The mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine. Evaporation of the solvent provided a crude product, which was purified by column on silica gel, eluting on DCM/EtOAc from 100:0 to 60:40 to give the product **5** as a colorless solid (3.11 g, 67% isolated yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.79 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.18 – 3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.91 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.58 (m, 2H), 1.58 – 1.54 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.10 (qd, *J* = 12.4, 4.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.4 MHz) δ 198.7, 159.5, 154.9, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.5, 79.2, 55.7, 44.0, 40.6, 35.8, 32.1, 31.1, 28.5; MS *m/z* [M+H]⁺ 397.60; [M-Boc+H]⁺ 297.51; [M-*t*-butyl+H]⁺ 341.55; IR (neat, cm⁻¹) ν 3470, 3353, 2975, 2930, 2851, 1673, 1624, 1588, 1421, 1366, 1311, 1250, 1216, 1173, 967, 738; Mp 136°C. Spectral and analytical data matched with literature.²¹

***Tert*-butyl *N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (**8**)**

Following procedure A with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (**7**) (2.37 g, 5.98 mmol, 1 eq.) and *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate (1.61 g, 7.18 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (CHex/EtOAc, gradient 100:0 to 0:100), the compound (**8**) was obtained as a light yellow solid (780 mg, 30% isolated yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.71 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.98 (br s, 1H, NH), 4.49 (s, 2H, NH₂), 3.77 (s, 3H), 3.14 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.86 – 2.72 (m, 4H), 2.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 2H), 1.67 – 1.54 (m, 2H), 1.56 – 1.44 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.24 – 1.08 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.0 MHz) δ 199.0, 159.4, 156.0, 147.7, 132.2, 118.9, 111.2, 97.5, 79.1, 57.5, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 37.4, 35.6, 32.2 (2C), 31.3, 28.5 (3C); MS *m/z* [M+H]⁺ 441.8; IR (neat, cm⁻¹) ν 3486, 3376, 3325, 2980, 2925, 2855, 1690, 1625, 1573, 1467, 1367, 1311, 1175, 1216, 1114, 969, 610; Mp 119°C; HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₄ClN₃O₄ [M+H]⁺ 440.2316, found 440.2324;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9a**)**

Following procedure A with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (**7**) (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (230 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 10h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), the compound (**9a**) was obtained as a light yellow solid (141 mg, 47% isolated yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 7.78 (s, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 4H), 7.40 – 7.24 (m, 6H), 7.01 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 2.95 – 2.79 (m, 4H), 1.97 (t, *J* = 10.5 Hz, 2H), 1.66 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 1.64 – 1.51 (m, 2H), 1.47 – 1.20 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.9, 159.54, 148.6, 148.4, 147.8, 137.3, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.8 (2C), 127.7 (2C), 127.5, 127.3, 122.7, 118.7, 116.6, 114.6, 111.2, 97.5, 71.3, 71.2, 62.5, 55.6, 53.3 (2C), 40.7, 35.0, 31.5 (2C), 31.0; MS *m/z* [M+H]⁺

599.7; IR (neat, cm^{-1}) ν 3482, 3368, 3220, 2921, 2847, 2798, 1618, 1585, 1508, 1453, 1419, 1257, 1214, 1184, 1015, 735, 695; Mp 104.5°C. HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 599.2677, found 599.2673;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9b)

From general procedure B with 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzoyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one **9a** (125 mg, 0.21 mmol) to afford 71 mg of 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one **9b** as a pale yellow powder with a yield of 81%. ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.66 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.85 – 6.80 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.39 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 2.97 – 2.81 (m, 4H), 1.95 (m, 2H), 1.66 – 1.52 (m, 3H), 1.51 – 1.36 (m, 2H). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ 198.78, 160.32, 150.43, 146.74, 145.57, 131.46, 122.57, 120.61, 117.59, 116.27, 115.16, 110.26, 96.64, 60.35, 54.75, 51.86 (2C), 39.86, 33.28, 30.16, 29.05 (2C); MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.8; IR (neat, cm^{-1}) ν 3432, 3366, 3206, 2938, 2725, 1619, 1584, 1453, 1419, 1295, 1261, 1216, 1184; Mp 115.9°C; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.1738, found 419.1737;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4-piperidyl]propan-1-one (9c)

tert-butyl 4-(3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) was dissolved in 4 mL of DCM, then 1 mL of TFA was added. The solution was stirred 15 min at rt, then the solvent was reduced under pressure. The resulting yellow oil was dissolved in DMF (10 mL), then K_2CO_3 (691.0 mg, 5.00 mmol, 10 eq.) and 5-(bromomethyl)benzo[*d*][1,3]dioxole (129.4 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) were added dropwisely. The reaction mixture was warmed at 110°C for 3h. Then water was added and the solution was extracted three times with EtOAc, then dried over MgSO_4 , concentrated under vacuum to afford a crude product which was purified on neutral alumine column with a 100% DCM isocratic gradient. The product was obtained as a yellowish powder (65 mg, 30% isolated yield) ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.77 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.46 (br s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 2.93 – 2.80 (m, 4H), 1.90 (m, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.66 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 1.58 (dd, $J = 7.2, 6.4$ Hz, 2H), 1.31 – 1.15 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.1, 159.5, 147.7, 147.5, 146.4, 132.5, 132.2, 122.3, 118.9, 111.2, 109.6, 107.8, 100.8, 97.5, 63.3, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.3 (2C), 31.3; MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 431.6; IR (neat, cm^{-1}) ν 3470, 3358, 3216, 3013, 2922, 2873, 2854, 2810, 2775, 1715, 1642, 1619, 1573, 1440, 1421, 1332, 1312, 1261, 1214, 1178, 986, 932, 738, 567; Mp 124°C; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 431.1738, found 431.1747;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-[[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl]propan-1-one (9d)

Following procedure A with **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), the compound (**9d**) was obtained as a light yellow oil (74 mg, 28% isolated yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H), 7.49 – 7.28 (m, 5H), 6.96 – 6.88 (m, 1H), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.98 – 2.78 (m, 4H), 1.92 (s, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.1, 159.5, 149.4, 147.7, 147.2, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 127.8, 127.2 (2C), 121.4, 118.9, 113.5, 112.9, 111.2, 97.5,

71.1, 63.2, 56.1, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.2 (2C), 31.3; MS m/z $[M+H]^+$ 523.6; IR (neat, cm^{-1}) ν 3.449, 2.919, 2.853, 2.788, 1.616, 1.586, 1.463, 1.450, 1.414, 1.261, 1.216, 1.177, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[M+H]^+$ 523.2364, found 523.2363;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-{1-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one (9e)

From general procedure B with **9d** (80 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) to afford **9e** as yellow powder with a yield of 85%. ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.66 (s, 1H), 7.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.13 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.40 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 3.00 – 2.79 (m, 4H), 1.96 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 1.62 (m, 3H), 1.46 (m, 2H). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ 198.78, 160.3, 150.4, 148.0, 147.9, 131.5, 124.0, 120.5, 116.3, 115.1, 114.0, 110.3, 96.7, 60.5, 55.1, 54.8, 51.9 (2C), 39.9, 33.3, 30.2, 29.1 (2C); MS m/z $[M+H]^+$ 432.8; MP: 120.5°C; IR (neat, cm^{-1}) ν 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[M+H]^+$ 433.1894, found 433.1894;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-{[3-(benzyloxy)-4-hydroxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)propan-1-one (9f)

Following procedure A with **7** (200 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 80:20), the compound (**9f**) was obtained as a light yellow oil (100 mg, 38% isolated yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.87 (m, 4H), 1.96 – 1.84 (m, 2H), 1.65 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 1.62 – 1.56 (m, 2H), 1.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 199.0, 159.5, 149.0, 147.9, 147.7, 137.1, 132.1, 129.3, 128.5 (2C), 127.8, 127.5 (2C), 122.3, 118.7, 115.5, 111.4, 111.2, 97.5, 70.9, 62.7, 56.0, 55.7, 53.4 (2C), 40.8, 35.2, 31.7 (2C), 31.1; MS m/z $[M+H]^+$ 523.6; IR (neat, cm^{-1}) ν 3360, 2923, 2834, 2788, 1618, 1587, 1463, 1450, 1414, 1261, 1216, 1177, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[M+H]^+$ 523.2364, found 523.2365;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-{1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one (9g)

From general procedure B with **9f** (80 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) to afford acetate salt of **9g** as a pale yellow powder with a yield of 70%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.76 (s, 1H), 6.95 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.86 – 6.76 (m, 2H), 6.26 (s, 1H), 4.54 (br s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 3.16 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 2.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J = 11.5$ Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.74 – 1.72 (m, 2H), 1.62 – 1.60 (m, 2H), 1.54 – 1.43 (m, 2H), 1.37 (m, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 198.5, 176.9, 159.6, 147.9, 147.1, 145.9, 132.2, 125.78, 122.2, 118.6, 116.8, 111.3, 110.7, 97.5, 61.0, 55.9, 55.7, 52.1 (2C), 40.4, 34.2, 30.5, 30.1 (2C), 22.9; MS m/z $[M+H]^+$ 432.8; MP: 80.8°C; IR (neat, cm^{-1}) ν 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735; HRMS/ESI: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[M+H]^+$ 433.1894, found 433.1894;

N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-5-[(3R)-1,2-dithiolan-3-yl]pentanamide (10a)

To a stirred solution of **8** (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of LA (53 mg,

0.26 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were successively added hydroxybenzotriazole (HOBt) (42 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.) and 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDCI) (49 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.), the mixture was stirred at 0°C in the dark for 30min, then the free amine was added, and the reaction was stirred at rt for 16 h. Solvent was evaporated under vacuum then the product was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (97.5:2.5:0.25), **10a** was obtained as white powder with a yield of 44%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.81 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.59 (dq, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 1H), 3.35 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.24 – 3.07 (m, 2H), 2.97 – 2.82 (m, 4H), 2.47 (m, 3H), 2.24 – 2.17 (m, 2H), 2.01 – 1.90 (m, 3H), 1.76 – 1.65 (m, 6H), 1.62 (dt, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 2H), 1.57 – 1.42 (m, 2H), 1.33 – 1.17 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.9, 172.7, 159.5, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.6, 56.8, 56.5, 55.7, 53.7 (2C), 40.9, 40.3, 38.5, 36.5, 36.1, 35.6, 34.7, 32.3, 31.2 (2C), 28.9, 25.5; MS *m/z* [M+H]⁺ 527.8; MP: 122.5°C; IR (neat, cm⁻¹) ν 3217, 2926, 2844, 1642, 1586, 1462, 1419, 1316, 1254, 1250, 1170; HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₉ClN₃O₃S₂ [M+H]⁺ 528.2121, found 528.2118;

(2E)-N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enamide (10b)

Following the same procedure as **10a**, from *N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (**8**) (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) and ferulic acid (39 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.) with EDCI, HOBt, and TEA. The crude was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (92.5:7.5:0.75) to afford a bright yellow powder with a yield of 42%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.72 (s, 1H), 7.43 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.37 (br s, 1H), 6.23 – 6.07 (m, 2H), 4.40 (br s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.46 – 3.41 (m, 2H), 2.91 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 2.86 – 2.82 (m, 2H), 2.51 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.45 – 2.43 (m, 1H), 1.98 – 1.96 (m, 3H), 1.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 1.57 – 1.51 (m, 2H), 1.27 (s, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 198.8, 166.2, 159.5, 147.7, 147.4, 146.8, 140.7, 132.2, 127.4, 122.3, 118.9, 118.3, 114.8, 111.3, 109.5, 97.5, 57.1, 55.9, 55.7, 53.8 (2C), 40.7, 36.0, 35.3, 31.8 (2C), 31.0; MS *m/z* [M+H]⁺ 515.77; MP: 85°C; IR (neat, cm⁻¹) ν 3435, 2938, 2837, 1647, 1616, 1585, 1511, 1459, 1419, 1264, 1214, 1156; HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₇H₃₅ClN₃O₅ [M+H]⁺ 516.2265, found 516.2264.

***In vitro* evaluation**

DPPH radical scavenging activity

The antiradical activity of the tested compounds was assessed using a miniaturized DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay.^{46,47} The tested compounds were diluted from stock solution in absolute ethanol and incubated in the presence of 100 μM DPPH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution at rt in a 96-wells microplate (Sterilin®, Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) in the dark. The absorbance at 517 nm was then measured every 10 minutes min using Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and used to calculate the specific absorbance of DPPH in each solution subtracting absorbance of all other components in the solution as following:

$$A_{max}^{DPPH} = Abs_{DPPH\ alone} - Abs_{blank}$$

$$A_{sample}^{DPPH} = Abs_{mix\ DPPH/compound} - Abs_{compound}$$

$$A_{min}^{DPPH} = Abs_{mix\ DPPH/Trolox\ at\ 375\ \mu M} - Abs_{Trolox\ at\ 375\ \mu M}$$

where A_{max}^{DPPH} is the maximal absorbance of DPPH alone, A_{sample}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a tested compound at given concentration, A_{min}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a Trolox® from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) at 375 μ M considered as the minimal absorbance. Then, the DPPH radical scavenging activity were calculated according to the following formula:

$$\% DPPH\ RSA = \frac{A_{max}^{DPPH} - A_{sample}^{DPPH}}{A_{max}^{DPPH} - A_{min}^{DPPH}} \times 100$$

Assays were conducted in triplicate at 10 concentration levels (0, 10, 12.5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 μ M) of the tested compound. Absorbance calculations were carried out using Microsoft Excel and regressions were performed using GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). The kinetic absorbance data were fitted with a one-phase exponential association model allowing us to calculate the time of half-reaction and the plateau of the maximum effect at each concentration. The EC₅₀ values (concentrations required to obtain 50% scavenging effect) were calculated plotting concentration versus % DPPH RSA at 60, 120, plateau and fitting the data with linear model for Trolox®, one or two-phase exponential association model for other compounds. EC₅₀ and SD values were the mean of two independent experiments. Trolox® was tested as positive control.

ORAC assay

The antioxidant activity of the synthesized compounds was assessed using the Fluorescein Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFI) assay.^{46,47,48} Trolox® (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and other compounds stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO and diluted in 10 mM phosphate buffer to obtain working solution at 6 concentration levels. 25 μ L of buffer or Trolox® or compounds solution were mixed in a black microplate with 150 μ L of fluorescein (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 8 nM and incubated 30 min at 37°C in a multimodal microplate reader (Synergy 2, Biotek, Winooski, VT, USA). Then, 25 μ L of AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, Sigma-Aldrich) solution at 75 mM were added and mixed in each well before the kinetic. Measurements of fluorescence (λ_{ex} =485/20 nm, λ_{em} =520/20 nm) were performed every minute during 2 hours. Each point was measured in triplicate. The AUC and the Net AUC of the standards and samples were determined using Gen5 Data Analysis Software using equations (1) and (2) respectively.

$$AUC = \frac{F_1}{F_1} + \frac{F_2}{F_1} + \frac{F_3}{F_1} + \dots + \frac{F_n}{F_1} \quad (1)$$

$$NetAUC = AUC_{sample} - AUC_{blank} \quad (2)$$

Where F₁ is the fluorescence reading at the initiation of the reaction and F_n is the last measurement. The standard curve was obtained by plotting the Net AUC of different compound concentrations against their concentration using GraphPad® Prism statistical software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). ORAC values of samples were then calculated dividing the slope of standard curve of each compounds by value obtained for Trolox®. ORAC values are given as mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Affinity as Regards 5-HT₄ Receptors

For competition studies, 2.5 µg of proteins (5-HT₄B membrane preparations, HTS110M, Eurofins. Eurofins's 5-HT₄B membrane preparations are crude membrane preparations made by use of their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression.) were incubated in duplicate at 25 °C for 60 min in the absence or the presence of 10⁻⁶ or 10⁻⁸M of each compound together with 0.2 nM [³H]-GR 113808 (NET 1152, Perkin Elmer) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25°C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 1 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4 °C). Non-specific binding was evaluated in parallel, in the presence of 30 µM serotonin.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the GraphPad Prism 6 software and expressed as $K_i \pm SD$.

In cellulo experiment

Cell lines

SH-SY5Y cells (ATCC, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Euroclone, Milan, Italy) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (supplements were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). Cells were grown in a humidified incubator with 95% air and 5% CO₂ at 37°C.

Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected by electroporation with plasmid encoding HA-tagged 5-HT₄R (100 ng/10⁶ cells), then seeded in 96-well plates (35,000 cells/well). 24 hours after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO201724, at 37°C in 100 µL of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%). Quantification of cAMP production was performed by HTRF[®] by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

MTT ASSAY

The effect of **9b**, **9g**, **10a**, **10b** on the growth of SH-SY5Y cell line was assessed by MTT-based cell viability test, previously described by Mosmann.³⁸ Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a density of 5x10³ cells/well and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂ in humidified atmosphere to allow adhesion. After this time, cells were treated for 24 hours with the compounds or vehicle (DMSO) at different concentrations, ranging from 0.5 µM to 50µM, dissolved in complete DMEM.

Then, cells were carefully washed with PBS and treated with 300 µM MTT dissolved in DMEM and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Then, the aqueous solution was removed and the intracellular formazan salts were dissolved in DMSO for 15 minutes at rt. Finally, the formazan

absorbance from each well was measured at $\lambda = 570$ nm, using a microplate reader (Victor2 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

ROS assay

SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates (OptiPlate black, Perkin Elmer) at 5×10^3 cells/well and incubated overnight at 37°C and 5 % CO₂ to allow adhesion in complete culture medium. After this time, cells were treated for 24 hours with 10 μ M **9f**, **9g**, **10a**, **10b**, 100 μ M Trolox or vehicle (DMSO). Then, cells were carefully washed and treated for 30 minutes with 100 μ M TBH (tert-Butyl hydroperoxide solution, Luperox, Sigma-Aldrich) to induce oxidative stress. After this time, cells were washed with PBS and stained for 30 minutes with 10 μ M H₂DCFDA probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher) for ROS detection.

Finally, cells were washed three times with PBS supplemented with Glucose 5 mM and CaCl₂ 1 mM. The DCF fluorescence was measured ($\lambda_{exc} = 485$ nm; $\lambda_{em} = 535$ nm) with a plate reader (Enspire, PerkinElmer). Data were normalized on protein content determined by Lowry method.

ASSOCIATED CONTENT

Synthesis and spectroscopic characterization of intermediates and analytical analysis of final compounds.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-Mail: christophe.rochais@unicaen.fr; Tel.: +33-2-31-56-68-13. Fax +33-2-31-56-68-03.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment

This work was supported by funding from the Fondation Plan Alzheimer (AAP2015 Project TRIAD 016). The authors gratefully acknowledge the Conseil Régional de Normandie, as well as the European Community (FEDER) for their contribution to the CERMN's analytical platform. European COST action CA15135 (Multi-Target Paradigm for Innovative Ligand Identification in the Drug Discovery Process, MuTaLig) supports this article with the funding of a Short Term Scientific Mission attributed to CL.

ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; DCF, dichlorofluorescein; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; HAT, Hydrogen Atom Transfer; LA, Lipoic Acid; MTDL, multi-target directed ligands; ROS, Reactive Oxygen Species; SET, Single-Electron-Transfer; TBH, tert-butyl hydroxyperoxide; TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

REFERENCES

(1) Martin Prince, A.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Gemma-Claire Ali, M.; Wu, Y.-T.; Prina, M.; Yee Chan, K.; Xia, Z. World Alzheimer Report 2015 The global impact of dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **2015**.

- (2) Forner, S.; Baglietto-Vargas, D.; Martini, A.C.; Trujillo-Estrada, L. LaFerla, F. M. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony. *Trends Neurosci*, **2017**, *40*, 347–357.
- (3) Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 3030–3059.
- (4) Tonnies, E.; Trushina, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **2017**, *57*, 1105–1121
- (5) Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, P.; Collin, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biology*, **2018**, *14*, 450–464.
- (6) Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug-Development Pipeline: Few Candidates, Frequent Failures. *Alzheimers. Res. Ther.* **2014**, *6*, 37.
- (7) Karran, E.; De Strooper, B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem.* **2016**, *139*, 237–252
- (8) Congdon, E. E.; Sigurdsson, E. M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurology* **2018**, *14*, 399–415.
- (9) Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Why Pleiotropic Interventions Are Needed for Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 392–409.
- (10) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 347–372.
- (11) Rosini, M.; Simoni, E.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Multi-Target Design Strategies in the Context of Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibition and NMDA Receptor Antagonism as the Driving Forces. *Neurochem. Res.* **2014**.
- (12) Leon, R.; Garcia, A. G.; Marco-Contelles, J. Recent Advances in the Multitarget-Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 139–189.
- (13) Matos, M. J.; Rodríguez-Enríquez, F.; Borges, F.; Santana, L.; Uriarte, E.; Estrada, M.; Rodríguez-Franco, M. I.; Laguna, R.; Viña, D. 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 2071–2079.
- (14) Lee, S.; Zheng, X.; Krishnamoorthy, J.; Savelieff, M. G.; Park, H. M.; Brender, J. R.; Kim, J. H.; Derrick, J. S.; Kochi, A.; Lee, H. J.; Kim, C.; Ramamoorthy, A.; Bowers, M. T.; Lim, M. H. Rational Design of a Structural Framework with Potential Use to Develop Chemical Reagents That Target and Modulate Multiple Facets of Alzheimer's Disease. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 299–310.
- (15) Oliveira, C.; Bagetta, D.; Cagide, F.; Teixeira, J.; Amorim, R.; Silva, T.; Garrido, J.; Remião, F.; Uriarte, E.; Oliveira, P. J.; Alcaro, S.; Ortuso, F.; Borges, F. Benzoic acid-derived nitrones: A new class of potential acetylcholinesterase inhibitors and neuroprotective agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *174*, 116–129.
- (16) Prati, F.; De Simone, A.; Bisignano, P.; Armirotti, A.; Summa, M.; Pizzirani, D.; Scarpelli, R.; Perez, D. I.; Andrisano, V.; Perez-Castillo, A.; Monti, B.; Massenzio, F.; Polito, L.; Racchi, M.; Favia, A. D.; Bottegoni, G.; Martinez, A.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A. Multitarget Drug Discovery for Alzheimer's Disease: Triazinones as BACE-1 and GSK-3 β Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1578–1582.
- (17) Claeyssen, S.; Bockaert, J.; Giannoni, P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 940–943.
- (18) Lalut, J.; Karila, D.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Modulating 5-HT 4 and 5-HT 6 Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 781–795

- (19) Cachard-Chastel, M.; Lezoualc'h, F.; Dewachter, I.; Deloménie, C.; Croes, S.; Devijver, H.; Langlois, M.; Van Leuven, F.; Sicsic, S.; Gardier, A. M. 5-HT₄ Receptor Agonists Increase sAPP α Levels in the Cortex and Hippocampus of Male C57BL/6j Mice. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 883–892.
- (20) Cochet, M.; Donneger, R.; Cassier, E.; Gaven, F.; Lichtenthaler, S. F.; Marin, P.; Bockaert, J.; Dumuis, A.; Claeysen, S. Chronic treatments with a 5-HT₄ receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **2017**, *126*, 128–141.
- (21) Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert Fréon, A.; Mignani, S.; Cresteil, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E3825–E3830.
- (22) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Gaven, F.; Giannoni, P.; Hamidouche, K.; Hedou, D.; Dubost, E.; Genest, D.; Yahiaoui, S.; Freret, T.; Bouet, V.; Dauphin, F.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert-Freon, A.; Legay, R.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Dallemagne, P. Novel Multi-Target Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities as Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3172–3187.
- (23) Yahiaoui, S.; Hamidouche, K.; Ballandonne, C.; Davis, A.; de Oliveira Santos, J. S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–293.
- (24) Marcinkowska, M.; Bucki, A.; Panek, D.; Siwek, A.; Fajkis, N.; Bednarski, M.; Zygmunt, M.; Godyń, J.; Del Rio Valdivieso, A.; Kotańska, M.; Kołaczkowski, M.; Więckowska, A. Anti-Alzheimer's multitarget-directed ligands with serotonin 5-HT₆ antagonist, butyrylcholinesterase inhibitory, and antioxidant activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2019**, *352*, e1900041.
- (25) Spagnuolo, C.; Napolitano, M.; Tedesco, I.; Moccia, S.; Milito, A.; Russo, G. L. Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Curr Top Med Chem.* **2016**, *16*, 1943–1950.
- (26) Zhang, X.; He, X.; Chen, Q.; Lu, J.; Rapposelli, S.; Pi, R. A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target directed ligands against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 543–550.
- (27) Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lenaz, G.; Rosini, M.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Melchiorre, C. Toward a rational design of multitarget-directed antioxidants: merging memoquin and lipoic acid molecular frameworks. *J Med Chem.* **2009**, *52*, 7883–7886.
- (28) Yang, W.; Ruan, Z.; Wang, Y.; Van Kirk, K.; Ma, Z.; Arey, B. J.; Cooper, C. B.; Seethala, R.; Feyen, J. H. M.; Dickson, J. K. Discovery and Structure–Activity Relationships of Trisubstituted Pyrimidines/Pyridines as Novel Calcium-Sensing Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1204–1208.
- (29) Kaspi, J.; Lerman, O.; Arad, O.; Alnabari, M.; Sery, Y. Process for the preparation of donepezil *Eur. Pat. Appl.*, EP 1386607 A1, **2004**.
- (30) Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2* (4), 152–159.
- (31) Tai, A.; Sawano, T.; Yazama, F.; Ito, H. Evaluation of Antioxidant Activity of Vanillin by Using Multiple Antioxidant Assays. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1810*, 170–177.

- (32) Zhang, Y.-H.; Wang, D.-W.; Xu, S.-F.; Zhang, S.; Fan, Y.-G.; Yang, Y.-Y.; Guo, S.-Q.; Wang, S.; Guo, T.; Wang, Z.-Y.; Guo, C. α -Lipoic Acid Improves Abnormal Behavior by Mitigation of Oxidative Stress, Inflammation, Ferroptosis, and Tauopathy in P301S Tau Transgenic Mice. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 535–548.
- (33) Sultana, R.; Ravagna, A.; Mohmmad-Abdul, H.; Calabrese, V.; Butterfield, D.A. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta- peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J Neurochem.* **2005**, *92*, 749–758.
- (34) Perluigi, M.; Joshi, G.; Sultana, R.; Calabrese, V.; De Marco, C.; Coccia, R.; Cini, C.; Butterfield, D. A. In vivo protective effects of ferulic acid ethyl ester against amyloid-beta peptide 1-42-induced oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *84*, 418–426.
- (35) Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-Pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109*, 618–624.
- (36) Gunesch, S.; Schramm, S.; Decker, M. Natural antioxidants in hybrids for the treatment of neurodegenerative diseases: a successful strategy? *Future Med Chem.* **2017**, *9*, 711–713.
- (37) Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation - Sebaugh - 2011 - Pharmaceutical Statistics. *Pharm Stat.* **2011**, *10*, 128–134.
- (38) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (39) Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader 11 Mention of a Trade Name, Proprietary Product, or Specific Equipment Does Not Constitute a Guarantee by the United States Department of Agriculture and Does Not Imply Its Approval to the Exclusion of Other Products That May Be Suitable. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (5), 612–616.
- (40) Rankovic, Z. CNS Drug Design: Balancing Physicochemical Properties for Optimal Brain Exposure. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2584–2608.
- (41) Bajda, M.; Więckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sottriffer, C.A.; Malawska, B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*(3), 5608–5632.
- (42) Bianco, F.; Bonora, E.; Natarajan, D.; Vargiolu, M.; Thapar, N.; Torresan, F.; Giancola, F.; Boschetti, E.; Volta, U.; Bazzoli, F.; Mazzoni, M.; Seri, M.; Clavenzani, P.; Stanghellini, V.; Sternini, C.; De Giorgio, R. Prucalopride exerts neuroprotection in human enteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2016**, *310*, G768–775.
- (43) Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 227–250.
- (44) Boyer, N.; Gloanec, P.; De Nanteuil, G.; Jubault, P.; Quirion, J. C. Synthesis of α -Difluoro- β -amino Esters or gem-Difluoro- β -lactams as Potential Metalloprotease Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4277–4295.
- (45) Villalobos, A.; Blake, J. F.; Biggers, C. K.; Butler, T. W.; Chapin, D. S.; Chen, Y. L.; Ives, J. L.; Jones, S. B.; Liston, D. R.; Nagel, A. A.; Nason, D. M.; Nielsen, J. A.; Shalaby, J. A.; White, W. F. Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2721–2734.
- (46) Apak, R.; Gorinstein, S.; Bohm, V.; Schaich, K. M.; Ozyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957–998.
- (47) Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* **2015**, *14*, 111–125.

Chapitre 3 : Travaux personnels

(48) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.

3. Résumé des principaux résultats

De par sa complexité, la MA est une maladie dans laquelle une intervention pléiotropique est nécessaire afin de ralentir sa progression. Parmi les différentes causes moléculaires de la maladie, la pathologie amyloïde ainsi que le stress oxydant jouent des rôles primordiaux dans la pathogenèse. Ces deux causes sont étroitement liées entre elles. Dans ce premier article, le but était de développer d'innovants MTDLs capables de diminuer le stress oxydant en réduisant les EROs mais également de diminuer la formation et l'accumulation de peptides A β à travers un motif agoniste des récepteurs 5-HT₄ dans un contexte neuronal.

Les composés ont été conçus en liant à une pipéridine centrale deux motifs chimiques distincts, avec d'une part un motif caractéristique des agonistes des récepteurs 5-HT₄ tels que l'aminochlorobenzophénone présent dans des composés tels que le RS-67333 ou le donécopride, et d'autre part plusieurs motifs antioxydants tels que des composés phénoliques, l'acide lipoïque ou l'acide férulique.

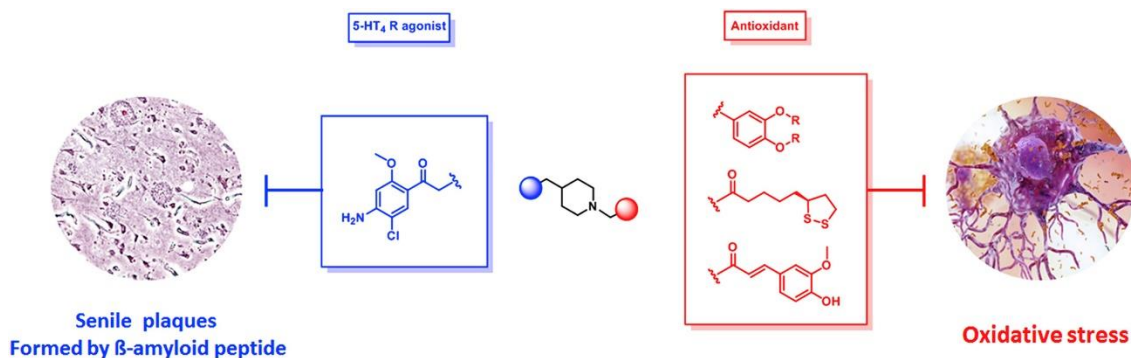


Figure 50 - Conception des composés MTDLs.²³⁸

²³⁸ Lanthier, C *et al.* Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT₄ Receptors with in Cellulo Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111596.

a. Synthèse des composés

Afin d'avoir une synthèse la plus linéaire possible, le synthon **7** a été préparé d'après de précédentes études en 3 étapes.^{209,215} La première étape consiste en la formation du β -céto-ester **2** à partir de l'acide carboxylique **1** activé grâce au CDI et réagissant avec du 3-éthoxy-3-oxopropanoate de potassium avec un rendement de 60%. Suite à cela, le composé **2** a subi une alkylation par le fragment **6** suivie d'une dernière étape de saponification/décarboxylation sous l'action de KOH dans un mélange EtOH/H₂O afin d'obtenir ce synthon principal **7** avec un rendement de 67%. La synthèse du composé **6** sera précisée dans la partie discussion et projet annexes. À partir de ce synthon **7**, les différents composés finaux ont donc été obtenus en 2 ou 3 étapes. Une première étape de déprotection du Boc de la pipéridine par le TFA tout d'abord, suivie par une réaction de substitution nucléophile avec divers fragments antioxydants préalablement synthétisés, dont la synthèse sera également décrite dans la partie discussion. Ces étapes ont des rendements moyens de 28 à 47% principalement dus à des étapes de purification complexes. Une dernière étape de déprotection des phénols protégés par un groupement benzyle a été réalisée pour 3 composés avec l'HBr à 33% dans l'AcOH avec des rendements allant de 67 à 85%.

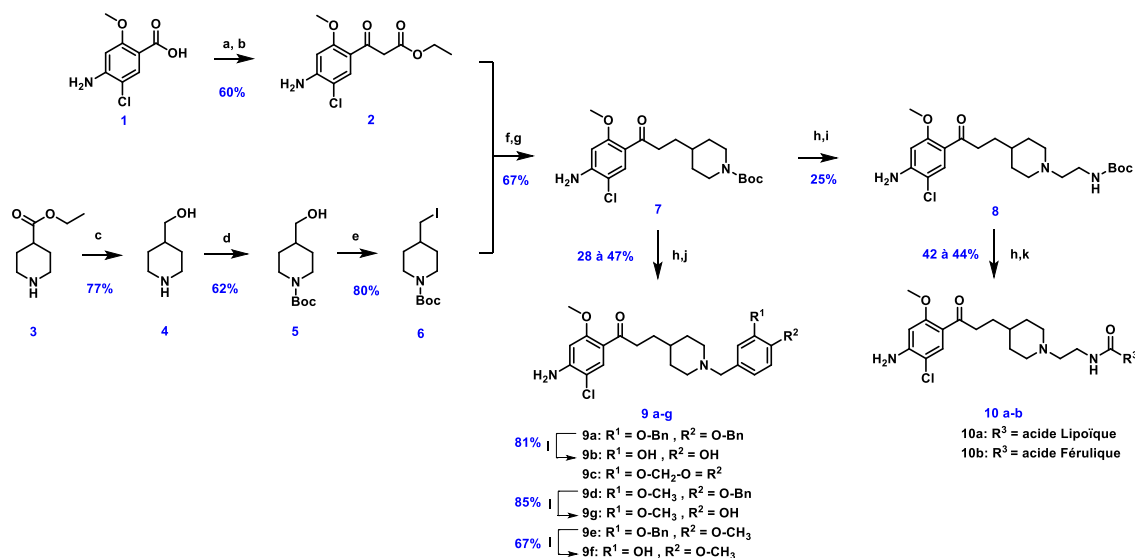


Schéma 1- Voie de synthèse de différents composés, Réactifs et Conditions : (a) CDI, THF; (b) KO₂CCH₂CO₂Et, MgCl₂, THF, 40°C; (c) LiAlH₄, Et₂O, reflux; (d) (Boc)₂O, DCM; (e) PPh₃, I₂, Imidazole, THF; (f) K₂CO₃, DMF; (g) KOH, EtOH/H₂O; (h) TFA, DCM; (i) tert-butyl N-(2-bromoethyl)carbamate, K₂CO₃, ACN; (j) Bromobenzylalcohol, K₂CO₃, DCM; (k) EDCI, HOBt, TEA, 0°C à ta, dans le noir, sous N₂; (l) HBr 33% in AcOH, DCM, 0°C.

Afin de lier les acides férulique et lipoïque, tout en maintenant la basicité de l'azote de la pipéridine nécessaire à l'activité envers le récepteur 5-HT₄, l'ajout d'un linker éthylamine a été réalisé. Ce linker a été sélectionné car ayant peu d'influence sur l'affinité envers le récepteur 5-HT₄ comme le montrent les précédents travaux du laboratoire.²¹⁵ Le second synthon **8** a donc été obtenu après déprotection

Chapitre 3 : Travaux personnels

du Boc de la pipéridine avec du TFA, suivie d'une étape de *N*-alkylation avec un rendement de 25%. Les acides férulique et lipoïque ont ensuite été couplés grâce à l'EDCI, HOBt avec des rendements de 42 à 44%. L'acide lipoïque étant un composé instable, son couplage a été effectué à température ambiante (ta), dans le noir et sous azote afin d'éviter toute dégradation. Une fois couplé, le composé est cependant beaucoup plus stable.

Au total neuf nouveaux composés finaux ont été synthétisés sur cette série et ont ensuite été évalués dans divers tests *in vitro* ainsi que *in cellulo*.

b. Evaluation *in vitro* des composés

Le but de cette première étude était de découvrir un composé ayant des propriétés antioxydantes suffisantes ainsi qu'une bonne affinité envers les récepteurs 5-HT₄. Les résultats sur les tests *in vitro* ont mis en évidence trois composés en particulier, les composés **9b**, **9g** et **10b** (Figure 51).

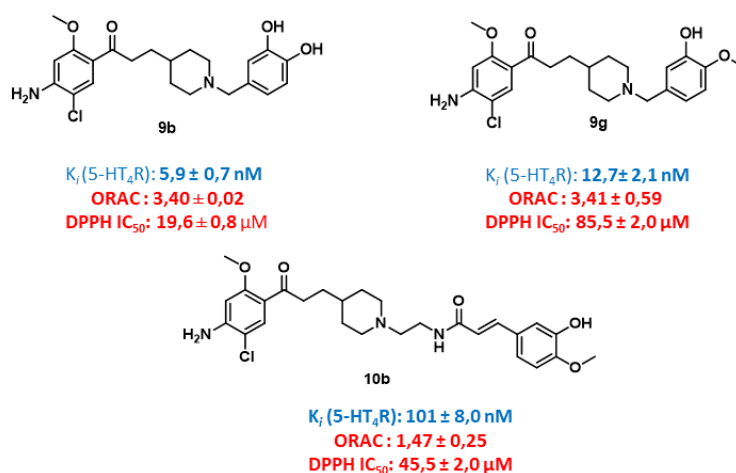


Figure 51 - Structure des composés les plus intéressants et résultats des tests *in vitro*.

Comme on peut le voir, les composés **9b** et **9g**, possédant des motifs catéchol et isovanilline respectivement, ont une forte affinité pour le récepteur 5-HT₄ avec des K_i de 5,9 nM pour **9b** et 12,7 nM pour **9g**. Le composé **10b**, lui, semble moins affiné avec un K_i de 101 nM pour la cible. En ce qui concerne les résultats sur les tests antioxydants, les composés **9b** et **9g** ont obtenu des scores ORAC près de 3,4 fois supérieurs à celui du trolox, le témoin positif. Le composé **10b**, comportant l'acide férulique semble une fois de plus un peu moins actif avec un score ORAC de seulement 1,5 fois celui du trolox. Concernant les tests DPPH, les trois composés **9b**, **9g** et **10b** ont montré des propriétés antioxydantes assez intéressantes avec des IC₅₀ de 19 μM, 85 μM et 45 μM respectivement. Ces

résultats sont de toute évidence corrélés à la présence d'un ou plusieurs phénols libres dans les composés.

c. Évaluation *in cellulo* des composés

Plusieurs de ces composés ont ainsi été sélectionnés afin d'être testés dans des conditions plus complexes en milieu cellulaire.

Le profil pharmacologique des trois composés **9b**, **9g** et **10b** a été évaluée sur des récepteurs humanisés 5-HT₄ exprimés dans des cellules COS-7 (cellule rénale de singe utilisé afin d'exprimer des récepteurs spécifiques). Cette étude a permis de mettre en évidence l'activité agoniste partielle de ces composés avec des EC₅₀ de 2,8 nM, 1,4 nM et 4,5 nM pour **9b**, **9g** et **10b** respectivement.

Des études de toxicité ont également été effectuées au moyen d'un test MTT permettant de montrer l'innocuité de ces produits jusqu'à la concentration de 10 µM sur des cellules SH-SY5Y (cellules de neuroblastome sur lesquelles le prucalopride a été testé notamment). Par la suite, un test d'induction de stress oxydant par le *tert*-butylperoxyde (*t*-BuOOH), en présence d'une sonde fluorescente le DCFDA, a été réalisé sur ce même type cellulaire. Cela a montré un effet antioxydant des composés susmentionnés dans un contexte cellulaire plus complexe. En effet, les composés **9b**, **9g** et **10b** ont notamment démontré une réduction d'induction de stress oxydant de plus de 50% par rapport au groupe contrôle.

d. Conclusion de l'article

Cette étude a permis de démontrer qu'il était possible de générer une nouvelle série de composés à la fois agonistes des récepteurs 5-HT₄ mais également ayant des propriétés antioxydantes au niveau cellulaire. Parmi les trois composés les plus intéressants, le composé **9g** semble être le meilleur compromis entre une bonne activité envers le récepteur 5-HT₄ avec un K_i de 12,7 nM dans le test *in vitro*, une EC₅₀ de 1,4 nM et un E_{max} de 57% par rapport à la référence, dans le test de profil envers le récepteur h5-HT₄ en milieu cellulaire. De plus, ce composé a montré de bonnes activités antioxydantes en milieu cellulaire également.

Bien qu'il existe des activités très différentes entre les essais *in vitro* et *in cellulo* avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire pour l'un et du micromolaire pour l'autre, ces composés restent très intéressants de par leur activité sur des modèles cellulaires complexes. De plus, il faut noter que lors

de l'induction du stress oxydant avec du *t*-BuOOH, la quantité d'ERO n'est quantifiable qu'après un certain seuil de DCFDA oxydé, ce seuil est atteint à des concentrations en EROs bien supérieures au stress oxydant présent dans les neurones de patients atteints par la MA. Il semble alors plausible, sur ces premières données, qu'avec de bonnes propriétés pharmaco-chimiques ainsi qu'un bon passage de la BHE comme le laisse présager le LogP calculé, le composé **9g** pourrait avoir un réel effet antioxydant à des concentrations nanomolaires. Ce composé pourrait être testé dans un futur proche, sur des modèles murins de la MA.

4. Discussion et projets annexes

a. Préparation du fragment pipéridine central

Le motif pipéridine central est un motif nécessaire à l'activité envers le récepteur 5-HT₄, c'est pour cela qu'on le retrouve dans de nombreux composés agissant sur cette cible.¹²⁸ Le synthon **6** a donc été synthétisé en 3 étapes à partir de l'isonipécotate d'éthyle **3**. Une première étape de réduction de l'ester en alcool grâce au LiAlH₄ est tout d'abord réalisée avec un rendement de 77%. Ensuite une étape de protection de l'amine par un groupement Boc permet d'obtenir la pipéridine méthanol **5** qui peut alors subir une iodation, dans les conditions de Garegg, afin de conduire au composé **6** avec un rendement de 80% sur cette dernière étape.²³⁹

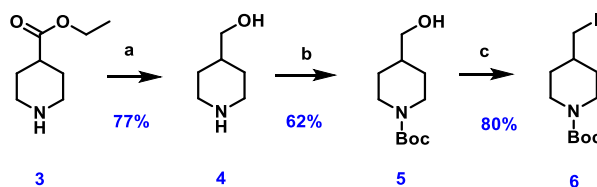


Schéma 2 – Synthèse du fragment pipéridine **6** ; Réactifs et conditions : (a) LiAlH₄, Et₂O, reflux ; (b) (Boc)₂O, DCM ; (c) PPh₃, I₂, Imidazole, THF.

b. Préparation des motifs antioxydants

Afin de coupler les différents motifs antioxydants à notre synthon principal **7**, il a été nécessaire de former certains intermédiaires sous forme d'halogénures de benzyle. Les acides, quant à eux, ont été couplés, tels quels, par couplage peptidique avec le synthon **8** permettant de conserver l'azote de la pipéridine suffisamment basique pour sa liaison avec le récepteur 5-HT₄.

²³⁹ Garegg, P. J. Some Aspects of Regio-, Stereo-, and Chemoselective Reactions in Carbohydrate Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56* (7), 845–858.

Chapitre 3 : Travaux personnels

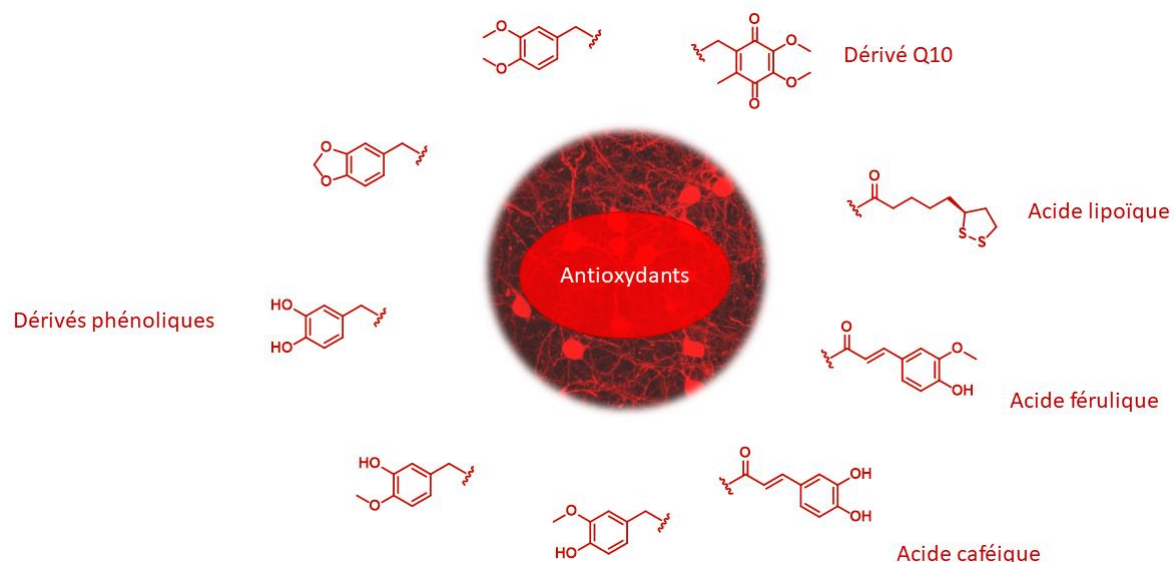


Figure 52 - Motifs antioxydants sélectionnés.

i. Composés phénoliques et dérivés

Les composés phénoliques et dérivés sont des structures largement décrites comme motifs antioxydants. On les retrouve dans de nombreuses structures dérivées de produits naturels tels que la curcumine et les composés polyphénoliques (voir 4 Les antioxydants). Afin de lier ces motifs simplement à la pipéridine avec de bons rendements, différents halogénures de benzyle ont été synthétisés.

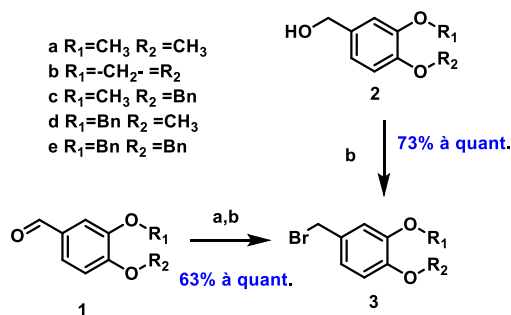


Schéma 3 - Synthèses des fragments phénoliques et dérivés, Réactifs et conditions : (a) NaBH_4 , DCM, 4 h, 0°C ; (b) PBr_3 , Et_2O , 1 h, 0°C .

Les précurseurs des aldéhydes **1** contenant des phénols libres ont été préalablement protégés par des groupements benzyles afin d'éviter les réactions secondaires sur les phénols. Ensuite deux étapes étaient nécessaires à la formation des bromobenzyles **3a-e**. La première étape consistant en une réduction de l'aldéhyde en alcool grâce au NaBH_4 , suivie d'une étape de bromation de cet alcool par le PBr_3 avec des rendements de 63% à quantitatif. Pour certains composés, dont l'alcool était disponible au laboratoire, les produits ont été obtenus après bromation directe avec PBr_3 et des rendements de 73 à 92%.

ii. Composés dérivés du coenzyme Q10

La synthèse et l'utilisation du motif hydroxyquinone afin d'obtenir des analogues de type coenzyme Q10 ont été envisagées en suivant la méthode décrite par Wang *et al.*²⁴⁰

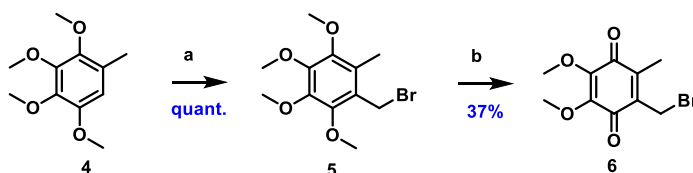


Schéma 4 - Synthèse du fragment hydroxyquinone, réactifs et conditions : (a) (HCHO)_n, 47% HBr, 40°C, 1h; (b) CAN, THF/H₂O, 0°C, 3h.

Une première étape de bromométhylation, avec comme réactif de Blanc, de l'HBr 47% à la place de l'HCl 37% a été réalisée. La chlorométhylation de Blanc est une réaction chimique entre un composé aromatique, du formaldéhyde et de l'acide chlorhydrique pouvant être catalysée par du chlorure de zinc. Elle a été découverte par Gustave Louis Blanc en 1923.²⁴¹

Cette étape a été réalisée avec du paraformaldéhyde à partir du tétraméthoxy-méthyl-benzène commercial, avec un rendement quantitatif et sans solvant. Le composé **6** a ensuite été obtenu après oxydation grâce au CAN (nitrate d'ammonium cérique), avec un rendement de 37%. Ce faible rendement est expliqué par la faible stabilité du composé **6** et sa dégradation partielle lors de la purification sur colonne chromatographique. Les couplages effectués avec ces composés ont donc été réalisés rapidement après sa synthèse et purification.

iii. Composés bromophénoliques

Ce fragment a été synthétisé dans le cadre d'un projet différent, relatif aux travaux de thèse de Bérénice Hatat travaillant sur la conception, la synthèse et l'évaluation de molécules multi cibles, agonistes des récepteurs 5-HT₄, antagonistes des récepteurs 5-HT₆ et également inhibitrices de l'AcChE. Le composé issu de la collaboration entre nos deux projets ayant été testé dans un test DPPH et ORAC

²⁴⁰ Wang, J. *et al.* Efficient Synthesis and Antioxidant Activities of N-Heterocyclyl Substituted Coenzyme Q Analogues. *Bioorganic Chem.* **2016**, *68* (Supplement C), 214–218.

²⁴¹ Blanc, G. Preparation of Aromatic Chloromethylenic Derivatives. *Bull Soc Chim Fr.* **1923**, *33*, 313.

a montré des propriétés antioxydantes pouvant être dues à la présence de son phénol. Ce fragment a été synthétisé de la manière suivante.

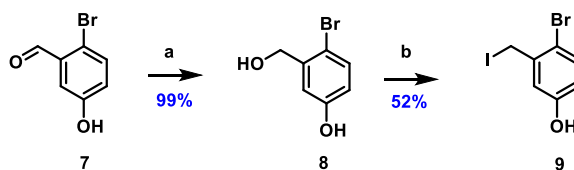


Schéma 5 - Synthèse du fragment bromophénolique, réactifs et conditions : (a) NaBH₄, MeOH, 0°C, 4h; (b) KI, P₂O₅, ACN, ta, 16 h.

Le fragment **9** a été obtenu en 2 étapes, la première consistant en la réduction de l'aldéhyde en alcool grâce au NaBH₄ avec un rendement de 99% suivie d'une seconde étape d'iodation par KI et P₂O₅ avec un rendement de 52%.

c. Travaux annexes réalisés autour du motif aminochlorobenzophénone

i. Autres motifs antioxydants non publiés

Ces différents fragments antioxydants ont été couplés en deux étapes avec le synthon **7** ou **8**. La majorité des composés obtenus sur cette série ont été décrits dans la publication ci-dessus, cependant d'autres essais ont été réalisés.

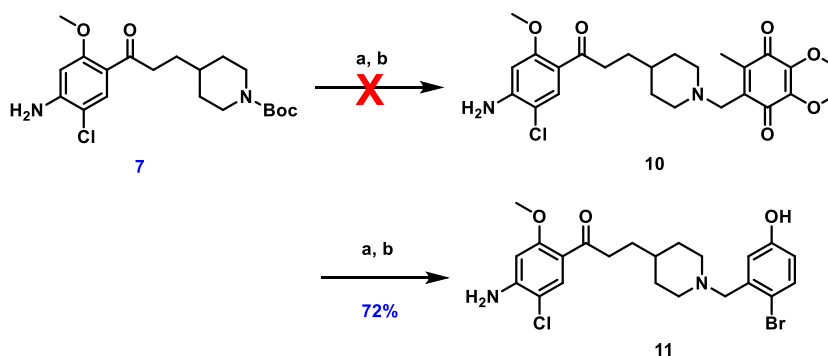


Schéma 6 - Produits dérivés du synthon **7** non publiés ; réactifs et conditions : (a) TFA, DCM, ta, 1h ; (b) K₂CO₃, ACN, ta.

A partir du synthon **7**, plusieurs nouveaux composés ont été envisagés (Schéma 6). La S_N avec le dérivé **6**, inspiré du coenzyme Q10 a été réalisée. Lors de cet essai, bien que la masse du composé **10** soit décelée en LCMS et le produit isolé après purification, celui-ci se dégrade très rapidement malgré les précautions portées à l'environnement dans lequel était conservé ce composé (à froid et sous

azote). La dégradation a été confirmée par plusieurs analyses RMN. Ce composé étant trop instable, son obtention a été rapidement abandonnée.

Le composé **11** a été obtenu après déprotection du synthon **7** par le TFA suivi d'une S_N avec le fragment **9**, avec un rendement global sur deux étapes de 72%. Ce composé fait l'objet d'une publication commune avec Hatat *et al.* disponible en annexe.

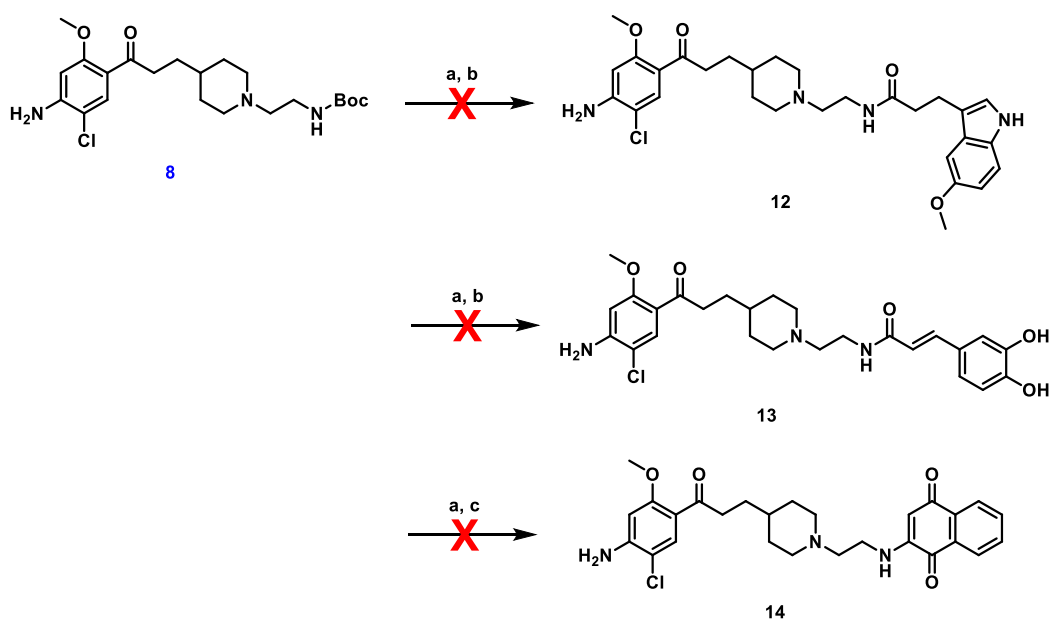


Schéma 7 - réactifs et conditions : (a) TFA, DCM, rt, 1 h ; (b) EDCI, HOBT, TEA, THF, 0°C à ta, 16 h (c) K_2CO_3 , DCM, rt, 16 h .

La stratégie de couplage utilisée avec les dérivés pour obtenir les composés **10a** et **10b** n'a malheureusement pas été effective avec l'acide caféique ainsi que dérivé de la mélatonine. Concernant le dérivé de la mélatonine **12**, le couplage en lui-même n'a pas fonctionné, seuls les produits de départ ont été isolés après purification. D'autres agents de couplage pourraient alors être utilisés, mais par manque de temps ces stratégies n'ont pas été développées. Concernant l'acide caféique, bien que la formation du produit **13** soit observée par suivi CCM, celui-ci semble se dégrader sur colonne chromatographique sur silice ou alumine, ne permettant alors pas l'isolation du produit. Une dernière S_N a été tentée entre le synthon **8** et un dérivé bromo-naphtoquinone disponible au laboratoire afin de former le composé **14**. Malheureusement après purification, seules les matières premières ont été récupérées.

ii. Série tétrahydro-aminochlorobenzophénone

Chapitre 3 : Travaux personnels

En nous basant sur le hit **9g** découvert lors de la synthèse et l'évaluation de cette première série, un nouveau dérivé a été suggéré, analogue structural entre **9g** et le lead développé par Brodney *et al.* PF-04995274. La première idée a donc été de remplacer le méthyle du groupement méthoxy par un tétrahydrofurane (THF) selon la rétrosynthèse suivante.

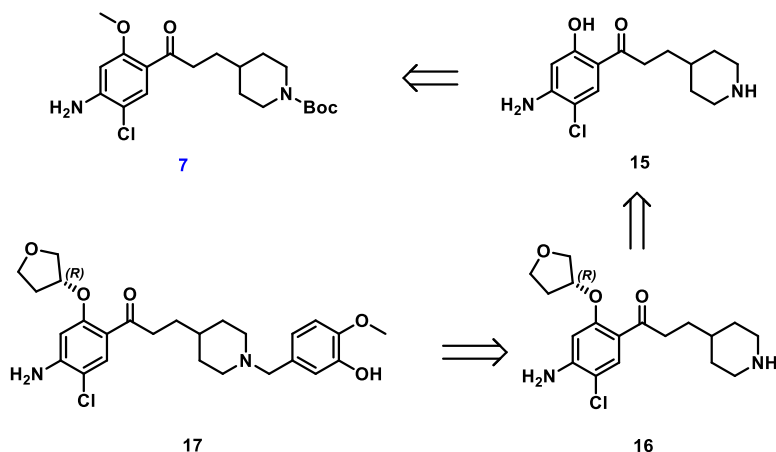


Schéma 8 - Rétrosynthèse possible pour la série tétrahydrofurane benzophénone

A partir du même synthon disponible **7**, il suffirait de déméthyle l'éther grâce au BBr_3 . Cette étape permettrait également vraisemblablement la déprotection du Boc pour obtenir le composé **15**. Ensuite une réaction de Mitsunobu pourrait être réalisée afin de coupler le motif tétrahydrofurane et former **16**. La réaction de Mitsunobu entraînant une inversion de la stéréochimie du précurseur (*S*), on pourrait s'attendre à une configuration (*R*) de ce fragment THF final **16**.

Dans les dernières étapes, le fragment isovanilline serait couplé par la méthode habituelle par substitution nucléophile avec un dérivé bromo-phényle et une déprotection avec de l' HBr à 33% dans l'acide acétique serait réalisée pour libérer le phénol **17** de son groupement protecteur benzyle.

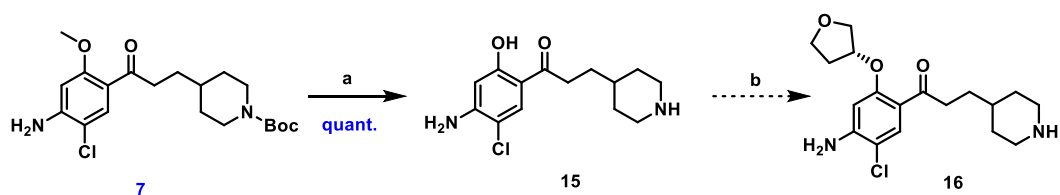


Schéma 9 – Synthèse des dérivé THF, conditions et réactifs : (a) BBr_3 , DCM, 30 min, 0°C à ta; (b) (*S*)-tetrahydrofuran-3-ol, PPh_3 , DEAD, DMF, 16 h, ta.

La première étape de cette synthèse a donc été réalisée, nous permettant d'obtenir le composé **15** avec un rendement quantitatif. Comme prédit, l'utilisation de BBr_3 , en plus de déméthyle le phénol, a également hydrolysé le groupement protecteur Boc présent sur l'azote de la pipéridine. Une étape de reprotection de cet azote a été envisagée mais les environnements électroniques du phénol et de

l'amine pipéridinique étant fondamentalement très différents cela ne devrait pas poser trop de problème lors de la réaction de Mitsunobu par la suite.

Un premier essai de formation de liaison éther entre le phénol et le (S)-3-hydroxy-THF a été réalisé. Malheureusement bien que la réaction ait été portée à reflux pendant 48h, seules les matières premières ont été détectées en CCM. Le composé **15** étant peu soluble dans le THF (solvant de référence dans les réactions de type réaction de Mitsunobu), un autre solvant plus polaire, le DMF, sera envisagé dans les prochaines tentatives.

5. Conclusion

Le but général de cette première étude était de synthétiser de nouveaux composés agonistes des récepteurs 5-HT₄ possédant des capacités antioxydantes. Cette première étude nous a alors permis d'analyser l'impact de la substitution de la pipéridine par différents motifs antioxydants.

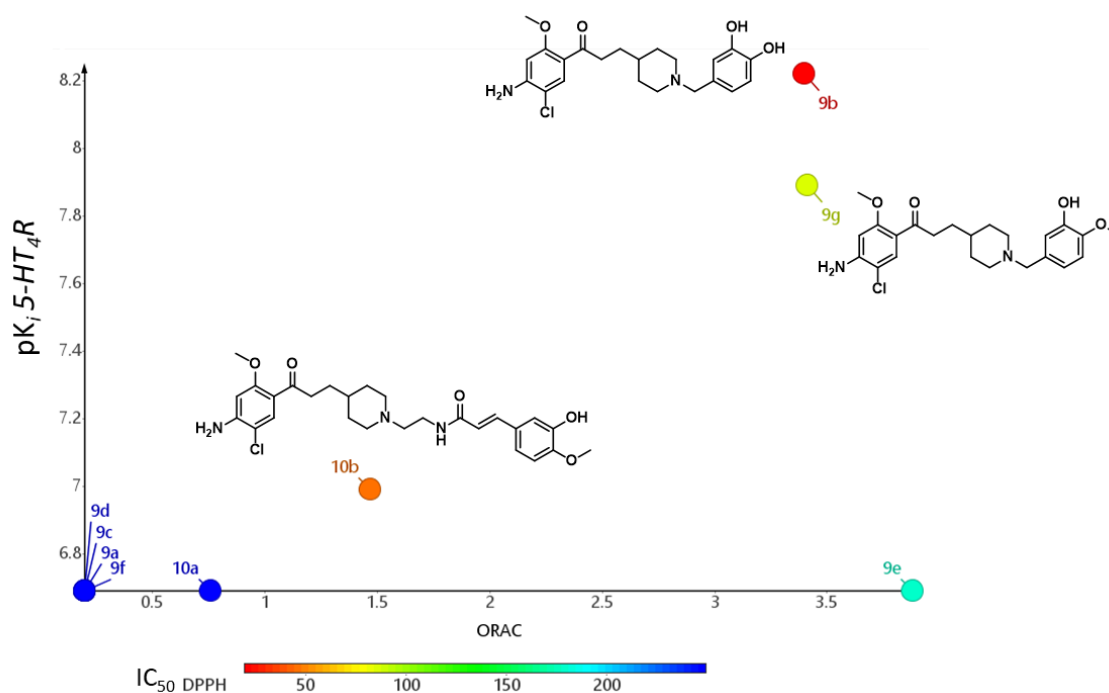


Figure 53- Récapitulatifs des tests *in vitro* sur la série aminochlorobenzophénone

Les premières analyses *in vitro* ont mis en évidence trois composés particulièrement intéressants **9b**, **9g** et **10b** (Figure 53). Sur cette figure, le score ORAC est inscrit en abscisse, le pK_i sur le récepteur 5-HT₄ en ordonnée, et l'IC₅₀ au test DPPH est représentée par des variations de couleur (rouge pour très antioxydant, bleu pour faiblement ou pas antioxydant). On peut noter une nette différence d'activité entre le dérivé vanilline **9e** et le dérivé isovanilline **9g**, aussi bien sur l'affinité envers le récepteur 5-HT₄ que sur la capacité antioxydante dans le test DPPH. Cette nette différence reste à ce jour inexplicée. Des études *in silico* pourraient cependant nous apporter des éléments de réponse

Les tests cellulaires réalisés sur ces composés ont permis de vérifier leur innocuité à la dose de 10 μM sur des cellules de neuroblastome SH-SY5Y. Un test cellulaire d'induction de stress oxydant par le *t*-BuOOH a également été réalisé sur cette même lignée cellulaire. Le stress oxydant a été mesuré par une sonde devenant fluorescente en présence de ERO, le DCFDA. Bien que présente dans un milieu cellulaire plus complexes les différents composés de cette série ont tout de même empêché l'induction de stress oxydant induit par la *t*-BuOOH. Les composés **9b** et **10b** se sont même avérés plus puissants à la concentration de 10 μM que le témoin positif, le trolox, à la concentration de 100 μM .

Le composé **9g** présentant le meilleur compromis entre activité envers le récepteur et capacité antioxydante a été sélectionné en tant que Hit sur ce projet. Afin que celui-ci soit testé sur un modèle murin de la maladie, les propriétés physico-chimiques devront être évaluées. La cible se trouvant dans le SNC, des essais de passage de barrière hémato encéphalique pourraient également être réalisés dans le futur. De plus, sa toxicité envers HepG2 et hERG est un paramètre à évaluer le plus précocement possible afin de se prévenir d'une potentielle toxicité hépatique ou cardiaque.

Ce composé **9g** a été préféré au composé catéchol **9b**. Bien que celui-ci présentait de meilleurs résultats au travers des premiers tests *in vitro*, cela ne s'est pas grandement répercuté sur les tests *in cellulo*. En effet le composé **9b** n'a pas montré une plus forte diminution d'induction de stress oxydant alors que lors des tests DPPH, son IC_{50} était près de 4,5 fois inférieure à celle du composé **9g**. Les tests ORAC sur ces deux composés montraient cependant des valeurs à peu près égales, se rapprochant alors plus de ce que l'on a observé dans le test *in cellulo* d'induction de stress oxydant par *t*-BuOOH. Bien que cette corrélation entre test ORAC et *in cellulo* se confirme sur les composés **9b** et **9g**, il faut cependant noter que le composé **10b** contenant l'acide férulique, bien que peu actif sur le test ORAC avec un score de 1,47, a été très efficace sur le test *in cellulo*. Celui-ci n'a pas été sélectionné en tant que hit de par son affinité envers le récepteur 5-HT₄.

D'un point de vue des propriétés pharmaco-chimiques les composés **9b** et **9g** sont très semblables. Cependant le catéchol **9b** va présenter un cLogP légèrement inférieur à celui du composé **9g**. De plus le groupement catéchol est un groupement identifié comme PAINS (Pan assay interference inhibitor) pouvant alors induire la survenue de faux positifs lors des essais biologiques.²⁴² D'après les modèles de prédictions de SwissADME,^{243,244} ces deux composés ne seraient cependant pas perméables à la

²⁴² Baell, J. B. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *J Nat Prod* **2016**, 13.

BHE à la différence du donécopride et de l'analogue portant un simple groupement benzyle comme partie proximale.

Les données expérimentales sur le donécopride ou l'analogue carbamoylé de Toublert *et al.* tendent à confirmer sa bonne perméabilité à travers la BHE malgré un résultat négatif prédictif de passage de BHE de SwissADME sur ce dernier composé.^{209,217} Ces résultats ne sont que des prédictions, et bien que cela puisse donner des indications, ils doivent cependant être confirmés ou invalidés par des expériences sur des modèles de passages de barrière.

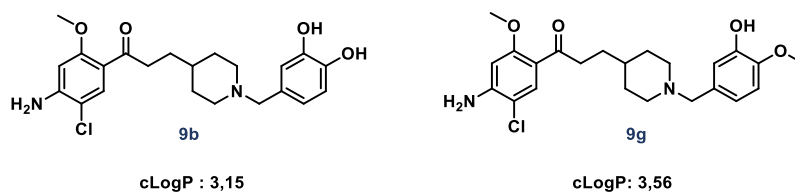


Figure 54 - Composés **9b** et **9g**, cLogP calculé comme moyenne des cinq prédictions disponibles sur SwissADME.²⁴⁴

Les travaux de modulation chimique sur cette série pourraient ainsi continuer en évaluant l'impact de la substitution du phénol sur le noyau aminochlorobenzophénone comme décrit dans la partie b. ii. Série tétrahydro-aminochlorobenzophénone. Si cette stratégie s'avérait concluante, d'autres groupements pourraient être alors greffés en cette position. L'analogue (*S*) pourrait également être synthétisé afin d'étudier l'impact du centre chiral sur la liaison au récepteur et l'effet sur le profil pharmacocinétique des composés synthétisés.

Afin de confirmer ces premiers résultats, les motifs antioxydants ont été greffés sur un noyau benzisoxazole connu comme étant un puissant agoniste des récepteurs 5-HT₄. Les résultats de cette deuxième série chimique sont présentés dans l'article 2.

²⁴³ Daina, A. *et al.* A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **2016**, *11* (11), 1117–1121.

²⁴⁴ Daina, A. *et al.* SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 42717.

II. Article 2: Benzisoxazoles targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising compound in Alzheimer's Disease.

1. Introduction

Cet article ne pouvant suivre la numérotation du précédent, un code couleur a été appliqué de manière à pouvoir identifier les différents composés plus facilement. Le **bleu foncé** sera ainsi utilisé pour évoquer les composés décrits dans l'article 1, du **rouge** sera utilisé pour les composés décrits dans l'article 2 et du noir pour tous les autres composés.

Le deuxième article de cette thèse présente les différentes modulations effectuées autour d'un noyau benzisoxazole décrit par différents groupes comme ligand à forte affinité des récepteurs 5-HT₄.^{136,212} Dans la continuité de l'article 1, différents motifs antioxydants sélectionnés ont été greffés à ce noyau afin d'étudier l'influence de ceux-ci sur l'affinité et le profil envers les 5-HT₄R. Après des tests *in vitro*, plusieurs composés ont été évalués sur différents modèles *in cellulo* de stress oxydant. Les résultats de cette étude sont présentés dans cet article.

Cette partie s'articulera de la même manière que l'article 1, avec un résumé des principaux résultats obtenus, suivi des projets annexes réalisés lors du projet mais non inclus dans la publication et enfin une discussion autour de ce projet ainsi qu'une conclusion.

2. Article

Novel potent Benzisoxazoles targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising leads for Alzheimer disease

Authors : Caroline Lanthier,¹ Irene Liparulo,² Matthias Scheiner,³ Cédric Lecoutey,¹ Julien Lalut,¹ Marc Since,¹ Sophie Corvaisier,¹ Audrey Davis,¹ Christian Bergamini,² Patrick Dallemagne,¹ Maria-Laura Bolognesi,² Michael Decker,³ Christophe Rochais¹

¹ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

² Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum – University of Bologna, I-40126 Bologna, Italy

³ Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy and Food Chemistry, Julius Maximilian University of Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany

Manuscript in preparation

Introduction :

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia worldwide. It is a multifactorial disease linked to two main molecular causes, the neurofibrillary tangles linked to hyper phosphorylated Tau protein and the senile plaques linked to amyloid beta peptide (A β).¹ Since several years, researchers have proven that both of these molecular causes were related to oxidative stress.^{2,3} Indeed, those lesions could be linked to mitochondrial dysfunctions and neuroinflammation leading to overproduction of reactive oxygen species (ROS) and ultimately to cell death.⁴ Among others, those factors contributed to the definition of AD as a multifactorial disease.⁵

In this context, a new polypharmacological approach has emerged and has been developed since the last decade, the Multi-Target-Directed Ligand (MTDL) strategy. It implies that, in order to tackle such disease, researcher should focus their attention into developing singles molecules that could act simultaneously on more than one target.^{6,7} This new concept have been applied to AD leading to the development of potent compounds.⁸ Among them, several MTDL containing antioxidant moiety linked to another target related to cholinesterase activity or to the amyloid pathology, were developed in AD.⁹⁻¹²

Further, it has been demonstrated that the modulation of the 5-HT₄R with an agonist could reduce the amyloid pathology *in vivo*,¹³ and several MTDL have been developed with this receptor as a primary target.^{14,15} For example, the donecopride a potent 5-HT₄R agonist and inhibitor or

acetylcholinesterase (AChE) have been developed by Rochais *et al.*¹⁶ This compound was designed as a structural combination of RS-67333, a potent 5-HT₄R agonist and donepezil, a potent inhibitor of AChE. Those three molecules were thus evaluated on *in vivo* models showing that donecopride had a synergetic effect compared to the two molecules it is derived from.^{13,17}

Following this example, we postulate that the reduction of the amyloid pathology though 5-HT₄R activation associated with antioxidant properties would lead to a neuroprotective effect.

In previous work, we already reported promising compounds based on a aminochlorobenzophenone scaffold found in donecopride. Those derivatives were design to possess potent 5-HT₄R agonism as well as antioxidant properties in *in cellulo* models.¹⁸ Inspired by those promising results, we decided to evaluated the introduction of such moieties on another scaffold. The benzisoxazole ring selected as 5-HT₄R moiety was first described as potent 5-HT₄R agonist by Brodney *et al.* in 2012. Inspired by this first discovery, Lalut *et al.* recently published a first series of MTDL compound combining 5-HT₄R agonism and inhibition of AChE with the same scaffold.^{19,20}

The objective of the present article would be to evaluate the influence of the introduction of an antioxidant moiety (i.e phenol or lipoic acid derivative) on 5-HT₄R affinity and drugability. The desired compounds (Fig 1.) will be evaluated in a series of *in vitro* as well as *in cellulo* experiment.

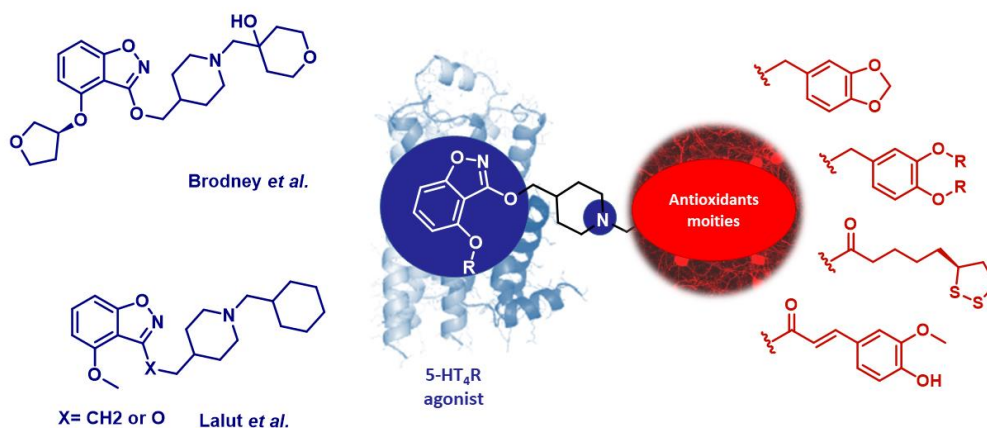
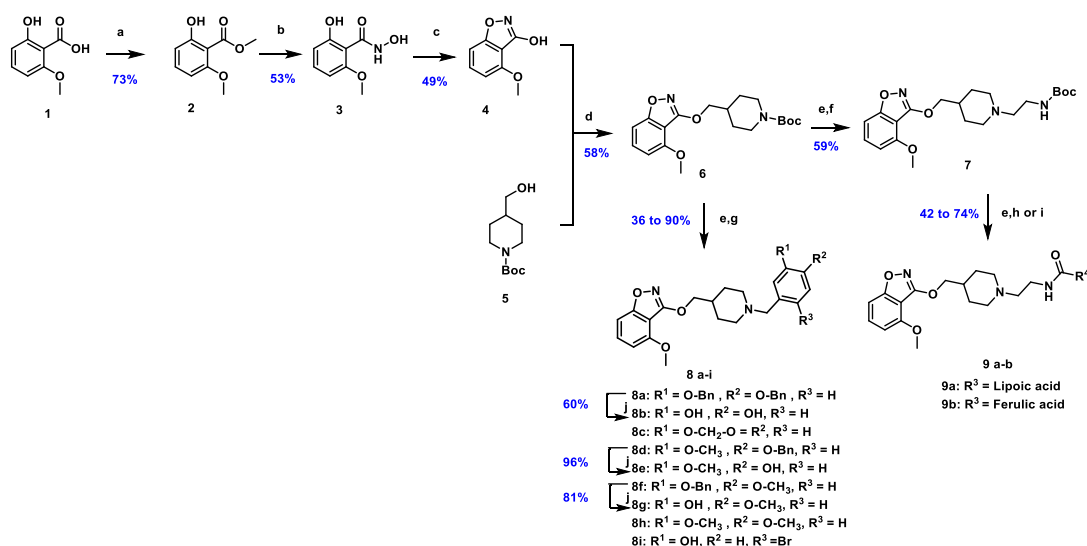


Figure 1- Targeted structure of the MTDLs

Results & discussion

Chemistry

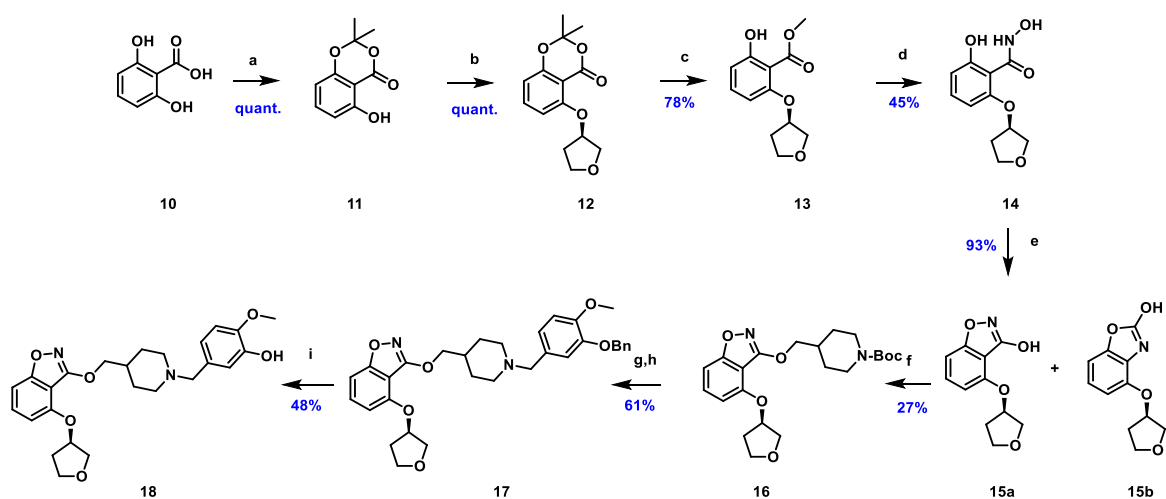


Scheme 1-Synthesis of the methoxy benzisoxazole derivatives. Reagents and conditions: (a) H₂SO₄, MeOH, reflux ; (b) NH₂OH, NaOH, MeOH/H₂O, 40°C ; (c) CDI, dry THF, reflux ; (d) PPh₃, DEAD, dry THF, reflux ; (e) TFA, DCM ; (f) *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate, K₂CO₃, ACN ; (g) halogeno benzylalcohol, K₂CO₃, DCM ; (h) EDCI, HOBT, TEA, 0°C to rt, in the dark ; (i) DCC, THF, rt ; (j) HBr 33% in AcOH, DCM, 0°C.

The methoxy benzisoxazole scaffold was synthesized using the same protocol developed by Lalut *et al.*²⁰ First, an esterification was performed to obtain ester **2** with a yield of 73%, the latter was used to generate the hydroxamic acid derivative **3** with a yield of 53%. The benzisoxazole ring **4** was thus formed from the hydroxamic acid **3** in reaction with CDI with a yield of 49%. This heterocyclic moiety was linked to the central *N*-Boc protected piperidine using a Mitsunobu reaction with piperidine methanol derivative **5** with a yield of 58% allowing the first preparation of synthon **6**. The final compounds were synthesized in two or three steps for the ones containing phenols derivatives. The first step consisted in the deprotection of the Boc protecting group with TFA followed by a nucleophilic substitution with substituted benzyl bromide with yields from 36 to 90%. The benzyl protected phenol groups were latter deprotected with HBr 33% in acetic acid with a yield of 60 to 96%.

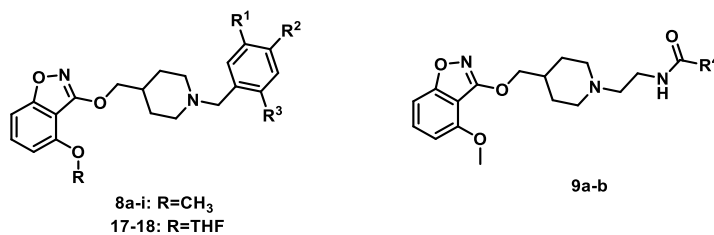
Other acids were supposed to be coupled to the piperidine. However, the basicity of the nitrogen on this one is playing a crucial role regarding the affinity toward 5-HT₄R, an ethylamine linker was thus added to obtain synthon **7**. The ethylamine linker was chosen due to its limited influence on 5-HT₄R affinity as described by Yahouahi *et al.*²¹ Lipoic acid was thus linked using EDCI, HOBT with a yield of 74% while ferulic acid was coupled with DCC with a yield of 42%. Due to the high sensitivity to heat, light and air of the lipoic acid, the reaction was performed in cold, dark and under inert atmosphere.

Chapitre 3 : Travaux personnels



Scheme 2-Reagents and conditions: (a) Acetone, DMAP, SOCl₂, DME, 0°C to rt, 24 h ; (b) DEAD, PPh₃, (S)-3-OH-THF, dry THF, rt, 16 h ; (c) K₂CO₃, MeOH, rt, 2 h ; (d) NH₂OH.HCl, NaOH, MeOH/H₂O, rt, 1 h ; (e) CDI, dry THF, 16 h ; (f) DEAD, PPh₃, **6**, dry THF, reflux, 16 h ; (g) TFA, DCM, rt 2 h ; (h) Bromo-benzyl, K₂CO₃, ACN, rt, 16 h ; (i) HBr 33% in AcOH, 0°C to rt, 1h.

To study the influence of the tetrahydrofuran derivative described by Brodney *et al.* as potent 5-HT₄R agonist, an analog of **8g** was synthesized following the protocol described in Scheme 2. A first step of protection of the dihydroxybenzoic acid **10** was performed allowing only one phenol to be available for the Mitsunobu reaction in order to get the tetrahydrofuran derivative **12** with a quantitative yield. The deprotection and esterification of the carboxylic acid was performed in one step with a yield of 78% followed by the formation of the hydroxamic acid derivative **14** with a yield of 45%. An intramolecular cyclisation was allowed with CDI to obtain compound **15a** and **15b** with a yield of 93%. Unfortunately, the mixture was not separable and was engaged as such in the following reaction. The latter was coupled to piperidine methanol **5**, to form a mixture of ether which were separated by chromatography to get compound **16** with a yield of 27%. The final compound **18** was obtained after the same last three step already described in scheme 1.

***In vitro* result & discussion**


Compound	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	5-HT ₄ R				DPPH	ORAC
						%inh at 10 ⁻⁸ M	%inh at 10 ⁻⁶ M	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ at 120 min (μM)	(μM _{compound} / μM _{Trolox})
MR36204 8a	OCH ₃	OBn	OBn	H	-	72%	100%	30.2± 19.1	12.3±2.1	>250	<0.2
MR36209 8b	OCH ₃	OH	OH	H	-	100%	100%	1.24±0	1.25±0	30.7±0.4	4.09±0.17
MR36200 8c	OCH ₃	O-CH ₂ -O		H	-	-	100%	7.1±3.3	8.5±2.8	>250	<0.2
MR36208 8d	OCH ₃	OCH ₃	OBn	H	-	67%	100%	58.1±13.2	15.5±2.8	>250	<0.2
MR36211 8e	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	-	73%	100%	6.9±0.4	7.7±0.5	71.0±6.4	2.60±0.22
MR36207 8f	OCH ₃	OBn	OCH ₃	H	-	44%	100%	113±9.1	158±49.5	>250	<0.2
MR36210 8g	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	-	97%	100%	2.6±0.1	3.0±0.3	>250	4.84±0.81
MR36202 8h	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	-	55%	100%	54.6±23.1	53.0±25.3	>250	<0.2
MR36203 8i	OCH ₃	OH	H	Br	-	100%	100%	4.4±2.8	5.0±3.8	>250	3.51±0.24
MR36219 9a	OCH ₃	-	-	-	Lipoic acid	97%	100%	8.7±0.4	8.1±3.6	>250	0.52±0.05
MR36218 9b	OCH ₃	-	-	-	Ferulic acid	70%	100%	20.6±2.4	17.8±4.9	48.9±1.6	0.97±0.01
MR36223 17	3-OTHF	OBn	OCH ₃	H	-	8%	98%	-	-	>250	<0.2
MR36222 18	3-OTHF	OH	OCH ₃	H	-	42%	100%	12.8±2.8	13.5±2.0	67.0±18.0	1.35±0.09
Serotonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trolox	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.9	1
Quercetin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.3	6.50

 Table 1 - Summary of *in vitro* experiments

The main goal of this study was to discover a hit that could possess high 5-HT₄R affinity as well as sufficient antioxidant properties. Several *in vitro* assays were thus performed on the final compounds previously synthesized. First, the affinity toward 5-HT₄R was evaluated for all final compounds following the protocol developed by Grossman *et al.*²² As shown in Table 1, all the compounds shown excellent affinity toward 5-HT₄R with K_i from 1.24 nM to 118 nM, out of eleven final compounds six had a K_i < 15 nM. The benzylated protected compounds **8a**, **8d**, and **8f** showed lower affinity toward the target than their free phenol analogs **8b**, **8e** and **8g**. Indeed, the free phenol derivative had high affinity with K_i of 1.24 nM, 6.9 nM and 2.6 nM for **8b**, **8e** and **8g** respectively. As seen in our previous study, the isovanilline moiety **8g** seems to be slightly more potent against 5-HT₄R compared to the vanilline **8e** moiety. Regarding the tetrahydrofuran analog of **8g**, the compound **18**, the K_i was of 12.8 nM, the THF could thus induce a little difference in the binding but could still demonstrate a significant effect on the profile. Regarding the lipoic acid **9a** and ferulic acid **9b** analog, the affinity was also quite promising with K_i of 8.7 nM and 20.6 nM respectively.

In order to select the more promising compounds only, several *in vitro* antioxidant assays were performed. We focused our attention in two types of tests, the DPPH and the ORAC_{FL} assay.²³ On one hand, the DPPH assay is performed in an organic solvent, and evaluate the single electron transfer (SET) antioxidant capacity of the compounds. Its results are expressed as an IC₅₀.²⁴ On the other hand, the ORAC_{FL} assay is performed in aqueous medium and that evaluate the hydrogen atom transfer (HAT) antioxidant capacity of the selected compound. Its results are expressed as a score compared to a reference antioxidant, Trolox®.²⁵

Out of thirteen compounds only four showed antioxidant capacity on DPPH assay, **8b** being the most potent with an IC₅₀ of 30 μM. Surprisingly the isovanilline derivative **8g** did not show any antioxidant capacity on this assay with an IC₅₀ > 250 μM while the THF isovanilline derivative showed an interesting capacity at 68 μM and the vanillin derivative **8e** showed an antioxidant capacity of 71 μM. These difference in reactivity between the THF derivative and the methoxy derivative is still not explained as the benzylated THF compound **17** did not show any antioxidant capacity in this assay neither, validating the fact that the antioxidant capacity was due to the free phenol from the isovanilline moiety. However, **8g** was the compound with the highest ORAC score, almost five times more potent than trolox (4.84). In second position was found the catechol **8b** with an ORAC score of 4.09. The vanillin scaffold **8e** shows moderate antioxidant capacity with a score of 2.60 and the ferulic compound **9b** showed only a score of 0.97. The lipoic derivative did not show any results on those assays, however this compound is known to be activated in cells to express its antioxidant capacity. Interestingly, the bromo derivative compound **8i** did not show any activity in DPPH assay but seems quite potent in ORAC assay with a score of 3.5 as **8g**.

From those preliminary assay, seven compounds were selected to be evaluated *in cellulo* for profile, antioxidant as well as neuroprotective assay (Fig 2.)

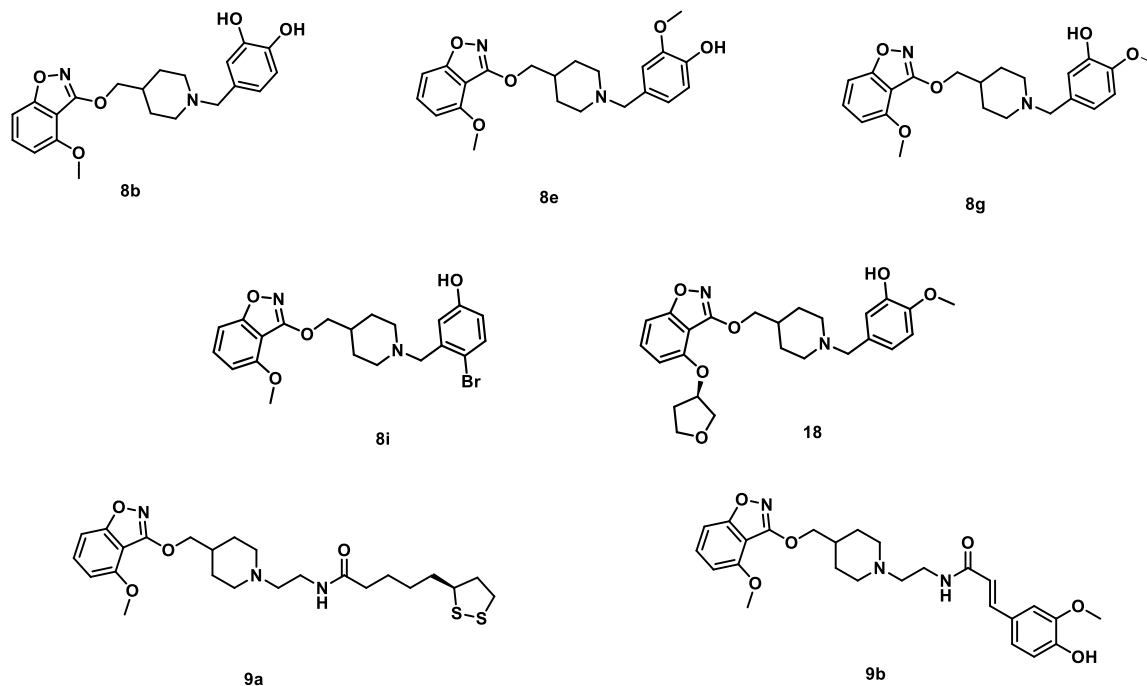


Figure 2 - Compound selected for *in cellulo* assay

In cellulo result & discussion

Experiments on SH-SY5Y cells

First, the antioxidant properties of the selected compounds were further evaluated in a ROS induced *in cellulo* assay. In order to make sure that our compounds were devoid of cytotoxicity, a preliminary MTT assay was performed on SH-SY5Y cells with the selected compound from 1 μM to 50 μM . As seen on Figure 3, none of the selected compounds were toxic at a dose of 10 μM . **9a** slightly promotes cell viability while **18** on the opposite seems to decrease the viability of 16%. The survival of the cells incubated were still higher than 80% for every compounds tested thereby the dose of 10 μM was thus selected for the ROS inducement assay.

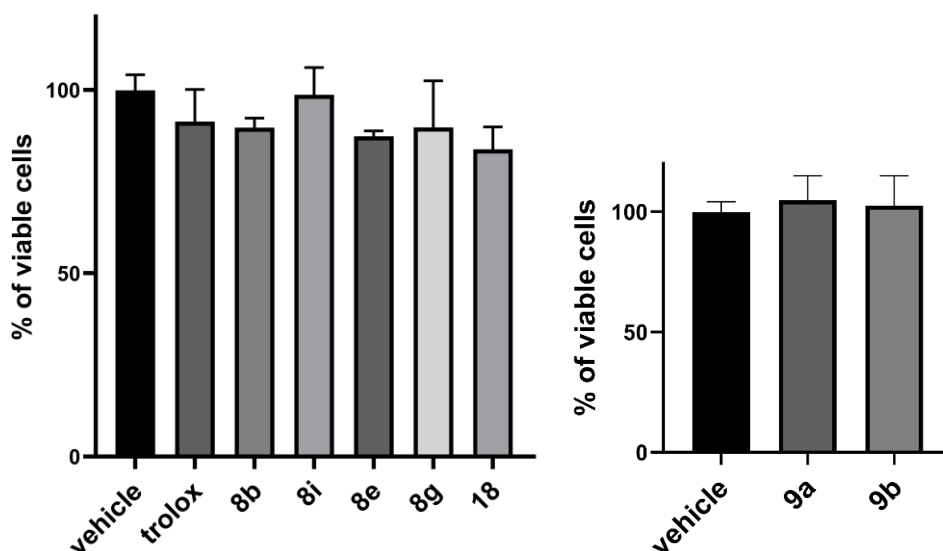


Figure 3 – Cell viability determined by MTT assay. Cells were grown on 96-well plates and treated with selected compounds for 24h at the concentration of 10 μM or vehicle (DMSO). Data are presented as percentage of viable cells in comparison with vehicle treated controls. Error bars indicate \pm SEM .

The antioxidant activity of selected compound was evaluated on SH-SY5Y cells using H_2DCFDA as fluorescent probe. This probe is able to diffuse passively inside the cells to get hydrolyzed by intracellular esterase into a non fluorescent compound, H_2DCF . This latter can be later oxidized by ROS and therefore produce a highly fluorescent molecule, the DCF.²⁶ The intensity of DCF fluorescence is directly correlated to ROS concentration and to oxidative stress. To evaluate this phenomenon the selected compounds were incubated with the cells during 24h, then the DCFDA probe was incubated for 30 min. After a quick wash with PBS, the *t*-BuOOH, a strong oxidant promoting oxidative stress, was added. The result of those assays are shown in Figure 4.

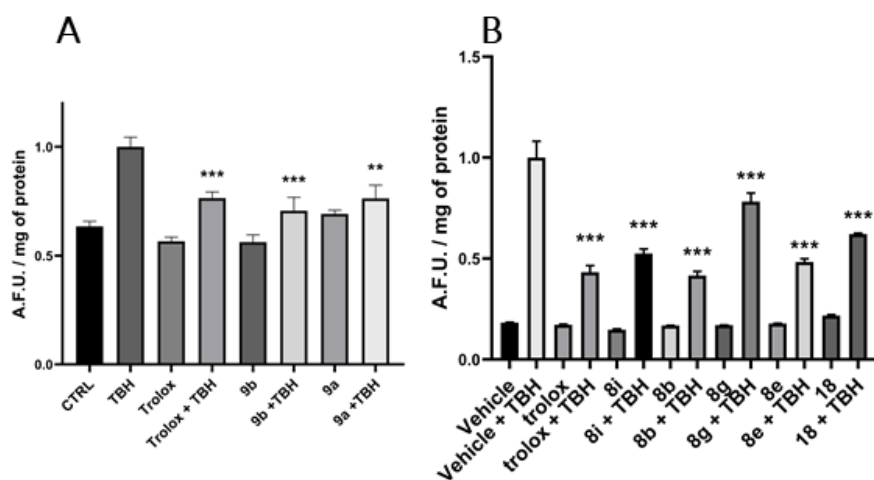


Figure 4 – Reactive oxygen species determination in live SH-SY5Y cells. Cells were grown in 96 wells plates and incubated for 24h with selected compounds (10 μM), trolox (100 μM) or vehicle (CTRL). Oxidative stress was induced by treating the cells with TBH (100 μM) for 30 min and detected by

staining the cells with the fluorogenic probe H₂DCF-DA. Data are presented as Arbitrary Florescence Unit normalized on protein content measured by Lowry method. The statistical analysis is performed using ordinary one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparisons test. Levels of significance:
 ** p ≤ 0.01 compared to TBH treated cells
 *** p ≤ 0.001 compared to TBH treated cells

All compounds seem to have antioxidant effect *in cellulo* as seen on Figure 4. **8b** and **9b** seems to be more potent at 10 μM than the positive control trolox at 100 μM. **8e** was not as potent as Trolox at 100 μM but it was below 50 % of oxidative stress inducement by *t*-BuOOH and could therefore be an interesting antioxidant. Those premiliminary data being quite promising another evaluation of the antioxidant property was evaluated in a more complex *in cellulo* experiment.

Experiments on HT-22 cells

A preliminary MTT assay was performed on all the selected compound except **9b** on HT-22 cells, the compounds were discarded for those assay due to its lower affinity toward 5-HT₄R compared to the other compounds selected. None of the compounds selected were toxic until the dose of 25 μM (supplementary info).

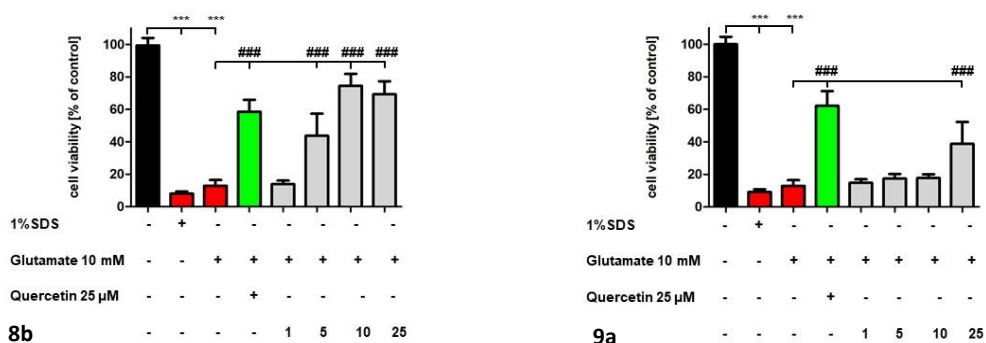


Figure 5 - Compounds were studied on neuronal HT-22 cells for neuroprotection against glutamate-induced oxidative stress at 1–25μM. Results of the modified MTT test are presented as means±SD of three independent experiments, each performed in sextuplicate, and refer to untreated control cells, which were set as 100% values. Statistical analysis was achieved by applying one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test.

Levels of significance:

*p < 0.005;

**p < 0.01;

***p < 0.001.

Treated cells were compared to cells treated with glutamate only.

HT-22 cells are mouse hippocampal neuronal cells that are used frequently to study oxidative neuronal cell death.²⁷ In this assay, glutamate is used to induce cell death by upsetting the cellular redox homeostasis. Only two of the selected compounds seem to have neuroprotective properties on

this assay. The compound **8b** as a catechol seems to have a dose-effect mechanism and be more antioxidant at 10 μM than quercetin, the positive control at 25 μM . A small antioxidant response was also observed with **8b** at a dose of 25 μM (Fig. 5).

Result of pharmacological profile to insert here

Conclusion

Material & method

Chemistry

General Material and Methods.

All chemical reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined on Stuart melting point apparatus (SMP50). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a BRUKER AVANCE III 400 MHz with chemical shifts expressed in parts per million (in chloroform- d , methanol- d_4) downfield from TMS as an internal standard and coupling in Hertz. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer BX FT-IR apparatus using KBr pellets.

High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by impact electronic on a Jeol JMS GC Matespectrometer (compound 1) or by electrospray on a Bruker maXis (compounds 4, 7, 8, 13–19) or on a Q-ToF micro Waters (compounds 6, 9–12, 21). The purities of all tested compounds were analyzed by LC-MS, with the purity all being higher than 95%. Analyses were performed using a Waters Alliance 2695 as separating module (column XBridge C18 2.5 μM /4.6 \times 50 mm) using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio held for 1.50 min before returning to the initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H_2O , B = CH_3CN ; each containing HCOOH : 0.1%). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI.

Synthesis

General procedure for deprotection/alkylation of the piperidine moiety A

To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the

solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 eq.) was dissolved in DCM or ACN (10 mL/mmol) and bromo-benzyl-alcohol derivatives (1.1-1.5 eq.) and K_2CO_3 (10.0 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at rt or 70°C depending on the product for 2-72h, then concentrated *under vacuum*. The crude was directly purified by chromatography on silica gel column and concentrated under reduced pressure to afford alkylated compound (isolated yields)

The general procedure to obtain unprotected catechol B

Appropriate benzylated product (1 Eq) was stirred in bromhydric acid 33 % diluted in acetic acid (10 mL. mmol⁻¹, 0.1M) and DCM (50 mL.mmol⁻¹, 0.02M) at 0°C for 1 to 4h. The mixture was evaporated *under vacuum* at rt. Then the crude was directly purified on silica gel column (DCM/MeOH; from 100 :0 to 80 :20).

tert-butyl N-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl]ethyl]carbamate (7)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (1.18 g, 3.25 mmol, 1.0 eq.) and *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate (875 mg, 3.9 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 16 h in DMF. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a light yellow solid (1.01 mg, 77% isolated yield). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 7.46 – 7.36 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.05 (br s, 1H), 4.28 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.24 (m, 2H), 3.02 – 2.84 (m, 2H), 2.47 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.12 – 1.93 (m, 3H), 1.93 – 1.78 (m, 2H), 1.45 (m, 11H); **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.3, 165.9, 156.0, 155.0, 131.9, 104.3, 103.2, 102.9, 79.2, 74.7, 57.4, 56.0, 53.1 (2C), 37.3, 35.3, 28.7 (2C), 28.5 (3C); **MS** *m/z* [M+H]⁺ : 406.89 ; [M+H-*Tert*-butyl]⁺ : 350.86; **IR (neat, cm⁻¹)** : 3370, 2980, 2934, 2809, 1687, 1533, 1428, 1102; **Mp**: 89°C -92°C; **HRMS/ESI: *m/z*** calcd. for C₂₁H₃₂N₃O [M+H]⁺ 406.2342, found 406.2358

3-[(1-[[3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8a)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.55 mmol, 1eq.) and 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (253 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁸ the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* then solubilized in water, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fraction was dried over MgSO₄ and evaporated *under vacuum*. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a yellow powder (275 mg, 90% isolated yield). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 7.48 – 7.27 (m, 11H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.87 (m, 2H), 2.02 – 1.89 (m, 3H), 1.81 (m, 2H), 1.46 (m, 2H); **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.3, 166.0, 155.0, 148.6, 148.1, 137.5, 137.4, 131.8, 131.5 (determined with HMBC), 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.8, 127.7, 127.4 (2C), 127.3 (2C), 122.3, 116.3, 114.7, 104.3, 103.2, 102.9, 74.8, 71.4, 71.2, 62.8, 56.0, 52.9 (2C), 35.3, 28.6 (2C); **MS** *m/z* [M+H]⁺: 564.70; **IR (neat, cm⁻¹)**: 3034, 2942, 2889, 2789, 1625, 1534, 1431, 1366, 1283, 1097; **Mp**: 102-104°C; **HRMS/ESI: *m/z*** calcd. for C₃₅H₃₇N₂O₅ [M+H]⁺ 565.2702, found 565.2699.

4-[(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]benzene-1,2-diol hydrobromide (8b)

From general procedure **B** with 3-[(1-[[3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (210 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light brown powder once evaporated with Et₂O (85 mg, isolated yield 49%). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)** δ = 7.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.83 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.47 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 12.0 Hz, 2H), 2.25 (m, 1H), 2.09 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 1.70 (q, *J* = 12.6 Hz, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)** δ = 167.3, 167.2, 156.4, 148.04, 146.9, 133.7, 124.0, 122.1, 119.0, 116.5, 104.8, 104.6, 103.3, 74.2, 61.7, 56.4, 52.6 (2C), 34.7, 26.9 (2C). **MS** *m/z* [M+H]⁺: 385.91 ; **IR (neat, cm⁻¹)** : 3408, 3220, 2938, 2847, 2809, 161, 1525, 1427, 1099; **Mp**: 111°C-113°C; **HRMS/ESI: *m/z*** calcd. for C₂₁H₂₅N₂O₅ [M+H]⁺ 385.1763, found 385.1761.

3-[(1-[(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8c)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (100 mg, 0.27 mmol, 1eq.) and 5-(bromomethyl)-2H-1,3-benzodioxole (71 mg, 0.33 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 95:5), the compound was obtained as a yellow powder (70

mg, 65% isolated yield). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = δ 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 2.93 (br d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.10 – 1.93 (m, 3H), 1.85 (m, 2H), 1.45 (m, 2H); **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.3, 165.9, 155.0, 147.6, 146.5, 131.9, 131.8, 122.3, 109.6, 107.8, 104.3, 103.2, 102.8, 100.9, 74.8, 63.1, 56.0, 53.0 (2C), 35.4, 28.7 (2C); **MS** *m/z* [M+H]⁺: 497.64 ; **IR (neat, cm⁻¹)**: 2949, 2911, 2851, 2804, 1613, 1533, 1444, 1102; **Mp**: 114°C-117°C; **HRMS/ESI**: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₅N₂O₅ [M+H]⁺ 397.1763, found 397.1768.

3-[(1-{[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8d)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.55 mmol, 1eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene (203 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁹ the reaction was stirred at rt for 16 h in ACN. The solvent was removed *under vacuum* a purification by chromatography on silica gel column was directly performed with DCM/MeOH (from 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a yellow powder (214 mg, 87% isolated yield). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 7.47 – 7.27 (m, 6H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.93 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.09 – 1.93 (m, 3H), 1.86 (br d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 1.44 (qd, *J* = 12.5, 3.7 Hz, 2H); **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.4, 166.1, 155.1, 149.6, 147.3, 137.4, 132.0, 131.4, 128.6 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 121.4, 113.7, 112.9, 104.4, 103.3, 103.0, 74.9, 71.2, 63.2, 56.2, 56.1, 53.2 (2C), 35.5, 28.8 (2C); **MS** *m/z* [M+H]⁺: 489.62; **IR (neat, cm⁻¹)**: 2934, 2847, 2802, 1622, 1512, 1418, 1102; **Mp**: 98 – 102°C; **HRMS/ESI**: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₂N₂O₅ [M+H]⁺ 489.2389, found 489.2387.

2-methoxy-4-[(4-{[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl}piperidin-1-yl)methyl]phenol hydrobromide (8e)

From general procedure **B** with 3-[(1-{[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (180 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light yellow powder (120 mg, isolated yield 67%). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)** δ = 7.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 2.71 (m, 2H), 2.10 (m, 1H), 1.95 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 1.55 (q, *J* = 13.6 Hz, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)** δ = 167.4, 167.3, 156.5, 149.3, 148.9, 133.7, 125.1, 123.3, 116.4, 115.2, 104.9, 104.7, 103.4, 74.5, 62.3, 56.5, 56.5, 53.0 (2C), 35.1, 27.5 (2C); **MS** *m/z* [M+H]⁺: 399.87; **IR (neat, cm⁻¹)** : 3424, 2933, 2847, 2809, 1612, 1533, 1420, 1102; **Mp**: 94°C -97°C ; **HRMS/ESI**: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₅ [M+H]⁺ 399.1920, found 399.1924.

3-[(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8f)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.55 mmol, 1eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (203 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁹ the reaction was stirred at rt for 16 h in ACN. The solvent was removed *under vacuum* a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 95:5), the compound was obtained as a yellow oil (145 mg, 54% isolated yield). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 7.47 – 7.26 (m, 6H), 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.86 – 6.81 (m, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.27 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 2.90 (m, 2H), 2.02 – 1.87 (m, 3H), 1.82 (m, 2H), 1.44 (m, 2H); **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.4, 166.1, 155.1, 148.9, 147.8, 137.3, 132.0, 130.4 (Determined by HMBC), 128.6 (2C), 127.8, 127.5 (2C), 122.1, 115.4, 111.5, 104.4, 103.3, 103.0, 74.9, 71.0, 62.9, 56.2, 56.1, 53.0

(2C), 35.5, 28.8 (2C); **MS** m/z $[M+H]^+$: 489.62; **IR** (neat, cm^{-1}): 3428, 2917, 2847, 2795, 1612, 1532, 1428, 1102; **HRMS/ESI**: m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$ $[M+H]^+$ 489.2389, found 489.2392.

2-methoxy-5-[(4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]phenol hydrobomide (8g)

From general procedure **B** with 3-[(1-[(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (110 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as yellow powder (Hydrobromide salt, 87 mg, isolated yield 82%). **^1H NMR (400 MHz, MeOD)** δ = 7.50 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (m, 4H), 6.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.48 (m, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.26 (m, 1H), 2.11 (m, 2H), 1.70 (m, 2H); **^{13}C NMR (101 MHz, MeOD)** δ = 167.4, 167.3, 156.4, 150.4, 148.2, 133.7, 124.0, 123.4, 118.7, 112.7, 104.8, 104.7, 103.4, 74.2, 61.6, 56.5, 56.4, 52.8 (2C), 34.7, 27.0 (2C). **MS** m/z $[M+H]^+$: 399.62 ; **IR** (neat, cm^{-1}) : 3424, 2933, 2847, 2809, 1612, 1533, 142, 1102; **Mp**: 97°C -100°C; **HRMS/ESI**: m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ $[M+H]^+$ 399.1920, found 399.1924.

3-[(1-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8h)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (100 mg, 0.27 mmol, 1eq.) and 4-(bromomethyl)-1,2-dimethoxybenzene (74.3 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,³⁰ the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* then the crude was solubilized in water, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fractions were dried over MgSO_4 and evaporated *under vacuum*. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 97:3), and the compound was obtained as a yellow oil (40 mg, 36% isolated yield). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)** δ = 7.41 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.84 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 2.95 (br d, J = 11.4 Hz, 2H), 2.12 – 1.94 (m, 3H), 1.86 (br d, J = 12.2 Hz, 2H), 1.49 (m, 2H); **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ = 166.3, 165.9, 155.0, 148.8, 148.1, 132.3, 131.9, 121.4, 112.3, 110.7, 104.3, 103.2, 102.9, 74.80, 63.1, 56.0, 55.9, 55.9, 53.1 (2C), 35.3, 28.6 (2C); **MS** m/z $[M+H]^+$: 413.64; **IR** (neat, cm^{-1}): 3433, 2935, 2838, 1612, 1532, 1101; **HRMS/ESI**: m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ $[M+H]^+$ 413.2076, found 413.2082.

4-bromo-3-[(4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3yl)oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]phenol (8i)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (100 mg, 0.27 mmol, 1eq.) and 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol (102 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) previously synthesized, the reaction was stirred at rt for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* then water was added, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fraction was dried over MgSO_4 and evaporated *under vacuum*. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 90:10), the compound was evaporated with Et_2O that led to a yellow powder (76 mg, 63% isolated yield). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)** δ = 7.41 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.04 – 6.95 (m, 2H), 6.62 (dd, J = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 2.99 (dt, J = 11.8, 3.4 Hz, 2H), 2.20 (td, J = 11.8, 2.5 Hz, 2H), 2.03 (m, 1H), 1.86 (br d, J = 12.2 Hz, 2H), 1.46 (qd, J = 12.2, 3.4 Hz, 2H); **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ = 166.3, 165.9, 155.4, 155.0, 138.3, 133.4, 131.9, 117.8, 116.2, 114.6, 104.2, 103.2, 102.8, 74.7, 61.8, 56.0, 53.2 (2C), 35.2, 28.5 (2C); **MS** m/z $[M+H]^+$: 447.46 - 450.47; **IR** (neat, cm^{-1}): 3379, 3247, 2937, 1614, 1533, 1429, 1366, 1283, 1101; **Mp**: 145-148°C; **HRMS/ESI**: m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrN}_2\text{O}_4$ $[M+H]^+$ 447.0919, found 447.0923.

5-[(3S)-1,2-dithiolan-3-yl]-N-[2-(4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3yl)oxy]methyl]piperidin-1-yl)ethyl]pentanamide (9a)

To a stirred solution of *tert*-butyl *N*-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl)ethyl]carbamate (100 mg, 0.25 mmol, 1.1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of Lipoic acid (47 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were successively added hydroxybenzotriazole (HOBt) (36 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq.) and 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDCI) (41 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at 0°C in the dark for 30 min, and the free amine was added. The reaction was stirred at rt for 16 h. Solvent was evaporated under vacuum at rt and then the crude was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100:0:0 to 97.5:2.5:0.25). The compound was obtained as white powder (90 mg, 74% isolated yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.06 (br s, 1H), 4.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.57 (dq, *J* = 12.8, 6.4 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* = 11.2, 5.6 Hz, 2H), 3.22 – 3.03 (m, 2H), 2.93 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.54 – 2.41 (m, 3H), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H₁), 2.05 – 2.02 (m, 3H), 1.95 – 1.84 (m, 3H), 1.77 – 1.61 (m, 4H), 1.56 – 1.35 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 172.7, 166.3, 166.0, 155.0, 131.9, 104.2, 103.2, 102.9, 74.7, 56.8, 56.5, 56.0, 53.0 (2C), 40.3, 38.5, 36.5, 36.0, 35.4, 34.7, 28.9, 28.8 (2C), 25.4; MS *m/z* [M+H]⁺: 494.74 ; IR (neat, cm⁻¹): 3413, 3307, 2935, 2848, 2806, 1612, 1532, 1428, 1102; Mp: 107°C -110°C; HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₅N₃O₄S₂ [M+H]⁺ 494.2147, found 494.2149

(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl]ethyl]prop-2-enamide (9b)

To a stirred solution of *tert*-butyl *N*-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl)ethyl]carbamate (100 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of ferrulic acid (53 mg, 0.27 mmol, 1.1.0 eq.) in THF (5 mL), was successively added *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (55 mg, 0.27 mmol, 1.1.0 eq.) at 0°C then the crude product solubilized in THF (1 mL). The mixture was stirred at 70°C for 2 h, in the dark. Solvent was evaporated under vacuum, the crude was first filtered to remove dicyclohexyl urea (DCU), then the filtrate was collected, evaporated under vacuum and purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (100:0:0 to 95:5:0.5), the compound was obtained as a white powder (50 mg, 42% isolated yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.51 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.09 – 6.94 (m, 3H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.30 (br s, 1H), 6.21 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.51 (dd, *J* = 11.1, 5.4 Hz, 2H), 3.02 (m, 2H), 2.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.16 – 1.97 (m, 3H), 1.91 (m, 2H), 1.48 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 166.2, 165.9, 154.9, 147.4, 146.8, 140.8, 131.9, 127.4, 122.2, 118.3, 114.8, 109.6, 104.2, 103.2, 102.9, 74.6, 57.0, 56.0, 55.9, 53.1 (2C), 36.1, 35.3, 28.5 (2C); MS *m/z* [M+H]⁺: 482.24; IR (neat, cm⁻¹): 3421, 2937, 2851, 1614, 1532, 1429, 1101; Mp: 97 – 100°C; HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₆H₃₂N₃O₆ [M+H]⁺ 482.2291, found 482.2290.

3-[(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazole (17)

Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (150 mg, 0.36 mmol, 1eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (133 mg, 0.43 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 4h in DCM. The solvent was removed *under vacuum* a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 95:5), the compound was obtained as a yellow oil (120 mg, 61% isolated yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.49 – 7.26 (m, 6H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 – 6.81 (m, 2H), 6.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.04 (dq, *J* = 7.1, 2.4 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 2H), 4.12 – 3.92 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.47 (s, 2H), 2.89 (m, 2H), 2.22 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 1.81 (m, 2H), 1.46 (m, 2H); ¹³C NMR (101

MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.2, 152.9, 149.1, 148.0, 137.3, 131.8, 130.4 (Determined by HMBC) 128.6 (2C), 127.9, 127.5 (2C), 122.2, 115.5, 111.5, 105.5, 105.3, 103.4, 78.6, 74.4, 73.0, 71.0, 67.3, 62.8, 56.2, 52.9 (2C), 35.6, 33.3, 28.5 (2C); **MS** m/z [M+H]⁺ : 545.72 ; **IR (neat, cm⁻¹)** : 3434, 2937, 2867, 2804, 2752, 1612, 1532, 1428, 1102; **HRMS/ESI:** m/z calcd. for C₃₂H₃₇N₂O₆ [M+H]⁺ 545.2652, found 545.2656.

2-methoxy-5-({4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazol-3-yl}oxy)methyl}piperidin-1-yl)methylphenol (18)

From general procedure **B** with 3-[(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazole (200 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light yellow oil (131 mg, isolated yield 76%). Then the pure compound was solubilized in *i*-PrOH, then fumaric acid (66.9 mg, 0.58 mmol, 2.0 eq.) was added, the solution was heated with a heat gun for 1 min then, stirred at rt. After 1h, the suspension was filtered over vacuum and final salt was obtained as white powder (61 mg, 28% isolated yield over two steps). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 7.38 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 1.4 Hz, 1H₂), 6.82 – 6.73 (m, 2H), 6.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.13 – 4.97 (m, 1H), 4.25 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 4.12 – 3.92 (m, 4H), 3.87 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.93 (br d, J = 11.4 Hz, 2H), 2.23 (m, 2H), 2.00 (br t, J = 11.7 Hz, 2H), 1.88 (m, 1H), 1.78 (br d, J = 11.8 Hz, 2H), 1.54 (m, 2H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 166.4, 166.1, 152.9, 145.9, 145.6, 131.9, 131.8, 120.5, 115.5, 110.5, 105.4, 105.3, 103.3, 78.6, 74.5, 73.1, 67.4, 62.7, 56.1, 53.3 (2C), 35.8, 33.3, 28.8 (2C). **MS** m/z [M+H]⁺: 455.8; **IR (neat, cm⁻¹)**: 3387, 2938, 2879, 2804, 2763, 1613, 1524; **Mp**: 112-115°C; **HRMS/ESI:** m/z calcd. for C₂₅H₃₁N₂O₆ [M+H]⁺ 455.2182, found 455.2184.

in vitro experiments**DPPH radical scavenging activity**

The antiradical activity of the tested compounds was assessed using a miniaturized DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay.^{31,32} The tested compounds were diluted from stock solution in absolute ethanol and incubated in the presence of 100 μM DPPH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution at rt in a 96-wells microplate (Sterilin®, Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) in the dark. The absorbance at 517 nm was then measured every 10 minutes min using Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and used to calculate the specific absorbance of DPPH in each solution subtracting absorbance of all other components in the solution as following:

- i. $A_{max}^{DPPH} = Abs_{DPPH \text{ alone}} - Abs_{blank}$
- ii. $A_{sample}^{DPPH} = Abs_{mix \text{ DPPH/compound}} - Abs_{compound}$
- iii. $A_{min}^{DPPH} = Abs_{mix \text{ DPPH/Trolox at } 375 \mu\text{M}} - Abs_{Trolox \text{ at } 375 \mu\text{M}}$

where A_{max}^{DPPH} is the maximal absorbance of DPPH alone, A_{sample}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a tested compound at given concentration, A_{min}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a Trolox® from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) at 375 μM considered as the minimal absorbance. Then, the DPPH radical scavenging activity were calculated according to the following formula:

$$\% \text{ DPPH RSA} = \frac{A_{max}^{DPPH} - A_{sample}^{DPPH}}{A_{max}^{DPPH} - A_{min}^{DPPH}} \times 100$$

Assays were conduct in triplicate at 10 concentration levels (0, 10, 12.5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 μM) of the tested compound. Absorbance calculations were carried out using Microsoft Excel and regressions were performed using GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). The kinetic absorbance data were fitted with a one-phase exponential association model allowing us to calculate the time of half-reaction and the plateau of the maximum effect at each concentration. The EC_{50} values (concentrations required to obtain 50% scavenging effect) were calculated plotting concentration versus % DPPH RSA at 60, 120, plateau and fitting the data with linear model for Trolox®, one or two-phase exponential association model for other compounds. EC_{50} and SD values were the mean of two independent experiments. Trolox® was tested as positive control.

ORAC assay

The antioxidant activity of the synthesized compounds was assessed using the Fluorescein Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC_{Fl}) assay [1, 2, 3].^{31–33} Trolox® (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and other compounds stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO and diluted in 10 mM phosphate buffer to obtain working solution at 6 concentration levels. 25 µL of buffer or Trolox® or compounds solution were mixed in a black microplate with 150 µL of fluorescein (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 8 nM and incubated 30 min at 37°C in a multimodal microplate reader (Synergy 2, Biotek, Winooski, VT, USA). Then, 25 µL of AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, Sigma-Aldrich) solution at 75 mM were added and mixed in each well before the kinetic. Measurements of fluorescence ($\lambda_{ex}=485/20$ nm, $\lambda_{em}=520/20$ nm) were performed every minute during 2 hours. Each point was measured in triplicate. The AUC and the Net AUC of the standards and samples were determined using Gen5 Data Analysis Software using equations (1) and (2) respectively.

$$- \quad AUC = \frac{F_1}{F_1} + \frac{F_2}{F_1} + \frac{F_3}{F_1} + \dots + \frac{F_n}{F_1} \quad (1)$$

$$- \quad NetAUC = AUC_{sample} - AUC_{blank} \quad (2)$$

Where F_1 is the fluorescence reading at the initiation of the reaction and F_n is the last measurement. The standard curve was obtained by plotting the Net AUC of different compound concentrations against their concentration using GraphPad® Prism statistical software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). ORAC values of samples were then calculated dividing the slope of standard curve of each compounds by value obtained for Trolox®. ORAC value are given as mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Affinity as Regards 5-HT₄ Receptors

Equipment and Methods Sampling Striatal Tissue and Membrane Preparation All of the procedures described in this chapter are the result of the work of Grossman *et al.*²² In brief, the animals (Male Guinea pigs: 300-350 g. IFFA CREDO, France) are euthanized by decapitation then the brain is quickly removed at +4°C. The striatal regions are carefully dissected then reassembled. The striata assembly is placed in 10 volumes of 50 mM HEPES buffer, pH 7.4, at +4°C. After homogenisation at +4°C. (Ultra-Turrax, maximum speed, 15 sec) and ultracentrifugation (23 000 g. 60 min, +4°C.), the cell pellet is re-suspended in 50 mM, pH 7.4 buffer at +4°C. so as to obtain a tissue concentration in the order of 15 mg/ml (protein assay by the Lowry *et al.* method, 1951,³⁴ using bovine serum albumin as a standard). Competition Studies of the Products to be Studied in Competition Against H-GR113808 Prior to these competition studies, a series of Saturation curves were performed in order to check whether the pharmacological parameters K_d , B_{max} and the Hill Coefficient of HI-GR113808, obtained in our

experimental conditions, are consistent with those published in the literature. For that purpose, 7.5 µg/µL membrane preparation samples are incubated in duplicate (50 mM HEPES buffer, pH 7.4, +37° C.) at +37° C. for 30 minutes, in the presence of 7 increasing concentrations (0.05-1.5 nM, 200 µl of final volume) of [3H]-GR113808.²² Using a Brandel Cell Harvester, the binding of the radioligand with the proteins is interrupted by rapid filtration of the incubation medium through a filter strip (WHATMAN GF/B FP-100) pre-incubated in polyethylenimine (PEI 0.5% in water); filtration is followed by 3 rinses with 4 ml of 50 mM HEPES buffer, pH 7.4, at +4°C. The non-specific binding of H-GR113808 is quantified in the presence of 30 µM of serotonin, specific binding thus being estimated as the difference: (binding in the absence of serotonin)-(binding in the presence of serotonin). The competition studies are carried out with 0.1 nM of H-GR113808 in the presence of 10 or 10 M, or n concentrations for the K_i , of ligand to be studied, prucalopride being used as the reference 5-HT₄ agonist. After incubation, the filtration and rinsing procedures were identical to those described above.³⁵ Results By way of example, the affinities of several compounds according to the invention as regards 5-HT₄ receptors are listed in Table 1

In cellulo experiment

MTT ASSAY

The effects of the selected compounds on the growth of SH-SY 5Y were assessed by cell viability test using MTT assay, previously described by Mosmann *et al.*³⁶ Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well and treated with (compounds used and concentrations). After 24 hours cells were washed with PBS and incubated for 2 h with 300 µM MTT dissolved in DMEM. Then, MTT solution was removed from each well and formazan salts were treated with DMSO for 15 minutes at rt. After dissolution of formazan salts, the absorbance of each well was measured at 570 nm using a microplate reader (Victor2 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

ROS inducing assay

SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates at 5×10^3 cells/well. After 24 h incubation at 37°C in 5% CO₂ in culture medium supplemented with selected compounds at a single dose of 10 µM and cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and treated with 10 µM H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher) in DMEM for 30 minutes. Then washed again with PBS and some wells were treated for 30 minutes with 100 µM tert-butyl hydroperoxide (TBH) in PBS. After 20 minutes of incubation, cells were washed three times with PBS and the fluorescence

increase in each well was measured (lexc = 485 nm; lem = 535 nm) with a plate reader (Victor2 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, USA.).

Neurotoxicity and Neuroprotection on HT-22 Cells.

Cells were cultured in T75-flasks using DEMEM medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS, and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Cells were passaged every two days and incubated at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator. For performing the assays, 80% confluent cells were washed with 5 mL PBS and 2 mL trypsin/EDTA were added. After incubation for 5 min in the incubator, 8 mL culture medium were added and the cell-suspension was transferred into a falcon tube, which was then centrifuged (1.400 rpm, 4 min). The supernatant was discarded, the pellet resuspended in 5 mL culture medium and cells were counted using a hemocytometer. The cell suspension was diluted using culture medium to obtain a concentration of 20.000 cells/mL. In each well, 100 µL diluted cell-suspension were added and incubated overnight in the incubator. Compounds were dissolved in DMSO to obtain 5 mM stock solutions, which were freshly further diluted using culture medium. Dilution of DMSO instead of compound stock solution served as control. Treatment with 1% SDS served as positive control for cell death. After incubation for 24 h in the incubator, a cell viability assay was performed. For neuroprotection, 10 mM monosodium-L-glutamate was co-incubated with different compound concentrations. Quercetin (25 µM) served as positive control for neuroprotection. After 24 h incubation in the incubator, a cell viability assay was performed. Therefore, a MTT solution (4 mg/mL in PBS) was freshly diluted 1:10 with culture medium. After removal of the previous medium, 100 µL diluted MTT-solution were added to each well and cells incubated for further 3 h in the incubator. Then the MTT-solution was discarded, and 100 µL lysis buffer (10% SDS in H₂O) were added. The next day, absorbance at 560 nm was determined with a multiwell plate photometer (Tecan, SpectraMax 250). Data are expressed as means ± SD of three independent experiments, each performed in sextuplicate. Statistical analysis was accomplished using GrapPad Prism 5 software applying one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post-test. Levels of significance: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; #*p* < 0.05; ##*p* < 0.01; ###*p* < 0.001.

- (1) Alzheimer, A. Uber Einen Eigenartigen Schweren Erkrankungsprozeb Der Himrinde. *Neurol Zentralbl* **1906**, *23*, 1129–1136.
- (2) Praticò, D. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease: A Reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29* (12), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.09.001>.
- (3) Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 2821–2831. <https://doi.org/10.1021/jm400970m>.
- (4) Behl, C.; Moosmann, B. Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (2), 182–191. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00883-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00883-3).

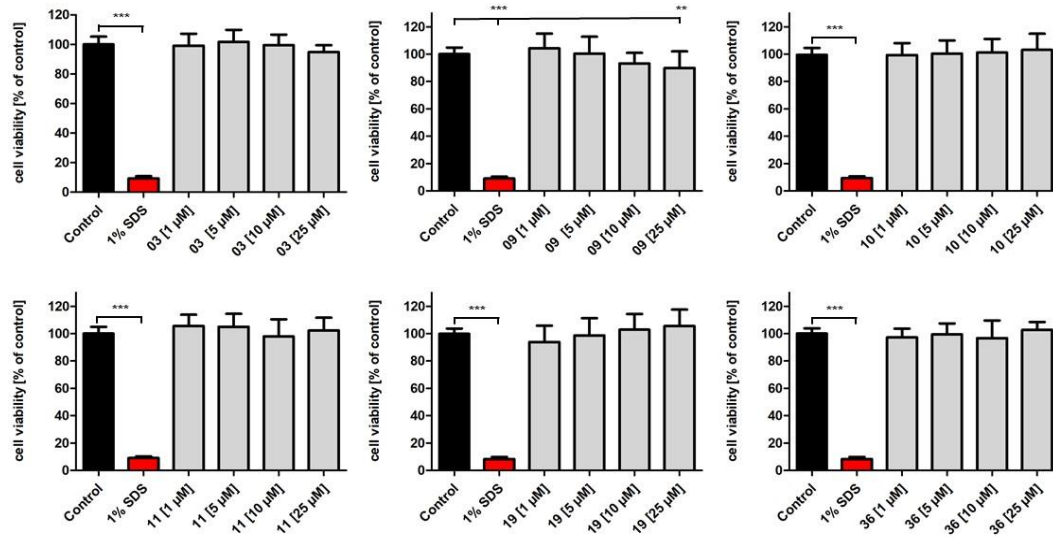
- (5) Citron, M. Alzheimer's Disease: Strategies for Disease Modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (5), 387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd2896>.
- (6) Proschak, E.; Stark, H.; Merk, D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *J. Med. Chem.* **2018**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00760>.
- (7) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 347–372. <https://doi.org/10.1021/jm7009364>.
- (8) Albertini, C.; Salerno, A.; de Sena Murteira Pinheiro, P.; Bolognesi, M. L. From Combinations to Multitarget-directed Ligands: A Continuum in Alzheimer's Disease Polypharmacology. *Med. Res. Rev.* **2020**.
- (9) Pérez-Areales, F. J.; Garrido, M.; Aso, E.; Bartolini, M.; De Simone, A.; Espargaro, A.; Ginex, T.; Sabaté, R.; Pérez, B.; Andrisano, V.; Puigoriol-Illamola, D.; Pallàs, M.; Luque, F. J.; Loza, M. I.; Brea, J. M.; Ferrer, I.; Ciruela, F.; Messeguer, A.; Muñoz-Torrero, D. Centrally Active Multitarget Anti-Alzheimer Agents Derived from the Antioxidant Lead CR-6. *J. Med. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00528>.
- (10) Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Peña-Altamira, L. E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G. E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M.; Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M. L. Multitarget Drug Design Strategy: Quinone–Tacrine Hybrids Designed To Block Amyloid- β Aggregation and To Exert Anticholinesterase and Antioxidant Effects. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8576–8589. <https://doi.org/10.1021/jm5010804>.
- (11) Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel Tacrine–Melatonin Hybrids as Dual-Acting Drugs for Alzheimer Disease, with Improved Acetylcholinesterase Inhibitory and Antioxidant Properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 459–462. <https://doi.org/10.1021/jm050746d>.
- (12) Perone, R.; Albertini, C.; Uliassi, E.; Pietri, F. D.; Pinheiro, P. de S. M.; Petralla, S.; Rizzardi, N.; Fato, R.; Pulkrabkova, L.; Soukup, O.; Tamarin, A.; Bartolini, M.; Bolognesi, M. L. Turning Donepezil into a Multi-Target-Directed Ligand through a Merging Strategy. *ChemMedChem n/a* (n/a). <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000484>.
- (13) Freret, T.; Bouet, V.; Quiedeville, A.; Nee, G.; Dallemagne, P.; Rochais, C.; Boulouard, M. Synergistic Effect of Acetylcholinesterase Inhibition (Donepezil) and 5-HT₄ Receptor Activation (RS67333) on Object Recognition in Mice. *Behav. Brain Res.* **2012**, *230* (1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.012>.
- (14) Toubllet, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Hatat, B.; Davis, A.; Since, M.; Corvaisier, S.; Freret, T.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Claeysen, S. Inhibiting Acetylcholinesterase to Activate Pleiotropic Prodrugs with Therapeutic Interest in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2786.
- (15) Hatat, B.; Yahiaoui, S.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Freret, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. A Novel in Vivo Anti-Amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT₆R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00148>.
- (16) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Hamidouche, K.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Cem, E.; Mignani, S.; Baranger, K.; Freret, T.; Bockaert, J.; Rivera, S.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Claeysen, S. Donecopride, a Swiss Army Knife with Potential against Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2020**. <https://doi.org/10.1111/bph.14964>.
- (17) Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Fréon, A. M.; Mignani, S.; Cresteil, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), E3825–E3830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111>.

- (18) Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Bolognesi, M.-L.; Rochais, C. Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT₄ Receptors with *in cellulo* Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>.
- (19) Brodney, M. A.; Johnson, D. E.; Sawant-Basak, A.; Coffman, K. J.; Drummond, E. M.; Hudson, E. L.; Fisher, K. E.; Noguchi, H.; Waizumi, N.; McDowell, L. L.; Papanikolaou, A.; Pettersen, B. A.; Schmidt, A. W.; Tseng, E.; Stutzman-Engwall, K.; Rubitski, D. M.; Vanase-Frawley, M. A.; Grimwood, S. Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–9254. <https://doi.org/10.1021/jm300953p>.
- (20) Lalut, J.; Payan, H.; Davis, A.; Lecoutey, C.; Legay, R.; Santos, J. S. O.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Rational Design of Novel Benzisoxazole Derivatives with Acetylcholinesterase Inhibitory and Serotonergic 5-HT₄ Receptors Activities for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59805-7>.
- (21) Yahiaoui, S.; Hamidouche, K.; Ballandonne, C.; Davis, A.; de Oliveira Santos, J. S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.048>.
- (22) Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-Pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13617.x>.
- (23) Liang, N.; Kitts, D. D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods That Define Mechanisms of Action. *Molecules* **2014**, *19* (11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>.
- (24) Molyneux, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **2004**, *26* (2), 9.
- (25) Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>.
- (26) Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader11Mention of a Trade Name, Proprietary Product, or Specific Equipment Does Not Constitute a Guarantee by the United States Department of Agriculture and Does Not Imply Its Approval to the Exclusion of Other Products That May Be Suitable. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (5), 612–616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0).
- (27) Schäfer, M.; Goodenough, S.; Moosmann, B.; Behl, C. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 β Is Involved in the Resistance to Oxidative Stress in Neuronal HT22 Cells. *Brain Res.* **2004**, *1005* (1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.037>.
- (28) Mondini, S.; Drago, C.; Ferretti, A. M.; Puglisi, A.; Ponti, A. Colloidal Stability of Iron Oxide Nanocrystals Coated with a PEG-Based Tetra-Catechol Surfactant. *Nanotechnology* **2013**, *24* (10), 105702. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/10/105702>.
- (29) Wang, S.; Jia, X.-D.; Liu, M.-L.; Lu, Y.; Guo, H.-Y. Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Activity of Ciprofloxacin Derivatives Containing a *N*-Substituted Benzyl Moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5971–5975. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.040>.
- (30) Romero, M. A.; González-Delgado, J. A.; Arteaga, J. F. Synthesis of Stilbene Derivatives: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10* (7), 1257–1262. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000731>.
- (31) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85* (5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

- (32) Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and Pitfalls in Measuring Antioxidant Efficacy: A Critical Evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC Assays. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.
- (33) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
- (34) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Estimation by Lowry's Method. *J Biol Chem* **1951**, *193*, 265.
- (35) Dallemagne, P.; Rochais, C.; Lecoutey, C.; Boulouard, M.; Freret, T. Acetylcholinesterase Inhibitors and Promnesiant Serotonin 5-HT4 Receptor Agonists, Their Methods of Preparation and the Pharmaceutical Compositions Containing the Same. US9663465B2, May 30, 2017.
- (36) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Supplementary data :

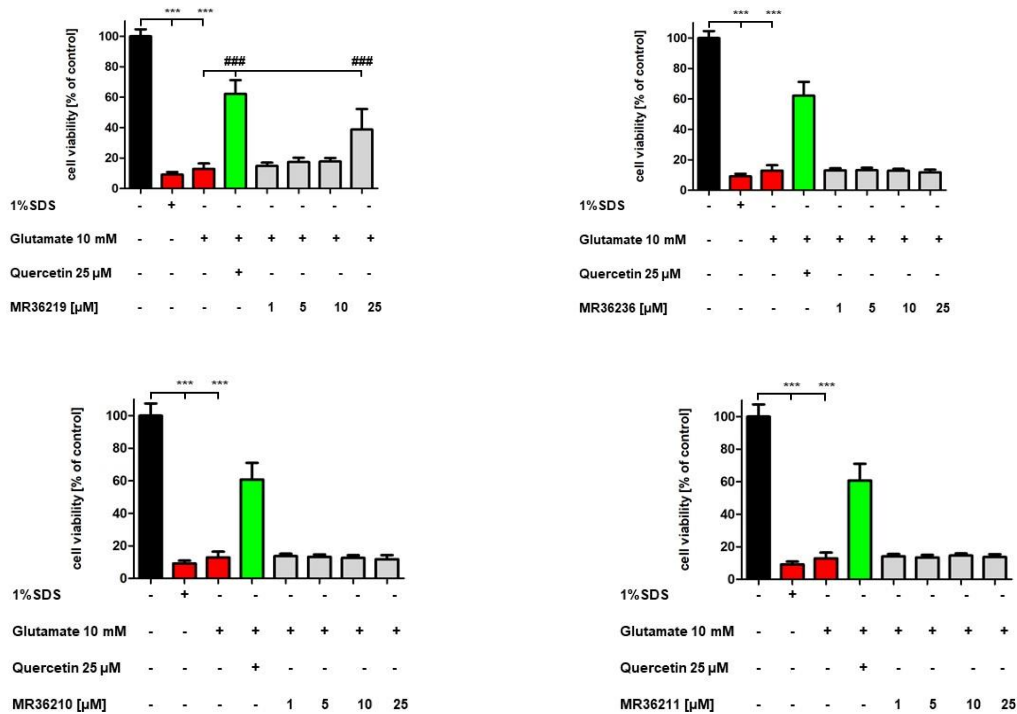
MTT on HT22



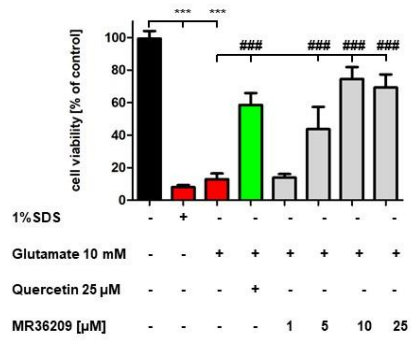
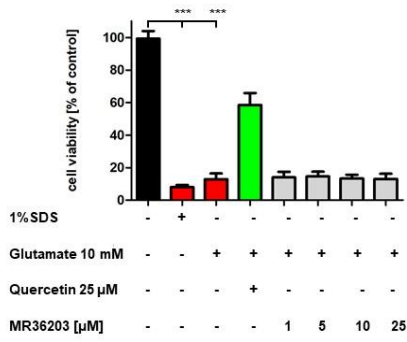
Compounds were studied on neuronal HT-22 cells for neurotoxic effects. Results of MTT test are presented as means \pm SD of three independent experiments, each performed in sextuplicate, and refer to untreated control cells, which were set as 100% values. Treatment with 1% SDS served as positive control for cell death. Statistical analysis was achieved by applying one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post-test. Levels of significance: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. Treated cells were compared with untreated control cells.

MTT assay on HT-22 cells –03= 8i ; 09 = 8b; 10 = 8g; 11 = 8e; 19 = 9a, 36 = 18

HT-22 neuroprotective assay



Chapitre 3 : Travaux personnels



Compounds were studied on neuronal HT-22 cells for neuroprotective effects against glutamate induced oxidative stress. Results of MTT test are presented as means \pm SD of three independent experiments, each performed in sextuplicate, and refer to untreated control cells, which were set as 100% values. Treatment with 1% SDS served as positive control for cell death, while treatment with quercetin served as positive control for neuroprotection. Statistical analysis was achieved by applying one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post-test. Cells treated with 1% SDS and 10 mM Glu were compared with untreated control cells, while quercetin and compound dilutions were compared to 10 mM glutamate treated cells. Levels of significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

Neuroprotective assay on HT-22; 03= 8i ; 09 = 8b; 10 = 8g; 11 = 8e; 19 = 9a, 36 = 18

3. Résumé des principaux résultats

a. Introduction

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des travaux réalisés dans l'article 1. En effet comme démontré avec ce premier article, le couplage d'un motif agoniste à un motif antioxydant relié par un noyau central pipéridine a permis l'obtention de composés actifs sur un modèle cellulaire de stress oxydant. Le but de ce deuxième article est d'étendre cette stratégie de couplage vis-à-vis d'une seconde série chimique à motif agoniste 5-HT₄R décrit dans la littérature : les benzisoxazoles, afin d'évaluer l'influence de l'ajout de motif antioxydant sur le profil pharmacologique notamment (Figure 55).

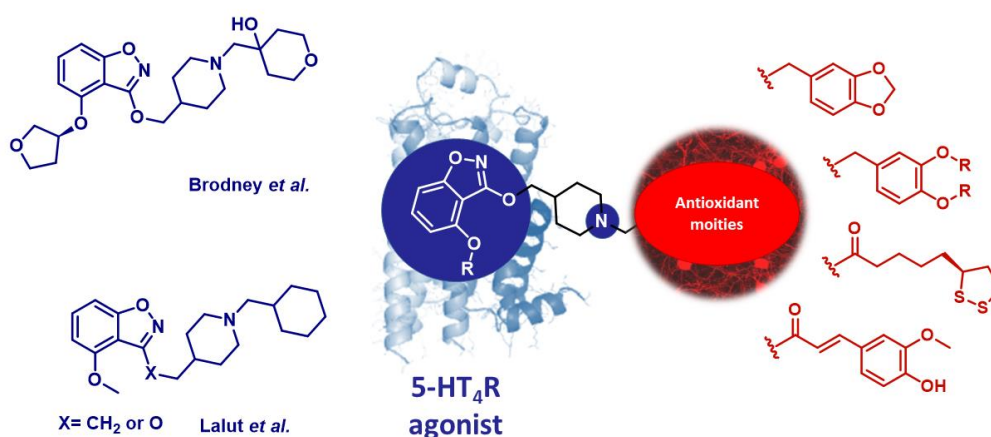


Figure 55- Stratégie de MTDL décrit dans l'article 2

b. Synthèses des composés

Deux séries de benzisoxazoles ont été préparées dans cet article. Les premiers composés sont dérivés des travaux de Lalut *et al.* avec le développement d'une série méthoxy-benzisoxazole décrit dans le Schéma 10.

Chapitre 3 : Travaux personnels

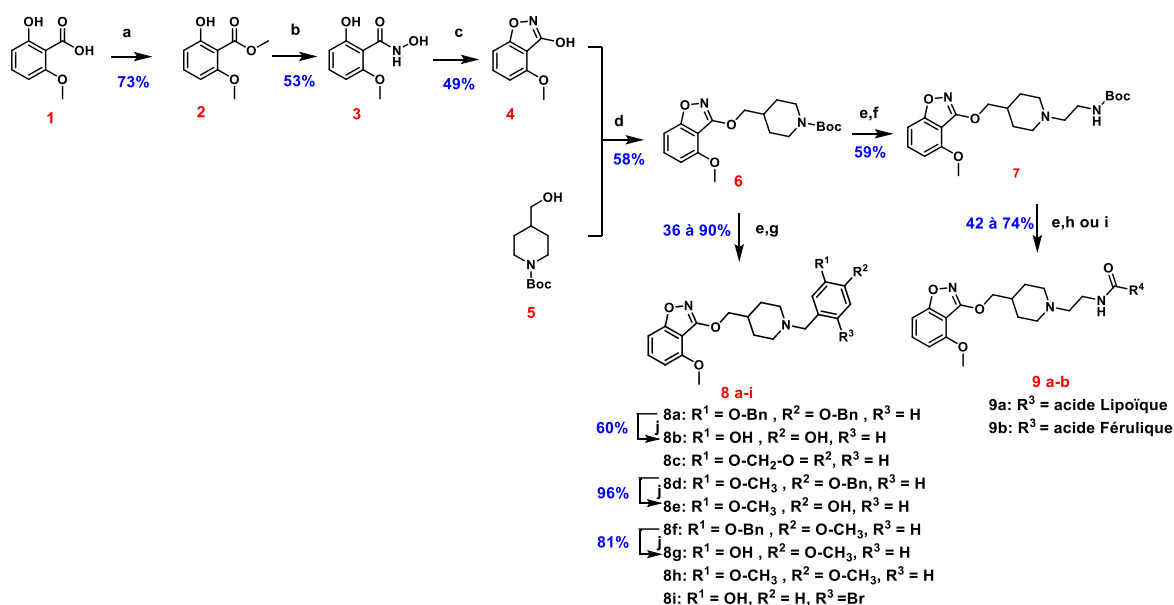


Schéma 10- Synthèse des dérivés méthoxy-benzisoxazoles. Réactifs et conditions : (a) H_2SO_4 , MeOH, reflux ; (b) NH_2OH , NaOH, MeOH/ H_2O , 40°C ; (c) CDI, THF sec, reflux ; (d) PPh_3 , DEAD, THF sec, reflux ; (e) TFA, DCM, ta ; (f) *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate, K_2CO_3 , ACN, 110°C ; (g) dérivés halogéno-benzyles, K_2CO_3 , DCM, ta ; (h) EDCI, HOBT, TEA, 0°C à ta, dans le noir ; (i) DCC, THF, ta ; (j) HBr 33% dans l'AcOH, DCM, 0°C.

Les premiers composés finaux ont été obtenus en 2 ou 3 étapes (pour les phénols protégés) à partir du premier synthon **6**. Ce premier synthon a été obtenu en 4 étapes. Une première étape d'estérification de l'acide benzoïque **1**, suivie par la formation d'un acide hydroxamique **3** avec un rendement de 53% s'expliquant par la saponification d'une partie de l'ester pendant la réaction. Une fois l'acide hydroxamique obtenu, une réaction intramoléculaire permet d'obtenir le noyau 1,2 benzisoxazole **4** en mélange avec le noyau 1,3-benzoxazole **4'** (voir partie expérimentale) dont la formation pourrait s'expliquer par un réarrangement de Lossen tel que décrit dans la littérature.²⁴⁵ Le synthon **6** est ainsi obtenu après réaction de Mitsunobu entre le mélange de **4** et **4'** non séparables et le dérivé hydroxy-méthyl-pipéridine **5** avec un rendement de 58% après purification.

La synthèse des fragments antioxydants est décrite dans la partie Article 1. b. Préparation des motifs antioxydants. Ces différents fragments ont été couplés au synthon **6** en 2 étapes. Une première de déprotection du Boc avec du TFA suivie d'une réaction de substitution nucléophile avec les différents halogénures de benzyle et des rendements moyens de 30 à 90%. Certains composés phénoliques ont ensuite été déprotégés au moyen d'HBr à 33% dans l'acide acétique avec des rendements allant de 60 à 81 %. Au total neuf premiers composés **8a-i** ont été obtenus de cette manière.

²⁴⁵ Hoare, D. G. *et al.* The Reaction of Hydroxamic Acids with Water-Soluble Carbodiimides. A Lossen Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (6), 1638–1643.

Afin d'obtenir les dérivés des acides lipoiïque et férulique, la même stratégie que celle présentée dans l'article 1 a été utilisée.²³⁸ Un synthon **7** possédant un linker éthylamine a été synthétisé à partir du synthon **6**, permettant des réactions de couplage peptidique tout en gardant intacte la basicité de l'amine de la pipéridine. L'acide lipoiïque a ainsi été couplé en utilisant l'EDCI et l'HOBt avec un rendement de 74% pour le composé **9a**, dans des conditions spécifiques afin d'éviter la dégradation de l'acide par la lumière, la chaleur ou l'oxygène. Quant au dérivé possédant l'acide férulique **9b**, celui-ci a été couplé en utilisant le DCC avec un rendement de 42%.

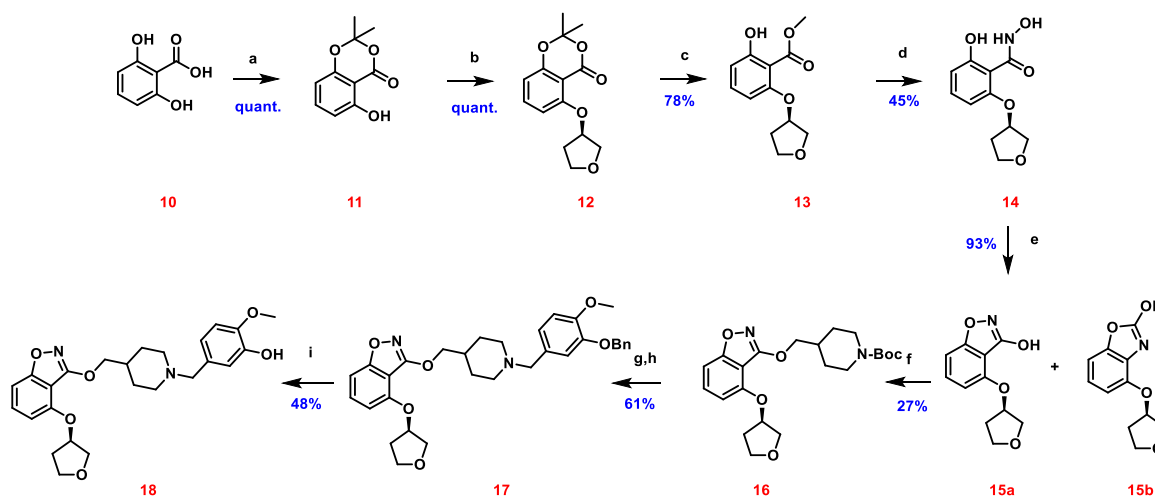


Schéma 11 – Réactifs et conditions : (a) Acétone, DMAP, SOCl₂, DME, 0°C to rt, 24 h ; (b) DEAD, PPh₃, (S)-3-OH-THF, THF sec, rt, 16 h ; (c) K₂CO₃, MeOH, rt, 2 h ; (d) NH₂OH.HCl, NaOH, MeOH/H₂O, rt, 1 h ; (e) CDI, THF sec, 16 h ; (f) DEAD, PPh₃, **6**, dry THF, reflux, 16 h ; (g) TFA, DCM, rt 2h ; (h) dérivé bromo-benzyl-isovanilline, K₂CO₃, ACN, rt, 16 h ; (i) HBr 33% in AcOH, 0°C to rt, 1 h.

Afin d'étudier l'influence de l'éther tetrahydrofurane porté par le benzisoxazole, tel que décrit par Brodney *et al.*, un analogue du composé **8g** a été synthétisé en neuf étapes.¹³⁶ Ce motif a été choisi d'après les premiers résultats prometteurs obtenus avec ce motif antioxydant dans la première publication.

Après une première étape de protection de l'acide dihydroxy-benzoïque **10**, une réaction de Mitsunobu avec du (S)-3-O-THF a été réalisée sur le phénol libre du composé **11**, suivie d'une déprotection afin d'obtenir le dérivé THF **13** avec un rendement de 78% sur 3 étapes. L'acide hydroxamique **14** a été obtenu avec un rendement de 45% puis une dernière étape de cyclisation intramoléculaire avec du CDI a mené à l'obtention de deux cycles non séparables à cette étape : le 1,2 benzisoxazole recherché et le 1,3 benzoxazole (tel qu'observé lors de la synthèse de la première série).

Une seconde réaction de Mitsunobu a ensuite été réalisée afin de greffer le groupement pipéridine avec un rendement de 27% après séparation des deux espèces formées. Les composés finaux **17** et son analogue phénolique **18** ont été obtenus de la même manière que décrit précédemment avec un rendement de 61% pour la substitution nucléophile de la pipéridine et 48% pour la déprotection du groupement protecteur benzyle du phénol. Ce faible rendement de la déprotection s'explique par la formation de produit secondaire due à la réaction de l'HBr sur le fragment THF.

c. Evaluation *in vitro* des composés

Au total treize composés finaux ont été synthétisés et évalués *in vitro* dans ces séries benzisoxazoles. Concernant les résultats d'affinité envers le récepteur 5-HT₄, ces composés se sont montrés extrêmement puissants avec des K_i allant de 113 nM à 1,24 nM. Sept des composés possèdent un K_i<15 nM, notamment les composés possédant un phénol libre tel que **8b**, **8e**, **8i**, **8g** et **18**. Les composés plus encombrants possédant des groupements protecteurs benzyles aux niveau des phénols se sont montrés également très affins pour la cible avec des K_i de 30 nM pour l'analogue **8a**, 58 nM pour **8d** et 113 nM pour **8f**. Le composé possédant l'acide lipoïque **9b** montre également une très bonne affinité avec un K_i de 8,7 nM.

Concernant les tests de capacité antioxydante, les composés possédant des phénols se sont révélés très actifs sur le test DPPH avec des IC₅₀ < 100µM pour **8b**, **8e**, **9b** et **18** hormis les composés isovanille **8g** et bromo-phénol **8i**. Comme prévu, l'analogue acide lipoïque **9a** a été inactif sur ce test car il s'agit d'un antioxydant mitochondrial ayant besoin d'être activé dans les cellules.

Concernant les tests ORAC, c'est à l'inverse le composé isovanilline **8g** qui a obtenu le meilleur score, avec une capacité antioxydante près de 4,8 fois celle du trolox, suivi du composé catéchol **8b** avec un score de 4,09. Étonnamment, l'analogue THF **18** du composé **8g**, a obtenu un bon score DPPH et un score ORAC moyen avec seulement 1,35. On pourrait suggérer que le noyau THF-O-benzisoxazole aurait un effet antioxydant intrinsèque mais l'analyse du précurseur **17**, ne révèle pas de capacité antioxydante, montrant l'importance de la présence du phénol libre au niveau de l'isovanilline. Autre fait intéressant, le composé vanilline **8e** n'a un score que de 2,6, et se montre donc presque deux fois moins actif que l'analogue isovanilline **8g** sur ce test.

Les composés dont le phénol était protégé par un groupement benzyle ou méthyle ne se sont pas montrés actifs dans les tests DPPH et ORAC, permettant d'écarter la pouvoir antioxydant du noyau méthoxy-benzisoxazole en lui-même également.

Ces premiers résultats confirmant la capacité antioxydante de la majorité des composés, ceux représentés en Figure 56 ont alors été évalués dans un contexte cellulaire.

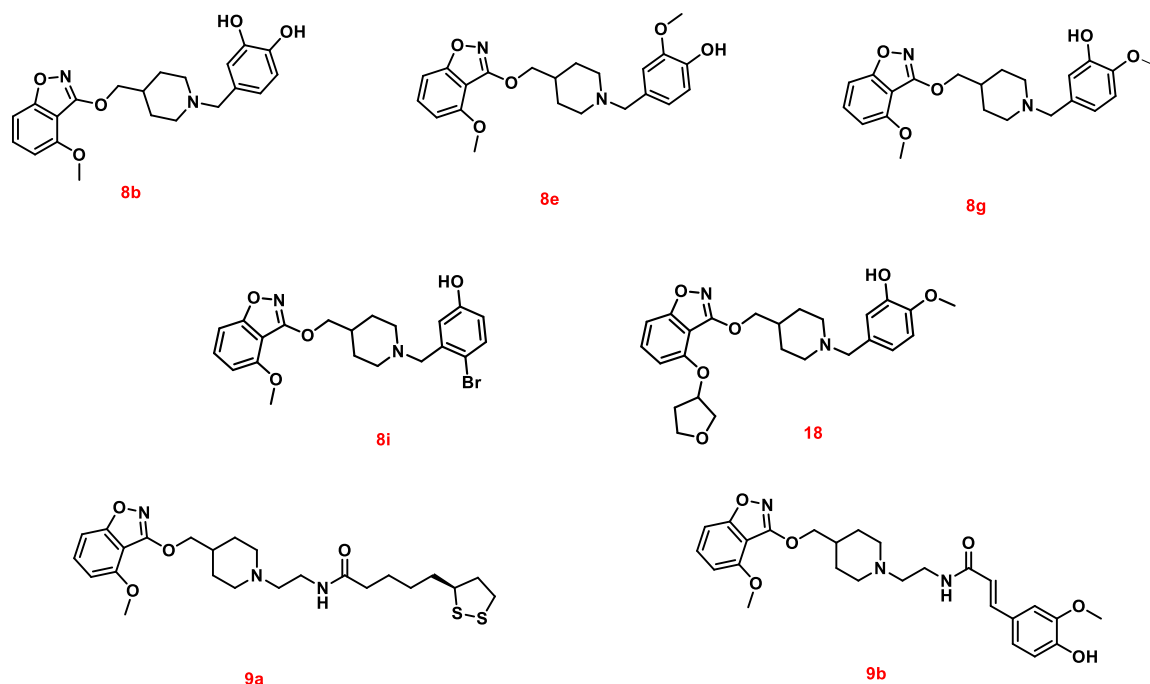


Figure 56 - Composés sélectionnés pour les tests cellulaires.

d. Évaluation *in cellulo* des composés

Les différentes molécules ont tout d'abord été testées sur les deux lignées cellulaires SH-SY5Y et HT-22 afin de vérifier leur innocuité au moyen de test de survie cellulaire MTT. Aucun effet neurotoxique n'a été détecté sur chacun des composés testés quelle que soit la lignée cellulaire et la concentration choisie. Deux tests différents ont ensuite été réalisés afin d'évaluer le potentiel antioxydant des molécules, un premier test d'induction de stress oxydant par *t*-BuOOH, comme présenté dans l'article 1, et un test de neuroprotection après induction de stress par du glutamate.

Le premier test a permis de montrer une diminution d'induction de stress oxydant des cellules par le *t*-BuOOH lorsque celles-ci avaient été traitées par les différents composés, avec des résultats prometteurs pour tous les composés testés. Les composés catéchol **8b**, lipoiqne **9a** et férulique **9b** se sont montrés les plus puissants avec une plus grande diminution de fluorescence (directement corrélée à la présence d'EROs) à 10µM que le trolox à 100µM.

Un deuxième test cellulaire de neuroprotection a été réalisé sur les composés sélectionnés hormis **9b** qui n'a pas été retenu sur ce test du fait de sa sélectivité moindre envers le récepteur 5-HT₄R ($K_i >$

20nM). Ce test est un test cellulaire un peu plus complexe de neuroprotection. En effet comme expliqué p118 il permet de mettre en évidence l'effet des composés sur des cellules neuronales soumises à un stress oxydant généré par le glutamate. Cela permet donc d'obtenir des données de neuroprotection sur un modèle cellulaire où le stress oxydant n'est pas seulement causé par une surcharge d'EROs mais également par une diminution des défenses antioxydantes. Les résultats de ce test ont permis de mettre en évidence deux composés. Notamment, le composé catéchol **8b** s'est montré très efficace avec un effet neuroprotecteur dose dépendant, et ce dès 5µM, et un effet supérieur au témoin positif dès 10µM. Le composé acide lipoïque **9a** s'est montré actif modérément à la dose de 25µM.

Bien que non présenté dans la publication elle-même, les autres composés **8e**, **8g**, **8i** et **18** ont également été étudiés pour leur effet neuroprotecteur, malheureusement comme le montre les résultats en annexe de l'article, aucun de ces composés ne s'est montré neuroprotecteur envers le stress oxydant induit par le glutamate et ce même à la dose de 25µM.

e. Conclusion provisoire de l'article

Les composés synthétisés sur ces séries chimiques se sont d'abord révélés très affins envers le récepteur 5-HT₄ et ce qu'importe l'encombrement apporté par les groupements proximaux. Les composés possédant des noyaux benzisoxazoles s'avèrent donc être très affins pour le récepteur 5-HT₄. De larges possibilités de pharmacomodulations sont ainsi possibles sur la partie proximale de la pipéridine.

Après des résultats prometteurs sur les tests *in vitro* de capacité anti-oxydante (ORAC et DPPH), les composés ont été évalués pour leur propriétés antioxydantes *in cellulo*. Sur le premier test d'induction de stress oxydant sur des cellules SH-SY5Y avec du *t*-BuOOH, tous les composés sélectionnés ont montré des propriétés antioxydantes, avec les composés **8b**, **9a** et **9b** étant plus efficaces. Ces résultats ont été confirmés par la suite pour le composé **8b** et **9a** sur le test de neuroprotection sur les cellules HT-22.

Certaines données cruciales sont en cours d'évaluation tel que le profil pharmacologique de ces composés sélectionnés. Une première partie de ces résultats ayant été obtenus tardivement, ils n'ont pas encore été inclus dans le présent article en préparation, ils seront toutefois présentés dans la partie conclusion de ce chapitre.

4. Travaux annexes et discussions

a. Composés dérivés de la mélatonine

D'autres composés ont été synthétisés lors de l'étude de ces séries mais n'ont pas pu être publiés. Ces structures ont donc été représentées dans cette partie.

i. Synthèse des fragments indole et mélatonine

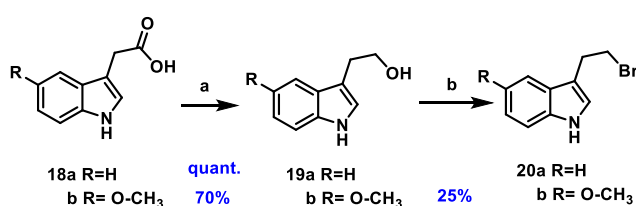


Schéma 12 - Synthèse des fragments indoliques, réactifs et conditions : (a) LiAlH₄, Et₂O, 0°C à 40°C, 4 h (b) PBr₃, Et₂O, 0°C, 3h.

La mélatonine est une hormone naturelle ayant des propriétés antioxydantes. Un fragment mélatoninergique, ainsi que son analogue indolique, ont été synthétisés afin d'étudier la capacité antioxydante de ces composés dans le cadre de notre projet. La sérotonine possédant un noyau indole et étant le ligand naturel du récepteur 5-HT₄, ce fragment pourrait avoir à lui seul des capacités agonistes du récepteur et antioxydantes.

Les fragments indoliques **20a** et **20b** ont été obtenus après 2 étapes. La première étape consiste en une réduction des acides carboxyliques **18a** et **18b** en alcool **19a** et **19b** grâce au LiAlH₄ avec des rendements quantitatifs et de 70% respectivement. La seconde étape consiste en la bromation de l'alcool par le PBr₃, dans l'éther diéthylique à froid. Le composé **20a** étant très instable, celui-ci n'a pas été isolé pur malgré plusieurs tentatives. Il a donc été resynthétisé et engagé tel quel dans la réaction de couplage. Le composé **20b**, a été synthétisé et isolé avec un rendement de 25%.

Les composés indoles possédant une réactivité particulière, de nombreux produits secondaires peuvent alors se former, malheureusement aucun de ces sous-produits n'a été identifié ou isolé permettant de confirmer un mécanisme précis.²⁴⁶

²⁴⁶ Bandini, M. Electrophilicity: The "Dark-Side" of Indole Chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (32), 5206–5212.

ii. Synthèse des produits finaux indoles

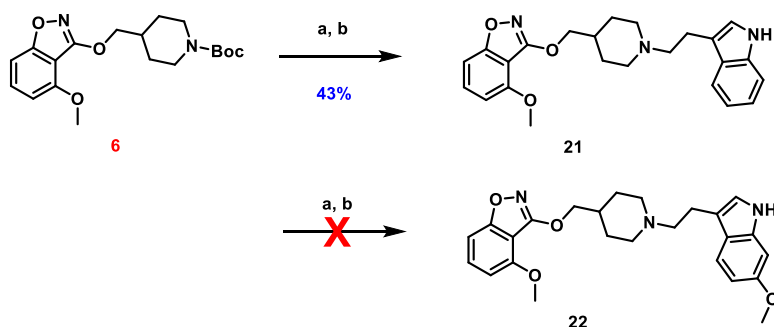


Schéma 13 - Synthèses des composés dérivés de la mélatonine, réactifs et conditions : (a) TFA, DCM, ta, 1h ;
(b) K₂CO₃, DCM, ta.

Selon le protocole habituel, les différents fragments indoliques ont donc été couplés au synthon **6**. Une première étape de déprotection de l'amine de la pipéridine avec du TFA a été réalisée dans les deux cas, suivi d'une substitution nucléophile avec les dérivés bromo-indoles **20a** et **20b** précédemment synthétisés. Le premier composé indolique **21** a été obtenu après purification avec un rendement de 43%. Le composé **22**, n'a pas été obtenu en raison d'un produit de départ **20b** trop impur.

b. Composés dérivés du coenzyme Q10

De la même manière que dans l'article 1, le fragment **6** dérivé du coenzyme Q10 a été engagé dans un couplage avec le fragment **6** méthoxybenzoxazole. Malheureusement, bien que la réaction ait été réalisée à froid (-15°C) et sous atmosphère inerte, le produit **23** semble s'être dégradé durant l'étape de purification et n'a donc pas pu être isolé. Une tentative de purification très rapide suivie de formation du fumarate a été réalisée afin de réduire les potentielles interactions entre l'azote basique de la pipéridine et le fragment quinone. Malheureusement, le produit s'est également dégradé pendant la tentative de formation du sel. Ces composés dérivés du Q10 semblant bien trop instables, l'utilisation de ce motif en tant qu'antioxydant a donc été abandonnée (Schéma 14).

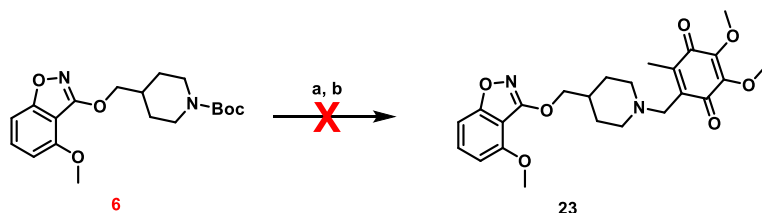


Schéma 14 - Synthèse des composés Q10, réactifs et conditions : (a) TFA, DCM, rt, 1 h ; (b) K₂CO₃, DCM, -15°C, 3 h à 8 h.

5. Conclusion

Le but principal de cette étude était de confirmer que l'ajout de motifs antioxydants sur des structures autres que les aminochlorobenzophénones pouvait également permettre d'obtenir des composés très affins envers 5-HT₄R avec des propriétés antioxydantes *in cellulo*.

Pour cela, quatorze composés finaux ont été synthétisés et treize sont décrits dans la publication. Les travaux sur les dérivés indoliques et de la mélatonine ne sont pas assez poussés à l'heure actuelle pour envisager leur publication.

Ces composés finaux ont été soumis à des tests *in vitro* d'affinité envers le récepteur 5-HT₄, ainsi que de capacité antioxydante avec des tests ORAC et DPPH. Les différents résultats sont résumés dans la Figure 57, avec en abscisse le score ORAC, en ordonnée les K_i 5-HT₄R et en couleur le score DPPH.

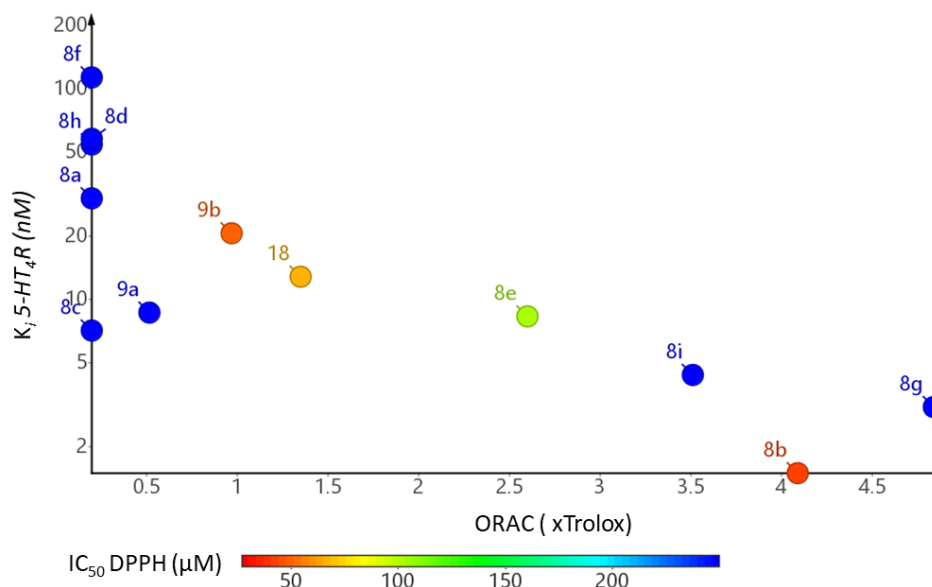


Figure 57 - Récapitulatif des test *in vitro* sur les séries benzisoxazoles.

On remarque, qu'étrangement, le composé THF **18** s'est montré actif sur le test DPPH alors que son analogue méthoxy-benzisoxazole **8g** n'a pas montré d'activité antioxydante sur ce premier test. Une resynthèse du composé **8g** est en cours afin de confirmer les résultats obtenus avec le premier lot. Ces résultats sont d'autant plus surprenants quand on les compare aux résultats obtenus dans la première série de l'article 1 qui montraient un analogue isovanilline actif sur DPPH et vanilline inactif, à l'inverse des résultats obtenus ici. Pour le composé bromo-phénol-benzisoxazole **8i**, cela reste cohérent avec les résultats observés sur la première série chimique.

On peut clairement voir sur cette Figure 57 que le composé catéchol **8b** est le composé regroupant le mieux les trois activités, cependant les différents composés **9b**, **18**, **8e**, **8i** et **8g** ont également été sélectionnés afin d'être testés dans des milieux cellulaires plus complexes. Le composé **9a** a également été sélectionné car ce composé étant un antioxydant indirect, un milieu cellulaire est nécessaire à son activation.

Deux tests *in cellulo* ont été réalisés grâce à des collaborations européennes notamment avec l'université de Bologne en Italie et Würzburg en Allemagne. Un premier test d'induction de stress oxydant sur des cellules SH-SY5Y a été réalisé et a permis de montrer des capacités antioxydantes pour tous les composés. Les composés **8b**, **9a** et **9b** se sont cependant montrés les plus actifs avec une réduction d'induction de stress oxydant par la *t-BuOOH* encore plus importante que la réduction obtenue avec le trolox à 100µM. Les résultats des tests ORAC semblent être corrélés en partie aux résultats que l'on retrouve dans ce premier test *in cellulo* sauf pour le composé isovanilline **8g**. En effet celui-ci, bien que le plus efficace sur le test ORAC, semble le moins efficace de la série sur ce premier test cellulaire. Dans le second test cellulaire de neuroprotection, seulement deux des composés sélectionnés ont montré l'effet attendu. Le composé **9a** a montré un faible potentiel de neuroprotection, alors que le composé **8b** s'est montré plus puissant avec un effet dose réponse de 5µM à 25µM. Les deux tests antioxydants *in cellulo* ne corrèlent donc pas totalement de toute évidence avec les résultats obtenus dans les tests *in vitro*. Le composé **8b** semble cependant bien répondre dans tous les tests.

Le choix du composé **8b** en tant que lead pourrait avoir quelques limites d'ordre pharmacocinétique. En effet l'analogue catéchol avait été exclu dans l'article 1 du fait des doutes sur sa stabilité chimique et métabolique. Ici le composé **8b** semble plus stable chimiquement (pas de changement d'état), mais les motifs catéchols sont tout de même très sensibles aux enzymes du métabolisme comme les COMT. Une comparaison des propriétés physico-chimiques a donc été effectuée sur SwissADME (Figure 58).²⁴⁴ Le cLogP prédisant la solubilité du composé est plus élevé chez le composé **9a**, laissant présager un meilleur passage de la BHE. Néanmoins dans les modèles de prédiction, ces deux composés ne passent pas la BHE. Par contre le composé **8b** ne semblerait pas substrat des pompes d'efflux.

Les pompes d'efflux P-glycoprotéine (ou P-gp) sont des transporteurs ATP-dépendant transmembranaires. Ils permettent d'éviter l'excès de molécules exogènes au niveau cérébral. Lors du développement d'une molécule ciblant le SNC, il est très important d'éviter l'efflux par ce transporteur,

d'autant que la concentration plasmatique de la molécule atteint rarement le seuil de saturation des pompes P-gp au niveau de la BHE.^{247,248}

Cependant ces modèles ne sont que des modèles prédictifs devant être confirmés par des essais de passage de BHE. Certains composés comme les dérivés décrits précédemment tel le Dérivé co-drogue tacrine/silibinine, semblent au premier abord ne pas passer cette BHE alors que les essais *in vivo* sur ce composé prouvent le contraire.²²⁵

Si d'aventure le composé catéchol ne traversait pas la BHE, son administration pourrait être envisagée par l'utilisation de nanocapsules ou par la formation de pro-drogue. De plus, afin de réduire l'effet des COMT, un inhibiteur de COMT (tel que l'entacapone co administré avec la L-dopa dans la maladie de Parkinson) pourrait être utilisé afin de diminuer la dégradation trop rapide de celui-ci.

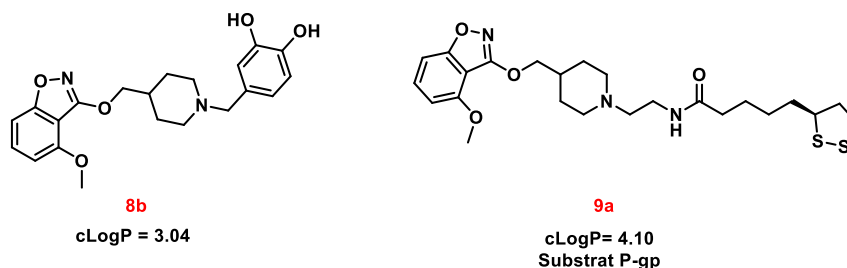


Figure 58 - Molécules potentiellement Hits en série benzisoxazole.

Afin de valider ces hits, le profil pharmacologique des composés est nécessaire. Des séries benzisoxazoles ont été développées au laboratoire par Julien Lalut avec notamment le développement des deux composés dérivés du donécopride représentés en Figure 59, **a** et **b**.²¹² Malheureusement cette étude récente publiée en 2020 a déterminé que ces deux composés n'agissaient pas en tant qu'agonistes des 5-HT₄R mais avaient plutôt un profil antagoniste pour ces récepteurs. Un docking entre le composé **a** et le récepteur a été réalisé et a montré le manque d'interaction entre la T304 et la molécule pouvant potentiellement expliquer le profil non agoniste comparé au docking avec le donécopride. Or, même chez l'analogue éther de cette molécule, l'effet agoniste n'a pas été retrouvé laissant présager des profils antagonistes chez les premiers composés méthoxy-benzisoxazoles développés dans l'article 2. C'est dans cette optique que des composés tétrahydrofuranes ont été synthétisés afin d'étudier l'effet de l'ajout de ce groupement connu pour conduire à un profil agoniste du récepteur.¹³⁶

²⁴⁷ Hitchcock, S. A. Structural Modifications That Alter the P-Glycoprotein Efflux Properties of Compounds. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (11), 4877–4895.

²⁴⁸ Desai, P. V. *et al.* Integration of *in Silico* and *in Vitro* Tools for Scaffold Optimization during Drug Discovery: Predicting P-Glycoprotein Efflux. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (4), 1249–1261.

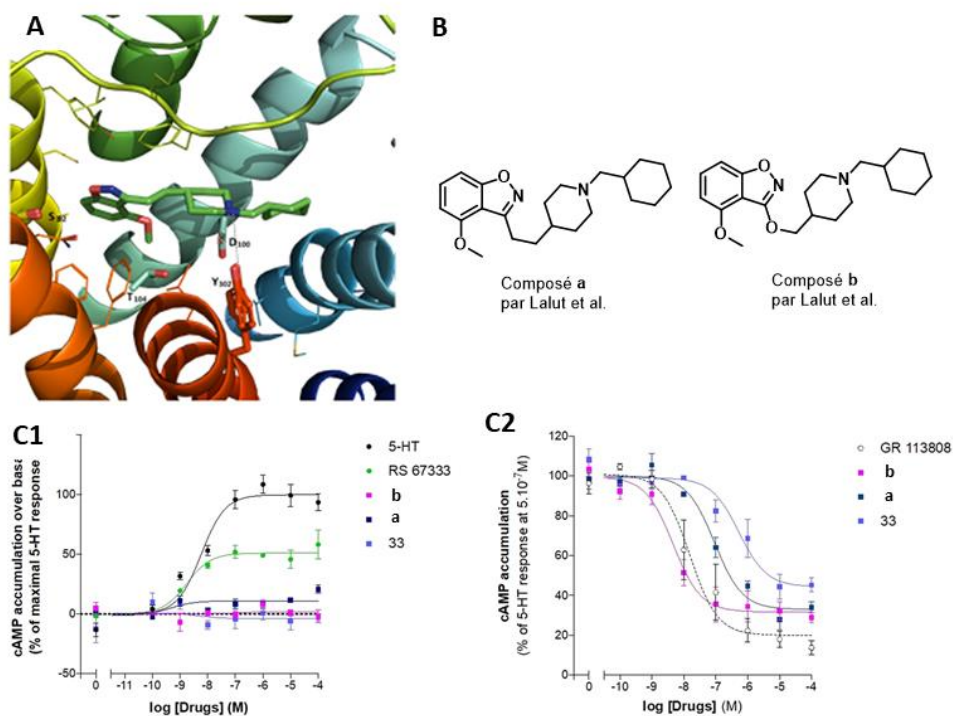


Figure 59 - Composés développés par Lalut *et al.* A) Docking de la structure **a** avec 5-HT₄R ; B) Structure des composés **a** et **b** ; C) Résultats des tests cellulaires de production d'AMPC.

Comme le laissait présager ces résultats préliminaires sur des composés structurellement proches, les études de profil pharmacologique nous ont permis de confirmer le profil antagoniste des composés méthoxy-benzisoxazoles. En effet, comme on peut le voir dans la Figure 60, les composés **8g** et **9b** n'ont pas permis l'activation du récepteur, confirmant une fois de plus le profil antagoniste de ce type de composé. Des essais complémentaires sur le profil antagoniste seront effectués prochainement. Le composé (*R*)-3-THF-benzisoxazole **18**, analogue du **8g** semble, permettre l'activation du récepteur avec une EC₅₀ de $6,8 \pm 2,4$ nM et avec une E_{max} de 40% de production d'AMPC, soit à peine moins que l'agoniste de référence le RS-67333. Cela confirme notre hypothèse selon laquelle le profil agoniste pourrait être « récupéré » par l'ajout d'un motif (*R*)-3-THF sur le noyau benzisoxazole. Un docking des composés **18** et **8g** avec le récepteur pourrait nous permettre de mieux comprendre les interactions en jeu menant à l'activation du récepteur et ainsi de pouvoir proposer un nouveau pharmacophore pour les agonistes des récepteurs 5-HT₄.

Chapitre 3 : Travaux personnels

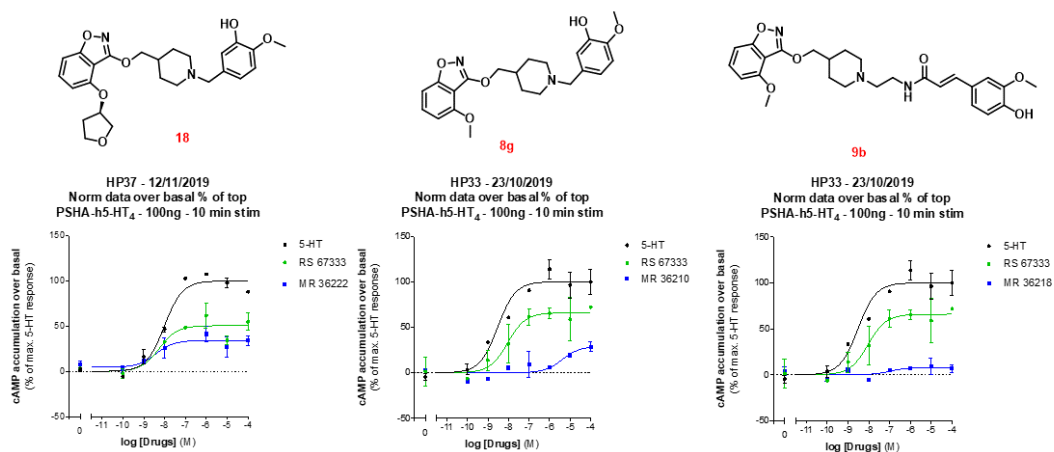


Figure 60 - Résultats des études préliminaires de profil pharmacologique.

Bien que les composés **8b** et **9a** semblent se démarquer dans le test de neuroprotection *in cellulo*, leur développement en tant que hits sur cette publication semble compromis en l'état, de par le fait qu'ils appartiennent, tous les deux, à la série des méthoxy-benzisoxazoles à profil antagoniste. Cependant, l'ajout du motif THF pourrait permettre de récupérer cette activité agoniste nécessaire à l'effet bénéfique dans la MA.

La stratégie de couplage de motif antioxydant semble être efficace d'après les différents tests *in vitro* et *in cellulo* réalisés sur l'affinité et la capacité antioxydante. Afin d'obtenir le meilleur hit possible pour de potentiels tests sur un modèle murin de la MA, différentes séries décrites comme agonistes dans la littérature ont alors été sélectionnées, synthétisées puis couplées à un motif antioxydant sélectionné. Les différents résultats obtenus sur cet axe de recherche sont présentés dans le paragraphe suivant.

III. Modulation du centre hétérocyclique à activité agoniste envers 5-HT₄R

1. Introduction

Le troisième paragraphe de ce chapitre Résultats s'intéressera aux différentes modulations effectuées sur le noyau hétérocyclique nécessaire à l'activité envers le récepteur 5-HT₄. En effet, comme cela a été montré dans la Figure 19 - Structure générale des ligands 5HT₄R.¹²⁸ la conception de ligands envers ces récepteurs peut se résumer en l'installation d'un motif chimique commun comportant un hétérocycle aromatique, lié à un linker, suivi d'un noyau basique saturé et enfin d'une partie proximale aisément diversifiable.

Les deux premiers articles présentent les résultats obtenus sur deux lignées chimiques distinctes réputées pour leurs propriétés agonistes envers le récepteur 5-HT₄. Le but de ces premières études était de sélectionner un motif antioxydant combinant de bonnes activités *in vitro* et *in cellulo* sur les cibles ainsi qu'une bonne pharmaco-potentialité afin de greffer celui-ci sur de nouveaux noyaux hétéroaromatiques susceptibles d'activer le récepteur 5-HT₄.

2. Choix du motif antioxydant

Les différents résultats obtenus sur les deux premières séries ont permis la sélection d'un premier motif antioxydant possédant les propriétés suivantes :

- Une bonne liaison au récepteur 5-HT₄ ainsi qu'un profil agoniste partiel ;
- Une activité antioxydante modérée sur les tests *in vitro*
 - o Avec une IC₅₀ dans le test DPPH <100 μM
 - o Et un score ORAC au minimum 2 fois supérieur à celui du trolox
- Ainsi qu'une facilité d'accès synthétique et une certaine stabilité physico-chimique et métabolique.

Parmi les motifs antioxydants testés sur les deux premières séries, les motifs catéchol, vanilline et isovanilline se sont très vite démarqués selon ces critères de sélection.

Pour la série chloroaniline dérivée du donécopride, le composé catéchol **9b** possède un K_i de 5,9 nM envers le récepteur, et le motif isovanilline **9g** un K_i de 12,7 nM. Étonnamment, sur cette série le motif vanilline **9e** s'est montré bien moins puissant que ses analogues structuraux avec une inhibition du récepteur à 7% seulement à la concentration de 10^{-8} M contre 76% et 64% pour les composés catéchol **9b** et isovanilline **9g** respectivement. Concernant les premiers tests antioxydants DPPH *in vitro* de ces composés phénoliques, les composés catéchol **9b** et isovanilline **9g** se sont également montrés les plus intéressants avec des IC_{50} à 2h de 19,6 μ M pour le catéchol **9b** et 85,5 μ M pour l'isovanilline **9g**. Le composé possédant le motif vanilline **9e** s'est montré moins puissant dans ce test avec une IC_{50} à 2h de 180 μ M. On peut cependant noter que concernant le test ORAC, c'est le motif vanilline **9e** qui semble légèrement le plus puissant avec une activité 3,88 fois supérieure au trolox contre 3,40 et 3,41 pour le catéchol **9b** et l'isovanilline **9g**.

Ces premiers résultats nous ont alors amenés à rejeter le motif vanilline car il semblait avoir un effet délétère sur la liaison du composé à son récepteur 5-HT₄ sur cette première série chimique.

Dans la seconde série chimique, les benzisoxazoles dérivés des composés décrits par Lalut *et al.* et Brodney *et al.*, les dérivés catéchols **8b**, vanilline **8e** et isovanilline **8g**, se sont montrés très affins envers le récepteur 5-HT₄. Le composé catéchol **8b** possède la meilleure activité sur l'ensemble des molécules synthétisées au cours de cette thèse avec un K_i de 1,24 nM. L'analogue isovanilline a obtenu un K_i de 2,6 nM contre 6,9 nM pour la vanilline **8e**, montrant alors une légère supériorité pour le motif isovanilline **8g** concernant la liaison au récepteur 5-HT₄. Concernant les tests de capacité antioxydante *in vitro*, le motif vanilline a démontré une IC_{50} de 71,0 μ M après 2h dans le test DPPH et une valeur 2,6 fois supérieure à celle du trolox dans le test ORAC. Étonnamment, par un mécanisme que l'on ne s'explique toujours pas le composé isovanilline de cette série n'a montré qu'une faible capacité antioxydante dans le test DPPH avec une IC_{50} à 2h supérieure à 250 μ M. Par contre, ce composé a été le plus puissant lors du test ORAC avec une activité 4,85 fois supérieure à celle du trolox dans celui-ci.

Les composés catéchol sont des composés qui ont été plus compliqués à synthétiser. En effet ceux-ci avaient tendance à se solubiliser dans la phase aqueuse lors des lavages ainsi qu'à se dégrader sur colonne chromatographique, que ce soit sur silice ou sur alumine, rendant leur purification complexe. La purification directe, sans étapes de lavage, des composés en sortie de réaction, par flash chromatographie a cependant permis d'obtenir ces composés avec des rendements satisfaisants proches de 60% pour les deux séries chimiques. Ces composés étant très réactifs en tant qu'antioxydants, ils peuvent alors s'oxyder et se dégrader à l'air libre. Un test rapide de stabilité a été effectué au laboratoire par analyse LCMS, entre un échantillon de composé **9b** stocké à température ambiante et un autre stocké sous azote à -4°C. Le composé stocké à température ambiante avait

changé d'aspect après 1 an et se présentait sous forme d'huile brune alors que le composé sous azote avait gardé sa forme d'huile légèrement jaune. Les résultats des analyses LCMS ont permis de mettre en évidence la présence d'un fragment **7'** précurseur **7** non protégé par le groupement Boc dans l'échantillon resté à l'air libre, en plus du composé **9b** (Figure 61). Sur la base de ces premières informations des études de stabilités devront être réalisées afin de confirmer ou d'infirmer le caractère instable des composés catéchol.

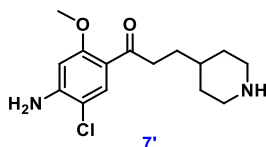


Figure 61- Structure du composé 7'

Outre leur possible instabilité chimique, les motifs catéchols sont également des motifs reconnus dans la littérature comme étant des PAINS. Ce sont des motifs chimiques pouvant mener à des résultats de faux-positifs sur des tests de criblage à haut débit.²⁴² Métaboliquement, les catéchols sont également la cible de divers enzymes du métabolisme de phase II telles que les catéchol-*O*-méthyl transférases (COMT) pouvant conduire à leur élimination rapide.²⁴⁹

Ces incertitudes concernant la stabilité physico-chimique et métabolique des composés catéchol nous ont donc poussé à sélectionner un fragment plus « sûr » malgré les données prometteuses sur les séries précédentes, notamment benzisoxazole.

De par ces premiers résultats sur les tests *in vitro*, le motif antioxydant de préférence choisi a été le motif isovanilline car celui-ci semblait être le meilleur compromis entre facilité synthétique, stabilité métabolique et physico-chimique, bonne affinité envers le récepteur 5-HT₄ et capacité antioxydante *in vitro* et *in cellulo*.

3. Préparation des fragments pipéridine-méthyl-isovanilline

Afin d'obtenir une synthèse de composés assez linéaire, deux premiers fragments ont été synthétisés dans le but de réaliser par la suite un simple couplage avec les différents motifs hétéroaromatiques sélectionnés.

²⁴⁹ Bonifácio, M. J. *et al.* Catechol-*O*-methyltransferase and Its Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Drug Rev.* **2007**, *13* (3), 352–379.

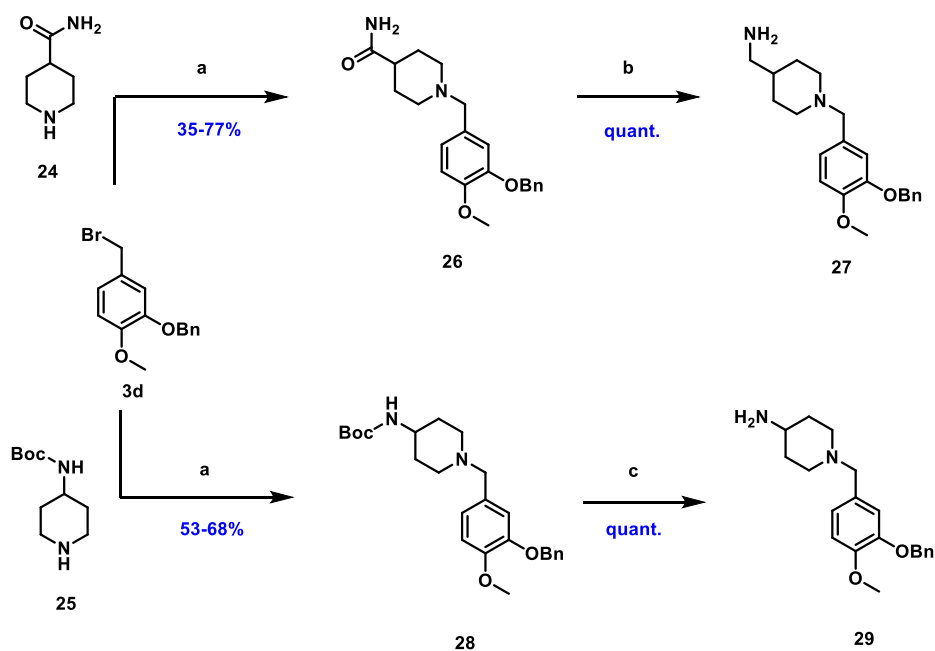
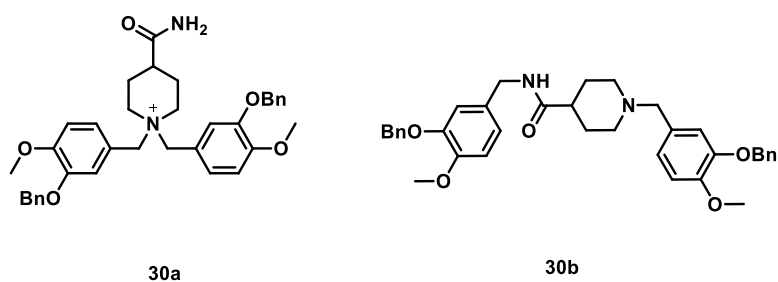


Schéma 15 - Synthèse des fragments proximaux de la molécule. Réactifs et conditions : (a) K_2CO_3 , ACN, 4 h à 16 h, ta; (b) $LiAlH_4$, THF anhydre, 3 h, à reflux; (c) TFA, DCM, 3 h, ta.

Afin d'étudier l'implication de la longueur de chaîne entre la tête hétérocyclique et la pipéridine basique, deux grands fragments proximaux ont été synthétisés : un premier fragment amine-méthyl pipéridine **27** et un second amino-pipéridine **29**. Dans les deux cas, une première étape de substitution nucléophile sur l'azote de la pipéridine a été réalisée en présence de K_2CO_3 pour neutraliser l'HBr formé au cours de la réaction. Cela a permis l'obtention des composés d'intérêt après purification par chromatographie flash avec des rendements de 35 à 77% pour **26** et 53 à 68% pour **28**. Les rendements, plutôt moyens de cette première réaction, s'expliquent par la présence de certaines impuretés identifiées.

En effet, le bromobenzyle **3d**, initialement présent à 1,2 équivalents (ou éq.) semble conduire à des réactions de di-substitution de l'azote de la pipéridine. Les conditions de réaction ont alors été optimisées, par la dilution (passage d'une solution de 30 mL/mmol à 90 mL/mmol) et en réduisant à 1,05 éq. la proportion de **3d**. Cela a permis de réduire la formation de ces produits de disubstitution **30a** et **30b** observés et représentés dans la Figure 62. Des produits de disubstitution de la pipéridine avaient déjà été observés dans la synthèse des composés présentés dans l'article 1 et 2 lorsque l'on faisait réagir certains bromures de benzyle sur l'azote de la pipéridine.

Figure 62 - Structure des produits secondaire à l'étapes de S_N des pipéridines

La charge positive du composé **30a** a permis sa détection assez facilement grâce aux techniques de LC-MS. Pour le composé **30b**, des analyses RMN 2D ont été réalisées permettant l'élucidation de la structure.

Une fois les pipéridines substituées obtenues, et dans le but de réaliser des couplages avec des acides carboxyliques par la suite, une deuxième étape a été réalisée afin d'obtenir les amines libres correspondantes à ces composés.

Le carboxamide **26** a donc été réduit en amine **27** grâce au LiAlH_4 sous atmosphère inerte. La solution a ensuite été traitée selon la méthode de Fieser permettant la précipitation des sels de lithium et d'aluminium. Cette méthode stipule que pour x g de LiAlH_4 , à 0°C , x mL d' H_2O sont ajoutés goutte à goutte. Par la suite x mL de solution à 15% de NaOH sont ajoutés, et enfin 3x mL d' H_2O . La réaction est alors agitée à température ambiante pendant 30 min, séchée avec un peu de MgSO_4 , puis les différents sels sont filtrés et le produit final de la réaction est récupéré pur en solution. L'amine ainsi obtenue est généralement utilisée telle quelle dans les réactions de couplage par la suite.

Le composé *N*-Boc pipéridine **28**, est déprotégé par réaction avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante avec un rendement quantitatif afin d'obtenir la seconde amine libre **29**.

4. Conditions de purifications des composés finaux

Tous les composés possédant une amine aliphatique telle que la pipéridine ont été purifiés sur colonne chromatographique en présence d'ammoniaque à hauteur de 10% dans le méthanol. L'azote basique est facilement protoné et peut alors interagir avec la silice rendant l'élution de ces composés plus compliquée lors de la purification. Cela se confirme en chromatographie sur couche mince. En absence d'ammoniaque, les produits forment une tache diffuse sur la plaque. Avec l'ammoniaque les tâches de produits sont bien mieux définies. De plus, la dernière étape consiste le plus souvent en une déprotection en milieu acide conduisant à la formation de sels d'HBr. La purification avec l'ammoniaque permet alors de former la base libre sans passer par un lavage basique.

5. Nouveaux hétérocycles aromatiques agonistes 5-HT₄R

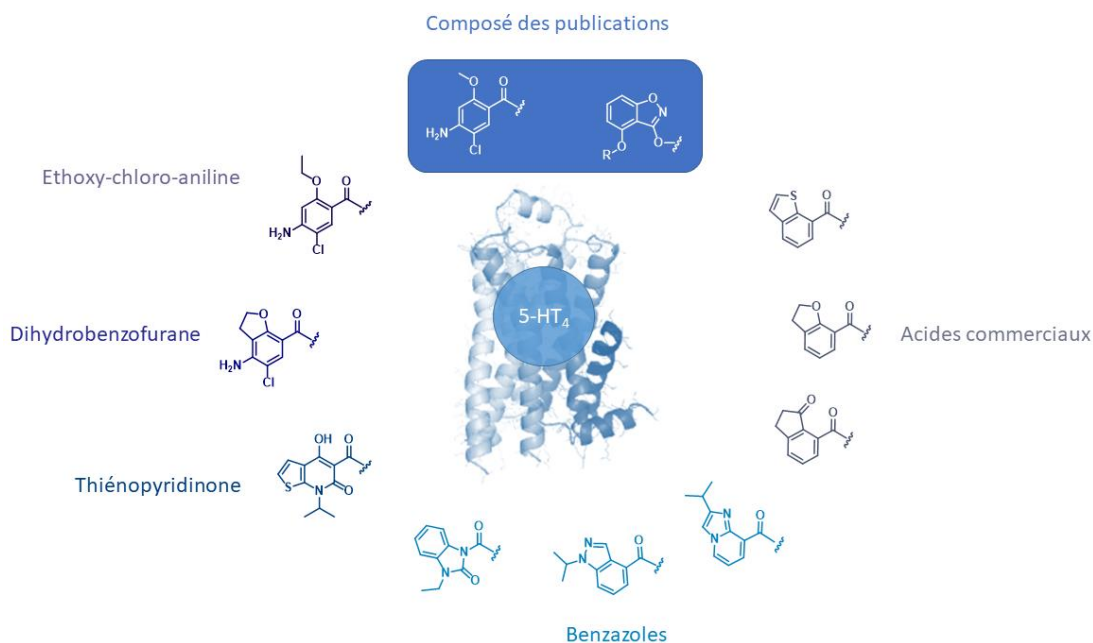


Figure 63 - Récapitulatif des têtes hétérocycliques pour la conception de ligands 5-HT₄R.

Une fois le motif antioxydant sélectionné, le projet s'est donc tourné vers la recherche de nouveaux hétérocycles aromatiques permettant une bonne affinité et un profil agoniste partiel envers le récepteur 5-HT₄. En s'inspirant des différents composés que l'on retrouve dans la littérature (voir chapitre sur les ligands du récepteur 5-HT₄) plusieurs de ces hétérocycles ont été sélectionnés (Figure 63). Ces motifs chimiques ont été liés à la partie proximale de la molécule contenant le motif isovanilline grâce à des réactions de couplage peptidique dans un premier temps.

La liaison amide est un linker assez développé dans les ligands du récepteur 5-HT₄. Il n'influe pas négativement sur la liaison du composé envers sa cible. Ces réactions de couplages peptidiques sont des réactions qui sont bien décrites dans la littérature. Il existe différents agents de couplage comme par exemple (Figure 64) :

- Les carbodiimides tel que l'EDCI (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), le CDI (carbonyldiimidazole) ou encore le DCC (dicyclohexylcarbodiimide). Ils sont souvent utilisés avec un triazole tel que l'HOBT (1-hydroxy-benzotriazole) permettant d'éviter la racémisation de l'acide carboxylique activé ;
- Les sels d'aminium/urinium tel que le HATU (hexafluorophosphate azabenzotriazole tétraméthyle uronium);

Chapitre 3 : Travaux personnels

- Des phosphates tels que le BOP (benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate), ou le byBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate). On retrouve également dans cette section le FDPP (pentafluorophenyl diphenylphosphinate) ;
- Le T3P (anhydride d'acide Propanephosphonique) peut aussi être utilisé.

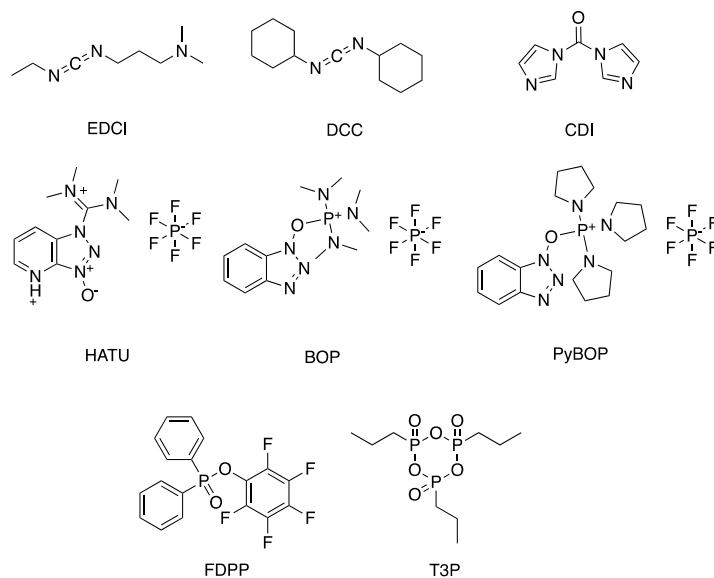


Figure 64 - Agents de couplage peptidique.

Ces agents de couplage vont permettre d'activer l'acide en lui greffant un bon groupement partant, permettant à l'amine nucléophile d'attaquer plus aisément. De nombreuses revues existent dans la littérature, montrant la diversité de réactifs possibles.^{250–252}

a. Conception et synthèse des nouveaux composés

i. Série éthoxy-chloro-aniline

Cette première série a été inspirée par le motif chimique hétérocyclique que l'on retrouve dans la structure du mosapride (présenté brièvement dans la [Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review \(2014-present\)](#)). Le mosapride est un agoniste des récepteurs 5-HT₄ sur le marché, utilisé dans les problèmes gastro-intestinaux tels que les reflux gastro-

²⁵⁰ El-Faham, A. *et al.* Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602.

²⁵¹ Montalbetti, C. A. G. N. *et al.* Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.

²⁵² Valeur, E. *et al.* Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631.

oesophagiens et la dyspepsie fonctionnelle. Il a l'avantage d'être dénué d'effet indésirable cardiaque.²⁵³

La synthèse de ces composés a été réalisée grâce à une première étape de couplage entre l'acide 4-amino-5-chloro-2-éthoxybenzoïque et les deux fragments proximaux **27** et **29**. Les deux composés ont été obtenus grâce à l'utilisation des agents de couplage EDCI, HOBt, avec de bons rendements de 96 et 89% pour **32** et **33** respectivement. Une dernière étape de déprotection du phénol-benzylé a été réalisée à l'aide d'HBr à 33% dans l'acide acétique solubilisé dans le DCM et agité pendant 3 à 4h. Afin d'éviter le clivage de l'éther éthoxy, ces réactions ont été réalisées à 0°C. Les deux mélanges réactionnels ont ensuite été évaporés à l'évaporateur rotatif et directement purifiés en colonne chromatographique flash en présence d'ammoniaque afin d'obtenir les deux produits finaux. Le composé **32a** a été obtenu directement avec un rendement de 80%. Concernant le composé **33a**, des traces d'acide acétique ont été décelées dans le produit après la colonne chromatographique. Ce composé a donc été extrait avec de l'acétate d'éthyle (EtOAc) et rincé rapidement avec une solution aqueuse froide de NaHCO₃. Après évaporation de la phase organique, le produit final **33a** a été obtenu avec un rendement global de 66% (Schéma 16).

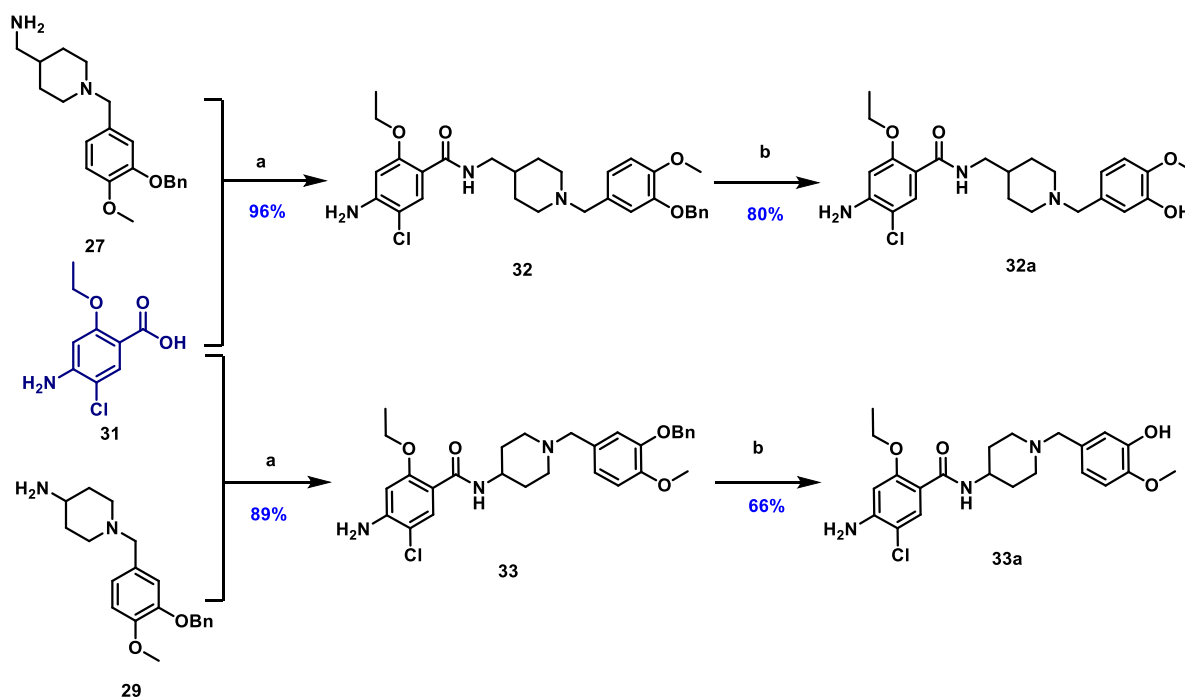


Schéma 16 - Synthèse de la série éthoxy-chloro-aniline; Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBt, THF, 16 h, ta; (b) HBr à 33% dans l'acide acétique, DCM, 0°C, 3 h.

²⁵³ Tack, J. *et al.* Systematic Review: Cardiovascular Safety Profile of 5-HT₄ Agonists Developed for Gastrointestinal Disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, 35 (7), 745–767.

Les composés benzylés et débenzylés ont été ajoutés à la chimiothèque du laboratoire et ont été envoyés en test afin d'étudier leur affinité envers les récepteurs 5-HT₄ et leurs capacités antioxydantes. Ces résultats seront présentés dans le paragraphe : résultats obtenus sur ces nouvelles séries.

ii. Série amino-chloro-dihydro-benzofurane

Le prucalopride est un agoniste des récepteurs 5-HT₄ utilisé également dans le traitement des troubles gastro-intestinaux (il est présenté brièvement dans la Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present)). Il possède un motif chimique hétérocyclique proche du mosapride ou du donécopride, de par la présence de son atome de chlore en para de l'oxygène alkylé, et de la fonction amine en para de la liaison amide.

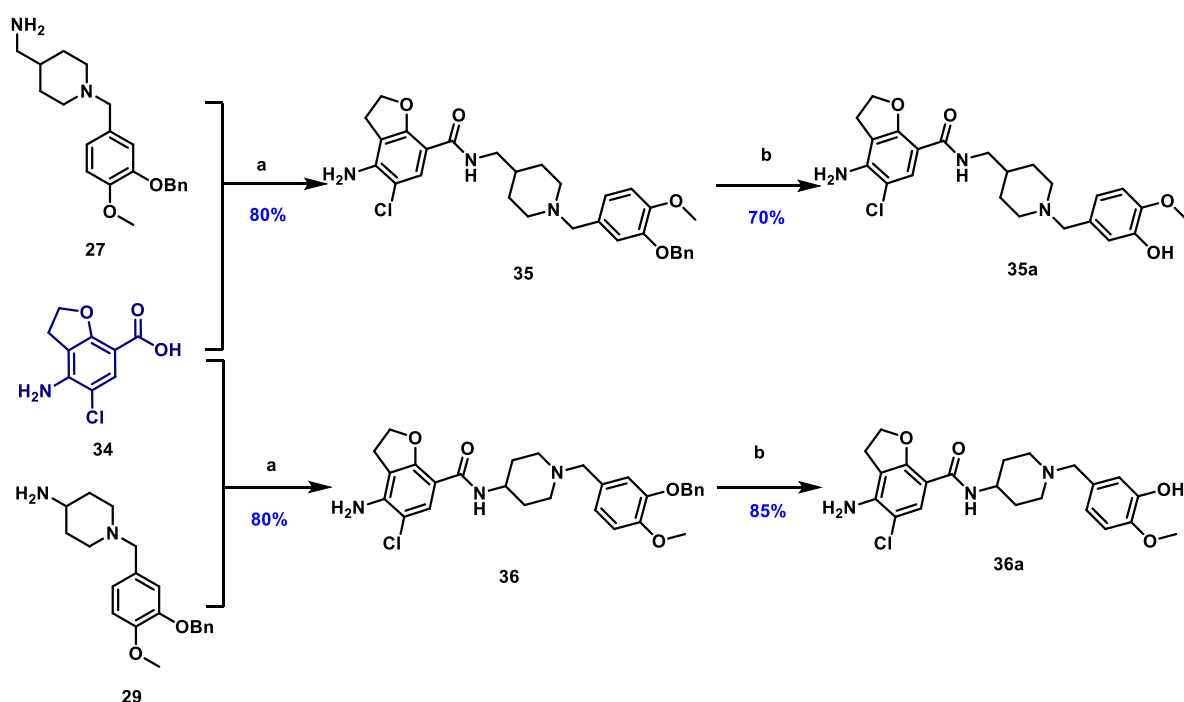


Schéma 17 - Synthèse de la série amino-chloro-dihydrobenzofurane; Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBT, THF, 16 h, ta; (b) HBr à 33% dans l'acide acétique, DCM, 0°C, 2-4 h.

Ces composés ont été synthétisés de la même manière que les composés précédemment décrits. La première étape consiste en un couplage de l'acide 4-amino-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxylique **34** commercial grâce à l'EDCI et l'HOBT avec les deux fragments proximaux **27** et **29**. Ces couplages ont permis l'obtention des deux premiers composés finaux benzylés avec un rendement de 80% pour les deux composés **35** et **36**. Ceux-ci ont ensuite été déprotégés de leur fonction benzyle par une déprotection à l'HBr 33% dans l'AcOH solubilisé dans le DCM à 0°C. Ils ont été purifiés directement après évaporation du milieu réactionnel, par chromatographie flash sur silice en présence d'ammoniaque pour obtenir les composés **35a** et **36a** avec des rendements de 70% et 85% respectivement.

iii. Hydroxyl-isopropyl-thiéno-pyridinone

Le composé PRX-0314 (voir Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present)) est un composé développé par Epix Pharmaceutical en tant qu'agoniste partiel des récepteurs 5-HT₄ et activateur d' α -sécrétase. Le noyau hydroxy-isopropyl-thiéno-pyridinone a donc été sélectionné afin de lier le récepteur 5-HT₄.

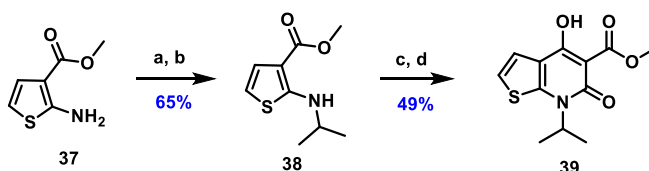


Schéma 18 - Synthèse de la tête hétérocyclique thiéno-pyridinone; Réactifs et conditions : (a) diméthoxypropane, AcOH, TFA (cat), DCM, -15°C à ta, 48 h, (b) NaBH(OAc)₃, DCM, ta, 1 h; (c) chlorure d'éthyle malonyle, TEA, DCM, ta; (d) MeOH, Na, reflux.

Ce noyau thiéno-pyridinone a été synthétisé après adaptation des protocoles initiaux publiés dans le brevet US20050256153 par Dhanoa *et al.*²⁵⁴ La première étape de cette synthèse est une amination réductrice entre l'amine **37** et l'acétone formée en milieu acide à partir du diméthoxypropane, permettant l'obtention du composé 2-(isopropylamino)thiophène-3-carboxylate de méthyle **38**.

Optimisation de l'étape d'amination réductrice.

Lors de la première synthèse du composé **38** à partir de 100 mg d'ester **37** commercial, le rendement après purification fut de 60%. Mais lors de la montée en échelle à 1g, ce rendement n'était plus que de 17%. La réaction initiale ne présentait alors que le produit majoritaire **38** en suivi CCM et LCMS alors que, lors de la seconde réaction, de nombreux produits secondaires ont été observés. L'analyse des masses en LCMS et la purification permettant l'isolement de certains de ces composés, ont alors permis l'identification des composés secondaires représentés dans la Figure 65.

²⁵⁴ Dhanoa, D *et al.* Thienopyridinone Compounds and Methods of Treatment. US20060079547A1, April 13, 2006.

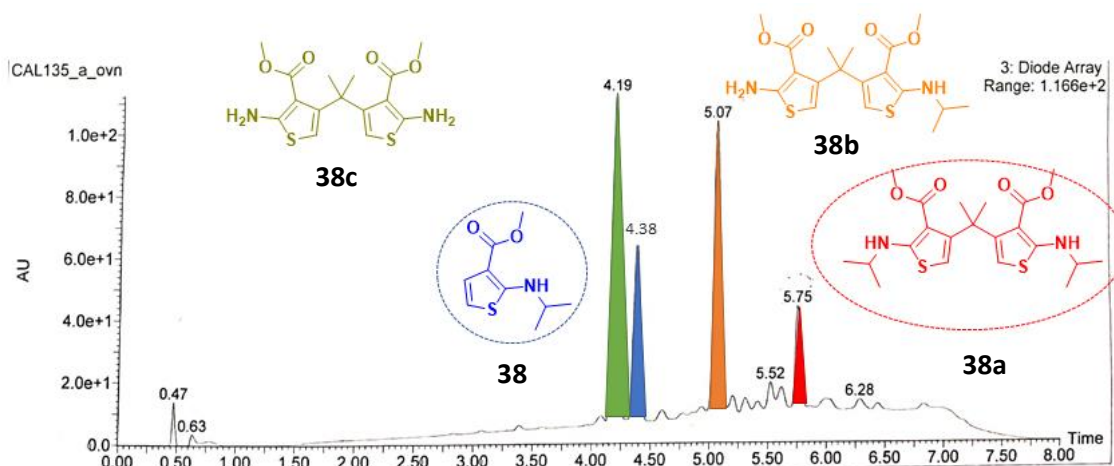


Figure 65 - Spectre LC-MS de l'amination réductrice; espèces encadrées : composés isolés et dont la structure a été confirmée par analyse RMN.

Tous les produits secondaires majoritaires semblent être des produits de dimérisation obtenus à cause d'une réaction avec l'excès de diméthoxypropane. La quantité de réactif a donc été limitée à 1.5 éq. puis 1 éq. dans les deux tests suivants. Malheureusement, bien que ces produits de dimérisation se soient moins formés d'après le suivi LC-MS, la réaction n'était toujours pas propre. La température de réaction a donc été baissée à -15°C afin de réduire l'apport énergétique et a été maintenue à cette température pendant 3 h, puis laissée remonter doucement à température ambiante. Nous avons alors observé une diminution drastique dans la formation des espèces secondaires rouge **38a** et orange **38b**. Un autre essai a été effectué en diluant d'un facteur dix la réaction. Cela nous a alors permis d'éviter la formation de l'espèce verte **38c**. Cependant, bien que relativement propre (sans produits secondaires de dimérisation), dans ces conditions, la réaction est très lente et le réactif limitant **37** n'est jamais totalement consommé. Cependant, celui-ci peut être récupéré après colonne chromatographique sur silice nous permettant alors de relancer la réaction si besoin est. La structure des composés vert **38c** et orange **38b** ne sont que des prédictions basées sur le poids moléculaire obtenus par la LC-MS. En effet, ceux-ci n'ont pas été isolés après colonne chromatographique et n'ont donc pas pu être formellement identifiés par RMN.

Synthèse des composés finaux

Après cette première étape d'amination réductrice, le cycle thiéno-pyridine est obtenu après une première étape d'addition du chlorure d'éthyle malonylé puis d'une cyclisation intramoléculaire permettant la formation de cette pyridinone suivie d'une trans-estérification afin d'obtenir l'ester méthylique **39** plutôt qu'éthylique avec un rendement de 49% (Schéma 18).

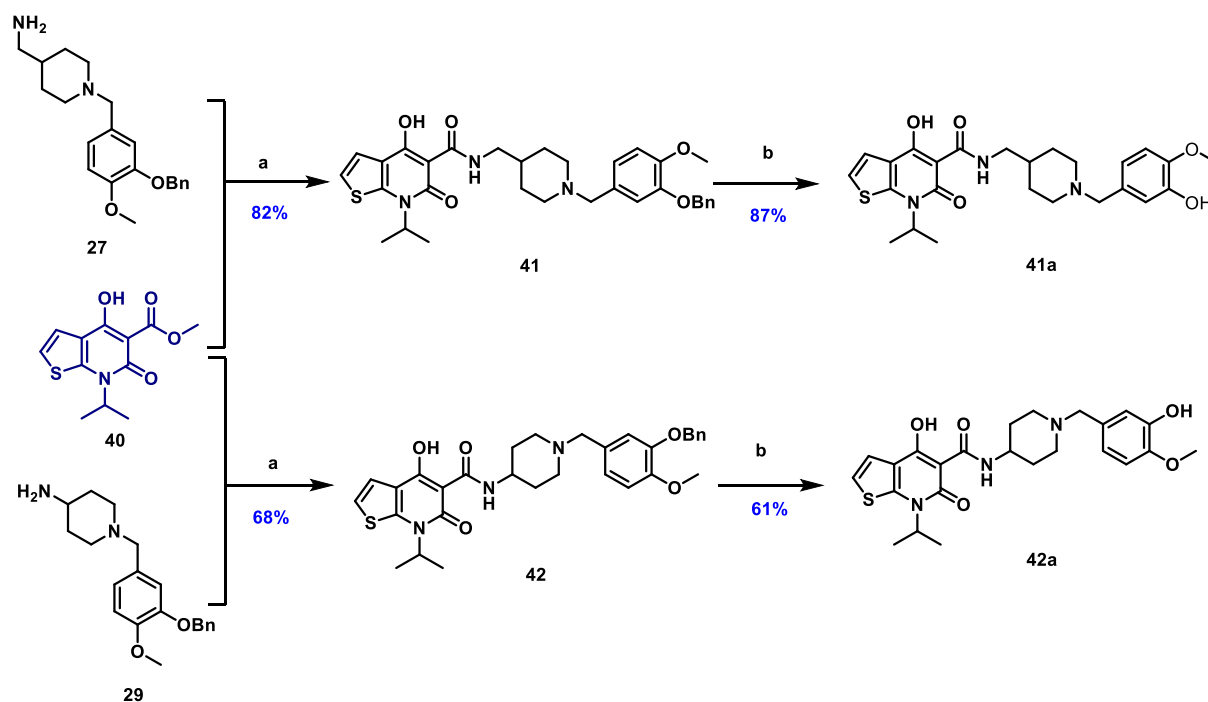


Schéma 19 - Synthèse des composés finaux thiéno-pyridine; Réactifs et conditions : (a) DIPEA, Xylène, 120°C, 48 h (b) HBr à 33% dans l'AcOH, DCM, 0°C .

L'avant dernière étape de synthèse des composés finaux, comme présentés sur le Schéma 19 a consisté en un couplage direct entre l'ester commercial **40** et l'amine permis grâce à la DIPEA solubilisée dans du xylène à 110°C pendant 48 h en suivant les conditions publiées dans le brevet initial avec des rendements de 82% et 68% pour les composés **41** et **42** respectivement. La déprotection des benzyles a été réalisée sous HBr à 33% dans l'acide acétique comme les séries précédentes permettant d'obtenir les composés finaux **41a** et **42a** avec des rendements de 87% et 61% sur cette dernière étape.

iv. Les benzazoles

Dans cette partie seront détaillées les conceptions et synthèses des composés de type benzazole. Ces motifs hétérocycliques sont des bioisostères structurellement proches du noyau indole de la sérotonine.

Benzimidazolinone

Cette série benzimidazolinone est inspirée par des composés reconnus comme de puissants agonistes du récepteur 5-HT₄ tels que les composés BIMU-1 et 8 (Revue 1: Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present)). L'acide étant non disponible commercialement, la synthèse a été effectuée à partir de l'1-éthyl-2-benzimidazolinone **43** commerciale.

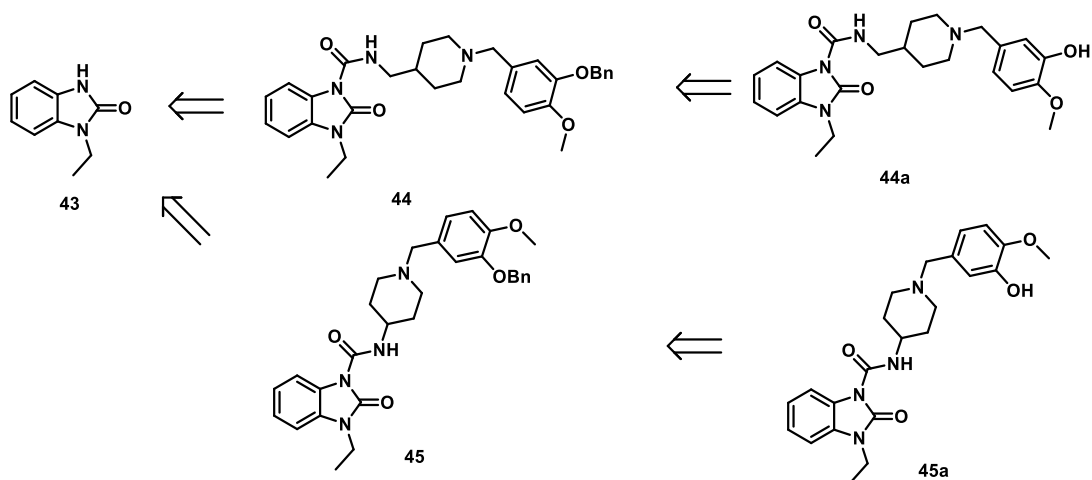


Schéma 20 - Approche retro synthétique initialement envisagée.

La stratégie initiale afin de synthétiser ces composés était la formation d'une espèce carbonylée grâce tout d'abord aux espèces issues d'un couplage au moyen du phosphore avec les amines désirées pour obtenir les composés **44** et **45** qui seraient ensuite précurseurs de **44a** et **45a** (Schéma 20).

Dans un premier essai, la benzimidazolone a donc été déprotonée en présence d'une base forte, le NaH. Puis après 15min, le triphosgène (0,5 éq.) a été ajouté en même temps que l'amine **29** ainsi qu'une base, la TEA. Le tout a été agité pendant 16 h à ta. Dans cette première réaction, le triphosgène a malheureusement réagi préférentiellement sur l'amine **29** afin de former le composé carbonylé de l'amine **46** (Figure 66) qui n'a ensuite pas réagi avec la benzimidazolone **43**.

Un second essai a donc été réalisé en ajoutant le triphosgène à la benzimidazolone déprotonnée par le NaH dès le départ. L'amine **29** a ensuite été ajoutée au milieu réactionnel après une agitation de 15 min. Cependant, le produit majoritaire de cette réaction s'est avéré être le conjugué **47**. Celui-ci semble être le produit de réaction entre une benzimidazolone carbonylée grâce au triphosgène réagissant sur une benzimidazolone et non sur l'amine libre **29**.

Le triphosgène semblant trop réactif, l'utilisation de diphosgène a alors été envisagée selon le protocole décrit par McKinnell *et al.*¹³⁷ Malheureusement cet essai s'est soldé par l'obtention d'un mélange complexe avec peu de traces de produit final d'après le suivi par LC-MS.

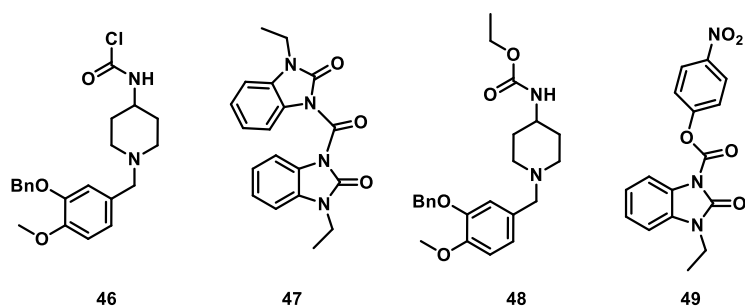


Figure 66 - Structure des produits secondaires et intermédiaires desynthèse dans série benzimidazolinone.

Dans le même temps, une autre stratégie a donc été mise en place, la formation du carbamate **50** grâce à une déprotonation de la benzimidazolinone par le NaH suivie d'une substitution nucléophile sur le chloroformate d'éthyle avec un rendement de 81%. Un couplage a été tenté entre le carbamate **50** et l'amine **27** en solution dans le toluène à 110°C pendant 16 h, comme cela avait été effectué sur la série thiénopyridinone (Schéma 19). Un phénomène de trans-carbomoylation a alors été observé et la benzimidazolinone **43** a été récupérée après purification ainsi que le produit secondaire **48**. La benzimidazolinone semble alors être un bon groupement partant ce qui pourrait expliquer les difficultés réactionnelles rencontrées dans cette série.

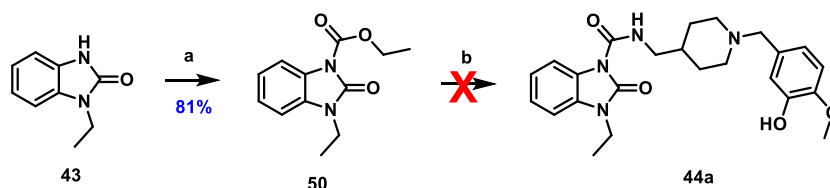


Schéma 21 – Deuxième stratégie d'obtention des dérivés benzimidazolinone; Réactifs et conditions : (a) chloroformate d'éthyle, NaH, THF, 3 h (b) HBr à 33% dans l'AcOH, DCM, 0°C.

Après analyse de la littérature une nouvelle stratégie a été envisagée suite à la lecture de la publication de Brodney *et al.*¹³⁶ L'utilisation de chloroformate de nitrophényle permettrait l'obtention de l'espèce intermédiaire **49** activée. Les premières tentatives n'ont malheureusement pas abouti à l'obtention du composé. Les différentes matières premières ont été analysées par RMN et ont montré la dégradation du chloroformate de nitrophényl en nitrophénol. Un nouveau lot de réactif a donc été commandé par la suite.

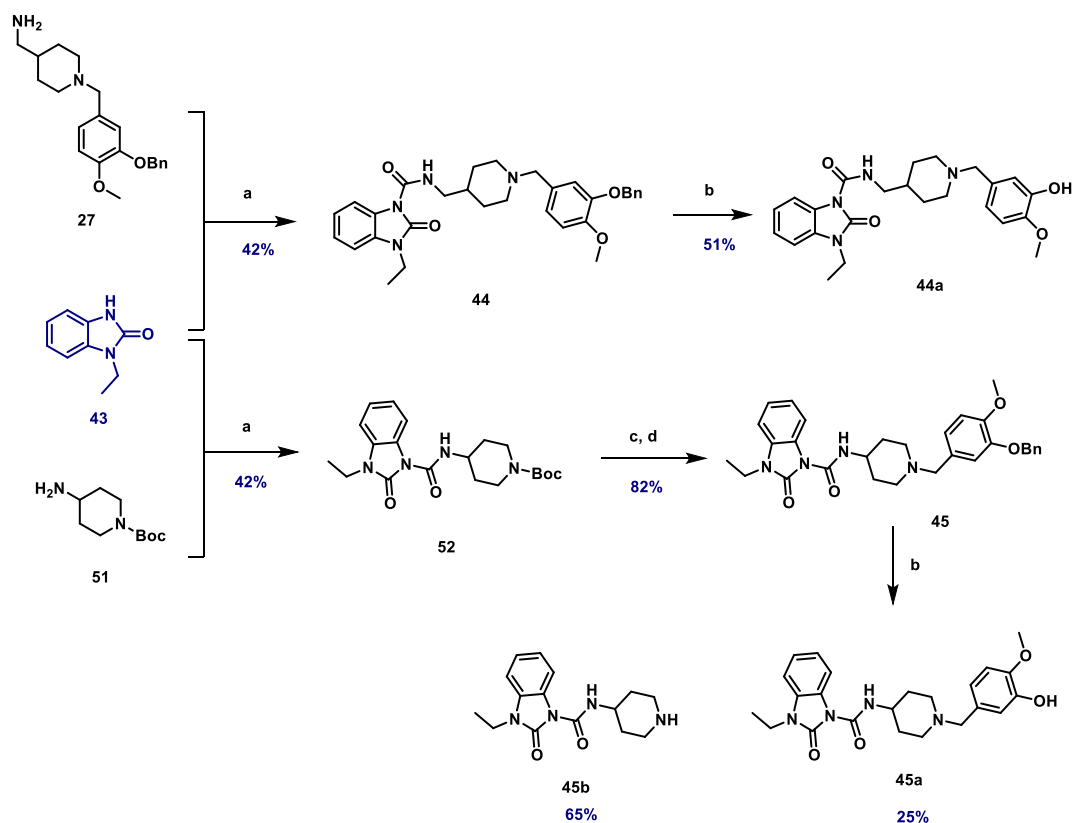


Schéma 22 - Synthèses des composés benzimidazolone; Réactifs et condition : (a) NaH, chloroformate de nitrophényle, THF, 0°C à ta, 16 h; (b) H₂, Pd/C, MeOH, ta, 18 h; (c) TFA, DCM, ta, 2 h; (d) K₂CO₃, composé **3d**, acétone, ta, 18 h.

Ce nouveau lot de chloroformate de nitrophényle a permis d'obtenir le composé **44** en one-pot avec un rendement de 42%. Une hydrogénolyse sur palladium sur charbon a alors été réalisée sur ce composé pour obtenir le produit final débénylé **44a** avec un rendement de 51% (Schéma 22).

La synthèse du composé **52** a été réalisée avec un rendement de 42% par la même méthode que précédemment avec l'amine commerciale **51**. Une déprotection du groupement Boc a ensuite été réalisée grâce au TFA, suivie d'une étape de substitution nucléophile avec l'intermédiaire bromo-benzyl-isovanilline **3d** pour obtenir le composé **45** avec un rendement de 82%. Enfin une dernière étape d'hydrogénolyse sur palladium sur charbon a été utilisée pour obtenir composé phénolique **45a** avec un rendement de 25%. En effet, après l'étape d'hydrogénolyse, le produit majoritaire, après purification sur colonne chromatographique, a été le composé **45b** avec un rendement de 65% (Schéma 22). Une déprotection avec de l'HBr à 33% dans l'acide acétique pourrait potentiellement augmenter ce rendement si ce composé devrait être synthétisé à nouveau.

Série Indazole

Les séries de composés possédant un indazole ont été largement décrites dans les brevets et publications de Nirogi *et al.* comme étant des composés agonistes des récepteurs 5-HT₄.^{134,135}

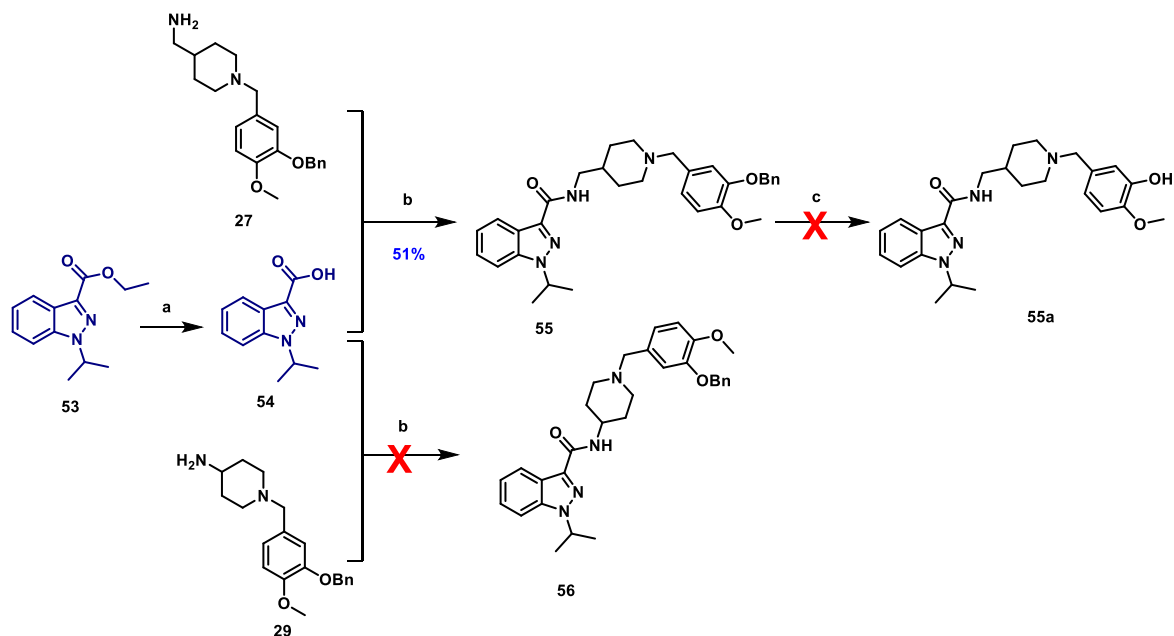


Schéma 23 - Synthèse des composés finaux indazoles; Réactifs et conditions : (a) NaOH 15% dans H₂O, THF, 2 h, ta (b) EDCI, HOBT, THF, 16 h, ta; (c) H₂, Pd/C, MeOH, 3 h

L'ajout de ce fragment en tant que tête hétérocyclique a donc été étudié. L'acide carboxylique **54** a été obtenu après saponification de l'ester **53** disponible au laboratoire avec un rendement quantitatif, puis celui-ci a été couplé au fragment **27** avec la méthode habituelle décrite plus haut. Le composé final benzylé **55** a ainsi été obtenu avec un rendement de 51%. Un test de déprotection par hydrogénolyse de ce composé avec du palladium sur charbon a été réalisé. Malheureusement l'hydrogénolyse a fragmenté le composé, le composé final **55a** n'a donc pas pu être obtenu.

Lors du couplage de l'acide avec l'amine **29**, le composé final **56** n'a pas été obtenu non plus. En effet, l'amine **29** est obtenue après déprotection par le TFA. Suite à cette étape l'amine est en solution dans le DCM avec le TFA et est généralement évaporée longuement à l'évaporateur rotatif afin de se débarrasser au maximum de cet acide. La réaction suivante se déroulant en présence d'un excès de TEA, cela suffit généralement à éviter les réactions secondaires avec les traces de TFA. Cependant lors de cette réaction, le composé **29a** a été obtenu et isolé pur en petite quantité après purification en chromatographie flash. Celui-ci ayant un temps de rétention très proche du composé final souhaité, leur séparation n'a pas été possible et ce malgré plusieurs tentatives. La purification du fragment

amine **29** après sa déprotection par le TFA dans des conditions basiques permettrait de régler ce problème. Par manque de temps et de réactifs, cette série n'a donc pas pu être finalisée à ce jour.

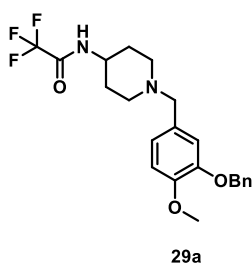


Figure 67 - Produit secondaire lié au TFA.

Imidazo-pyridine

La série imidazo-pyridine a été décrite initialement par Nirogi *et al.*, comme comprenant des composés agonistes des récepteurs 5-HT₄ avec une puissante affinité (IC₅₀ <10 nM).¹³⁴

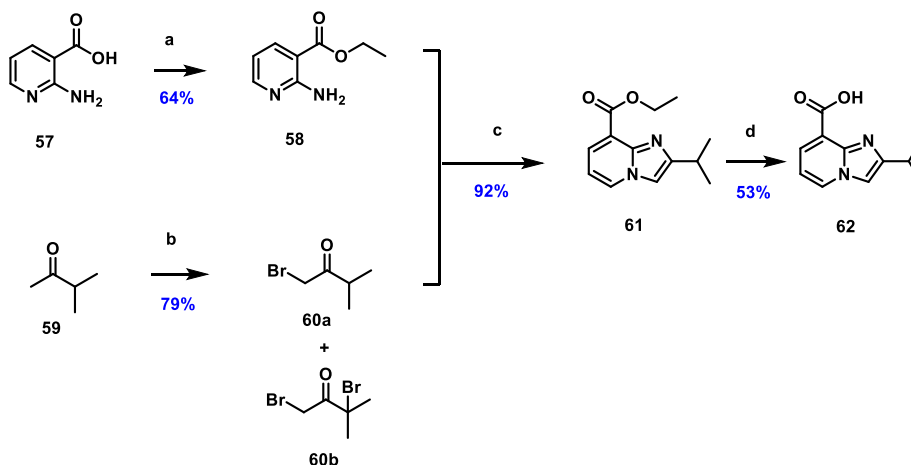


Schéma 24 – Schéma de synthèse de la tête hétérocyclique imidazo pyridine. Réactifs et conditions : (a) H₂SO₄, EtOH, 48 h, reflux ; (b) Br₂, MeOH, 4 h, -15°C ; (c) EtOH, 2 h, reflux ; (d) NaOH 15% dans H₂O, THF, 2 h, ta.

Ces composés ont donc été synthétisés en s'inspirant des procédures décrites dans cette publication. La première étape consiste en l'estérification de l'acide 2-amino nicotinique **57** afin d'obtenir l'ester **58** avec un rendement de 64%. Dans un deuxième temps, la 1-bromo-3-méthylbutan-2-one **60a** a été synthétisée à partir de la 3-méthylbutan-2-one **59** et du dibrome. Lors de cette réaction un produit secondaire **60b** peut être amené à se former. Afin de réduire sa formation au minimum la réaction a été maintenue à -15°C pendant 4 h jusqu'à décoloration totale de celle-ci, témoin de la consommation du dibrome. Ces composés n'étant pas séparables par chromatographie, le mélange (90/10 de **60a/60b**) a été utilisé tel quel dans la deuxième étape de formation du cycle. La cyclisation se réalise facilement dans l'EtOH à reflux pendant 2 h. Le cycle **61** a ainsi été obtenu après purification par colonne chromatographique avec un rendement de 92%. Une dernière étape de saponification a

alors été réalisée avec un rendement de 53% afin d'obtenir l'acide carboxylique **65** permettant le couplage.

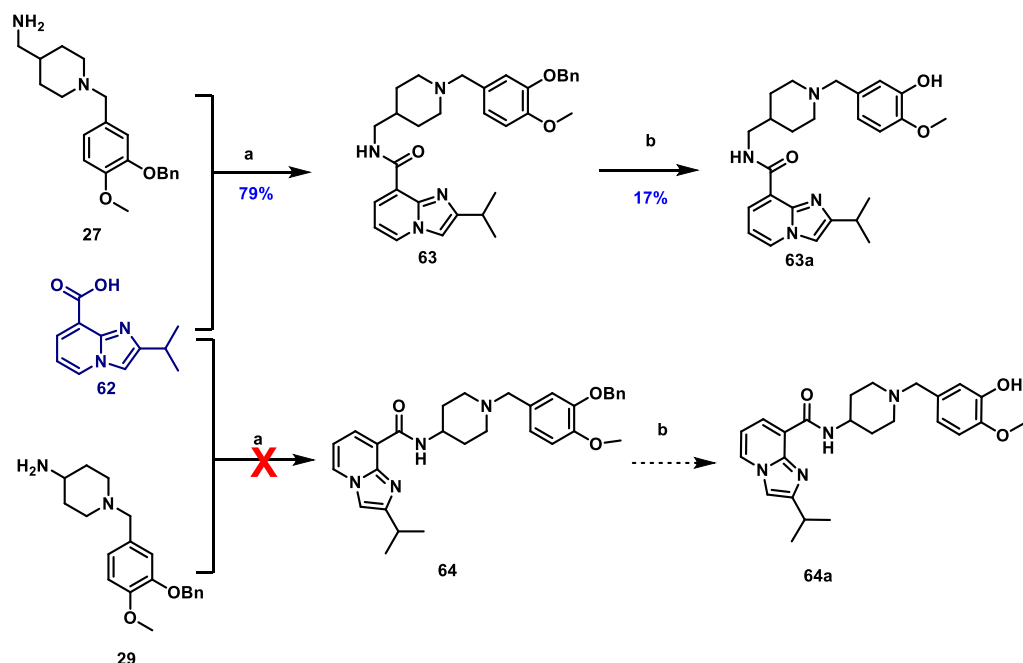


Schéma 25 – Synthèses des composés finaux de la série imadazo pyridine : Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBT, THF, 16 h, ta; (b) HBr à 33% dans l'acide acétique, DCM, 0°C, 3h.

Le premier couplage avec l'amine **27** a alors permis l'obtention du composé final benzylé **63** avec un rendement de 79%. Celui-ci a été déprotégé de son benzyle par l'HBr à 33% dans l'acide acétique, permettant l'obtention du composé final **63a** avec un rendement de 17%. Ce faible rendement est dû à l'étape de purification, le produit s'étant vraisemblablement dégradé sur la colonne chromatographique.

Le deuxième couplage avec l'amine **29** a malheureusement rencontré exactement le même problème de sous-produit dérivé du TFA tel que décrit dans le paragraphe précédent. Par manque de temps cette série n'a donc pas pu être synthétisée.

v. Acides commerciaux

Afin d'élargir les relations structure-activités des composés, certains motifs hétérocycliques disponibles au laboratoire ont été couplés aux amines **27** et **29**.

Série benzo-dihydro-cétone

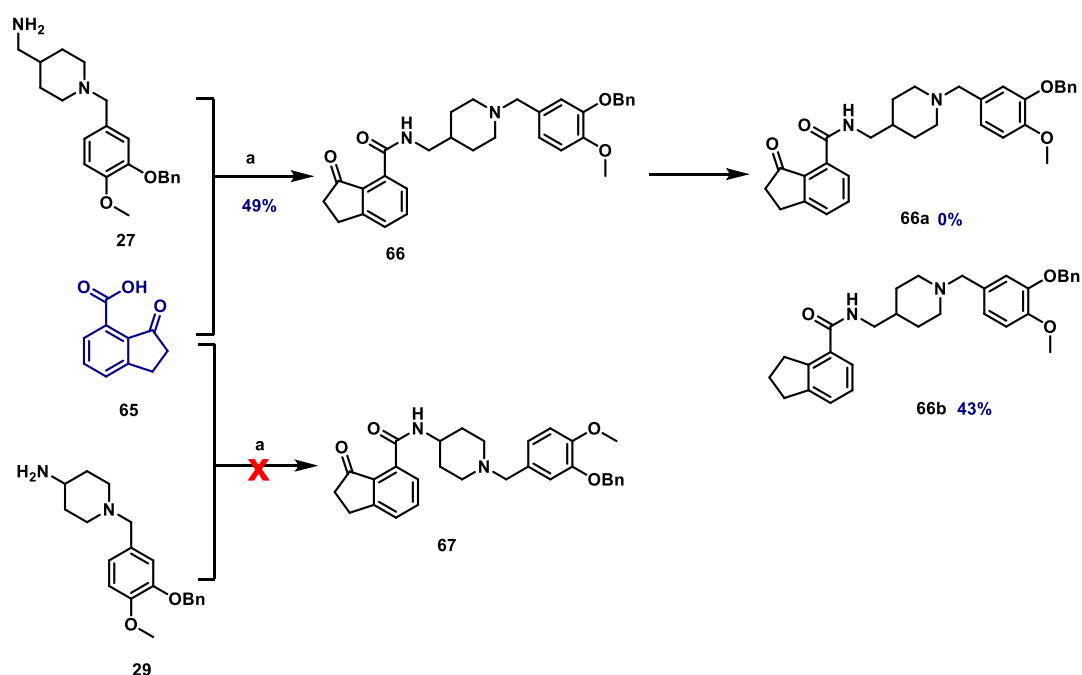


Schéma 26 - Synthèses des composés finaux de la série benzo dihydro cétone: Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBT, THF, 72 h, ta; (b) H₂, Pd/C, MeOH, 16 h, ta.

Le premier composé benzylé **66** a été obtenu après couplage de l'acide **65** à l'amine **27** avec un rendement de 49%. Ce rendement s'explique par une réactivité moindre de l'acide. En effet, des traces de ce réactif ainsi que de l'acide activé par EDCI, HOBT étaient présents sur le spectre LCMS lors de l'arrêt de la réaction. Une tentative de déprotection de ce composé a été réalisée par hydrogénolyse par palladium sur charbon. Malheureusement plutôt que d'obtenir le composé **66a**, le composé réduit **66b** a été obtenu. Le deuxième composé benzylé **67** a été dégradé lors de sa purification sur colonne chromatographique.

Série dihydrobenzofurane

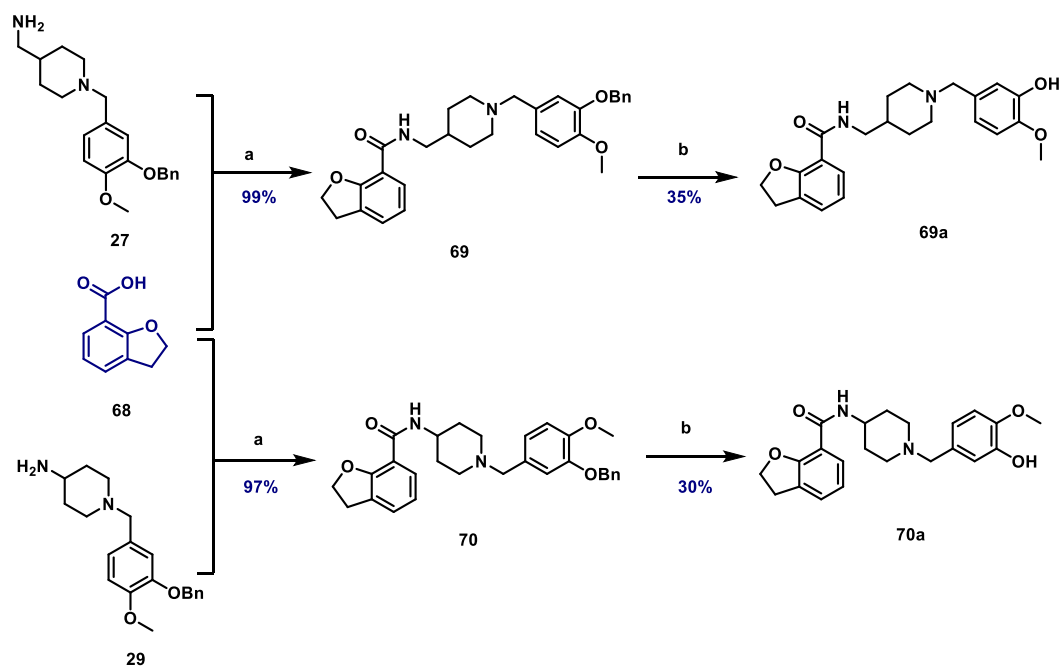


Schéma 27 - Synthèses des composés finaux de la série dihydrobenzofurane: Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBT, THF, 16 h, ta; (b) HBr à 33% dans l'acide acétique, DCM, 0°C, 3 h.

Les composés ont été synthétisés de la même manière que précédemment, les couplages grâce à l'EDCI, HOBT ont permis d'obtenir le composé **69** avec un rendement de 99% après purification et 97% pour le composé **70** (Schéma 27). Ces deux composés benzylés ont ensuite été solubilisés dans le DCM avec de l'HBr à 33% dans l'AcOH. Le composé **69a**, a alors subi un lavage basique par une solution aqueuse de NaHCO_3 . Malheureusement, une partie du produit semble s'être dégradé durant cette étape, ce qui explique un plus faible rendement de 35% après purification que sur les autres séries.

Le composé **70a** a été directement purifié sur colonne chromatographique sans passer par une étape de lavage préalable. Après purification sur colonne en présence d'ammoniaque, deux fractions de produits ont été isolées et analysées. En LCMS ces deux fractions semblaient posséder la même masse. Or, lors de l'analyse spectrale RMN, un shift des différents protons au voisinage de l'azote a été observé comme cela fut le cas avec les premiers produits phénoliques non purifiés sous ammoniaque et décrits au préalable (Figure 68). Comme on le voit sur la figure ci-dessous, les protons situés au voisinage de l'azote correspondant aux points bleu, vert et orange sont déblindés dans le cas de la forme bromhydrate par rapport aux mêmes protons du composé sous forme basique.

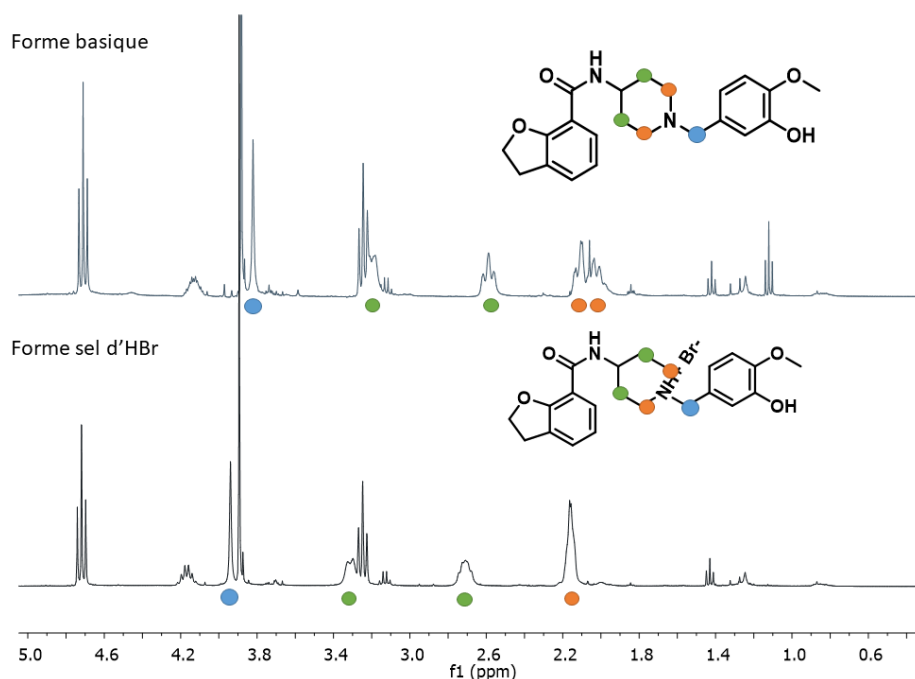


Figure 68 - spectres des deux composés **70a** isolés.

La cristallisation d'une des fractions de ce composé **70a** nous a permis d'obtenir une structure cristallographique (Figure 69). Cette analyse nous a permis de confirmer l'hypothèse de la formation d'un bromhydrate avec l'azote de la pipéridine. Cela a également mis en évidence le présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'oxygène du dihydroxyfurane et l'amine du linker amide. Le composé a été cristallisé dans le CDCl_3 en présence d'eau.

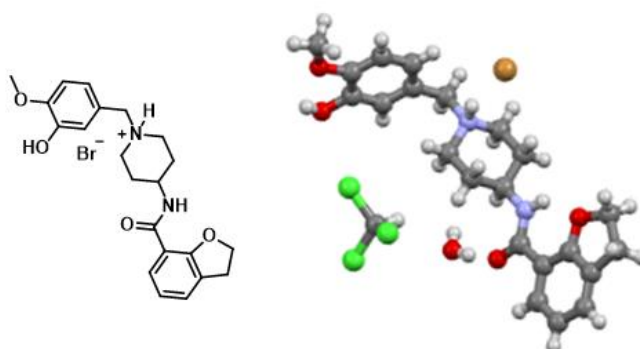


Figure 69 - Structure cristallographique du composé **70a** sous forme de bromhydrate en présence d' H_2O et de CDCl_3 ; oxygène en rouge, carbone en gris, azote en bleu, brome en marron, chlore en vert, hydrogène en blanc.

Série benzothiophène

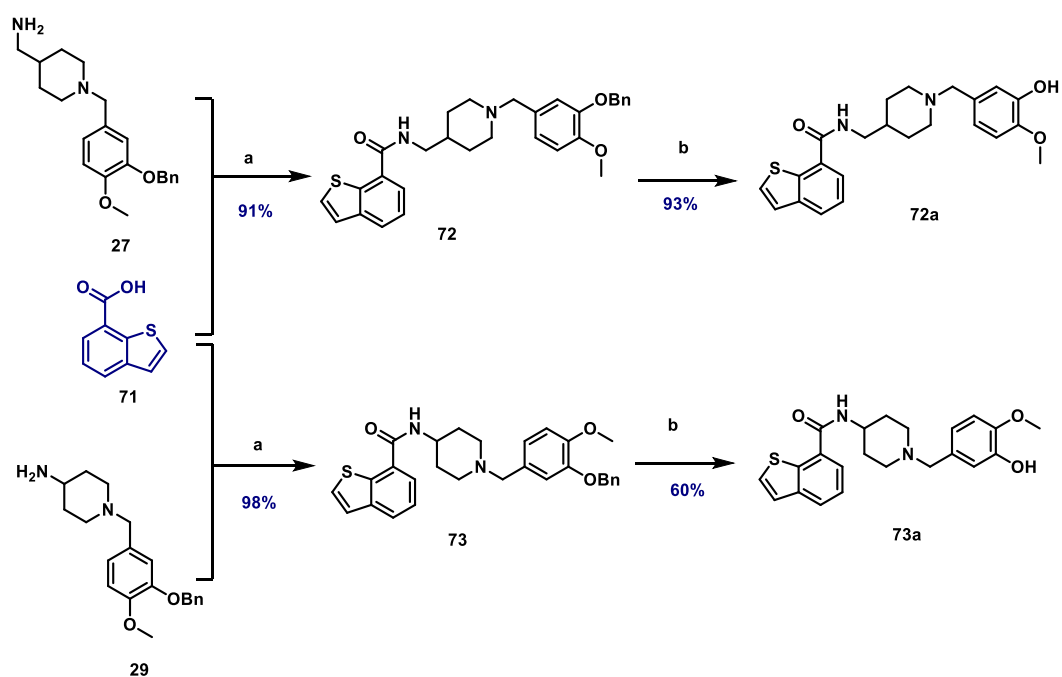


Schéma 28 – Synthèses des composés finaux de la série benzothiophène: Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBT, THF, 16 h, ta; (b) HBr à 33% dans l'acide acétique, DCM, 0°C, 2-4 h.

La série benzothiophène a été synthétisée avec plus de facilité et de bons rendements globaux. L'étape de couplage a permis d'obtenir le composé **72** avec un rendement de 91% et le composé **73** avec un rendement de 98%. Ces deux composés ont par la suite été déprotégés par l'HBr à 33% dans l'AcOH afin d'obtenir les composés finaux phénoliques avec des rendements de 93% et 60 % respectivement pour **72a** et **73a**.

b. Résultats obtenus sur ces nouvelles séries

Cmpd	Série chimique	<i>h5-HT₄R</i>				<i>DPPH</i>
		% inhibition at 10 ⁻⁸ M	% inhibition at 10 ⁻⁶ M	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ at 120 min (μM)
32	Ethoxy-chloroaniline	0	78%	-	-	>250
32a	Ethoxy-chloroaniline	62%	100%			70,2 ± 1,3
33	Ethoxy-chloroaniline	9%	46%	-	-	>250
33a	Ethoxy-chloroaniline	0%	67%	-	-	64,1 ± 5,3
35	Amino-chloro-Dihydroxybenzofurane	0%	85%	-	-	>250
35a	Amino-chloro-Dihydroxybenzofurane	73%	100%	8,9 ± 1,1	10,5 ± 1,1	92,5 ± 8
36	Amino-chloro-Dihydroxybenzofurane	1%	36%	-	-	>250
36a	Amino-chloro-Dihydroxybenzofurane	6%	82%	-	-	71,0 ± 7
41	Thiénopyridinone	0%	46%	-	-	>250
41a	Thiénopyridinone	1%	97%	-	-	72,8 ± 9,2
42	Thiénopyridinone	0%	11%	-	-	>250
42a	Thiénopyridinone	15%	57%	-	-	48,2 ± 3,2
63a	Imidazopyridine					Pas assez pour test
66b	Dihydrobenzocétone					>250
69	Dihydrobenzofurane					>250
69a	Dihydrobenzofurane					171,7 ± 17
70	Dihydrobenzofurane					>250
72	Benzothiophène					>250
72a	Benzothiophène					96,5 ± 2,3
73	Benzothiophène					>250
73a	Benzothiophène					79,2 ± 3,5
Sérotonine		0%	65%	246 ± 31	323 ± 25	-
Trolox		-	-	-	-	22,9 ± 0,9
Quercétine		-	-	-	-	9,3 ± 1,5

Tableau 2- Tableau récapitulatif des résultats des tests *in vitro*

Les résultats obtenus sur ces nouvelles séries ont été résumés dans le Tableau 2. Certaines analyses sont en attente. Certains composés ont tout de même pu être testés pour leur affinité envers le récepteur 5-HT₄R et sur leur capacité antioxydante sur le test DPPH.

Sur ces nouveaux composés un screening rapide des composés a permis de confirmer que tous les composés benzylés ne présentaient pas de capacité antioxydante. Ces premiers résultats ont permis de démontrer également une activité antioxydante chez tous les dérivés isovanilline testés avec des IC₅₀ allant de 48,2 μM pour le composé **42a** à 171,7 μM pour le composé **69a**. Sur huit des composés isovanilline testés sept avaient une IC₅₀ < 100 μM. Le choix du fragment isovanilline semble

donc efficace sur le test DPPH sur ces dernières séries. Des tests ORAC seront à effectuer afin de valider ces résultats et sélectionner les composés les plus prometteurs pour des essais *in cellulo* à comparer aux résultats obtenus dans les séries développées dans l'article 1 et 2.

Concernant les affinités envers le récepteur 5-HT₄R, certaines conclusions peuvent déjà apparaître. En effet les composés possédant un carbone entre le linker amide et la pipéridine centrale semblent plus efficaces que les analogues qui en sont dépourvues. Sur les 3 séries testées à ce jour, à savoir les composés finaux éthoxy-chloroaniline, amino-chloro-dihydroxybenzofurane et thiénopyridinone les deux seuls composés ayant une inhibition nécessaire au calcul de K_i sont les composés **32a** et **35a**. Bien que le K_i pour **32a** n'ait pas encore été réalisé, les données sur **35a** semblent montrer une haute affinité de ce composé avec un K_i de 8,9 nM. On remarque que les composés phénoliques sont également plus affins pour le récepteur que les analogues benzylés, comme le laissait présager les premiers résultats publiés dans l'article 1 et 2. Etonnamment, bien que la majorité des scaffolds chimiques soient issus de la littérature, seulement deux composés sur douze se sont montrés très affins pour le récepteur 5-HT₄. Les prochains résultats sur ces séries nous permettront d'identifier un potentiel candidat en comparaison avec les autres séries précédemment décrites pour évaluation biologique.

Chapitre 4 : Conclusion et Perspectives

I. Conclusion

Au total 52 molécules finales (composés benzylés et leurs dérivés phénoliques) ont été synthétisées au cours de cette thèse. La plupart de ces composés ont pu être évalués sur des tests *in vitro* pour leur affinité envers le récepteur 5-HT₄ ainsi que pour leur capacité antioxydante.

L'article 1 a mis en évidence un premier hit **9g** parmi les neufs premiers composés finaux en série aminochlorobenzophénone. Ce hit a été sélectionné après les résultats prometteurs obtenus sur le modèle cellulaire d'induction de stress oxydant réalisé à l'université de Bologne. Le composé catéchol **9b** a également montré des activités intéressantes et pourrait potentiellement être considéré comme hit après analyse plus approfondie de ses propriétés physicochimiques et tests de passage de la BHE (Figure 70).

Cependant, comme décrit dans l'article 2, ce premier test cellulaire d'induction de stress oxydant, bien que permettant de donner une première idée concernant la capacité antioxydante des composés dans un milieu cellulaire, n'est pas le test le plus complet. Un deuxième test de neuroprotection sur HT-22 devrait être réalisé sur les composés les plus prometteurs de cette première série afin d'avoir des données comparables entre les différentes séries et sélectionner le meilleur hit possible.

L'article 2 portant sur la conception, le synthèse et l'évaluation de la série benzisoxazole a identifié deux potentiels composés hits : les composés **8b** et **9a** parmi les treize composés décrits avec des activités antioxydantes très prometteuses sur les deux tests cellulaires mis en place dans ce projet. Le composé catéchol **8b** semble avoir un effet dose réponse de 5µM à 25µM et surpasse l'activité du témoin positif, la quercétine. Comme le laissait présager les premiers travaux de Lalut *et al.*²¹² sur les composés méthoxy-benzisoxazoles, il semblerait que les premières données tendent à confirmer le profil antagoniste obtenus pour **8g** et **9b**. Toutefois un profil agoniste a été observé pour le composé (*R*)-3-THF-benzisoxazole **18**. Bien que non actif sur le test de neuroprotection au stress induit par le glutamate sur HT-22, ce premier composé a tout de même obtenu des résultats prometteurs sur le premier test d'induction de stress sur SH-SY5Y au *t*-BuOOH. Le test cellulaire de neuroprotection sur HT-22 nous semble cependant le plus complet car il permet de mettre en évidence l'effet des composés sur un stress oxydant qui est généré suite à une absence de défense antioxydante comme on le retrouve dans la MA. Sur la base de ces résultats, il semblerait que l'ajout d'un motif (*R*)-3-THF au noyau benzisoxazole permette de récupérer l'activité agoniste envers le récepteur. Bien que les données de profil pour les composés **8b** et **9a** ne soient pas disponibles, l'ajout du fragment (*R*)-3-THF

aux benzisoxazoles pourrait permettre d'obtenir des composés à la fois, neuroprotecteurs et agonistes partiels de 5-HT₄R (Figure 70).

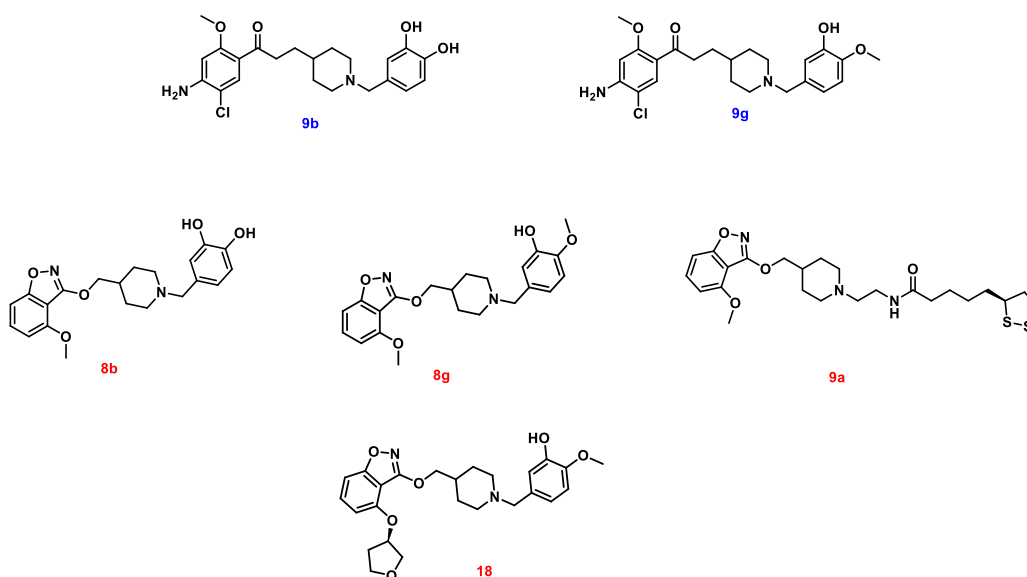


Figure 70 – Structures mentionnées dans la conclusion.

L'évaluation des composés détaillés dans la partie III. pourrait faire ressortir des composés prometteurs. La modulation des motifs hétérocycliques nous permettra d'établir de meilleures relations structure-activité afin de déterminer un potentiel pharmacophore dans le développement d'agonistes partiels des récepteur 5-HT₄. Ces modulations pourraient également conduire à l'obtention de composés aux propriétés pharmaco-chimiques optimales pour leur absorption et leur passage à travers le BHE.

Dans cette partie III, le choix du motif antioxydant s'est arrêté sur le motif isovanilline du fait des raisons énoncées précédemment. Cependant s'il s'avère que les composés possédant un motif catéchol ont également de bonnes propriétés pharmacocinétiques en plus d'un profil agoniste et de bon résultats *in cellulo*, il pourrait être intéressant de synthétiser des analogues catéchol des meilleurs composés conçus dans cette partie.

Un essai de type PAMPA sera prochainement réalisé sur les molécules les plus prometteuses avant toute expérience sur modèle murin pour s'assurer du bon passage des composés au travers de la BHE. De plus, des tests de cytotoxicité ont pu démontrer le profil non cytotoxique des molécules synthétisées sur deux lignées cellulaires HT-22 et SH-SY5Y. Ces composés seront également évalués quant à leur potentiel de toxicité sur les cellules HepG2 et d'inhibition des canaux hERG afin de

prévenir d'une éventuelle toxicité hépatique ou cardiaque. Si tous ces premiers indicateurs s'avèrent positifs, un ou deux composés sélectionnés pourront être testés sur des modèles murins de la MA afin de valider le concept de composé mutlicible à capacité antioxydante et agoniste des récepteurs 5-HT₄.

II. Perspectives de modulation

Dans ce projet, les différentes parties du pharmacophore des ligands des récepteurs 5-HT₄ ont été parcourues. La partie proximale a été tout d'abord modulée avec différents types d'antioxydants possible. Puis dans une deuxième partie de la thèse, la partie hétérocyclique a également été modifiée. Les différentes modulations effectuées sur la partie proximale de la molécule ont permis de mettre en évidence la grande variabilité de substituants possibles en cette position. Cependant l'ajout de certaines structures plus polaires aux propriétés antioxydantes peut s'avérer avoir un impact négatif en terme de lipophilie et de propriétés physico-chimiques nécessaires au passage de la BHE. De nouvelles modulations pourraient apporter de la nouveauté au niveau de ces structures tout en améliorant l'activité sur 5-HT₄R et les propriété physico-chimiques des derniers dérivés.

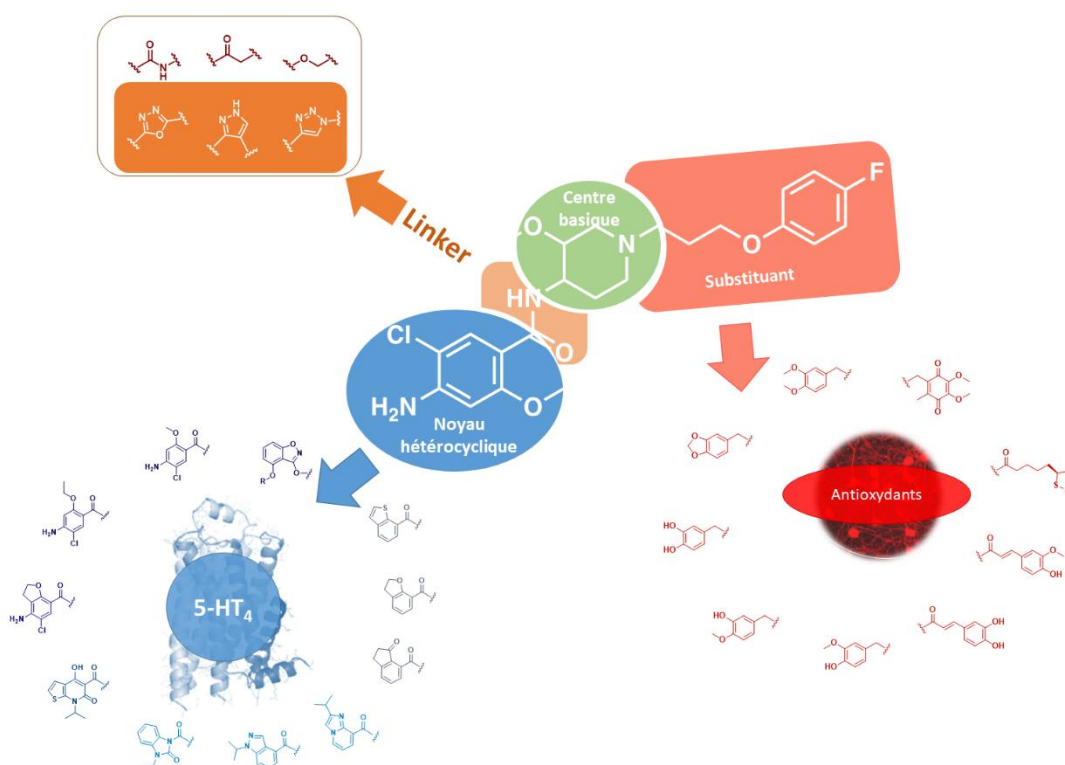


Figure 71 - Résumé des modulation du pharmacophore effectué lors de cette thèse et perspectives sur le linker.

Bien que le noyau hétérocyclique joue un grand rôle dans la liaison du composé à sa cible, d'autres parties de la molécule peuvent être modulées afin de gagner en affinité envers le 5-HT₄R ou en

pharmacopotentialité. C'est dans cette optique que nous avons alors cherché à modifier cette fois le linker. La première série développée dans l'article 1 présentait un linker cétonique. Dans l'article 2, les composés avaient un linker éther et dans la partie III le linker amide a été sélectionné (Figure 71).

Cependant il existe de nouveaux types de linkers bioisostères des traditionnels linkers amide retrouvés dans la majorité des ligands du récepteur 5-HT₄ sur le marché. Récemment Kumari *et al.* ont détaillé dans une revue un ensemble de bioisostères permettant de remplacer ces linkers amides.²⁵⁵ Le remplacement de ce linker amide pourrait alors permettre de rigidifier la structure et donc de favoriser les interactions à la cible et améliorer l'affinité, mais également d'augmenter la stabilité métabolique des composés qui pouvaient être la cible de peptidases. Nirogi *et al.* avaient déjà décrit des séries de composés possédant des linkers de type oxadiazole.¹³⁴ La formation de ces nouveaux linkers cycliques a donc été étudiée afin de déterminer l'impact de la rigidification de la structure au travers de linkers tricycliques.

Un premier essai de modification du linker a été réalisé sur le noyau chloroaminophénone représenté dans l'Article 1 et particulièrement sur le composé **9g**, hit sélectionné le plus intéressant sur cette première série chimique.²³⁸ La synthèse a été réalisée de la manière suivante. Une première étape de S_N entre l'isonipécotate d'éthyle **3** et le dérivé bromo-benzyle **3d** a été réalisée en présence de base afin d'obtenir le composé **74**, avec un rendement de 71%. Ce composé a été ensuite directement engagé dans une saponification par le LiOH, permettant d'obtenir le sel de lithium **75** correspondant avec un rendement quantitatif. Dans un second temps, l'acide amino-chloro-benzoïque **76** a été estérifié au moyen de SOCl₂ dans l'EtOH, permettant l'obtention de l'ester **77** avec un rendement de 41%. L'hydrazide **78** a été synthétisé à partir de ce dernier en présence d'hydrazine monohydratée dans l'éthanol à reflux avec un rendement quantitatif. Une fois l'hydrazide **78** et le sel de lithium **75** obtenus, l'étape de couplage-cyclisation moléculaire a été réalisée selon les conditions décrites par Nirogi *et al.* en one pot avec du POCl₃ servant à la fois de solvant et de réactif. Malheureusement, le composé benzylé **79** n'a été obtenu après purification qu'avec un très faible rendement de 3% et n'a jamais pu être isolé par la suite sur les essais suivants. La quantité obtenue étant trop faible le composé phénolique correspondant n'a alors pas pu être synthétisé.

²⁵⁵ Kumari, S. *et al.* Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *J. Med. Chem.* **2020**.

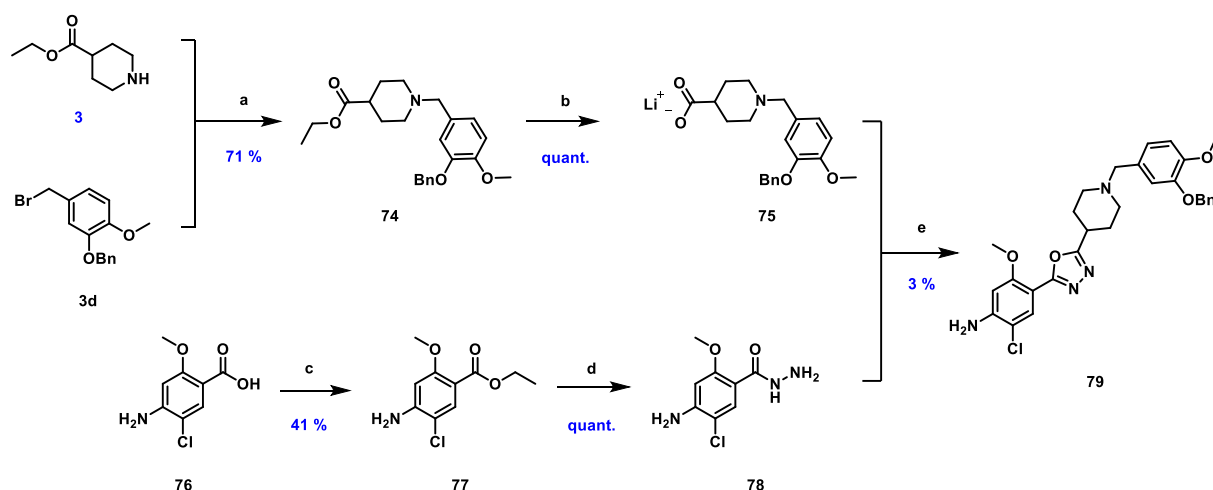


Schéma 29 - Synthèse des dérivés 1,3,4-oxadiazole. Réactifs et conditions : (a) K_2CO_3 , ACN, 2 h, ta ; (b) LiOH, THF, 16 h, 0 °C à ta ; (c) $SOCl_2$, EtOH, 16 h, 0 °C à reflux ; (d) N_2H_4 monohydrate, EtOH, 16 h, reflux ; (e) $POCl_3$, 30 min, reflux.

La purification de ce composé s'est montrée très ardue de par la complexité du mélange réactionnel obtenu. Différentes techniques ont été utilisées : flash chromatographie, chromatographie sur couche mince, chromatographie sur alumine neutre... Malheureusement, aucune de ces techniques n'a permis une obtention du composé pur. En effet, des composés secondaires très proches structuralement sont obtenus en mélange après les différentes purifications. Afin de permettre une étape de cyclisation plus aisée, une première étape de couplage entre l'hydrazine et le sel de lithium pourrait également être envisagée en amont grâce à des réactifs de couplage tels que EDCI, HOBt permettant alors d'isoler un intermédiaire diacyl-hydrazine pure pour pouvoir ensuite procéder à la cyclisation.

Sur cette première série chimique, étant donnée la présence de l'aniline et du chlore qui pourraient potentiellement intervenir lors de la réaction et former de nombreux composés secondaires, cette stratégie de formation de 1,2,3-oxadiazole sera prochainement testée sur une autre série chimique possédant des groupements moins susceptibles de former des espèces secondaires telles que la série pyridino-imidazoline ou la série indazole.

De plus la formation d'autres types de linkers sur les différents hétérocycles cibles développés tout au long de cette thèse pourrait être étudiée à l'image des linkers publiés par Kumari *et al.*²⁵⁵ Par exemple la formation de triazoles par des réactions de chimie click pourraient permettre l'obtention plutôt aisée de nouveaux dérivés.

Méthodologie

I. Synthèse Organique

All commercially available compounds were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart melting point apparatus (SMP50). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 on aluminium plates (Merck) and visualized with UV light (254 nm). Flash chromatography was conducted on a VWR SPOT II Essential instrument with silica gel 60 (40-63 μ m). Column size and flow rate followed the manufacturer's recommendations. NMR spectra were recorded at 295K, at 400 or 500 MHz (Bruker Avance III 400/500 MHz) for ^1H NMR and at 100 or 126 MHz for ^{13}C NMR in CDCl_3 , MeOD, D_2O or DMSO with chemical shifts (δ) given in parts per million (ppm) relative to TMS as internal standard and recorded. The following abbreviations are used to describe peak splitting patterns when appropriate: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet. Coupling constants J are reported in hertz units (Hz). Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrometer and are reported in terms of frequency of absorption (cm^{-1}) using KBr discs. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray (ESI, sampling cone 50V, capillary 0.3kV) on a Xevo G2-XS QToF WATERS mass spectrometer. LC-MS (ESI) analyses were realized with Waters Alliance 2695 as separating module using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H_2O , B = CH_3CN ; each containing HCOOH : 0.1 %; column XBridge BEH C18 2.5 μm /3.0 x 50 mm; flow rate 0.8 mL/min). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI. Mass spectrum data are reported as m/z .

The general procedure A for deprotection/substitution of the piperidine moiety

To a stirred solution of *tert*-butyl piperidine-1-carboxylate derivative (1.0 eq.) in DCM (20 mL.mmol $^{-1}$) was added TFA (2 mL.mmol $^{-1}$). The resulting mixture was stirred at rt (rt) for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. The residue obtained (1.0 eq.) was dissolved in DCM or ACN (10 mL.mmol $^{-1}$) and bromo-benzyl-alcohol derivatives (1.1-1.5 eq.) and K_2CO_3 (10.0 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at rt or 70°C depending on the product for 2-72 h, then concentrated *under vacuum*. The crude was directly purified by chromatography on silica gel column and concentrated under reduced pressure to afford alkylated compound (isolated yield).

The general procedure B to obtain unprotected catechol

Appropriate benzylated product (1.0 eq.) was stirred in HBr 33 % diluted in AcOH (10 mL.mmol⁻¹) and DCM (50 mL.mmol⁻¹) at 0°C to rt for 1 to 4 h. The mixture was evaporated *under vacuum* at rt. Then the crude was directly purified by flash chromatography and usually evaporated with Et₂O.

The general procedure C for peptidic coupling

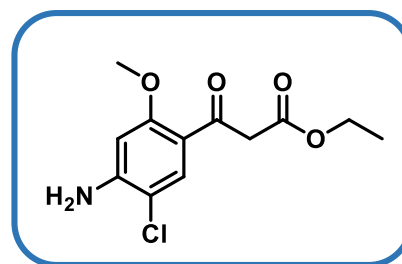
Carboxylic acid (1 eq.) was dissolved in dry THF (4 mL.mmol⁻¹) at 0 °C under nitrogen. TEA (1.25 eq.) was added and the mixture stirred for 5 min. Then, EDCI (1.5 eq.) was added. After another 15 min of stirring, HOBT (1.5 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min before adding the appropriate isovanilline piperidine derivate (1.2 eq.) in dry THF (4 mL.mmol⁻¹). The reaction mixture was left to stir overnight at rt. After evaporation of THF *under vacuum*, the compound of interest was purified by flash chromatography.

The general procedure D for Nucleophilic coupling of benzyl bromide derivates to piperidine derivates

The appropriate piperidine derivate (1.0 eq.) was suspended in ACN (30 mL.mmol⁻¹) and the suspension basified with K₂CO₃ (2.0 eq.). Then, 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene **3b** (1.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h or overnight. After that, the solvent was evaporated *under vacuum* at rt and the compound of interest was purified by flash chromatography.

Ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate (2)Chemical Formula: C₁₂H₁₄ClNO₄

Molecular Weight: 271,70



To a solution of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid **1** (5.00 g, 24.8 mmol, 1.0 eq.) in THF (200 mL, 0.12 M) was added CDI (4.42 g, 27.3 mmol, 1.1 eq.) portionwise. The mixture was stirred at rt for 4 h. Then, ethyl potassium malonate (5.06 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) and MgCl₂ (2.83 g, 29.7 mmol, 1.2 eq.) were added portionwisely. The resulting mixture was stirred 16 h at 40°C. Solvent were evaporated under vacuum. The residue was diluted with water and then extracted with DCM three times. Organics layers were combined and washed with NaHCO₃ sat. solution, then brine, and dried over MgSO₄. Solvent was evaporated under vacuum to afford a crude product which was purified on silica gel column (cHex/EtOAc from 100/0 to 60/40). The compound was obtained as a light yellow powder (3.76 g, 60% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.92 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 4.55 (br s, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.87 (br s, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 189.6, 168.6, 159.9, 148.7, 132.5, 117.3, 111.7, 97.0, 60.8, 55.4, 50.5, 14.2;

MS *m/z* [M+H]⁺: 272.51;

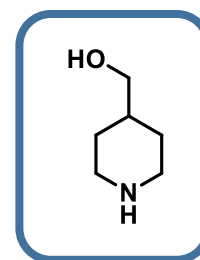
IR (neat, cm⁻¹): 3463, 3363, 3223, 2983, 1725, 1648, 1622, 1573, 1479, 1457 1326, 1220, 837, 654;

Mp: 117 - 120°C;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁰⁹

(piperidin-4-yl)methanol (4)Chemical Formula: C₆H₁₃NO

Molecular Weight: 115,18



To a solution of ethyl isonipecotate **3** (2 mL, 13.00 mmol, 1.0 eq.) in Et₂O (150 mL) was added portion-wise LiAlH₄ (1.48 g, 39.00 mmol, 3.0 eq.) at 0°C and the reaction mixture was refluxed for 7 h. The mixture was then cooled to 0°C and the reaction was then slowly quenched with 1.5 mL of water, 1.5 mL of 15% NaOH solution followed by 4.5 mL of water to afford a granular inorganic precipitate. The white solid was filtered and washed several times with EtOAc. Evaporation of the filtrate under reduced pressure provided the compound as a colorless oil (1.38 g, 92% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.59 (dt, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.71 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 1.12 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 66.9, 45.9 (2C), 38.8, 29.7 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 272.51;

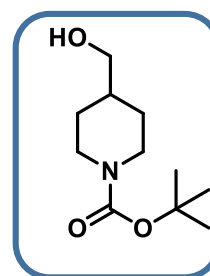
IR (neat, cm⁻¹): 3369, 2923, 2855, 1636, 1531, 1425, 1266, 1036;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁰⁹

Tert-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate (5) (5)

Chemical Formula: C₁₁H₂₁NO₃

Molecular Weight: 215,29



To a solution of (piperidin-4-yl)methanol **4** (1.14 g, 9.96 mmol, 1.0 eq.) in DCM (40 mL) was added di-*tert*-butyldicarbonate (2.39 g, 10.90 mmol, 1.1 eq.). The solution was stirred for 15 h at rt. The mixture was then diluted with water and the aqueous layer was extracted several times with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *under vacuum*. The crude product was purified by chromatography on silica gel column (cHex/EtOAc, gradient 100/0 to 70/0) to give the compound as white solid (1.34 g, 62% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.10 (m, 2H), 3.48 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H) 2.68 (m, 2H), 1.80 (br s, 1H, OH), 1.69 (m, 2H), 1.63 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.12 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 155.0, 79.5, 67.6, 43.9 (2C), 38.9, 28.7 (2C), 28.6 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 216.47; [M-Boc+H]⁺ 116.47; [M-*t*-butyl+H]⁺ 160.47;

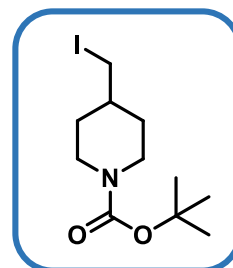
IR (neat, cm⁻¹): 3470, 2926, 2859, 1672, 1422, 1168, 1045, 572;

Mp: 86 - 89 °C.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁰⁹

Tert-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate (6)Chemical Formula: C₁₁H₂₀INO₂

Molecular Weight: 325,19



To a solution of *tert*-butyl-4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **5** (2.25 g, 10.50 mmol, 1.0 eq.), imidazole (858 mg, 12.6 mmol, 1.2 eq.) and triphenylphosphine (3.30 g, 12.60 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) was added dropwise a solution of iodine (3.20 g, 12.60 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt for 14 h. The mixture was quenched with a saturated Na₂S₂O₃ solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, and concentrated *under vacuum*. The crude was several times diluted with cold Et₂O, and white crystals were filtered. After concentration of filtrate *under vacuum*, the compound was obtained as a colorless oil (3.13 g, 92% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.11 (m, 2H), 3.10 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.68 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.62 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.15 (m, 2H);

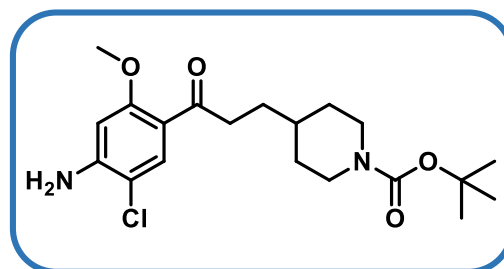
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 154.6, 79.5, 43.4 (2C), 38.6, 32.5 (2C), 28.4 (3C), 13.5;

IR (neat, cm⁻¹): 2975, 2932, 2850, 1692, 1422, 1243, 1157, 965;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁰⁹

Tert-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate (7)Chemical Formula: C₂₀H₂₉ClN₂O₄

Molecular Weight: 396,91



To a solution of ethyl 3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate **2** (3.14 g, 11.60 mmol, 1.0 eq.) and *tert*-butyl 4-(iodomethyl)piperidine-1-carboxylate **6** (4.14 g, 12.70 mmol, 1.1 eq.) in DMF (30 mL) was added K₂CO₃ (3.19 g, 23.10 mmol, 2.0 eq.). The mixture was stirred 72 h at rt. The reaction mixture was diluted with H₂O, and product was extracted with EtOAc. Combined organic layers were washed with H₂O and brine and then dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave a crude mixture which was directly dissolved in EtOH (500 mL) and H₂O (100 mL). After addition of KOH (3.23 g, 57.50 mmol, 5.5 eq.), the reaction mixture was stirred under reflux for 3 h, then EtOH was evaporated. The mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O and brine. Evaporation of the solvent provided a crude product, which was purified by column on silica gel, eluting on DCM/EtOAc from 100/0 to 60/40 to give the pure compound as a colorless solid (3.11 g, 67% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.79 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 4.46 (br s, 2H), 4.09 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.91 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.10 (br qd, *J* = 12.4, 4.3 Hz, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 198.7, 159.5, 154.9, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.5, 79.2, 55.7 (2C), 44.0, 40.6, 35.8, 32.1 (2C), 31.1, 28.5 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 397.60; [M-Boc+H]⁺ 297.51; [M-*t*-butyl+H]⁺ 341.55;

IR (neat, cm⁻¹): 3470, 3353, 2975, 2930, 2851, 1673, 1624, 1588, 1421, 1366, 1311, 1250, 1216, 1173, 967, 738;

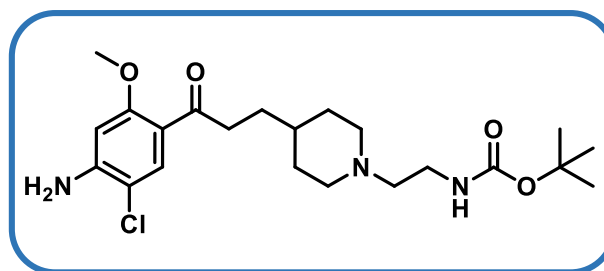
Mp: 136°C.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁰⁹

Tert-butyl N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (8)

Chemical Formula: C₂₂H₃₄ClN₃O₄

Molecular Weight: 439,98



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (2.37 g, 5.98 mmol, 1.0 eq.) and *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate (1.61 g, 7.18 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (cHex/EtOAc, gradient 100/0 to 0/100), the compound was obtained as a light yellow solid (780 mg, 30% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.71 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.98 (br s, 1H, NH), 4.49 (s, 2H, NH₂), 3.77 (s, 3H), 3.14 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.86 – 2.72 (m, 4H), 2.35 (br t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.24 – 1.08 (m, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 199.0, 159.4, 156.0, 147.7, 132.2, 118.9, 111.2, 97.5, 79.1, 57.5, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 37.4, 35.6, 32.2 (2C), 31.3, 28.5 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 440.89;

IR (neat, cm⁻¹): 3486, 3376, 3325, 2980, 2925, 2855, 1690, 1625, 1573, 1467, 1367, 1311, 1175, 1216, 1114, 969, 610;

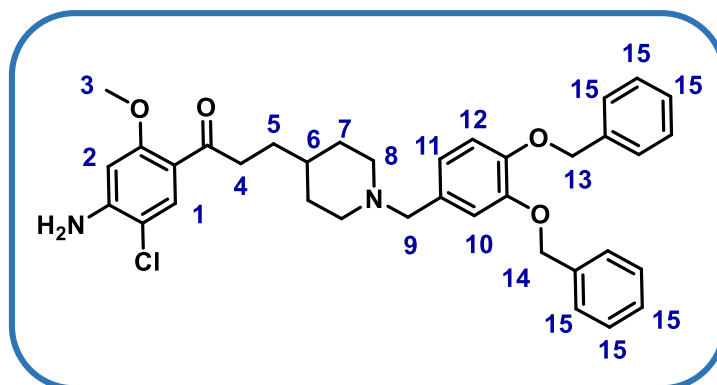
Mp: 115 -119°C.

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₃₅ClN₃O₄ [M+H]⁺ 440.2316, found 440.2324;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one (9a)

Chemical Formula: C₃₆H₃₉ClN₂O₄

Molecular Weight: 599,17



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq.) and 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (230 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁵⁶ the reaction was stirred at rt for 10 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100/0 to 90/10), the compound was obtained as a light yellow solid (141 mg, 47% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.78 (s, 1H, H₁), 7.49–7.24 (m, 10H, H₁₅), 7.01 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.81 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.25 (s, 1H, H₂), 5.18 (s, 2H, H₁₃), 5.14 (s, 2H, H₁₄), 4.51 (s, 2H, NH₂), 3.82 (s, 3H, H₃), 3.49 (s, 2H, H₉), 2.95 – 2.79 (m, 4H, H₄ and H₅), 1.97 (br t, *J* = 10.5 Hz, 2H, H₈), 1.66 (br d, *J* = 10.5 Hz, 2H, H₈), 1.58 (m, 2H, H₇), 1.47 – 1.20 (m, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 198.9, 159.5, 148.6, 148.4, 147.8, 137.3, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.8 (2C), 127.7 (2C), 127.5, 127.3, 122.7, 118.7, 116.6, 114.6, 111.2, 97.5, 71.3, 71.2, 62.5, 55.6, 53.3 (2C), 40.7, 35.0, 31.5 (2C), 31.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 599.7;

IR (neat, cm⁻¹): 3482, 3368, 3220, 2921, 2847, 2798, 1618, 1585, 1508, 1453, 1419, 1257, 1214, 1184, 1015, 735, 695;

Mp: 104 - 105°C.

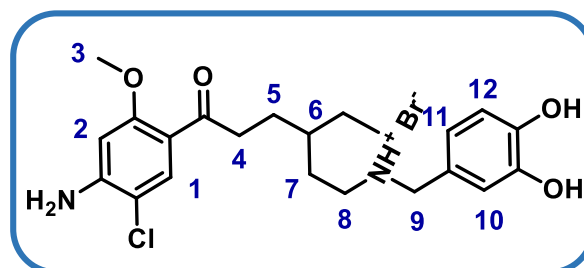
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₆H₄₀ClN₂O₄ [M+H]⁺ 599.2677, found 599.2673;

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dihydroxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one hydrobromide (9b)

Chemical Formula: C₂₂H₂₈ClN₂O₄Br

Molecular Weight:

418,92 (base), 499.83 (HBr salt)



From general procedure **B** with 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-[(3,4-dibenzoyloxyphenyl)methyl]-4-piperidyl]propan-1-one **9a** (125 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq.) to afford the pure compound as a pale yellow powder (85 mg, 81% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.66 (s, 1H, H₁), 6.92 (s, 1H, H₁₀), 6.85 – 6.80 (m, 2H, H₁₂ and H₁₁), 6.45 (s, 1H, H₂), 4.06 (s, 2H, H₉), 3.86 (s, 3H, H₃), 3.39 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H, H₄), 2.97 – 2.81 (m, 4H, H₈ and H₅), 1.95 (m, 2H, H₈), 1.66 – 1.52 (m, 3H, H₇ and H₆), 1.43 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 198.8, 160.3, 150.4, 146.7, 145.6, 131.5, 122.6, 120.6, 117.6, 116.3, 115.2, 110.3, 96.6, 60.3, 54.7, 51.9 (2C), 39.9, 33.3, 30.2, 29.0 (2C);

MS *m/z* [M-HBr+H]⁺: 419.8;

IR (neat, cm⁻¹): 3432, 3366, 3206, 2938, 2725, 1619, 1584, 1453, 1419, 1295, 1261, 1216, 1184.;

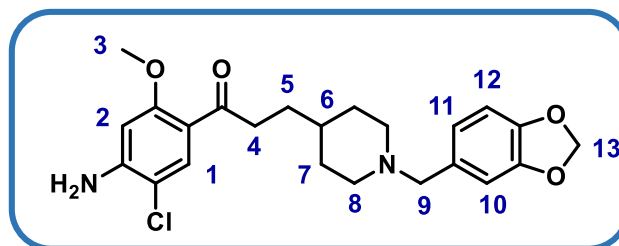
Mp: 112-115°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₈ClN₂O₄ [M-HBr+H]⁺ 419.1738, found 419.1737.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-[1-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4-piperidyl]propan-1-one (9c)

Chemical Formula: C₂₃H₂₇ClN₂O₄

Molecular Weight: 430,93



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq.) and 5-(bromomethyl)benzo[d][1,3]dioxole **3b** (129.4 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.) synthesized previously, the reaction was stirred at 110°C for 3 h. After a purification by chromatography on neutral alumina gel column (DCM 100% isocratic gradient), the compound was obtained as a light yellow solid (65 mg, 30% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.77 (s, 1H, H₁), 6.84 (s, 1H, H₁₀), 6.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₂), 6.72 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₁), 6.24 (s, 1H, H₂), 5.93 (s, 2H, H₁₃), 4.46 (br s, 2H, NH₂), 3.82 (s, 3H, H₃), 3.38 (s, 2H, H₉), 2.93 – 2.80 (m, 4H, H₄ and H₈), 1.90 (m, 2H, H₈), 1.66 (br d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H₇), 1.58 (dd, *J* = 7.2, 6.4 Hz, 2H, H₅), 1.25– 1.15 (m, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 199.1, 159.5, 147.7, 147.5, 146.4, 132.5, 132.2, 122.3, 118.9, 111.2, 109.6, 107.8, 100.8, 97.5, 63.3, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.3 (2C), 31.3;

MS *m/z* [M+H]⁺: 431.6;

IR (neat, cm⁻¹): 3470, 3358, 3216, 3013, 2922, 2873, 2854, 2810, 2775, 1715, 1642, 1619, 1573, 1440, 1421, 1332, 1312, 1261, 1214, 1178, 986, 932, 738, 567;

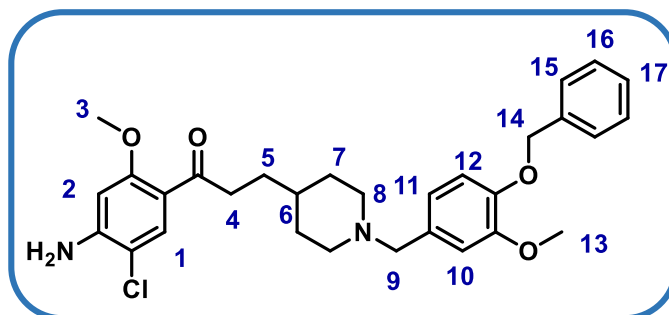
Mp: 119 -121°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₈ClN₂O₄ [M+H]⁺ 431.1738, found 431.1747.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-{[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)propan-1-one (9d)

Chemical Formula: C₃₀H₃₅ClN₂O₄

Molecular Weight: 523,07



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene **3d** (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100/0 to 80/20), the compound was obtained as a light yellow oil (74 mg, 28% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = δ 7.78 (s, 1H, H₁), 7.49 – 7.28 (m, 5H, H₁₅ and H₁₆ and H₁₇), 6.94 (s, 1H, H₁₀), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.75 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H₁₁), 6.24 (s, 1H, H₂), 5.13 (s, 2H, H₁₄), 4.46 (br s, 2H, NH₂), 3.89 (s, 3H, H₃), 3.82 (s, 3H, H₁₃), 3.43 (s, 2H, H₉), 2.98 – 2.78 (m, 4H, H₄ and H₈), 1.92 (m, 2H, H₈), 1.67 (m, 2H, H₇), 1.59 (m, 2H, H₅), 1.25 – 1.15 (s, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 199.1, 159.5, 149.4, 147.7, 147.2, 137.3, 132.2, 129.5, 128.5 (2C), 127.8, 127.2 (2C), 121.4, 118.9, 113.5, 112.9, 111.2, 97.5, 71.1, 63.2, 56.1, 55.6, 53.8 (2C), 40.9, 35.6, 32.2 (2C), 31.3;

MS *m/z* [M+H]⁺: 523.6;

IR (neat, cm⁻¹): 3449, 2919, 2853, 2788, 1616, 1586, 1463, 1450, 1414, 1261, 1216, 1177, 735;

Mp: 119 -122°C;

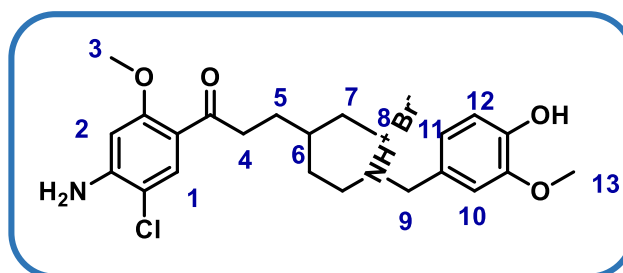
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₆ClN₂O₄ [M+H]⁺ 523.2364, found 523.2363.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-{1-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one hydrobromide salt (9e)

Chemical Formula: C₂₃H₃₀ClN₂O₄Br

Molecular Weight:

432,95 (base), 513,86 as salt



From general procedure **B** with 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-[(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)propan-1-one **9d** (80 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) to afford the final compound as yellow powder (70 mg, 85% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = δ 7.66 (s, 1H, H₁), 7.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.91 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₂), 6.45 (s, 1H, H₂), 4.13 (s, 2H, H₉), 3.90 (s, 3H, H₁₃), 3.86 (s, 3H, H₁₃), 3.40 (br d, *J* = 12.6 Hz, 2H, H₈), 3.00 – 2.79 (m, 4H, H₈ ad H₄), 1.96 (br d, *J* = 13.4 Hz, 2H, H₇), 1.65 – 1.60 (m, 3H, H₅ and H₆), 1.46 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 198.78, 160.3, 150.4, 148.0, 147.9, 131.5, 124.0, 120.5, 116.3, 115.1, 114.0, 110.3, 96.7, 60.5, 55.1, 54.8, 51.9 (2C), 39.9, 33.3, 30.2, 29.1 (2C);

MS *m/z* [M-HBr+H]⁺: 432.8;

IR (neat, cm⁻¹): 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735;

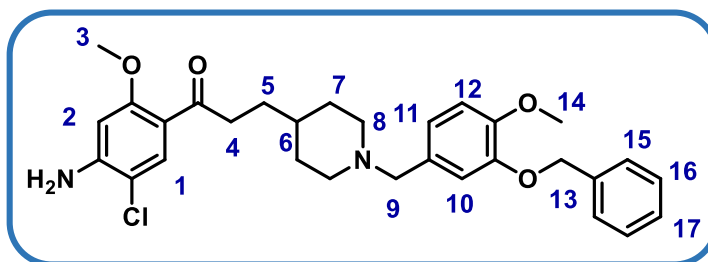
Mp: 117 -120°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₀ClN₂O₄ [M-HBr+H]⁺ 433.1894, found 433.1894.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)propan-1-one (9f)

Chemical Formula: C₃₀H₃₅ClN₂O₄

Molecular Weight: 523,07



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1 eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene **3d** (185 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100/0 to 80/20), the compound was obtained as a light yellow oil (100 mg, 38% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.78 (s, 1H, H₁), 7.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₁₅), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁₆), 7.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁₇), 6.94 (s, 1H, H₁₀), 6.88 – 6.76 (m, 2H, H₁₂ and H₁₁), 6.25 (s, 1H, H₂), 5.17 (s, 2H, H₁₄), 4.46 (br s, 2H, NH₂), 3.87 (s, 3H, H₃), 3.84 (s, 2H, H₁₃), 3.45 (s, 2H, H₉), 2.98 – 2.78 (m, 4H, H₄ and H₈), 1.92 (m, 2H, H₈), 1.65 (br d, *J* = 10.2 Hz, 2H, H₇), 1.59 (m, 2H, H₅), 1.28 (s, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 199.0, 159.5, 149.0, 147.9, 147.7, 137.1, 132.1, 129.3, 128.5 (2C), 127.8, 127.5 (2C), 122.3, 118.7, 115.5, 111.4, 111.2, 97.5, 70.9, 62.7, 56.0, 55.7, 53.4 (2C), 40.8, 35.2, 31.7 (2C), 31.1;

MS *m/z* [M+H]⁺: 523.6

IR (neat, cm⁻¹): 3360, 2923, 2834, 2788, 1618, 1587, 1463, 1450, 1414, 1261, 1216, 1177, 735;

Mp: 119 -124°C

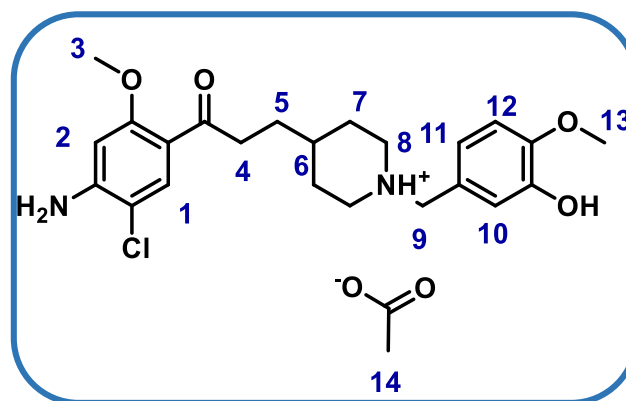
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₆ClN₂O₄ [M+H]⁺ 523.2364, found 523.2365.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-{1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}propan-1-one acetate salt (9g)

Chemical Formula: C₂₅H₃₃ClN₂O₆

Molecular Weight:

432,95 (base), 492.99 (AcOH salt)



From general procedure **B** with 1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-[(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)propan-1-one **9f** (80 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) to afford acetate salt of the desired compound as a pale yellow powder (55 mg, 70% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.76 (s, 1H, H₁), 6.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.86 – 6.76 (m, 2H, H₁₁ and H₁₂), 6.26 (s, 1H, H₂), 4.54 (br s, 2H, NH₂), 3.86 (s, 3H, H₃), 3.82 (s, 3H, H₁₃), 3.74 (s, 2H, H₉), 3.16 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₈), 2.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₄), 2.27 (br t, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₈), 2.04 (s, 3H, H₁₄), 1.73 (m, 2H, H₇), 1.61 (m, 2H, H₅), 1.54 – 1.35 (m, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 198.5, 176.9, 159.6, 147.9, 147.1, 145.9, 132.2, 125.8, 122.2, 118.6, 116.8, 111.3, 110.7, 97.5, 61.0, 55.9, 55.7, 52.1 (2C), 40.4, 34.2, 30.5, 30.1 (2C), 22.9;

MS *m/z* [M-AcOH+H]⁺: 432.8;

IR (neat, cm⁻¹): 3360, 3220, 2932, 2855, 1620, 1586, 1420, 1254, 1216, 1177, 1136, 1084, 735;

Mp: 80 - 83°C;

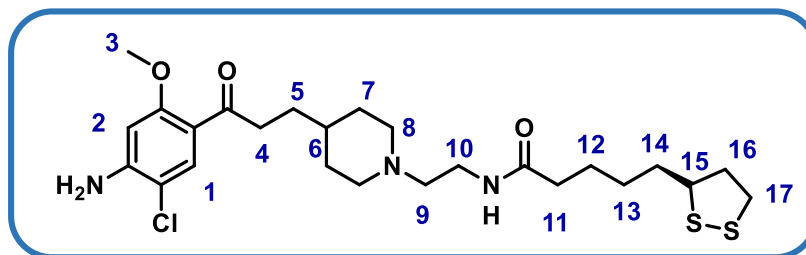
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₀ClN₂O₄ [M-AcOH+H]⁺ 433.1894, found 433.1894.

***N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-5-[(3*R*)-1,2-dithiolan-3-yl]pentanamide (10a)**

Chemical Formula:

$C_{25}H_{38}ClN_3O_3S_2$

Molecular Weight: 528,17



To a stirred solution of *tert*-butyl *N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate **8** (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of LA (53 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were successively added hydroxybenzotriazole (HOBt) (42 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.) and 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDCI) (49 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.), the mixture was stirred at 0°C in the dark for 30min, then the free amine was added, and the reaction was stirred at rt for 16 h. Solvent was evaporated under vacuum then the product was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100/0/0 to 97.5/2.5/0.25), pure compound was obtained as white powder (65 mg, 44% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.81 (s, 1H, H₁), 6.28 (s, 1H, H₂), 6.11 (br s, 1H, NH), 4.49 (br s, 2H, NH₂), 3.87 (s, 3H, H₃), 3.59 (dq, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 1H, H₁₅), 3.35 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, H₁₀), 3.15 (m, 2H, H₁₇), 2.97 – 2.82 (m, 4H, H₄ and H₈), 2.53 – 2.44 (m, 3H, H₁₁ and H₁₆), 2.21 (m, 2H, H₉), 2.01 – 1.90 (m, 3H, H₁₆ and H₈), 1.76 – 1.65 (m, 6H, H₅, H₁₄ and H₁₂), 1.62 (br dt, *J* = 8.5, 6.5 Hz, 2H, H₇), 1.50 (m, 2H, H₁₃), 1.33 – 1.17 (m, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 198.9, 172.7, 159.5, 147.7, 132.2, 118.9, 111.3, 97.6, 56.9, 56.5, 55.7, 53.7 (2C), 40.9, 40.3, 38.5, 36.5, 36.1, 35.6, 34.7, 32.3, 31.2 (2C), 28.9, 25.5;

MS *m/z* [M+H]⁺: 527.8;

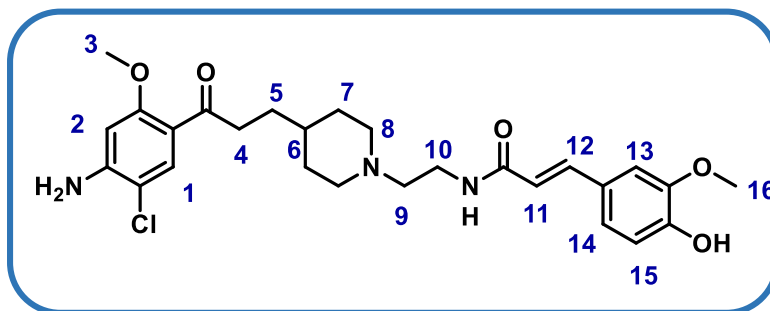
IR (neat, cm⁻¹): 3217, 2926, 2844, 1642, 1586, 1462, 1419, 1316, 1254, 1250, 1170;

Mp: 121- 123°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₅H₃₉ClN₃O₃S₂ [M+H]⁺ 528.2121, found 528.2118;

(2E)-N-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enamide (10b)Chemical Formula: C₂₇H₃₄ClN₃O₅

Molecular Weight: 516,04



Following the same procedure as **10a** from *N*-(2-{4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidin-1-yl}ethyl)carbamate (125 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) and ferulic acid (39 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.) with EDCI, HOBT, and TEA. The crude was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (100/0/0 to 92.5/7.5/0.75) to afford a bright yellow powder (60 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.72 (s, 1H, H₁), 7.43 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H₁₂), 6.96 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H₁₄), 6.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₃), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₅), 6.37 (br s, 1H, NH), 6.23 – 6.07 (m, 2H, H₂ and H₁₁), 4.40 (br s, 2H, NH₂), 3.84 (s, 3H, H₃), 3.77 (s, 3H, H₁₆), 3.44 (m, 2H, H₁₀), 2.91 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, H₈), 2.84 (m, 2H, H₄), 2.51 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₉), 1.98 – 1.96 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.67 (m, 2H, H₇), 1.54 (m, 2H, H₅), 1.27 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 198.8, 166.2, 159.5, 147.7, 147.4, 146.8, 140.7, 132.2, 127.4, 122.3, 118.9, 118.3, 114.8, 111.3, 109.5, 97.5, 57.1, 55.9, 55.7, 53.8 (2C), 40.7, 36.0, 35.3, 31.8 (2C), 31.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 515.77;

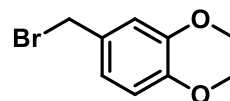
IR (neat, cm⁻¹): 3435, 2938, 2837, 1647, 1616, 1585, 1511, 1459, 1419, 1264, 1214, 1156;

Mp: 85°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₇H₃₅ClN₃O₅ [M+H]⁺ 516.2265, found 516.2264.

4-(bromomethyl)-1,2-dimethoxybenzene (3a)Chemical Formula: C₉H₁₁BrO₂

Molecular Weight: 231,09



To a solution of 3,4-dimethoxyphenylmethanol (0.87 mL, 5.90 mmol, 1 eq.) in Et₂O (10 mL) cooled to 0°C was added dropwisely a solution of PBr₃ (0.22 mL, 2.40 mmol, 0.4 eq.) in Et₂O (8.5 mL) for 5 min. The reaction was stirred at 0°C for 1h. Then the reaction was quenched with cold water, then extracted with Et₂O three times, dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The product was obtained as a colorless oil (1.0 g, 73% isolated yield)

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.98 – 6.93 (m, 1H), 6.93 – 6.90 (m, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H);

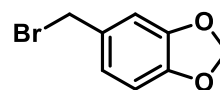
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 149.2, 149.1, 130.2, 121.6, 112.1, 111.0, 55.9, 55.9, 34.4.

* Spectral and analytical data matched with literature ²⁵⁷

5-(bromomethyl)benzo[d][1,3]dioxole (3b)

Chemical Formula: C₈H₇BrO₂

Molecular Weight: 215,05



To a solution of piperonyl alcohol (1.0 g, 6.60 mmol, 1 eq.) in Et₂O (10 mL) cooled to 0°C was added dropwisely a solution of PBr₃ (0.68 mL, 7.20 mmol, 1.1 eq.) in Et₂O (8.5 mL) for 5 min. The reaction was stirred at 0°C for 1h. Then the reaction was quenched with cold water, then extracted with Et₂O three times, dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The product was obtained as a colorless oil (1.41 g, quantitative yield).

Spectral and analytical data

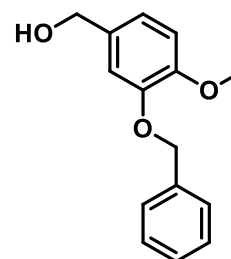
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.94 – 6.82 (m, 2H), 6.75 (m, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.46 (s, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 147.9, 147.8, 131.5, 122.7, 109.5, 108.3, 101.3, 77.3, 34.4.

Spectral and analytical data matched with literature: ²⁵⁷

(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methanol (2c)Chemical Formula: C₁₅H₁₆O₃

Molecular Weight: 244.29



NaBH₄ (298 mg, 7.88 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in MeOH (15 ml) and the solution cooled to 0 °C. Then, 3-(benzyloxy)-4-methoxybenzaldehyde (1.59 g, 6.57 mmol, 1 eq.) was dissolved in DCM (30 ml) and added dropwise over the course of 30 min. The mixture was stirred for 3.5 h at 0 °C. After that, MeOH was evaporated, water was added and the product was extracted DCM three times. The organic layers were combined, washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. The pure compound was obtained as a colourless oil was obtained (1.6 g, quantitative yield)

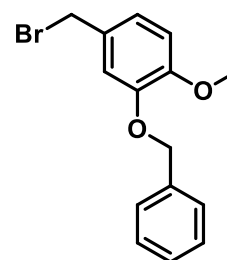
Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.45 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 2H), 7.45 (m, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 2H), 7.32 - 7.28 (m, 1H), 6.96 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.17 (s, 2H), 1.54 (s, 1H).

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (3c)Chemical Formula: C₁₅H₁₅BrO₂

Molecular Weight: 307.19



(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methanol **3b** (1.0 g, 4.09 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in Et₂O (30 ml) and the solution cooled to 0 °C. PBr₃ (0.43 ml, 4.50 mmol, 1.1 eq.) was added dropwisely. The mixture was then stirred at 0 °C for 30 min before the reaction was quenched with water. The product was extracted from the aqueous phase with DCM, the organic phase was dried with MgSO₄ and the solvent was evaporated *under vacuum*. The reaction afforded the pure compound as a white powder (1.2 g, quantitative yield).

Spectral and analytical data

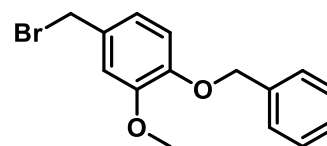
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.47 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.02 – 6.95 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.91 (s, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 150.0, 148.3, 136.9, 130.2, 128.7 (2C), 128.1, 127.5 (2C), 122.2, 114.9, 111.7, 71.1, 56.1, 34.5.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene (3d)

Chemical Formula: C₁₅H₁₅BrO₂
 Molecular Weight: 307.19



NaBH₄ (92 mg, 2.47 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in MeOH (5 ml) and the solution cooled to 0 °C. Then 4-(benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyde (500 mg, 2.06 mmol, 1 eq.) was dissolved in DCM (10 ml) and added dropwise over the course of 30 min. The mixture was stirred for 3 h at 0 °C. After that, MeOH was evaporated, water was added and the product extracted in DCM three times. The organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO₄. Concentration over vacuum of the latter allowed the obtention of a clear, colourless oil. The crude was dissolved in Et₂O (10 ml) and the solution cooled to 0 °C. PBr₃ (215 μM, 2.26 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise. The mixture was then stirred at 0 °C for 30 min before the reaction was quenched with water. The product was extracted from the aqueous phase with DCM, the organic phase dried with MgSO₄ and the solvent evaporated under vacuum. The compound was obtained as a white powder (585 mg, 93% isolated yield).

Spectral and analytical data

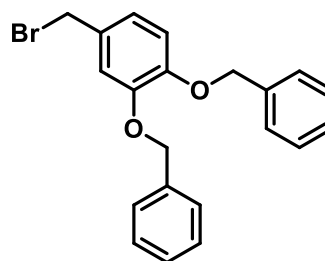
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.91 (s, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 149.7, 148.4, 136.9, 130.7, 128.6 (2C), 127.9, 127.2 (2C), 121.5, 113.6, 112.6, 71.0, 56.0, 34.4.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene (3e)Chemical Formula: C₂₁H₁₉BrO₂

Molecular Weight: 383,29



NaBH₄ (235 mg, 6.28 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in MeOH (10 ml) and the solution cooled to 0°C. Then 3,4-bis(benzyloxy)benzaldehyde (1.0 g, 3.14 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (20 ml) and added dropwise over the course of 30 min. The mixture was stirred for 3 h at 0°C. After that, MeOH was evaporated, the product extracted in water and DCM and the organic layer washed with brine. After drying with MgSO₄ and evaporation of the organic solvent *under vacuum*, a clear, colourless oil was obtained. The crude was dissolved in Et₂O (20 ml) and the solution cooled to 0 °C. PBr₃ (325 μM, 3.45 mmol, 1.1 eq) was added dropwise. The mixture was then stirred at 0 °C for 30 min before the reaction was quenched with water. The product was extracted from the aqueous phase with DCM, the organic phase dried with MgSO₄ and the solvent evaporated *under vacuum*. The compound was obtained as a white powder (1.20g, quantitative yield)

Spectral and analytical data

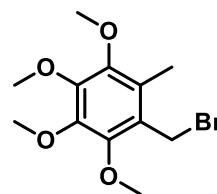
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.39 – 7.31 (m, 4H), 7.31 – 7.17 (m, 6H), 6.90 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 1.9 Hz, 4H), 4.34 (s, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 149.3, 149.0, 137.1, 137.0, 130.9, 128.6 (4C), 128.0, 127.9 (2C), 127.5 (2C), 127.3, 122.4, 115.9, 114.7, 71.4, 71.2, 34.3.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁸

1-(bromomethyl)-2,3,4,5-tetramethoxy-6-methylbenzene (5)Chemical Formula: C₁₂H₁₇BrO₄

Molecular Weight: 305,17



To a stirred mixture of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-methylbenzene (0.19 mL, 0.92 mmol, 1.0 eq.) and paraformaldehyde (56.0 mg, 1.8 mmol, 2.0 eq.) was added 47% HBr in water (1 mL) dropwise at rt. Then the mixture was stirred at 40°C for 1h. Water was added and the mixture was extracted with petroleum ether twice. Then combined organic fractions were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford the compound as a brown oil (290 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.60 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.26 (s, 3H);

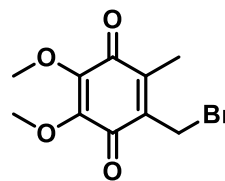
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 148.5, 148.0, 147.8, 144.7, 126.6, 124.9, 61.3, 61.1, 61.0, 60.8, 26.6, 11.1.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁴⁰

2-(bromomethyl)-5,6-dimethoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione (6)

Chemical Formula: C₁₀H₁₁BrO₄

Molecular Weight: 305,17



To a stirred solution of CAN (10.9 g, 19.81 mmol, 4.0 eq) in water (7 mL) at 0°C was added a solution of 1-(bromomethyl)-2,3,4,5-tetramethoxy-6-methylbenzene **5** (1.51 g, 4.95 mmol, 1.0 eq.) in THF (10 mL). Water was added and the mixture was extracted three times with DCM. Then combined organic fractions were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford a crude product which was purified on silica column with PE/EtOAc from 100/0 to 70/30 to give the pure compound as an orange oil (505 mg, 37% isolated yield)

Spectral and analytical data

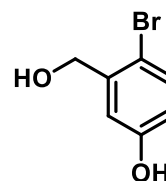
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.24 (s, 2H), 3.96 -3.94 (m, 6H), 2.03 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 183.9, 181.6, 145.0, 144.5, 141.7, 137.6, 61.4, 61.3, 21.5, 12.0.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁴⁰

4-bromo-3-(hydroxymethyl)phenol (8)Chemical Formula: C₇H₇BrO₂

Molecular Weight: 203,04



To a solution of 2-bromo-5-hydroxybenzaldehyde (1.0 g, 4.97 mmol, 1.0 eq.) solubilized in MeOH (20mL) was added NaBH₄ (94 mg, 2.48 mmol, 0.5 eq.) dropwisely at 0°C. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h, then solvent was removed over vacuum. The crude was extracted with EtOAc three times, then the combined organic fraction was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford the pure compound as a white powder (1.0 g, 99% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H);

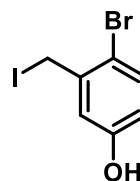
¹³C NMR (101 MHz, MeODI) δ = 158.4, 142.6, 133.9, 116.6, 116.3, 111.3, 64.6;

IR (neat, cm⁻¹): 3362, 1595, 1436, 1326, 1240, 1019, 507;

Mp: 135-137°C;

4-bromo-3-(iodomethyl)phenol (9)Chemical Formula: C₇H₇BrIO

Molecular Weight: 312.93



To a solution of 4-bromo-3-(hydroxymethyl)phenol **8** (1.0 g, 4.95 mmol, 1.0 eq.) solubilized in ACN (20 mL) were added KI (1.23 g, 7.38 mmol, 1.5 eq.) and P₂O₅ (1.05 mg, 7.38 mmol, 1.5 eq.) dropwisely. The reaction mixture was stirred at rt for 16 h. The crude mixture was filtered to remove salt and washed with EtOAc, then water was added to the filtrate and the solution was extracted with EtOAc three times. The combined organic fraction was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum and the latter residue was purified on silica gel column with cHex/EtOAc (50/50 isocratic gradient) to afford a bright yellow powder (815 mg, 52% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.7, 2.9 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H);

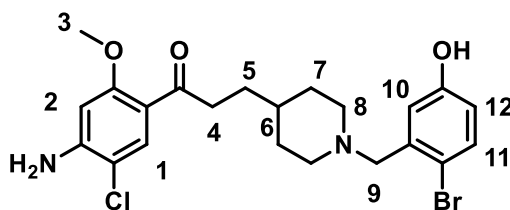
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 158.5, 140.7, 135.0, 118.3, 118.1, 113.6, 5.7;

IR (neat, cm⁻¹): 3156, 1589, 1420, 1290, 1240, 1019, 954, 501;

Mp: 132-133°C

4-bromo-3-(iodomethyl)phenol (11)Chemical Formula: C₂₂H₂₆BrClN₂O₃

Molecular Weight: 481,82



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidine-1-carboxylate **7** (200 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq.) and 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol **9** (190 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 16 h. After a purification by chromatography on neutral alumina gel column (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 95/5/0.5), the compound was obtained as a white powder (174 mg, 72% isolated yield)

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.65 (s, 1H, H₁), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₁), 6.95 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.60 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H, H₁₂), 6.43 (s, 1H, H₂), 3.85 (s, 3H, H₃), 3.51 (s, 2H, H₉), 2.95 – 2.88 (m, 4H, H₄ and H₈), 2.07 (m, 2H, H₈), 1.69 (m, 2H, H₇), 1.54 (m, 2H, H₅), 1.33 – 1.24 (m, 3H, H₇ and H₆);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 201.1, 161.6, 158.2, 151.7, 139.1, 134.3, 132.9, 119.1, 117.9, 117.1, 114.5, 111.6, 98.1, 63.0, 56.1, 55.0 (2C), 41.7, 36.8, 33.1 (2C), 32.8;

IR (neat, cm⁻¹): 2920, 1618, 1580, 1465, 1420, 1250, 1178, 954, 501;

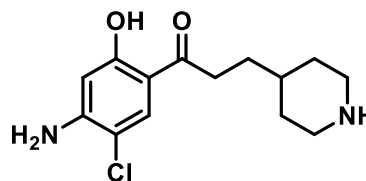
Mp: 98-102°C;

MS *m/z* [M+H]⁺: 481.6-483.6;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇BrClN₂O₃ [M+H]⁺ 481.094, found 481.0889.

1-(4-amino-5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3-(piperidin-4-yl)propan-1-one (15)Chemical Formula: C₁₄H₁₉ClN₂O₂

Molecular Weight: 282.77



tert-butyl 4-(3-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-oxopropyl)piperidine-1-carboxylate **7** (500 mg, 1.26 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (30 ml) and the solution cooled to -5°C. To the stirred solution was added BBr₃ dropwisely (2.52 ml, 2.52 mmol, 2.0 eq.). The cooling bath was removed and the reaction mixture stirred at rt for 1 h. The reaction was quenched with ice water. The solids were filtered off, washed with DCM and air dried overnight. After dissolving of the product in MeOH and evaporation of the solvent, the product was obtained as an orange solid (355mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.72 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.40 - 3.60 (m, 2H), 3.01 - 2.92 (m, 4H), 2.03 - 1.99 (m, 2H), 1.72 - 1.69 (m, 3H), 1.47 - 1.37 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, MeODI) δ = 204.0, 164.8, 153.3, 132.2, 112.0, 110.7, 101.3, 45.3 (2C), 35.1, 34.5, 31.7, 29.9(2C);

Mp: 95°C;

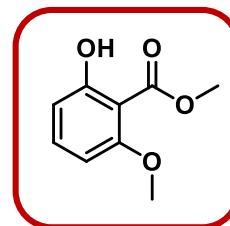
MS *m/z* [M+H]⁺: 283.4;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₁₄H₂₀ClN₂O [M+H]⁺ *in progress*.

methyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (2)

Chemical Formula: C₉H₁₀O₄

Molecular Weight: 182.17



To a solution of 2-hydroxy-6-methoxybenzoic acid (5.0 g, 29.55 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (120 mL), was added concentrated H₂SO₄ (0.25 mL/mmol, 6.6 mL) dropwisely. The resulting mixture was refluxed for 48 h. Then MeOH was evaporated under vacuum and the crude was dissolved in water and extracted with EtOAc three times. The combined organic fractions were washed with NaHCO₃ sat. solution, then dried over MgSO₄, and evaporated under vacuum to afford brownish crystals (3.93 g, 73% isolated yield)

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.49 (br s, 1H, OH), 7.34 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.87 (s, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 171.6, 163.6, 160.9, 135.2, 110.1, 103.1, 102.3, 56.2, 52.5;

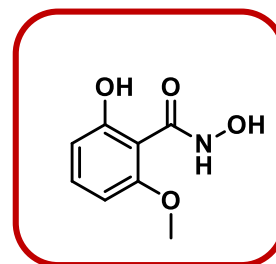
IR (neat, cm⁻¹): 3251, 3011, 2979, 2954, 1655, 1232, 1087, 815;

Mp: 57°C;

Spectral and analytical data matched with literature.²¹²

N,2-dihydroxy-6-methoxybenzamide (3)

Chemical Formula: C₈H₉NO₄
 Molecular Weight: 183.16 g/mol⁻¹



To a stirred solution of hydroxylamine hydrochloride (2.24 g, 32.3 mmol, 1.5 eq.) in H₂O (37 mL) was added NaOH (3.02 g, 75.6 mmol, 3.5 eq.). The resulting mixture was stirred at rt for 1 h under nitrogen. The compound methyl 2-hydroxy-6-methoxy-benzoate **2** (3.93 g, 21.6 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (13 mL) was added and the mixture was stirred at 40°C for 20 h. After cooling to rt, the mixture was concentrated under vacuum, HCl 1N solution was added and the latter mixture was extracted three times with EtOAc. The combined organic fractions were dried over MgSO₄ concentrated under vacuum and the crude was purified by chromatography on silica gel column with cHex/DCM (from 50/50 to 0/100). The pure compound was obtained as light brown powder (1.07 g, 53 % isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.74 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.31 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.65 (dd, *J* = 8.4, 0.7 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H);

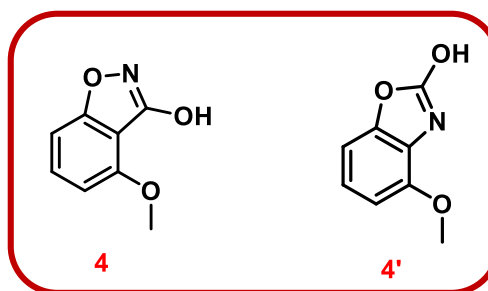
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.2, 163.5, 158.1, 133.9, 111.8, 101.3, 101.1, 56.4;

IR (neat, cm⁻¹): 3.359, 3.240, 2.950, 2.850, 1.627, 1.462, 1.090, 805.

Spectral and analytical data matched with literature.²¹²

4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-ol (4) / 4-methoxy-1,3-benzoxazol-2-ol (4')Chemical Formula: C₈H₇NO₃

Molecular Weight: 165.15



To a stirred solution of *N*,2-dihydroxy-6-methoxybenzamide (2.0 g, 10.90 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (30 mL) was added a solution of CDI (3.54 g, 21.81 mmol, 2.0 eq.) in dry THF (30 mL) under nitrogen. The resulting mixture was refluxed for 5 h. After cooling to rt, the mixture was concentrated under vacuum. Then the crude was dissolved with H₂O, and was precipitated by addition of HCl 6N solution and filtrated off to afford a mixture of **4** and **4'** (58:42 as calculated on NMR), as a white solid (1.54 g, 85% isolated yield).

Spectral and analytical data**4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-ol (4)**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 165.6, 165.1, 155.9, 133.4, 104.2, 103.5, 102.9, 56.1;

MS *m/z* [M+H]⁺: 166.45.

4-methoxy-1,3-benzoxazol-2-ol (4')

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.06 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H);

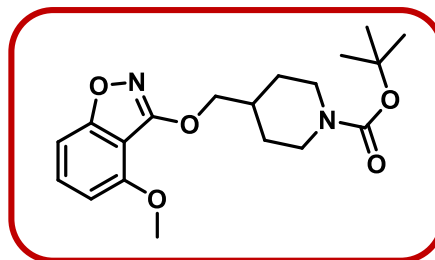
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 155.1, 144.6, 144.3, 122.9, 118.3, 106.6, 103.4, 56.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 166.45.

Spectral and analytical data matched with literature.²¹²

tert-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (6)Chemical Formula: C₁₉H₂₆N₂O₃

Molecular Weight: 362.42



To a stirred solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **5** (2.21g, 11.18 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (60 mL) was added PPh₃ (4.87 g, 18.6 mmol, 2.0 eq.) and DEAD (2.93 mL, 18.6 mmol, 2.0 eq.), under nitrogen at 0°C. The resulting mixture stirred for 15 min then 4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-ol **4** / 4-methoxy-1,3-benzoxazol-2-ol **4'** (1.54 g, 9.32 mmol, 1.0 eq.) was added and stirred at reflux for 16 h. After cooling to rt, the mixture was concentrated under vacuum, water was added and the latter mixture was extracted three times with EtOAc. The combined organic fractions were washed with brine then dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and the crude was purified by chromatography on silica gel column with cHex/EtOAc (from 100/0 to 80/20). The pure compound was obtained as colorless oil that crystalized (1.95 g, 58% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.16 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 2.76 (td, *J* = 13.2, 2.5 Hz, 2H), 2.13 (m, 1H), 1.85 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.29 (m, 2H);

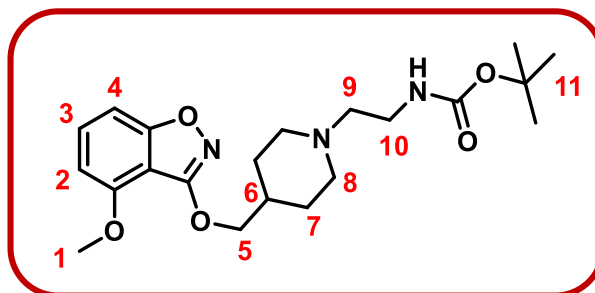
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.1, 155.1, 155.0, 132.1, 104.3, 103.3, 103.0, 79.5, 74.5, 56.1, 43.6 (2C), 35.8, 28.7 (2C), 28.6 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 363.34; [M-Boc+H]⁺ 263.31; [M-*t*-butyl+H]⁺ 307.36;

Spectral and analytical data matched with literature.²¹²

tert-butyl N-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl]ethyl]carbamate (7)Chemical Formula: C₂₁H₃₁N₃O₅

Molecular Weight: 405,50



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (1.18 g, 3.25 mmol, 1.0 eq.) and *tert*-butyl *N*-(2-bromoethyl)carbamate (875 mg, 3.9 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 16 h in DMF. After a purification by chromatography on silica gel column (DCM/MeOH, gradient 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a light yellow solid (1.01 g, 77% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.46 – 7.36 (m, 1H, H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.05 (br s, 1H, NH), 4.28 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₅), 3.95 (s, 3H, H₁), 3.24 (m, 2H, H₁₀), 3.02 – 2.84 (m, 2H, H₈), 2.47 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H₉), 2.12 – 1.93 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.93 – 1.78 (m, 2H, H₇), 1.45 (m, 11H, H₇ and H₁₁);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 165.9, 156.0, 155.0, 131.9, 104.3, 103.2, 102.9, 79.2, 74.7, 57.4, 56.0, 53.1 (2C), 37.3, 35.3, 28.7 (2C), 28.5 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 406.89; [M+H-*Tert*-butyl]⁺ : 350.86;

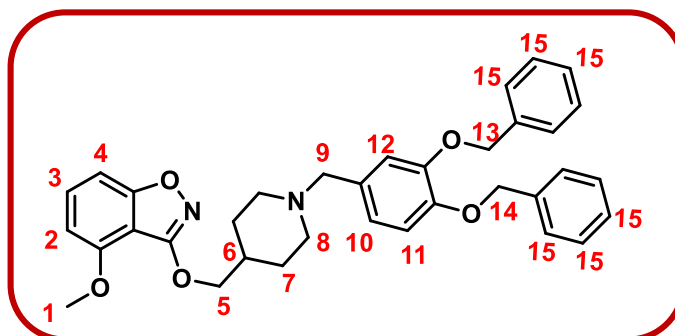
IR (neat, cm⁻¹) : 3370, 2980, 2934, 2809, 1687, 1533, 1428, 1102;

Mp: 89 -92°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₃₂N₃O [M+H]⁺ 406.2342, found 406.2358.

3-[(1-{[3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8a)Chemical Formula: C₃₅H₃₆N₂O₅

Molecular Weight: 564,68



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (200 mg, 0.55 mmol, 1eq.) and 1,2-bis(benzyloxy)-4-(bromomethyl)benzene **3e** (253 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁵⁶ the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed under vacuum then solubilized in water, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fraction was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a yellow powder (275 mg, 90% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.48 – 7.27 (m, 11H, H₁₅ and H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.97 (s, 1H, H₁₂), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₁), 6.80 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H₁₀), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.18 (s, 2H, H₁₃), 5.15 (s, 2H, H₁₄), 4.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.45 (s, 2H, H₉), 2.87 (m, 2H, H₈), 2.02 – 1.89 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.81 (m, 2H, H₇), 1.46 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 166.0, 155.0, 148.6, 148.1, 137.5, 137.4, 131.8, 131.5 (determined with HMBC), 128.5 (2C), 128.4 (2C), 127.8, 127.7, 127.4 (2C), 127.3 (2C), 122.3, 116.3, 114.7, 104.3, 103.2, 102.9, 74.8, 71.4, 71.2, 62.8, 56.0, 52.9 (2C), 35.3, 28.6 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 564.70;

IR (neat, cm⁻¹): 3034, 2942, 2889, 2789, 1625, 1534, 1431, 1366, 1283, 1097;

Mp: 102-104°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₅H₃₇N₂O₅ [M+H]⁺ 565.2702, found 565.2699.

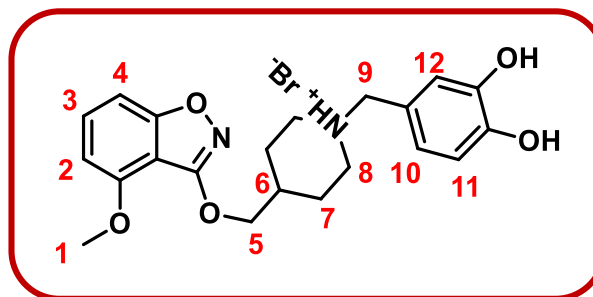
4-[(4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]benzene-1,2-diol

hydrobromide(8b)

Chemical Formula: C₂₁H₂₅N₂O₅Br

Molecular Weight:

465,34 (HBr salt); 384,43 (base)



From general procedure **B** with 3-[[1-[[3,4-bis(benzyloxy)phenyl]methyl]piperidin-4-yl]methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole **8a** (210 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light brown powder once evaporated with Et₂O (85 mg, isolated yield 49%)

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.94 (s, 1H, H₁₂), 6.83 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 4.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₅), 4.10 (s, 2H, H₉), 3.92 (s, 3H, H₁), 3.47 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H, H₈), 2.97 (t, *J* = 12.0 Hz, 2H, H₈), 2.25 (m, 1H, H₆), 2.09 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H, H₇), 1.70 (q, *J* = 12.6 Hz, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 167.3, 167.2, 156.4, 148.0, 146.9, 133.7, 124.0, 122.1, 119.0, 116.5, 104.8, 104.6, 103.3, 74.2, 61.7, 56.4, 52.6 (2C), 34.7, 26.9 (2C);

MS *m/z* [M-HBr+H]⁺: 385.91;

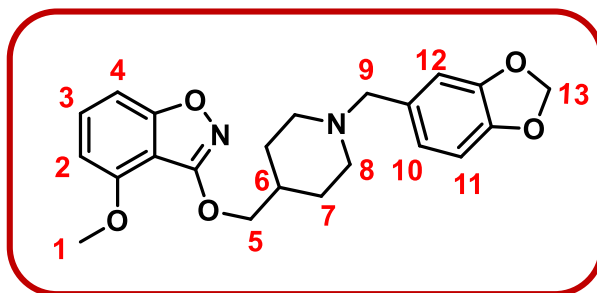
IR (neat, cm⁻¹) : 3408, 3220, 2938, 2847, 2809, 161, 1525, 1427, 1099;

Mp: 111-113°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₅N₂O₅ [M-HBr+H]⁺ 385.1763, found 385.1761.

3-({1-[(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8c)Chemical Formula: C₂₂H₂₄N₂O₅

Molecular Weight: 396,44



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[{(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) and 5-(bromomethyl)-2H-1,3-benzodioxole **3b** (71 mg, 0.33 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100:0 to 95:5), the compound was obtained as a yellow powder (70 mg, 65% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = δ 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.86 (s, 1H, H₁₂), 6.75 (s, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.94 (s, 2H, H₁₃), 4.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.44 (s, 2H, H₉), 2.93 (br d, *J* = 11.1 Hz, 2H, H₈), 2.10 – 1.93 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.85 (m, 2H, H₇), 1.45 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 165.9, 155.0, 147.6, 146.5, 131.9, 131.8, 122.3, 109.6, 107.8, 104.3, 103.2, 102.8, 100.9, 74.8, 63.1, 56.0, 53.0 (2C), 35.4, 28.7 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 397.64;

IR (neat, cm⁻¹): 2949, 2911, 2851, 2804, 1613, 1533, 1444, 1102;

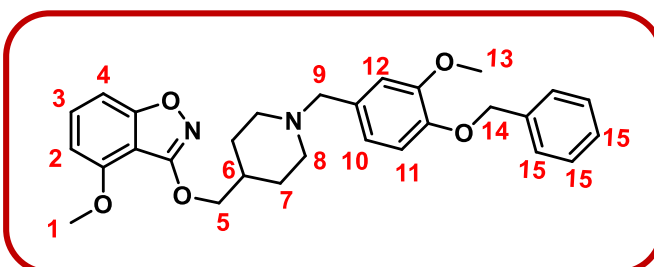
Mp: 114 - 117°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₅N₂O₅ [M+H]⁺ 397.1763, found 397.1768.

3-[(1-{[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8d)

Chemical Formula: C₂₉H₃₂N₂O₅

Molecular Weight: 488,58



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate (200 mg, 0.55 mmol, 1eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene (203 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁵⁹ the reaction was stirred at rt for 16 h in ACN. The solvent was removed under vacuum. A purification by chromatography on silica gel column was directly performed with DCM/MeOH (from 100:0 to 90:10), the compound was obtained as a yellow powder (214 mg, 87% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.47 – 7.27 (m, 6H, H₁₅ and H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.93 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₀), 6.76 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.14 (s, 2H, H₁₄), 4.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.90 (s, 3H, H₁₃), 3.45 (s, 2H, H₉), 2.93 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₈), 2.09 – 1.93 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.86 (br d, *J* = 12.5 Hz, 2H, H₇), 1.44 (qd, *J* = 12.5, 3.7 Hz, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.1, 155.1, 149.6, 147.3, 137.4, 132.0, 131.4, 128.6 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 121.4, 113.7, 112.9, 104.4, 103.3, 103.0, 74.9, 71.2, 63.2, 56.2, 56.1, 53.2 (2C), 35.5, 28.8 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 489.62;

IR (neat, cm⁻¹): 2934, 2847, 2802, 1622, 1512, 1418, 1102;

Mp: 98 – 102°C;

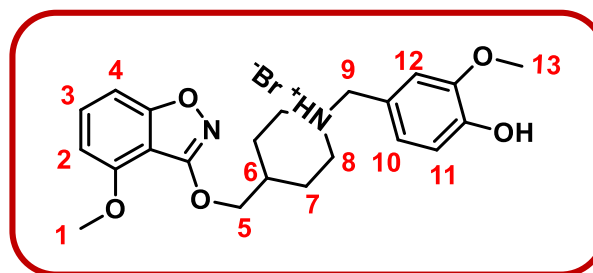
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₃N₂O₅ [M+H]⁺ 489.2389, found 489.2387.

2-methoxy-4-[(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]phenol hydrobromide (8e)

Chemical Formula: C₂₂H₂₇N₂O₅Br

Molecular Weight:

479.37 (HBr salt), 398,46 (Base)



From general procedure **B** with 3-[(1-[[4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole **8d** (180 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light yellow powder (120 mg, 67% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 6.98 (s, 1H, H₁₂), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.79 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H₁₀), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 4.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₅), 3.93 (s, 2H, H₉), 3.81 (s, 3H, H₁), 3.79 (s, 3H, H₁₃), 3.28 (m, 2H, H₈), 2.71 (m, 2H, H₈), 2.10 (m, 1H, H₆), 1.95 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H, H₇), 1.55 (q, *J* = 13.6 Hz, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 167.4, 167.3, 156.5, 149.3, 148.9, 133.7, 125.1, 123.3, 116.4, 115.2, 104.9, 104.7, 103.4, 74.5, 62.3, 56.5, 56.5, 53.0 (2C), 35.1, 27.5 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 399.87;

IR (neat, cm⁻¹) : 3424, 2933, 2847, 2809, 1612, 1533, 1420, 1102;

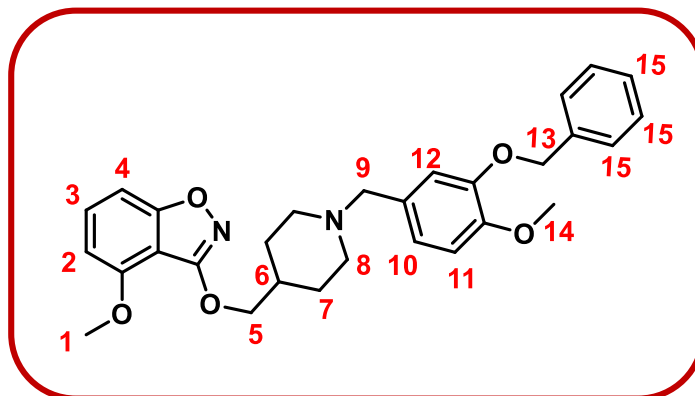
Mp: 94 - 97°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₅ [M-HBr+H]⁺ 399.1920, found 399.1924.

3-[(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8f)

Chemical Formula: C₂₉H₃₂N₂O₅

Molecular Weight: 488,58



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (200 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene **3d** (203 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁵⁹ the reaction was stirred at rt for 16 h in ACN. The solvent was removed under vacuum a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100/0 to 95/5), the compound was obtained as a yellow oil (145 mg, 54% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.47 – 7.26 (m, 6H, H₁₅ and H₃), 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₄), 6.91 (s, 1H, H₁₂), 6.86 – 6.81 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 5.17 (s, 2H, H₁₃), 4.27 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.88 (s, 3H, H₁₄), 3.44 (s, 2H, H₉), 2.90 (m, 2H, H₈), 2.02 – 1.87 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.82 (m, 2H, H₇), 1.44 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.1, 155.1, 148.9, 147.8, 137.3, 132.0, 130.4 (Determined by HMBC), 128.6 (2C), 127.8, 127.5 (2C), 122.1, 115.4, 111.5, 104.4, 103.3, 103.0, 74.9, 71.0, 62.9, 56.2, 56.1, 53.0 (2C), 35.5, 28.8 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 489.62;

IR (neat, cm⁻¹): 3428, 2917, 2847, 2795, 1612, 1532, 1428, 1102;

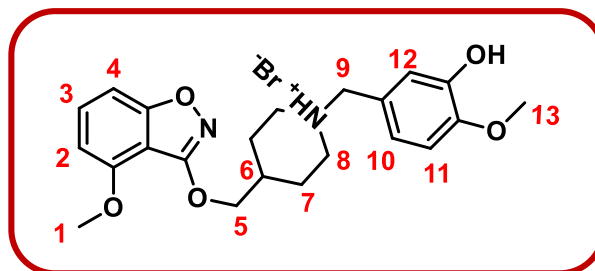
HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₃N₂O₅ [M+H]⁺ 489.2389, found 489.2392.

2-methoxy-5-[(4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)methyl]phenol hydrobomide (8g)

Chemical Formula: C₂₂H₂₇N₂O₅Br

Molecular Weight:

479,37 (HBr salt); 398,46 (base)



From general procedure **B** with 3-[(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-methoxy-1,2-benzoxazole **8d** (110 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as a yellow powder (87 mg, 82% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.50 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 6.98 (m, 4H, H₄, H₁₀, H₁₁ and H₁₂), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 4.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₅), 4.16 (s, 2H, H₉), 3.93 (s, 3H, H₁), 3.88 (s, 3H, H₁₃), 3.48 (m, 2H, H₈), 3.01 (m, 2H, H₈), 2.26 (m, 1H, H₆), 2.11 (m, 2H, H₇), 1.70 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 167.4, 167.3, 156.4, 150.4, 148.2, 133.7, 124.0, 123.4, 118.7, 112.7, 104.8, 104.7, 103.4, 74.2, 61.6, 56.5, 56.4, 52.8 (2C), 34.7, 27.0 (2C);

MS *m/z* [M-HBr+H]⁺: 399.62;

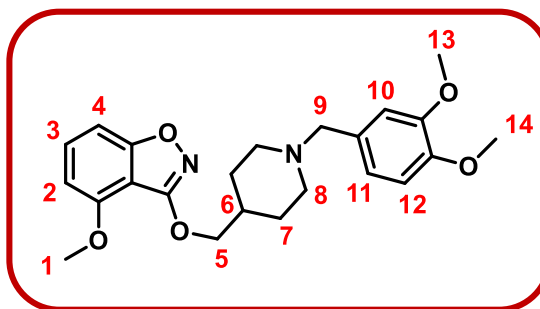
IR (neat, cm⁻¹) : 3424, 2933, 2847, 2809, 1612, 1533, 142, 1102;

Mp: 97 - 100°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₅ [M-HBr+H]⁺ 399.1920, found 399.1924.

3-({1-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}methoxy)-4-methoxy-1,2-benzoxazole (8h)Chemical Formula: C₂₃H₂₈N₂O₅

Molecular Weight: 412,49



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[{(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) and 4-(bromomethyl)-1,2-dimethoxybenzene **3a** (74.3 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature,²⁶⁰ the reaction was stirred at 110°C for 16 h in DMF. The solvent was removed *under vacuum* then the crude was solubilized in water, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fractions were dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100/0 to 97/3), and the compound was obtained as a yellow oil (40 mg, 36% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₄), 6.93 (s, 1H, H₁₀), 6.84 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H₁₁), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₂), 6.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂), 4.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.91 (s, 3H, H₁₃), 3.87 (s, 3H, H₁₄), 3.49 (s, 2H, H₉), 2.95 (br d, *J* = 11.4 Hz, 2H, H₈), 2.12 – 1.94 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.86 (br d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₇), 1.49 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 165.9, 155.0, 148.8, 148.1, 132.3, 131.9, 121.4, 112.3, 110.7, 104.3, 103.2, 102.9, 74.8, 63.1, 56.0, 55.9, 55.9, 53.1 (2C), 35.3, 28.6 (2C);

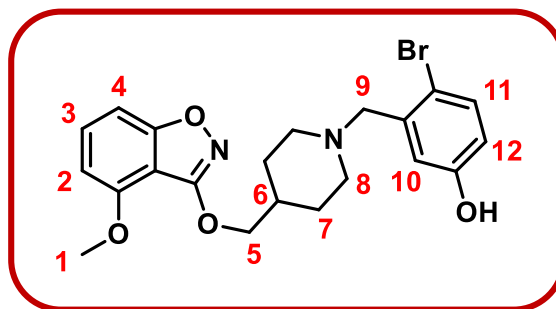
MS *m/z* [M+H]⁺: 413.64;

IR (neat, cm⁻¹): 3433, 2935, 2838, 1612, 1532, 1101;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₉N₂O₅ [M+H]⁺ 413.2076, found 413.2082.

4-bromo-3-[(4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methyl)piperidin-1-yl]methyl]phenol (8i)Chemical Formula: C₂₁H₂₃BrN₂O₄

Molecular Weight: 447,33



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[(4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy]methylpiperidine-1-carboxylate **6** (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) and 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol **9** (102 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) previously synthesized, the reaction was stirred at rt for 16 h in DMF. The solvent was removed under vacuum then water was added, the latter suspension was extracted with DCM three times. The combined organic fraction was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100/0 to 90/10), the compound was evaporated with Et₂O that led to a yellow powder (76 mg, 63% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.41 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₁₂), 7.04 – 6.95 (m, 2H, H₁₀ and H₄), 6.62 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂), 4.27 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₅), 3.93 (s, 3H, H₁), 3.57 (s, 2H, H₉), 2.99 (dt, *J* = 11.8, 3.4 Hz, 2H, H₈), 2.20 (td, *J* = 11.8, 2.5 Hz, 2H, H₈), 2.03 (m, 1H, H₆), 1.86 (br d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₇), 1.46 (qd, *J* = 12.2, 3.4 Hz, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 165.9, 155.4, 155.0, 138.3, 133.4, 131.9, 117.8, 116.2, 114.6, 104.2, 103.2, 102.8, 74.7, 61.8, 56.0, 53.2 (2C), 35.2, 28.5 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 447.46 - 449.47;

IR (neat, cm⁻¹): 3379, 3247, 2937, 1614, 1533, 1429, 1366, 1283, 1101;

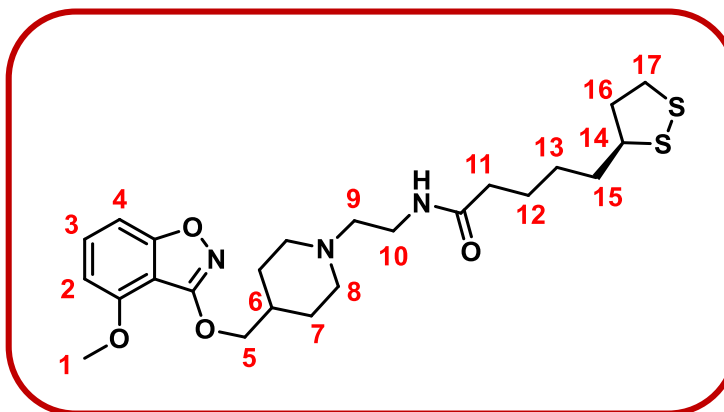
Mp: 145-148°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₄BrN₂O₄ [M+H]⁺ 447.0919, found 447.0923.

5-[(3S)-1,2-dithiolan-3-yl]-N-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl]ethyl]pentanamide (9a)

Chemical Formula: C₂₄H₃₅N₃O₄S₂

Molecular Weight: 493,68



To a stirred solution of *tert*-butyl *N*-[2-(4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl)piperidin-1-yl]ethyl]carbamate **7** (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of Lipoic acid (47 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) were successively added HOBt (36 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq.) and EDCI (41 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at 0°C in the dark for 30 min, and the free amine was added. The reaction was stirred at rt for 16 h. Solvent was evaporated under vacuum at rt and then the crude was purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100/0/0 to 97.5/2.5/0.25). The compound was obtained as white powder (90 mg, 74% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 6.06 (br s, 1H, NH), 4.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₅), 3.95 (s, 3H, H₁), 3.57 (dq, *J* = 12.8, 6.4 Hz, 1H, H₁₄), 3.35 (dd, *J* = 11.2, 5.6 Hz, 2H, H₁₀), 3.22 – 3.03 (m, 2H, H₁₇), 2.93 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₈), 2.54 – 2.41 (m, 3H, H₉ and H₁₆), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₁₁), 2.05 – 2.02 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.95 – 1.84 (m, 3H, H₁₆ and H₇), 1.77 – 1.61 (m, 4H, H₁₂ and H₁₅), 1.56 – 1.35 (m, 4H, H₇ and H₁₃);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 172.7, 166.3, 166.0, 155.0, 131.9, 104.2, 103.2, 102.9, 74.7, 56.8, 56.5, 56.0, 53.0 (2C), 40.3, 38.5, 36.5, 36.0, 35.4, 34.7, 28.9, 28.8 (2C), 25.4;

MS *m/z* [M+H]⁺: 494.74;

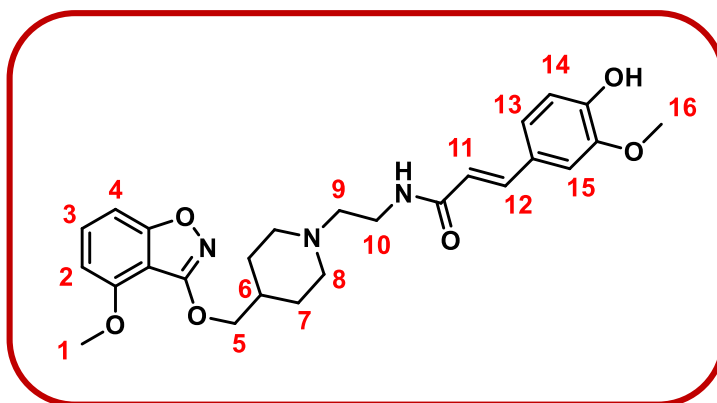
IR (neat, cm⁻¹): 3413, 3307, 2935, 2848, 2806, 1612, 1532, 1428, 1102;

Mp: 107 -110°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₆N₃O₄S₂ [M+H]⁺ 494.2147, found 494.2149

(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-[2-(4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)ethyl]prop-2-enamide (9b)Chemical Formula: C₂₆H₃₁N₃O₆

Molecular Weight: 481,55



To a stirred solution of *tert*-butyl *N*-[2-(4-[[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidin-1-yl)ethyl]carbamate **7** (100 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was added TFA (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at rt for 1 h. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude product, which was directly engaged in the next step. To a solution of ferric acid (53 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) in THF (5 mL), was successively added *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (55 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) at 0°C then the crude product solubilized in THF (1 mL). The mixture was stirred at 70°C for 2 h, in the dark. Solvent was evaporated under vacuum, the crude was first filtered to remove dicyclohexyl urea (DCU), then the filtrate was collected, evaporated under vacuum and purified on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (100/0/0 to 95/5/0.5), the compound was obtained as a white powder (50 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.51 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H₁₂), 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.09 – 6.94 (m, 3H, H₁₃, H₁₅ and H₄), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₄), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 6.30 (br s, 1H, NH), 6.21 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H₁₁), 4.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₁), 3.91 (s, 3H, H₁₆), 3.51 (dd, *J* = 11.1, 5.4 Hz, 2H, H₁₀), 3.02 (m, 2H, H₈), 2.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H₉), 2.16 – 1.97 (m, 3H, H₈ and H₆), 1.91 (m, 2H, H₇), 1.48 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 166.2, 165.9, 154.9, 147.4, 146.8, 140.8, 131.9, 127.4, 122.2, 118.3, 114.8, 109.6, 104.2, 103.2, 102.9, 74.6, 57.0, 56.0, 55.9, 53.1 (2C), 36.1, 35.3, 28.5 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 482.24;

IR (neat, cm⁻¹): 3421, 2937, 2851, 1614, 1532, 1429, 1101;

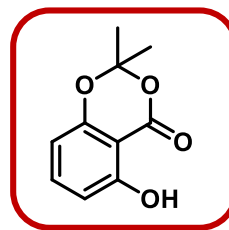
Mp: 97 – 100°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₆H₃₂N₃O₆ [M+H]⁺ 482.2291, found 482.2290.

5-hydroxy-2,2-dimethyl-2,4-dihydro-1,3-benzodioxin-4-one (11)

Chemical Formula: C₁₀H₁₀O₄

Molecular Weight: 194,19



To a stirred solution of 2,6-dihydroxybenzoic acid (5.0 g, 32.5 mmol, 1.0 eq.) in DME (100 mL) was added SOCl₂ (3.06 mL, 42.2 mmol, 1.3 eq.), acetone (3.1 mL, 42.2 mmol, 1.3 eq.) and DMAP (198 mg, 1.6 mmol, 0.05 eq.) at 0°C. The resulting mixture allowed to warm to rt, and was stirred for 16 h. NaHCO₃ sat solution was poured into the reaction cooled down to 0°C, then the mixture was extracted three times with EtOAc, then dried of MgSO₄, and evaporated under vacuum. the crude was used as such for the next reaction (6.3 g, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.33 (s, 1H), 7.40 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.5, 0.5 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 8.1, 0.5 Hz, 1H), 1.74 (s, 6H);

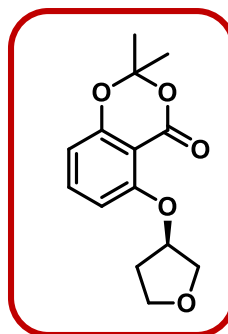
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 165.5, 161.4, 155.6, 138.0, 110.8, 107.3, 107.1, 99.3, 25.7 (2C);

IR (neat, cm⁻¹): 3209, 2996, 1687, 1199, 1073;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶¹

2,2-dimethyl-5-[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]-2,4-dihydro-1,3-benzodioxin-4-one (12)Chemical Formula: C₁₄H₁₆O₅

Molecular Weight: 264,28



To a stirred solution of 5-hydroxy-2,2-dimethyl-2,4-dihydro-1,3-benzodioxin-4-one **11** (1.0 g, 5.15 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (10 mL) was added PPh₃ (1.7 g, 6.44 mmol, 1.5 eq.) and DEAD (1.0 mL, 6.44 mmol, 1.5 eq.) under nitrogen at 0°C. The resulting mixture was stirred for 15 min then (*S*)-tetrahydrofuran-3-ol (347 μL, 4.29 mmol, 1.0 eq.) was added and stirred at rt for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by chromatography on silica gel column with PE/EtOAc (from 95/5 to 50/50). The pure compound was obtained as a colorless oil (1.1 g, quantitative yield).

Spectral and analytical data

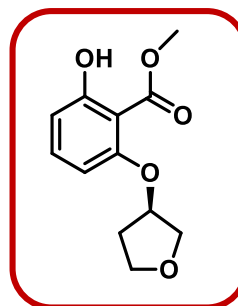
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.41 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.99 (m, 1H), 4.14 – 3.98 (m, 4H), 2.27 (m, 2H), 1.69 (s, 6H).

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁶

Methyl 2-hydroxy-6-[(3R)-oxolan-3-yloxy]benzoate (13)

Chemical Formula: C₁₂H₁₄O₅

Molecular Weight: 238,24



K₂CO₃ (1.72 g, 12.5 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of 2,2-dimethyl-5-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-2,4-dihydro-1,3-benzodioxin-4-one **12** (1.1 g, 4.2 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of MeOH. The mixture was stirred at rt for 2 h, and then concentrated under vacuum. The residue was dissolved in EtOAc and washed with NH₄Cl aq. solution. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to afford the crude which was purified by chromatography on silica gel column with PE/EtOAc (80/20 isocratic gradient). The pure compound was obtained as a colorless oil (910 mg, 91% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.47 (s, 1H), 7.31 (t, *J* = 8.4 Hz 1H), 6.61 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 4.96 (dq, *J* = 7.2, 2.4 Hz, 1H), 3.99 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 2.21 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 171.6, 163.8, 158.8, 135.0, 110.4, 104.3, 104.1, 78.6, 73.1, 67.4, 52.4, 33.4.

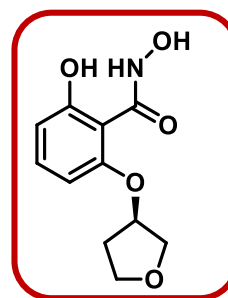
MS *m/z* [M+H+Na]⁺: 260.92.

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁶

N,2-dihydroxy-6-[(3R)-oxolan-3-yloxy]benzamide (14)

Chemical Formula: C₁₁H₁₃NO₅

Molecular Weight: 239,23



K₂CO₃ (1.57 g, 11.3 mmol, 3.0 eq.) was added portionwisely to a solution of hydroxylamine HCl (394 mg, 5.67 mmol, 1.5 eq.) in 10 mL of water at 0°C. After stirring for 30 min, a solution of 2,2-dimethyl-5-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-2,4-dihydro-1,3-benzodioxin-4-one (12) (900 mg, 3.78 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL of MeOH was added and the mixture was stirred at 50°C for 30 h. Solvent was removed from the cooled reaction mixture under vacuum and the resulting aqueous layer was acidified with HCl 2N. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc and then the combine organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to afford the product as a light yellow solid. (406 mg, 45% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 12.81 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 7.27 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.09 (m, 1H), 4.08 (m, 2H), 3.93 (m, 2H), 2.37 – 2.12 (m, 2H);

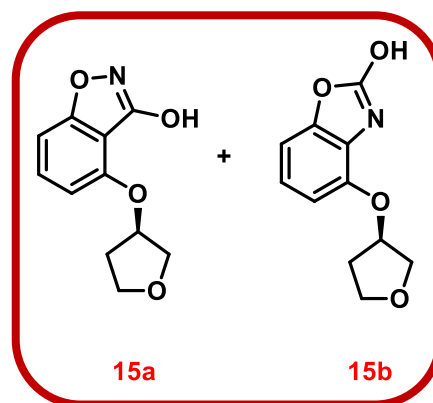
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.8, 163.8, 155.8, 133.7, 112.1, 103.3, 102.5, 79.4, 72.9, 66.9, 32.6;

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁶

[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]-1,3-benzoxazol-2-ol (15a); N,2-dihydroxy-6-[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]benzamide (15b)

Chemical Formula: C₁₁H₁₁NO₄

Molecular Weight: 221,21



To a solution of *N*,2-dihydroxy-6-[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]benzamide **14** (400 mg, 1.67 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (10 mL) was added CDI (542 mg, 3.35 mmol, 2.0 eq.) portionwisely, The resulting mixture was stirred at reflux for 16 h. After the mixture was cooled to rt, HCl 2N was added and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were then washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated to afford the mixture (50/50 according to NMR) as a slightly yellow oil (350 mg, 94% isolated yield).

Spectral and analytical data

MS *m/z* [M+H]⁺: 222.2

[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]-1,3-benzoxazol-2-ol (15a)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 3.89 (m, 4H), 2.20 (m, 2H).

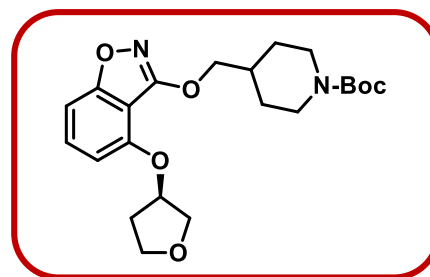
N,2-dihydroxy-6-[(3*R*)-oxolan-3-yloxy]benzamide (15b)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.99 (m, 1H), 6.85 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.66 (d, *J* = 7.6, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.01 (m, 4H), 2.20 (m, 2H).

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁶

Tert-butyl 4-[(4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy)methyl]piperidine-1-carboxylate (16)Chemical Formula: C₂₂H₃₀N₂O₆

Molecular Weight: 418,49



To a stirred solution of *tert*-butyl 4-(hydroxymethyl)piperidine-1-carboxylate **5** (408 mg, 1.89 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (30 mL) were added PPh₃ (830 mg, 3.16 mmol, 2.0 eq.) and DEAD (500 μL, 3.16 mmol, 2.0 eq.), under nitrogen at 0°C. The resulting mixture was stirred for 15 min then [(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,3-benzoxazol-2-ol **15a**; *N*,2-dihydroxy-6-[(3R)-oxolan-3-yloxy]benzamide **15b** (350 mg, 1.58 mmol, 1.0 eq.) was added and stirred at reflux for 16 h. After cooling to rt, the mixture was concentrated under vacuum, and the crude was purified by chromatography on neutral alumina column with DCM (100% isocratic gradient). The pure compound was obtained as a colorless oil that crystalized (180 g, 27% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 4.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.09 – 3.90 (m, 4H), 2.76 (s, 2H), 2.23 (m, 2H), 2.07 (m, 1H), 1.82 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.32 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.2, 166.1, 154.8, 152.7, 131.8, 105.3, 105.1, 103.2, 79.4, 78.5, 74.2, 72.9 (2C), 67.2, 47.3 (2C), 35.9, 33.2, 28.7 (2C), 28.6 (3C);

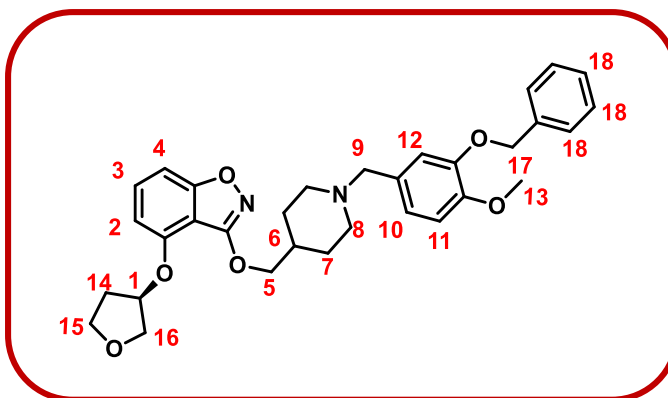
MS *m/z* [M+H]⁺: 419.65

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁶

3-[(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methoxy]-4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazole (17)

Chemical Formula: C₃₂H₃₆N₂O₆

Molecular Weight: 544,65



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[(4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy)methyl]piperidine-1-carboxylate **16** (150 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) and 2-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (133 mg, 0.43 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 4 h in DCM. The solvent was removed under vacuum, then a purification by chromatography on silica gel column was directly performed (DCM/MeOH gradient 100/0 to 95/5), the compound was obtained as a yellow oil (120 mg, 61% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.49 – 7.26 (m, 6H, H₃ and H₁₈), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.95 (s, 1H, H₁₂), 6.88 – 6.81 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂), 5.18 (s, 2H, H₁₇), 5.04 (dq, *J* = 7.1, 2.4 Hz, 1H, H₁), 4.24 (dd, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 2H, H₅), 4.12 – 3.92 (m, 4H, H₁₄ and H₁₅), 3.88 (s, 3H, H₁₃), 3.47 (s, 2H, H₉), 2.89 (m, 2H, H₇), 2.22 (m, 2H, H₁₆), 1.98 (m, 2H, H₇), 1.90 (m, 1H, H₆), 1.81 (m, 2H, H₈), 1.46 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.2, 152.9, 149.1, 148.0, 137.3, 131.8, 130.4 (Determined by HMBC) 128.6 (2C), 127.9, 127.5 (2C), 122.2, 115.5, 111.5, 105.5, 105.3, 103.4, 78.6, 74.4, 73.0, 71.0, 67.3, 62.8, 56.2, 52.9 (2C), 35.6, 33.3, 28.5 (2C);

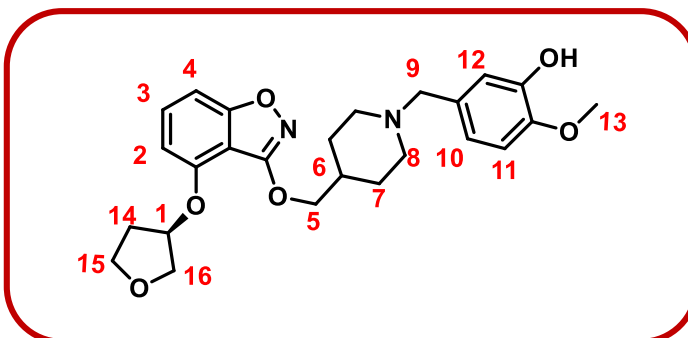
MS *m/z* [M+H]⁺: 545.72;

IR (neat, cm⁻¹): 3434, 2937, 2867, 2804, 2752, 1612, 1532, 1428, 1102;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₂H₃₇N₂O₆ [M+H]⁺ 545.2652, found 545.2656.

2-methoxy-5-((4-((3-(3R)-oxolan-3-yloxy)-1,2-benzoxazol-3-yl)oxy)methyl)piperidin-1-yl)methyl)phenol (17a)Chemical Formula: C₂₅H₃₀N₂O₆

Molecular Weight: 454,52



From general procedure **B** with 3-[(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methoxy]-4-[(3R)-oxolan-3-yloxy]-1,2-benzoxazole **17** (200 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq.) to afford the compound as light yellow oil (base : 131 mg, isolated yield 76%). Then the pure compound was solubilized in *i*-PrOH, and fumaric acid (66.9 mg, 0.58 mmol, 2.0 eq.) was added, the solution was heated with a heat gun for 1 min then, stirred at rt. After 1h, the suspension was filtered over vacuum and final salt was obtained as white powder (61 mg, 28% isolated yield over two steps).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, DMSO) Fumarate salt δ = 7.51 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H₁₀), 6.84 (br s, 1H, H₁₂), 6.81 – 6.72 (m, 2H, H₂ and H₁₁), 6.59 (s, 2H, H_{fumaric}), 5.16 (m, 1H, H₁), 4.20 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H₅), 3.93 (dd, J = 10.3, 4.5 Hz, 1H, H₁₄), 3.81 (m, 3H, H₁₄ and H₁₅), 3.77 – 3.70 (m, 5H, H₁₃ and H₉), 3.09 (br d, J = 10.7 Hz, 2H, H₇), 2.45 (m, 2H, H₁₆), 2.33 – 2.17 (m, 1H, H₆), 2.06 – 1.90 (m, 2H, H₇), 1.84 (br d, J = 12.1 Hz, 2H, H₈), 1.49 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) Fumarate salt δ = 166.5 (2C Fumarate), 165.7, 165.4, 152.4, 147.7, 146.4, 134.3 (2C Fumarate), 132.7, 126.2, 121.1, 117.3, 111.9, 106.2, 104.1, 102.7, 78.4, 73.3, 72.2, 66.5, 60.1, 55.6, 51.2 (2C), 34.0, 32.6, 26.3 (2C);

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.38 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.95 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H₁₂), 6.82 – 6.73 (m, 2H, H₁₁ and H₁₀), 6.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H₂), 5.13 – 4.97 (m, 1H, H₁), 4.25 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H₅), 4.12 – 3.92 (m, 4H, H₁₄ and H₁₅), 3.87 (s, 3H, H₁₃), 3.43 (s, 2H, H₉), 2.93 (br d, J = 11.4 Hz, 2H, H₇), 2.23 (m, 2H, H₁₆), 2.00 (br t, J = 11.7 Hz, 2H, H₇), 1.88 (m, 1H, H₆), 1.78 (br d, J = 11.8 Hz, 2H, H₈), 1.54 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.1, 152.9, 145.9, 145.6, 131.9, 131.8, 120.5, 115.5, 110.5, 105.4, 105.3, 103.3, 78.6, 74.5, 73.1, 67.4, 62.7, 56.1, 53.3 (2C), 35.8, 33.3, 28.8 (2C);

MS m/z [M+H]⁺: 455.8;

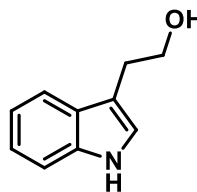
IR (neat, cm⁻¹): 3387, 2938, 2879, 2804, 2763, 1613, 1524;

Mp: 112-115°C

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₂₅H₃₁N₂O₆ [M+H]⁺ 455.2182, found 455.2184.

2-(1*H*-indol-3-yl)ethan-1-ol (19a)Chemical Formula: C₁₀H₁₁NO

Molecular Weight: 161.20



To a stirred solution of 3-indole acetic acid (1.0 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.) in Et₂O (200 mL) was added LiAlH₄ (650 mg, 17.1 mmol, 3.0 eq.) dropwisely at 0°C. After 15 min, the resulting mixture was refluxed for 3h at 40°C. Then, the mixture was cooled to 0°C and the reaction was slowly quenched with 6.5 μL of water, 6.5 μL of 15 % NaOH solution followed by 1.95 mL of water according to the Fieser method. Salt were then removed by filtration and filtrate was evaporated under vacuum to afford the product as an orange oil that was used as such for next reaction. (920 mg, quantitative yield)

Spectral and analytical data

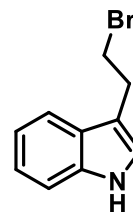
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.05 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.14 (ddd, *J* = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, 1H), 7.10 (m, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.05 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 136.6, 127.5, 122.6, 122.4, 119.6, 119.0, 112.4, 111.3, 62.7, 28.9.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶²

3-(2-bromoethyl)-1H-indole (20a)Chemical Formula: C₁₀H₁₀BrN

Molecular Weight: 224.10



2-(1H-indol-3-yl)ethan-1-ol **19a** (300 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in Et₂O (10 ml) and the solution cooled to 0 °C. PBr₃ (192 μM, 2.05 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise. The mixture was then stirred at 0 °C for 1 h before the reaction was quenched with water. The product was extracted from the aqueous phase with DCM, the organic phase dried with MgSO₄ and the solvent evaporated *under vacuum*. The compound, a brown oil, was used as such in the next reaction.

Spectral and analytical data

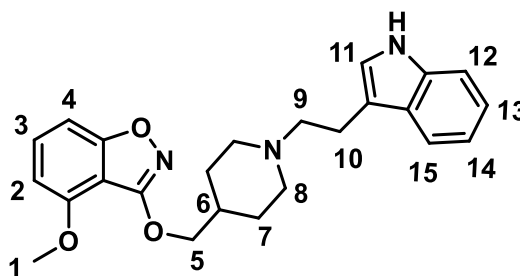
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.05 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 3.63 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 136.4, 127.2, 122.4, 122.3, 119.6, 119.0, 113.7, 111.3, 33.0, 28.9.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶³

3-({1-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]piperidin-4-yl}methoxy)-4-methoxy-1,2-benzoxazole (21)Chemical Formula: C₂₄H₂₇N₃O₃

Molecular Weight: 405,50



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-[[4-methoxy-1,2-benzoxazol-3-yl]oxy]methyl]piperidine-1-carboxylate **6** (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) and 3-(2-bromoethyl)-1*H*-indole **20a** (74 mg, 0.33 mmol, 1.2 eq.), the reaction was stirred at rt for 19 h in ACN. The solvent was removed *under vacuum* then solubilized in water, the latter suspension was extracted with EtOAc three times and washed with brine. The combined organic fraction was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A purification by chromatography on silica gel column was thus performed (DCM/MeOH gradient 100/0 to 90/10), the compound was dissolved in Et₂O and evaporated to give a yellow powder (49 mg, 43% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.06 (s, 1H, NH), 7.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₅), 7.42 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₄), 7.12 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₃), 7.04 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₁), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 6.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 4.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₅), 3.95 (s, 3H, H₁), 3.15 (m, 2H, H₈), 3.01 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₉), 2.74 (m, 2H, H₁₀), 2.14 (m, 2H, H₈), 2.04 (m, 1H, H₆), 1.94 (br d, *J* = 12.5 Hz, 2H, H₇), 1.54 (br qd, *J* = 12.5, 4.0 Hz, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.4, 166.1, 155.1, 136.3, 132.0, 127.6, 122.1, 121.6, 119.4, 119.0, 114.5, 111.2, 104.4, 103.3, 103.0, 74.9, 59.7, 56.1, 53.4 (2C), 35.5, 28.8 (2C), 23.0;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 406.84;

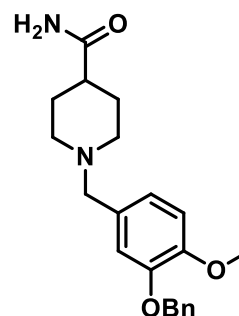
IR (neat, cm⁻¹) : 3416, 2930, 2851, 2809, 1612, 1532, 1428, 1102;

Mp: 105 - 108°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₂₈N₃O₃ [M+H]⁺ 406.2131, found 406.2130.

1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxamide (26)

Chemical Formula: C₂₁H₂₆N₂O₃
 Molecular Weight: 354.45



Following general procedure **D**, starting from piperidine-4-carboxamide **24** (409 mg, 3.19 mmol, 1.0 eq.). The crude was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). to give the compound as a white solid (658 mg, 61% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.44 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.29 (dd, *J* = 5.9, 3.7 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.85 – 6.77 (m, 2H), 5.39 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 2.83 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.12 (m, 1H), 1.90 (br t, *J* = 11.5 Hz, 2H), 1.81 (br d, *J* = 12.2 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 177.4, 148.7, 147.8, 137.2, 130.9, 128.5 (2C), 127.7, 127.4 (2C), 121.7, 114.9, 111.4, 70.9, 62.6, 56.1, 52.8(2C), 42.8, 28.9 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 355.60;

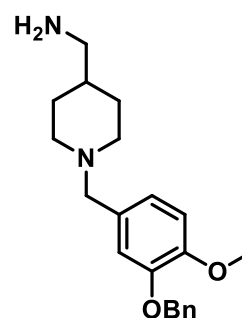
IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

Mp: 110°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₇N₂O₃ [M+H]⁺ *in progress*.

(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine (27)Chemical Formula: C₂₁H₂₈N₂O₂

Molecular Weight: 340.47



1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxamide **26** (200 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF (5 ml) at 0 °C under nitrogen. To the stirred solution; LiAlH₄ (65 mg, 1.69 mmol, 3.0 eq.) was added in small portions and the reaction mixture heated under reflux for 3 h. The reaction was quenched according to the Fieser method, using water and NaOH (aq., 15 %), before anhydrous MgSO₄ was added. The salts were removed by filtration. The product as a colorless oil was used as such for next reactions (190 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.28 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.82 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 2.80 (br d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.30 – 1.09 (m, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 148.7, 147.8, 137.3, 131.0, 128.5 (2C), 127.7, 127.4 (2C), 121.9, 115.2, 111.4, 70.9, 63.0, 56.0, 53.4 (2C), 48.2, 39.3, 29.9 (2C);

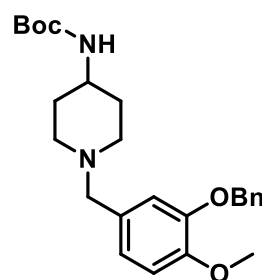
MS *m/z* [M+H]⁺ : 341.42;

IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₉N₂O₂ [M+H]⁺ *in progress*.

tert-butyl (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)carbamate (28)Chemical Formula: C₂₅H₃₄N₂O₄

Molecular Weight: 426,56



Following **General Procedure D**, starting from *tert*-butyl piperidin-4-ylcarbamate **25** (1.0 g, 4.95 mmol, 1.0 eq.). The crude was purified by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). Concentration of the product under vacuum afforded a colorless oil that crystallised at rt, forming a white solid. (1.28 g, 61% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.84 – 6.76 (m, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.44 (br s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.36 (s, 2H), 2.69 (br d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 1.98 (br t, *J* = 11.1 Hz, 2H), 1.86 (br d, *J* = 15.7 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.35 (m, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 155.2, 148.8, 147.8, 137.2, 130.7, 128.5 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 121.9, 115.2, 111.4, 79.2, 70.9, 62.6, 56.0, 52.1 (2C), 47.7, 32.5 (2C), 28.4 (3C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 427.60;

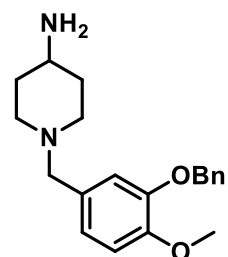
Mp: 97°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₅H₃₅N₂O₄ [M+H]⁺ *in progress*.

1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-amine (29)

Chemical Formula: C₂₀H₂₆N₂O₂

Molecular Weight: 326.44



tert-butyl (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)carbamate **28** (200 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (4 ml). TFA (1ml) was added dropwisely and the reaction mixture was stirred at rt for 3 h. After that, the solvent and TFA were evaporated under vacuum, yielding the deprotected amine (155 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.14 (br s, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.34 – 7.24 (m, 3H), 6.91 – 6.83 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 3.97 (br s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.45 – 3.20 (m, 3H), 2.72 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 2.04 (m, 2H);

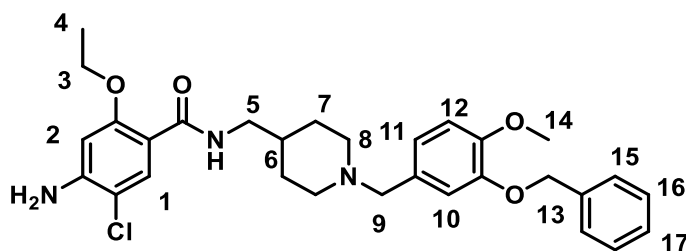
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 148.1, 136.4, 128.6 (2C), 128.1, 127.5 (2C), 124.6, 119.3, 116.3, 114.2, 112.0, 70.8, 60.9, 55.8 (2C), 50.1, 45.9, 26.7 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 327.60;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₇N₂O₂ [M+H]⁺ *in progress*.

4-amino-N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-5-chloro-2ethoxybenzamide (32)Chemical Formula: C₃₀H₃₆ClN₃O₄

Molecular Weight: 538.09



Following **general procedure C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (191 mg, 0.56 mmol, 1.2 eq.) and 4-amino-5-chloro-2-ethoxybenzoic acid (100 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). Pure compound was obtained as a white powder (243 mg, 96% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.11 (s, 1H, H₁), 7.90 (br t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₁₅), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁₆), 7.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁₇), 6.92 (s, 1H, H₁₀), 6.88 – 6.76 (m, 2H, H₁₂ and H₁₁), 6.26 (s, 1H, H₂), 5.17 (s, 2H, H₁₃), 4.35 (br s, 2H, NH₂), 4.08 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₃), 3.87 (s, 3H, H₁₄), 3.42 (s, 2H, H₉), 3.31 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₅), 2.84 (m, 2H, H₈), 1.91 (m, 2H, H₈), 1.70 (m, 2H, H₇), 1.55 (m, 1H, H₆), 1.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₄), 1.34 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.7, 156.9, 149.0, 147.9, 146.6, 137.3, 133.2, 130.0, 128.6 (2C), 127.9, 127.5 (2C), 122.2, 115.4, 112.8, 111.7, 111.5, 98.7, 71.0, 64.9, 62.8, 56.2, 53.2 (2C), 45.3, 36.0, 30.0 (2C), 15.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 539.88;

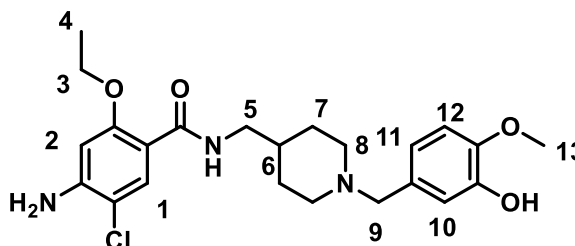
IR (neat, cm⁻¹): 3449, 3403, 3356, 2928, 2794, 1640, 1515, 1253;

Mp: 161 °C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₇ClN₃O₄ [M+H]⁺ 539.2473, found 539.2466.

4-amino-5-chloro-2-ethoxy-N-((1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-benzamide (32a)Chemical Formula: C₂₃H₃₀ClN₃O₄

Molecular Weight: 447.96



Following general procedure **B**, starting from 4-amino-*N*-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-5-chloro-2-ethoxybenzamide **32** (200 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (134 mg, 80 % isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.10 (s, 1H, H₁), 7.90 (br t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H₁₀), 6.80 – 6.77 (m, 2H, H₁₁ and H₁₂), 6.26 (s, 1H, H₂), 4.35 (br s, 2H, NH₂), 4.08 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₃), 3.87 (s, 3H, H₁₃), 3.40 (s, 2H, H₉), 3.31 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₅), 2.89 (m, 2H, H₈), 1.95 (m, 2H, H₈), 1.70 (m, 2H, H₇), 1.55 (m, 1H, H₆), 1.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₄), 1.35 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.7, 156.9, 146.5, 145.8, 145.4, 133.2, 131.4, 120.8, 115.7, 112.9, 111.7, 110.4, 98.7, 64.9, 62.9, 56.1, 53.3 (2C), 45.3, 36.1, 30.1 (2C), 15.1;

MS *m/z* [M+H]⁺: 449.91;

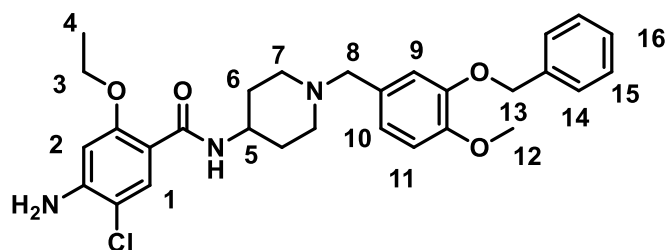
IR (neat, cm⁻¹): 3449, 3403, 3356, 2928, 2794, 1640, 1515, 1253;

Mp: 105°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₃₁ClN₃O₄ [M+H]⁺ 448.2003, found 448.2001.

4-amino-N-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-5-chloro-2-ethoxybenzamide (33)Chemical Formula: C₂₉H₃₄ClN₃O₄

Molecular Weight: 524.06



Following general procedure **C**, starting from 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-amine **29** (153 mg, 0.47 mmol, 1.2 eq.) and 4-amino-5-chloro-2-ethoxybenzoic acid (84 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). Pure compound was obtained as a white powder (183 mg, 89% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.09 (s, 1H, H₁), 7.83 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.44 (m, 2H, H₁₄), 7.35 (m, 2H, H₁₅), 7.29 (m, 1H, H₁₆), 6.90 (s, 1H, H₉), 6.86 - 6.82 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.26 (s, 1H, H₂), 5.17 (s, 2H, H₁₃), 4.33 (br s, 2H, NH₂), 4.08 (q, *J* = 6.9 Hz, H₃), 3.96 (m, 1H, H₅), 3.85 (s, 3H, H₁₂), 3.42 (s, 2H, H₈), 2.72 (m, 2H, H₇), 2.12 (m, 2H, H₇), 1.98 (m, 2H, H₆), 1.51 - 1.47 (m, 5H, H₆ and H₄);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.7, 156.8, 148.9, 147.7, 146.5, 137.2, 133.0, 130.2, 128.5 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 122.1, 115.4, 112.7, 111.6, 111.4, 98.6, 70.9, 64.9, 62.7, 56.0, 51.9 (2C), 46.3, 32.2 (2C), 15.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 525.85;

IR (neat, cm⁻¹): 3463, 3386, 3202, 2933, 2802, 1635, 1592, 1254;

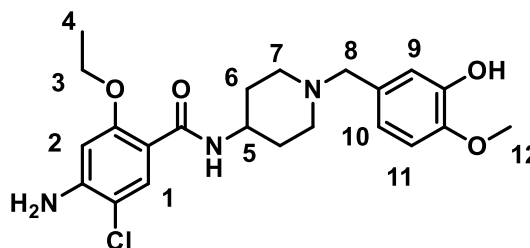
Mp: 155 °C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₇ClN₃O₄ [M+H]⁺ 524.2316, found 524.2311.

4-amino-5-chloro-2-ethoxy-N-(1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)benzamide (33a)

Chemical Formula: C₂₂H₂₈ClN₃O₄

Molecular Weight: 433.93



Following general procedure **B**, starting from 4-amino-*N*-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-5-chloro-2-ethoxybenzamide **33** (142 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (78 mg, 66% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.06 (s, 1H, H₁), 7.85 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H₉), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.24 (s, 1H, H₂), 4.44 (s, 2H, NH₂), 4.03 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₃), 3.96 (m, 1H, H₅), 3.85 (s, 3H, H₁₂), 3.40 (s, 2H, H₈), 2.78 (m, 2H, H₇), 2.15 (m, 2H, H₇), 1.98 (m, 2H, H₆), 1.53 (m, 2H, H₇), 1.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H₄);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.9, 157.0, 146.7, 146.0, 145.6, 133.0, 131.3, 120.8, 115.8, 112.6, 111.6, 110.5, 98.7, 65.0, 62.8, 56.0, 52.1 (2C), 46.5, 32.3 (2C), 15.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 434.93;

IR (neat, cm⁻¹): 3470, 3380, 3206, 2935, 2935, 1630, 1591, 1250, 1027;

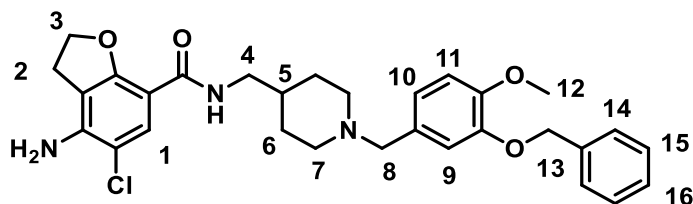
Mp: 106 °C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₉ClN₃O₄ [M+H]⁺ 434.1847, found 434.1845.

4-amino-N-[(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)methyl]-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide (35)

Chemical Formula: C₃₀H₃₄ClN₃O₄

Molecular Weight: 536,07



Following general procedure **C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (191 mg, 0.56 mmol, 1.2 eq.) and 4-amino-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxylic acid (100 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 90/10/1). Pure compound was obtained as a white powder (202 mg, 80% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.84 (s, 1H, H₁), 7.40 – 7.37 (m, 3H, H₁₄ and NH), 7.33 (m, 2H, H₁₅), 7.26 (m, 1H, H₁₆), 6.91 (s, 1H, H₉), 6.82 – 6.80 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 5.15 (s, 2H, H₁₃), 4.74 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃), 4.29 (br s, 2H, NH₂), 3.86 (s, 3H, H₁₂), 3.43 (s, 2H, H₈), 3.29 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₄), 3.02 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂), 2.82 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₇), 1.89 (br t, *J* = 10.9 Hz, 2H, H₇), 1.69 (m, 2H, H₆), 1.55 (m, 1H, H₅), 1.30 (m, 2H, H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.0, 157.1, 148.8, 147.7, 142.3, 137.1 (2C), 130.0, 128.5 (2C), 127.7, 127.4 (2C), 122.1, 115.4, 112.0, 111.4, 110.8, 107.3, 72.9, 70.9, 62.7, 56.0, 53.0 (2C), 44.9, 36.0, 29.7 (2C), 27.1;

MS *m/z* [M+H]⁺: 537.86;

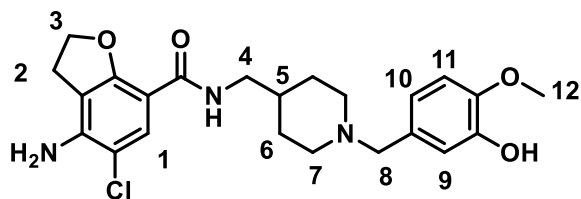
IR (neat, cm⁻¹): 3466, 3404, 3339, 2920, 2800, 1624, 1513, 1256;

Mp: 112-114 °C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₅ClN₃O₄ [M+H]⁺ 536.2316, found 536.2314.

4-amino-5-chloro-N-([1-([3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide (35a)Chemical Formula: C₂₃H₂₈ClN₃O₄

Molecular Weight: 445,94



Following general procedure **B**, starting from 4-amino-*N*-[([1-([3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide **35** (170 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 90/10/1). The pure product was obtained as a white solid (100 mg, 70 % isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.82 (s, 1H, H₁), 7.39 (br t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 6.86 (s, 1H, H₉), 6.77–6.74 (s, 2H, H₁₀ and H₁₁), 4.73 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃), 4.31 (s, 2H, NH₂), 3.83 (s, 3H, H₁₂), 3.39 (s, 2H, H₈), 3.28 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₄), 3.02 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂), 2.88 (br d, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₇), 1.92 (br t, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₇), 1.67 (br d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₆), 1.56 (m, 1H, H₅), 1.31 (br d, *J* = 12.2 Hz, 2H, H₆).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.1, 157.2, 145.9, 145.5, 142.3, 130.9, 129.9, 120.8, 115.9, 111.9, 110.9, 110.4, 107.2, 72.9, 62.7, 55.9, 53.1(2C), 45.0, 36.1, 29.8 (2C), 27.1.

MS *m/z* [M+H]⁺: 446.86;

IR (neat, cm⁻¹): 3472, 3399, 3208, 2923, 1623, 1547, 1277, 732;

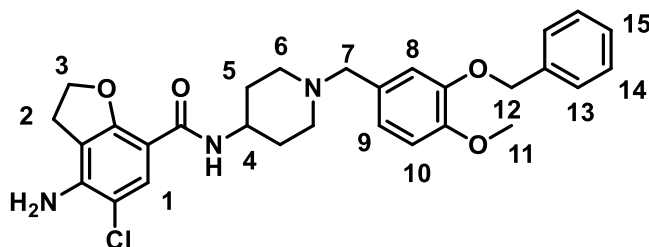
Mp: 102°C

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₉ClN₃O₄ [M+H]⁺ 446.1847, found 446.1842.

4-amino-N-(1-{[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl}piperidin-4-yl)-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide (36)

Chemical Formula: C₂₉H₃₂ClN₃O₄

Molecular Weight: 522,04



Following general procedure **C**, starting from 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-amine **29** (114 mg, 0.35 mmol, 1.2 eq.) and 4-amino-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxylic acid (63 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). Pure compound was obtained as a yellowish oil (120 mg, 79% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.80 (s, 1H, H₁), 7.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₁₃), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₁₄), 7.31 – 7.26 (m, 1H, H₁₅), 6.96 (s, 1H, H₈), 6.87– 6.85 (m, 2H, H₉ and H₁₀), 5.16 (s, 2H, H₁₂), 4.76 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃), 4.31 (br s, 2H, NH₂), 4.11 – 3.99 (m, 1H, H₄), 3.91 (s, 2H, H₇), 3.89 (s, 3H, H₁₁), 3.23 (m, 2H, H₆), 3.04 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂), 2.48 (m, 2H, H₆), 2.05 (br d, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₅), 1.87 (br d, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₅);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.5, 157.3, 150.6, 148.0, 142.6, 136.7 (2C), 129.9, 128.6 (2C), 127.9, 127.4 (2C), 123.9, 116.1, 112.0, 111.6, 110.9, 106.6, 73.1, 70.7, 60.9, 56.0 (2C), 51.0, 29.7 (2C), 27.0;

MS *m/z* [M+H]⁺: 523.74;

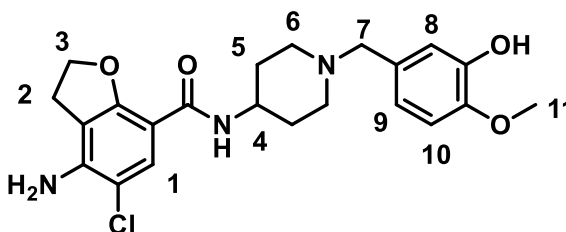
IR (neat, cm⁻¹): 3453, 3388, 3217, 2941, 1678, 1625, 1618, 1518, 1487, 1262, 1199, 728;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₃ClN₃O₄ [M+H]⁺ 522.2160, found 522.2160.

4-amino-5-chloro-N-{1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl}-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide (36a)

Chemical Formula: C₂₂H₂₆ClN₃O₄

Molecular Weight: 431,92



Following general procedure **B**, starting from 4-amino-N-(1-[(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)-5-chloro-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-carboxamide **36** (100 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (70 mg, 85% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.83 (s, 1H, H₁), 7.27 (br s, 1H, NH), 6.92 (s, 1H, H₈), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 4.75 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃), 4.27 (br s, 2H, NH₂), 4.00 (m, 1H, H₄), 3.86 (s, 3H, H₁₁), 3.46 (s, 2H, H₇), 3.04 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂), 2.85 (br d, *J* = 11.0 Hz, 2H, H₆), 2.17 (m, 2H, H₆), 2.95 (m, 2H, H₅), 1.60 (m, 2H, H₅);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.2, 157.2, 146.0, 145.5, 142.3, 130.5, 130.0, 121.0, 115.7, 112.0, 110.9, 110.4, 107.4, 72.9, 62.5, 56.0, 52.0 (2C), 46.1, 32.0 (2C), 27.1;

MS *m/z* [M+H]⁺: 432.92;

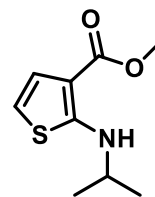
IR (neat, cm⁻¹): 3380, 3213, 2931, 2834, 1623, 1548, 1428, 1250, 1131;

Mp: 115 °C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇ClN₃O₄ [M+H]⁺ 432.2843, found 432.2841.

Methyl 2-[(propan-2-yl)amino]thiophene-3-carboxylate (38)Chemical Formula: C₉H₁₃NO₂S

Molecular Weight: 199,27



To a solution of commercial methyl 2-aminothiophene-3-carboxylate **37** (500 mg, 3.17 mmol, 1.0 eq.) in DCM (25 mL), glacial AcOH (365 μ L, 6.32 mmol, 2.0 eq.) and one drop of TFA, were added isobutyraldehyde (1.2 mL, 9.49 mmol, 3.0 eq.) and NaBH(OAc)₃ (1.0 g, 4.74 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred for 10 h at -15°C and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in EtOAc, washed with aqueous NaHCO₃ solution and with water, dried over MgSO₄ and concentrated. The residual oil was purified by flash chromatography on a silica gel column with cHex/EtOAc (from 100/0 to 50/50). The compound was isolated as a colorless oil (420 mg, 65% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.36 (br d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.15 (dd, *J* = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.50 (m, 1H), 1.30 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H);

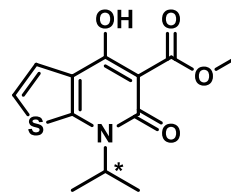
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.3, 164.6, 126.0, 105.5, 103.1, 50.8, 49.6, 22.7 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺: 200.35;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁴

methyl 4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxylate (39)Chemical Formula: C₁₂H₁₃NO₄S

Molecular Weight: 267,30



To a solution of Methyl 2-[(propan-2-yl)amino]thiophene-3-carboxylate **38** (265 mg, 1.33 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) at 0° C. were added TEA (560 μL, 3.99 mmol, 3.0 eq.) followed by ethyl 3-chloro-3-oxopropionate (256 μL, 1.99 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was warmed to rt, stirred for 16 h, concentrated under vacuum and dissolved in EtOAc. This solution was washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford a dark red oily residue. To a solution of this residue in MeOH (10 mL) at rt were added freshly cut pieces of Na metal (45 mg, 2.33 mmol, 2.0 eq.) in portions so as to allow for a gentle reflux. After the addition was complete, the reaction mixture was heated at reflux for 16 h, cooled to rt and concentrated. The residue was dissolved in water; the resulting solution was washed with DCM, acidified with concentrated HCl 1N and extracted three times with EtOAc. The extract was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The residual solid was purified by flash chromatography on a silica gel column with cHex/EtOAc (from 100/0 to 50/50). The compound was isolated as a colorless oil (175 mg, 49% yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 100°C) δ = 7.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.86 (m, 1H)*, 3.83 (s, 3H), 1.53 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO, 100°C) δ = 171.0, 165.7, 159.4, 152.1, 121.4, 117.6, 114.9, 98.8, 52.8*, 52.4, 19.2 (2C).

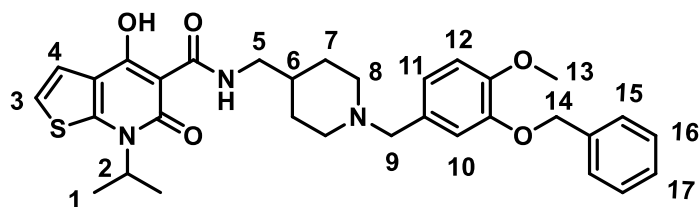
*proton and carbon are only observed at 110°C in DMSO

MS *m/z* [M+H]⁺: 268.52;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁵⁴

N-[(1-[(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (41)Chemical Formula: C₃₂H₃₇N₃O₅S

Molecular Weight: 575,72



A mixture of methyl 4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxylate **39** (100 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq.), (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (190 mg, 0.56 mmol, 1.5 eq.) and DIPEA (200 μ L, 1.2 mmol, 3.0 eq.) and toluene (1.5 mL) was heated at 100°C for 4 h and cooled to rt. Solvent was removed under reduced pressure; the crude residue was purified by flash chromatography on a silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The compound was isolated as a yellowish powder (180 mg, 82% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.32 (m, 2H, H₁₅), 7.27 – 7.19 (m, 3H, H₄ and H₁₆), 7.15 (m, 1H, H₁₇), 7.05 (d, J = 5.8 Hz, 1H, H₃), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H₁₀), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.75 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H₁₁), 5.02 (s, 2H, H₁₄), 3.74 (s, 3H, H₁₃), 3.36 (s, 2H, H₉), 3.22 (s, 2H, H₅), 2.74 (m, 2H, H₈), 1.91 (m, 2H, H₈), 1.63 (m, 2H, H₇), 1.53 (d, J = 6.9 Hz, 6H, H₁), 1.47 (m, 1H, H₆), 1.25 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 172.7, 170.8, 169.2, 164.4, 151.1, 149.3, 147.0, 138.8, 130.7 (2C), 129.4, 128.8, 128.7 (2C), 124.3, 122.2, 118.4, 118.3, 117.5, 113.7, 96.7, 72.5, 63.5, 56.8, 53.9 (2C), 45.0, 37.1, 30.5 (2C), 19.4 (2C).

Proton H₂ and C₂ not visible at rt on NMR.

MS m/z [M+H]⁺ : 576.82;

IR (neat, cm⁻¹) : 3432, 3214, 3089, 2927, 2750, 1646, 1549, 1512, 1256;

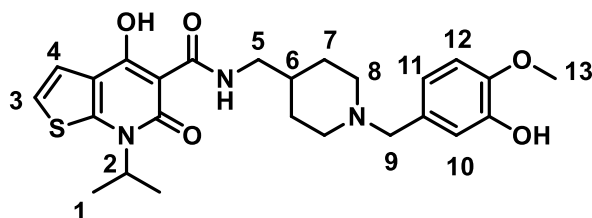
Mp: 104 - 107°C

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₃₂H₃₈N₃O₅S [M+H]⁺ 576.2532, found 576.2537.

4-hydroxy-N-({1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (41a)

Chemical Formula: C₂₅H₃₁N₃O₅S

Molecular Weight: 485,60



Following general procedure **B**, starting from *N*-[1-[(3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxamide **41** (150 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (110 mg, 87% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.31 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₄), 7.15 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H₃), 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₀), 6.80 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, H₁₁), 3.85 (s, 3H, H₁₃), 3.68 (s, 2H, H₉), 3.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₅), 3.12 (br d, *J* = 12.1 Hz, 2H, H₈), 2.37 (m, 2H, H₈), 1.83 (br d, *J* = 13.2 Hz, 2H, H₇), 1.73 (m, 1H, H₆), 1.61 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H₁), 1.45 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 172.7, 170.7, 164.3, 151.9, 149.3, 147.8, 128.0, 122.9, 122.1, 118.4, 118.3, 118.0, 112.7, 96.7, 62.9, 56.5, 53.7(2C), 44.6, 36.5, 29.6 (2C), 19.4 (2C);

Proton H₂ and C₂ not visible at rt on NMR.

MS *m/z* [M+H]⁺ : 486.82;

IR (neat, cm⁻¹) : 3417, 3237, 3097, 2932, 1615, 1549, 1444, 1277;

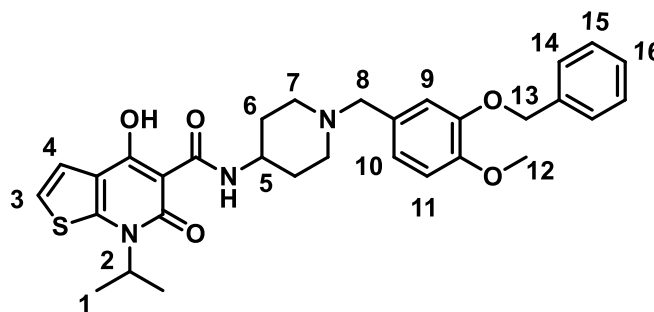
Mp: 103 - 105°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₅H₃₂N₃O₅S [M+H]⁺ 486.2063, found 486.2062.

N-(1-([3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl)piperidin-4-yl)-4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (42)

Chemical Formula: C₃₁H₃₅N₃O₅S

Molecular Weight: 561,70



A mixture of methyl 4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxylate (**39**) (150 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq.), 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-amine (**29**) (274 mg, 0.84 mmol, 1.5 eq.) and DIPEA (292 μ L, 1.68 mmol, 3.0 eq.) in toluene (2 mL) was heated at 100° C. for 2 h and cooled to rt. Solvent was removed under reduced pressure; the crude residue was purified by flash chromatography on a silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The compound was isolated as a yellowish powder (215 mg, 68% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 10.24 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.45 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H₁₄), 7.41 – 7.33 (m, 3H, H₄ and H₁₅), 7.30 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H₁₆), 6.97 – 6.88 (m, 2H, H₉ and H₃), 6.86 – 6.78 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 5.18 (s, 2H, H₁₃), 3.92 (m, 1H, H₅), 3.88 (s, 3H, H₁₂), 3.43 (s, 2H, H₈), 2.75 (br d, J = 10.6 Hz, 2H, H₇), 2.13 (m, 2H, H₇), 1.95 (br d, J = 10.5 Hz, 2H, H₆), 1.65 – 1.57 (m, 8H, H₆ and H₁).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 170.8, 169.9, 169.2, 162.9, 148.8, 147.8, 137.2, 130.8 (2C), 128.5, 127.8, 127.4 (2C), 121.7, 121.5, 117.1, 116.2, 115.0, 111.4, 95.6, 70.9, 62.4, 56.1, 51.8 (2C), 46.1, 31.8(2C), 19.1 (2C).

Proton H₂ and C₂ not visible at rt on NMR.

MS m/z [M+H]⁺ : 562.72;

IR (neat, cm⁻¹) : 3421, 3215, 3096, 2934, 2803, 1642, 1549, 1512, 1256;

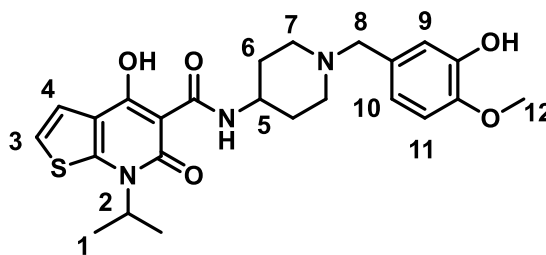
Mp: 101°C - 104°C

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₃₁H₃₆N₃O₅S [M+H]⁺ 562.2376, found 562.2374.

4-hydroxy-N-(1-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6H,7H-thieno[2,3-b]pyridine-5-carboxamide (42a)

Chemical Formula: C₂₄H₂₉N₃O₅S

Molecular Weight: 471,57



Following general procedure **B**, starting from *N*-(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)-4-hydroxy-6-oxo-7-(propan-2-yl)-6*H*,7*H*-thieno[2,3-*b*]pyridine-5-carboxamide **42** (175 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (90 mg, 61% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 10.25 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, NH), 7.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₄), 6.99 – 6.87 (m, 2H, H₃ and H₉), 6.87 – 6.75 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 4.05 – 3.92 (m, 1H, H₅), 3.88 (s, 3H, H₁₂), 3.46 (s, 2H, H₈), 2.83 (m, 2H, H₇), 2.24 (m, 2H, H₇), 2.01 (m, 2H, H₆), 1.72 (m, 2H, H₆), 1.62 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ = 170.9, 170.0, 169.3, 162.9, 145.8, 145.5, 131.6, 121.6, 120.6, 117.1, 116.0, 115.4, 110.5, 95.6, 62.4, 56.0, 51.8 (2C), 46.1, 31.8 (2C), 19.0 (2C);

Proton H₂ and C₂ not visible at rt on NMR.

MS *m/z* [M+H]⁺ : 472.79;

IR (neat, cm⁻¹) : 3428, 3212, 3097, 2976, 2803, 1643, 1544, 1512, 1256;

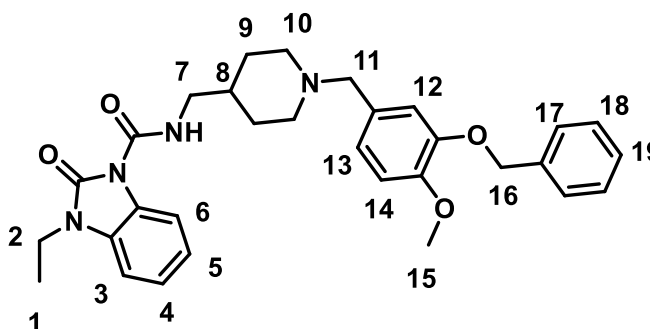
Mp: 115-117°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₀N₃O₅S [M+H]⁺ 472.1906, found 472.1906.

N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamide (44)

Chemical Formula: C₃₁H₃₆N₄O₄

Molecular Weight: 528,65



To a solution of 1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-one (126 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq.) in dry THF at 0°C was added NaH 60% portionwisely (47 mg, 1.17 mmol, 1.5 eq.), the mixture was stirred for 15 min. Then 4-nitrophenyl chloroformate (174 mg, 2.04 mmol, 1.1 eq.) was added and the latter mixture was stirred for 5 h at rt. 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene **3d** (280 mg, 0.81 mmol, 1.0 eq.) was added and the new mixture was stirred for 18 h. After filtration, and concentration under vacuum of the filtrate, the crude was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (255 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.87 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.23 (m, 1H, H₆), 7.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₁₇), 7.36 (m, 2H, H₁₈), 7.28 (m, 1H, H₁₉), 7.20 – 7.19 (m, 2H, H₄ and H₅), 7.02 (m, 1H, H₃), 6.92 (s, 1H, H₁₂), 6.85 – 6.82 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 5.17 (s, 2H, CH₂, H₁₆), 3.95 (qd, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂), 3.87 (s, 3H, H₁₅), 3.43 (s, 2H, H₁₁), 3.32 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₇), 2.85 (m, 2H, H₁₀), 1.91 (m, 2H, H₁₀), 1.72 (m, 2H, H₉), 1.61 (m, 1H, H₈), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁), 1.36 (m, 2H, H₉);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 153.0, 151.9, 148.8, 147.8, 137.2, 130.2, 128.5 (2C), 128.3, 127.8, 127.4 (2C), 126.8, 123.6, 122.7, 122.0, 115.4, 115.3, 111.4, 107.6, 70.9, 62.7, 56.1, 53.0 (2C), 45.3, 36.0, 36.0, 29.7 (2C), 13.2;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 529.96;

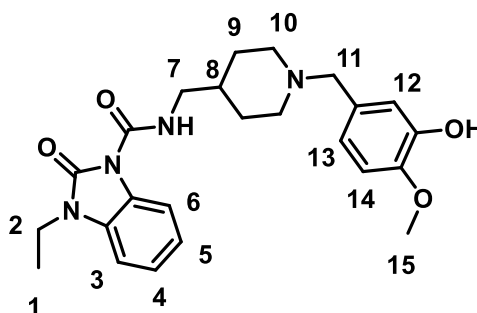
IR (neat, cm⁻¹) : 3299, 2933, 1731, 1690, 1545, 1513, 1487, 1380, 1257, 760;

Mp: 81 – 83°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₁H₃₇N₄O₄ [M+H]⁺ *in progress*.

3-ethyl-N-((1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamide (44a)

Chemical Formula: C₂₄H₃₀N₄O₄
Molecular Weight: 438,53



To a solution of *N*-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazole-1-carboxamide **44** (235 mg, 0.45 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (100 mL) was added Pd/C 5%. The mixture was stirred under H₂ for 18 h at rt. After filtration, the crude was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (100 mg, 51% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.85 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.19 (m, 1H, H₆), 7.27 – 7.19 (m, 2H, H₄ and H₅), 7.00 (m, 1H, H₃), 6.88 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₁₂), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H₁₃ and H₁₄), 3.92 (qd, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂), 3.83 (s, 3H, H₁₅), 3.46 (s, 2H, H₁₁), 3.30 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₇), 2.96 (m, 2H, H₁₀), 2.03 (m, 2H, H₁₀), 1.76 (m, 2H, H₉), 1.63 (m, 1H, H₈), 1.42 (m, 2H, H₉), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 153.0, 151.9, 146.2, 145.6, 129.9, 128.3, 126.7, 123.6, 122.7, 121.1, 116.1, 115.4, 110.5, 107.6, 62.5, 55.9, 52.9 (2C), 45.2, 36.0, 35.8, 29.4 (2C), 13.2;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 438.88;

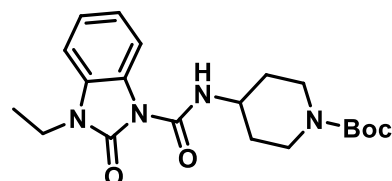
IR (neat, cm⁻¹) : 3300, 2934, 1731, 1687, 1546, 1510, 1487, 1383, 1277, 761;

Mp: 118 – 120°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₁N₄O₄ [M+H]⁺ 439.2345, found 439.2352

tert-butyl 4-(3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (52)Chemical Formula: C₂₀H₂₈N₄O₄

Molecular Weight: 388,47



1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-one (300 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq.) was added to a solution of NaH 60% (112 mg, 2.79 mmol, 1.5 eq.) in THF at 0°C for 15 min. Then 4-nitrophenyl chloroformate (413 mg, 2.04 mmol, 1.1 eq.) was added. After 18 h of stirring at rt, *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate **51** (391 mg, 1.96 mmol, 1.05 eq.) was added and the new mixture was stirred for 4 h. The reactional mixture was concentrated under vacuum and the residue was triturated in DCM. After filtration, the filtrate was purified by flash chromatography with DCM/EtOAc (gradient from 100/0 to 90/1). The pure product was obtained as a white solid (307 mg, 42% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 8.16 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 6.99 (m, 1H), 3.98 (m, 3H), 3.90 (qd, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.00 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 154.7, 153.0, 151.0, 128.3, 126.7, 123.7, 112.7, 115.3, 107.6, 79.7, 47.1, 42.4 (2C), 36.0, 31.8 (2C), 28.4 (3C), 13.2;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 388.96;

IR (neat, cm⁻¹) : 3288, 2976, 2936, 2858, 1732, 1693, 1617, 1542, 1487, 1424, 1381, 1175, 1143, 762;

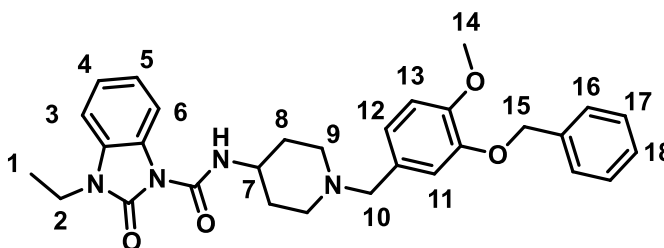
Mp: 112 - 114°C

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₀H₂₉N₄O₄Na [M+H+Na]⁺ 411.2008, found 411.2010

N-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamide (45)

Chemical Formula: C₃₀H₃₄N₄O₄

Molecular Weight: 514,63



Following procedure **A** with *tert*-butyl 4-(3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamido)piperidine-1-carboxylate **52** (262 mg, 0.67 mmol, 1.0 eq.) and 1-(benzyloxy)-4-(bromomethyl)-2-methoxybenzene **3d** (248 mg, 0.81 mmol, 1.2 eq.) synthesized following the literature, the reaction was stirred at rt for 16 h. The crude was purified by flash chromatography on silica gel column with DCM/MeOH/NH₃ (from 100/0/ to 95/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (285 mg, 82% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 8.22 (m, 1H, H₆), 7.46 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₁₆), 7.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₁₇), 7.29 (m, 1H, H₁₈), 7.19 – 7.17 (m, 2H, H₄ and H₅), 7.02 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, H₃), 6.92 (s, 1H, H₁₁), 6.85 – 6.82 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 5.17 (s, 2H, H₁₅), 3.94 (qd, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂), 3.90 – 3.84 (m, 4H, H₁₄ and H₇), 3.41 (s, 2H, CH₂, H₁₀), 2.70 (m, 2H, H₉), 2.16 (m, 2H, H₉), 1.97 (m, 2H, H₈), 1.60 (m, 2H, H₈), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 153.0, 151.0, 148.8, 147.8, 137.2, 130.8, 128.5 (2C), 128.4, 127.8, 127.4 (2C), 126.8, 123.6, 122.7, 121.8, 115.4, 115.0, 111.4, 107.6, 70.9, 62.5, 56.1, 51.7 (2C), 47.0, 36.0, 32.0 (2C), 13.3;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 514.92;

IR (neat, cm⁻¹) : 3288, 2937, 1731, 1689, 1541, 1514, 1487, 1381, 1261, 762;

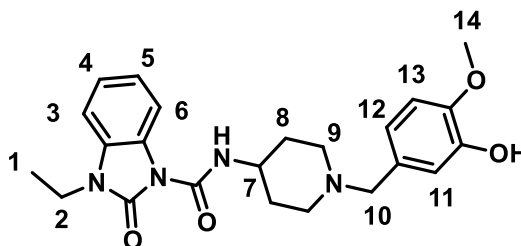
Mp: 136 – 138°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₅N₄O₄ [M+H]⁺ 515.2658, found 515.2654.

3-ethyl-N-(1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-1-carboxamide (45a)

Chemical Formula: C₂₃H₂₈N₄O₄

Molecular Weight: 424,50



To a solution of *N*-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-3-ethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazole-1-carboxamide **45** (237 mg, 0.46 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (100 mL) was added Pd/C 5%. The mixture was stirred under H₂ for 18 h at rt. After filtration, the crude was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as a white solid (45 mg, 25% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 8.21 (m, 1H, H₆), 7.19 – 7.17 (m, 2H, H₄ and H₅), 7.01 (m, 1H, H₂), 6.92 (s, 1H, H₁₁), 6.82 – 6.78 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 3.93 (qd, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₂), 3.90 (m, 1H, H₇), 3.87 (s, 3H, CH₃, H₁₄), 3.44 (s, 2H, CH₂, H₁₀), 2.80 (m, 2H, H₉), 2.23 (m, 2H, H₉), 2.01 (m, 2H, H₈), 1.67 (m, 2H, H₈), 1.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 153.0, 151.1, 145.8, 145.4, 131.4, 128.4, 126.8, 123.6, 122.7, 120.7, 115.5, 115.4, 110.4, 107.6, 62.6, 56.0, 51.8 (2C), 47.0, 36.0, 31.9 (2C), 13.2;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 424.96;

IR (neat, cm⁻¹) : 3290, 2937, 1728, 1688, 1536, 1510, 1487, 1380, 1274, 761;

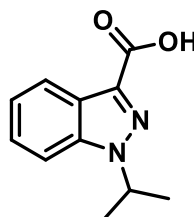
Mp: 112 – 114°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₉N₄O₄ [M+H]⁺ 425.2189, found 425.2190.

1-isopropyl-1H-indazole-3-carboxylic acid (54)

Chemical Formula: C₁₁H₁₂N₂O₂

Molecular Weight: 204,23



To a solution of Ethyl 1-isopropyl-1H-indazole-3-carboxylate (224 mg, 0.96 mmol, 1.0 eq.) in THF (10 mL) was added a solution of NaOH 15%, the solution was stirred at 70°C for 16 h. The crude was obtained after solvent evaporation. The crude was acidified with HCl 3N until pH 2-3 and extracted three times with EtOAc then washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The compound was obtained as a beige powder (197 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.27 (dt, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.35 (ddd, *J* = 7.8, 6.9, 0.8 Hz, 1H), 4.98 (m, 1H), 1.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H);

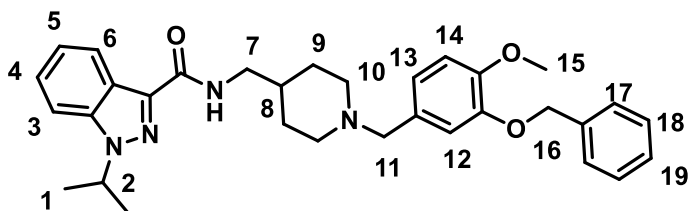
IR (neat, cm⁻¹) : 2980,1729,1682,1487,1287,1203,170,1127,1085,754;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 205.05;

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶⁴

N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-1-isopropyl-1H-indazole-3-carboxamide (55)

Chemical Formula: C₃₂H₃₈N₄O₃
Molecular Weight: 526,68



Following general procedure **C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (200 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq.) and 1-isopropyl-1H-indazole-3-carboxylic acid **54** (100 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq.) The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). Pure compound was obtained as a yellow oil (130 mg, 50% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.41 (dt, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1H, H₆), 7.50 – 7.41 (m, 3H, H₁₇ and H₄), 7.41 – 7.31 (m, 3H, H₅, and H₁₈), 7.31 – 7.24 (m, 2H, H₁₉ and H₃), 6.94 (s, 1H, H₁₂), 6.88 – 6.78 (m, 2H, H₁₃ and H₁₄), 5.19 (s, 2H, H₁₆), 4.98 (m, 1H, H₂), 3.89 (s, 3H, H₁₅), 3.46 (s, 2H, H₁₁), 3.41 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H₇), 2.87 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₁₀), 1.95 (br t, *J* = 11.0 Hz, 2H, H₁₀), 1.76 (br d, *J* = 13.0 Hz, 2H, H₉), 1.68 (m, 1H, H₈), 1.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, H₁), 1.40 (m, 2H, H₉);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.0, 148.8, 147.7, 140.0, 137.2, 136.9, 128.5(2C), 127.7, 127.4 (2C), 126.4, 123.0, 122.5, 122.1, 115.4, 111.4, 109.2, 70.9, 62.7, 56.06, 50.9 (2C), 44.4, 36.2, 29.8 (2C), 22.1;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 527.92;

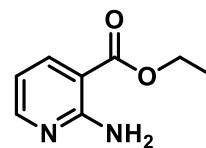
IR (neat, cm⁻¹) : 3428, 2626, 2830, 2598, 2046, 1645, 1545, 1032;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₂H₃₉N₄O₃ [M+H]⁺ *in progress*.

Ethyl 2-aminopyridine-3-carboxylate (58)

Chemical Formula: C₈H₁₀N₂O₂

Molecular Weight: 166,18



To a solution of 2-aminopyridine-3-carboxylic acid (2.00 g, 14.5 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (40 mL, 0.35 M) was added H₂SO₄ dropwisely. The mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, solvent was evaporated under vacuum. Water was added the residue, then NaOH 1N solution was added until pH 8. The crude was extracted three times with EtOAc, then washed with Brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give the pure compound as a slight pink powder (1.54g, 64% isolated yields).

Spectral and analytical data

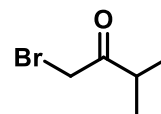
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.16 (dd, *J* = 4.7, 1.9 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 167.0, 159.6, 153.5, 140.2, 112.6, 106.5, 60.9, 14.3.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶⁵

1-bromo-3-methylbutan-2-one (60)Chemical Formula: C₅H₉BrO

Molecular Weight: 165,03



To a solution of 3-methylbutan-2-one (6.2 mL, 58.0 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (25 mL, 2.5 M) at -15°C was added Br₂ (2.9 mL, 58.0 mmol, 1.0 eq.) dropwisely. The mixture was stirred under nitrogen at -15°C until the solution became clear. Then, 20 mL of iced water was added to the solution and stirred for 30 min, 60 mL of water were the added, the solution was extracted 4 times with Et₂O. The combined organic fractions were washed twice with sat. NaHCO₃, then twice with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give the compound as a colorless oil that will be used as such in the next reaction (8.40 g, 10% impurities (determined by NMR), 79% isolated yields).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.00 (s, 2H), 3.00 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.18 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

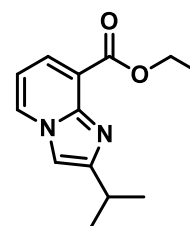
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 205.3, 38.2, 33.3, 18.3 (2C).

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶⁶

Ethyl 2-(propan-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylate (61)

Chemical Formula: C₁₃H₁₆N₂O₂

Molecular Weight: 232,28



To a stirred solution of Ethyl 2-aminopyridine-3-carboxylate (0.7 g, 3.72 mmol, 1.0 eq.), in ethanol (5 mL, 0.75M) at rt, 1-bromo-3-methylbutan-2-one (7.5 g, 45.81 mmol, 12.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at 95°C for 4 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude reaction mixture was purified by silica-gel column chromatography (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 80/20/0.2) to obtain the compound as a green powder (790 mg, 92% isolated yield).

Spectral and analytical data

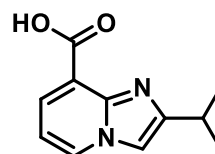
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.21 (dd, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.22 (m, 1H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.6, 155.9, 142.3, 129.2, 128.2, 119.5, 110.5, 108.1, 61.5, 28.7, 22.6 (2C), 14.4.

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁴

2-isopropylimidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid (62)

Chemical Formula: C₁₁H₁₂N₂O₂
 Molecular Weight: 204,23



To a solution of Ethyl 2-(propan-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylate **61** (480 mg, 2,10 mmol, 1.0 eq.) in THF/H₂O (3.6 mL: 3.6 mL) at 0°C was added NaOH (83 mg, 3.10 mmol, 3.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 h then the mixture was acidified with HCl 1N until pH 4-5 and extracted three times with DCM. The organic layers were combined, washed with brine; dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The compound was obtained as a yellow powder (220 mg, 53% isolated yield).

Spectral and analytical data

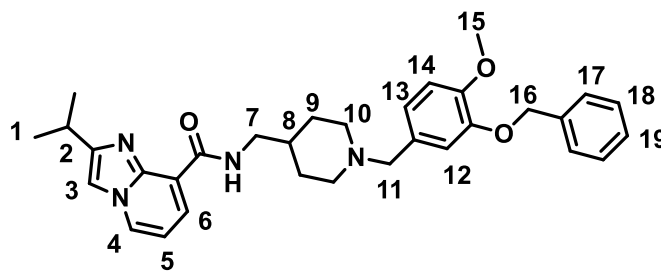
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.25 (dd, *J* = 6.7, 0.7 Hz, 1H), 8.12 (m, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.00 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.15 (dq, *J* = 13.7, 6.9 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H);

MS *m/z* [M-H]⁺ : 203.1.

Spectral and analytical data matched with literature.¹³⁴

N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2-isopropylimidazo [1,2-a]pyridine-8-carboxamide (63)Chemical Formula: C₃₂H₃₈N₄O₃

Molecular Weight: 526,68



Following general procedure **C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (137 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) and 2-isopropylimidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxylic acid **62** (84 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq.) The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). Pure compound was obtained as a yellow oil (140 mg, 79% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.57 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 8.16 – 8.10 (m, 2H, H₆ and H₃), 7.43 (m, 2H, H₁₇), 7.39 – 7.24 (m, 4H, H₁₈ and H₄), 6.91 (s, 1H, H₁₉), 6.87 (t, *J* = 8.6, 1H, H₅), 6.84 - 6.78 (m, 2H, H₁₃ and H₁₄), 5.15 (s, 2H, H₁₆), 3.87 (s, 3H, H₁₅), 3.46 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₇), 3.40 (s, 2H, H₁₁), 3.10 (m, 1H, H₂), 2.94 (m, 2H, H₁₀), 1.91 (br t, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₁₀), 1.81 (br d, *J* = 12.3 Hz, 2H, H₉), 1.65 (m, 1H, H₈), 1.41 (m, 2H, H₉), 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.7, 153.6, 148.8, 147.9, 143.1, 137.4, 130.8 (determined by HMBC) 128.6 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (2C), 127.2, 122.0, 120.9, 115.3, 111.8, 111.5, 108.0, 71.0, 63.0, 56.2, 53.4 (2C), 45.4, 36.4, 30.3 (2C), 28.3, 22.4 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 527.91;

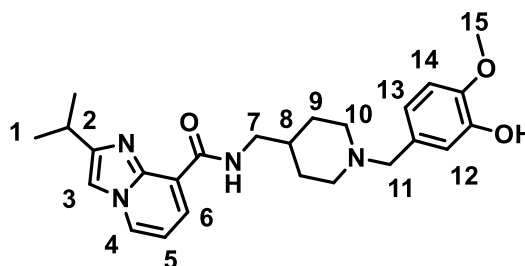
IR (neat, cm⁻¹) : 3433, 3245, 3078, 2922, 1660, 1552, 1512, 1255, 1136, 1024;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₂H₃₉N₄O₃ [M+H]⁺ *in progress*.

N-((1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2-isopropylimidazo[1,2-a]pyridine-8-carboxamide (63a)

Chemical Formula: C₂₅H₃₂N₄O₃

Molecular Weight: 436,56



Following general procedure **B**, starting from *N*-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2-isopropylimidazo [1,2-a]pyridine-8-carboxamide **63** (130 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). The pure product was obtained as a yellow oil (18 mg, 17% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 8.51 (dd, *J* = 6.7, 1.2 Hz, 1H, H₆), 8.01 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H₄), 7.69 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, H₃), 6.99 – 9.94 (m, 2H, H₅ and H₁₂), 6.91 – 6.77 (m, 2H, H₁₃ and H₁₄), 3.87- 3.85 (m, 5H, H₁₅ and H₁₁), 3.48 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H₇), 3.24 (m, 2H, H₁₀), 3.10 (m, 1H; H₂), 2.62 (br t, *J* = 11.6 Hz, 2H, H₁₀), 2.00 (br d, *J* = 13.4 Hz, 2H, H₉), 1.95 – 1.80 (m, 1H, H₈), 1.54 (m, 2H, H₉), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H₁);

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ =165.9, 154.7, 149.7, 147.9, 143.9, 130.8, 128.3, 123.2, 124.4, 120.5, 118.4, 112.6, 112.5, 109.9, 62.4, 56.4, 53.3 (2C), 45.2, 36.3, 29.4 (2C), 29.1, 22.7 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 437.99;

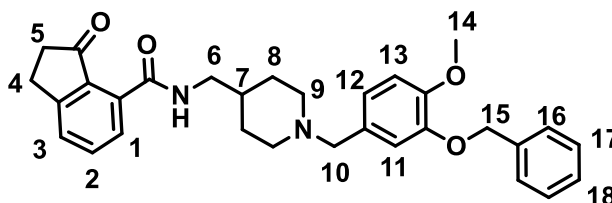
IR (neat, cm⁻¹) : 3429, 2967, 2926, 2558, 2050, 1652, 1281;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₅H₃₃N₄O₃ [M+H]⁺ *in progress*.

N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-4-carboxamide (66)

Chemical Formula: C₃₁H₃₄N₂O₄

Molecular Weight: 498,62



Following general procedure **C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (137 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) and 3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-4-carboxylic acid (52 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). Pure compound was obtained as a yellow oil (72 mg, 49% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.47 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH), 8.42 (m, 1H, H₁), 7.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₂), 7.59 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H, H₃), 7.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₁₆), 7.34 (m, 2H, H₁₇), 7.26 (m, 1H, H₁₈), 6.96 (s, 1H, H₁₁), 6.89 – 6.71 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 5.17 (s, 2H, H₁₅), 3.86 (s, 3H, H₁₄), 3.51 (s, 2H, H₁₀), 3.39 (m, 2H, H₆), 3.19 (m, 2H, H₄), 2.90 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₉), 2.83 (m, 2H, H₅), 2.01 (br t, *J* = 11.0 Hz, 2H, H₈), 1.79 (br d, *J* = 12.7 Hz, 2H, H₈), 1.69 (m, 1H, H₇), 1.46 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 209.7, 164.5, 157.9, 149.2, 147.8, 137.2, 135.2, 133.5, 133.1, 131.6, 129.7, 128.5 (3C), 127.8, 127.5 (2C), 122.5, 115.7, 111.5, 70.9, 62.3, 56.1 (2C), 52.8, 45.6, 37.0, 35.5, 29.4 (2C), 25.9;

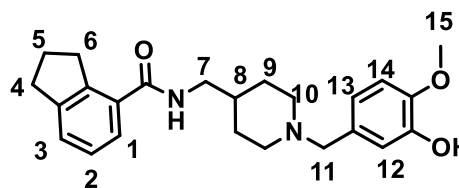
MS *m/z* [M+H]⁺ : 499.87;

IR (neat, cm⁻¹) : 3418, 3247, 3066, 2927, 1643, 1695, 1581, 1518, 1442, 1163, 1024;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₁H₃₅N₂O₄ [M+H]⁺ 499.2597, found 499.2599.

***N*-((1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2,3-dihydro-1*H*-indene-4-carboxamide (66b)**Chemical Formula: C₂₄H₃₀N₂O₃

Molecular Weight: 394,52



To a solution of *N*-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indene-4-carboxamide **66** (57 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (50 mL) was added Pd/C 5%. The mixture was stirred under H₂ for 18h at rt. After filtration, the crude was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/2/2). The pure product was obtained as a colourless oil (20 mg, 43% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.39 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁), 7.30 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₂), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₃), 7.06 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₂), 6.97 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H₁₃), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₁₄), 6.38 (br s, 1H, NH), 3.88 (s, 3H, H₁₅), 3.82 (s, 2H, H₁₁), 3.34 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H₇), 3.23 (br d, *J* = 11.4 Hz, 2H, H₁₀), 3.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₆), 2.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₄), 2.45 (m, 2H, H₁₀), 2.06 (m, 2H, H₅), 1.82 (dd, *J* = 38.0, 10.3 Hz, 5H, H₁₀ and H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 169.3, 147.4, 145.7, 145.6, 142.8, 131.3, 126.6, 126.2, 124.6, 122.6, 116.8, 110.8, 61.0, 56.0 (2C), 51.9, 44.4, 34.3, 33.0 (2C), 32.7(2C), 27.6, 25.3;

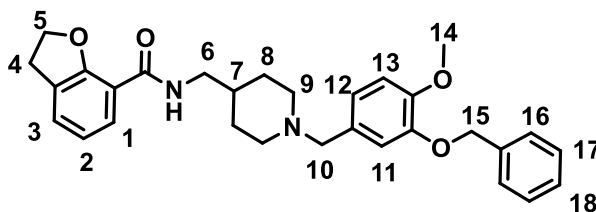
MS *m/z* [M+H]⁺ : 395.90;

IR (neat, cm⁻¹) : 3307, 3066, 2935, 2841, 2726, 2046, 1644, 1538, 1442, 1282, 1136, 1027;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₄H₃₁N₂O₃ [M+H]⁺ 395.2335, found 395.2337.

N-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide (69)Chemical Formula: C₃₀H₃₄N₂O₄

Molecular Weight: 486,61



Following procedure **C** with 2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxylic acid (40 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) and 1-(1-([3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (100 mg, 0.29 mmol, 1.2 eq.), the compound was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 90/10/1). The compound was obtained as a colorless oil (117 mg, 98% isolated yield)

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.84 (s, 1H, H₁), 7.40 – 7.37 (m, 3H, H₁₄ and NH), 7.33 (m, 2H, H₁₅), 7.26 (m, 1H, H₁₆), 6.91 (s, 1H, H₉), 6.82 – 6.80 (m, 2H, H₁₀ and H₁₂), 5.15 (s, 2H, H₁₃), 4.74 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃), 4.29 (s, 2H, NH₂), 3.86 (s, 3H, H₁₂), 3.43 (s, 2H, H₈), 3.29 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₄), 3.02 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂), 2.82 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₇), 1.89 (t, *J* = 10.9 Hz, 2H, H₇), 1.69 (m, 2H, H₆), 1.55 (m, 1H, H₅), 1.30 (m, 2H, H₆);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.6, 157.4, 149.2, 148.9, 147.8, 137.2, 129.2, 128.5 (2C), 128.1, 127.8, 127.5 (2C), 127.4, 122.4, 121.1, 116.0, 115.5, 111.4, 72.3, 70.9, 62.3, 56.1, 52.8(2C), 44.8, 35.1, 29.4 (2C), 28.8;

MS *m/z* [M+H]⁺ : 486.92

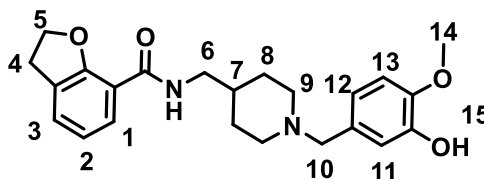
IR (neat, cm⁻¹) : 3434, 2960, 2919, 2135, 1650, 1578, 1384, 1025;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₃₀H₃₅N₂O₄ [M+H]⁺ *in progress*.

***N*-((1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide (69a)**

Chemical Formula: C₂₃H₂₈N₂O₄

Molecular Weight: 396,49



Following general procedure **B**, starting from *N*-((1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methyl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide **69** (100 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). The pure product was obtained as a yellow oil (28 mg, 35% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.84 (m, 1H, H₁), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.24 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 – 6.91 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.91 – 6.83 (m, 1H, H₂), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 4.65 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₅), 4.06 (m, 1H, H₆), 3.82 (s, 3H, H₁₃), 3.76 (s, 2H, H₉), 3.18 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₄), 3.12 (s, 2H, H₈), 2.53 (t, *J* = 10.9 Hz, 2H, H₈), 2.15 – 1.80 (m, 4H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 64.9, 157.3, 147.4, 145.7, 128.8, 128.1, 127.5, 122.8, 120.9, 116.8, 115.4, 110.8, 72.3, 60.8, 55.8, 51.6 (2C), 46.1, 44.1, 33.8, 28.8, 27.1(2C);

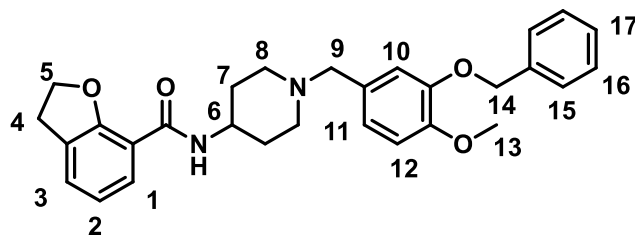
MS *m/z* [M+H]⁺ : 397.98;

IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₉N₂O₄ [M+H]⁺ 397.2127 found 397.2128.

N-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide (70)Chemical Formula: C₂₉H₃₂N₂O₄

Molecular Weight: 472,59



Following general procedure **C**, starting from (1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)methanamine **27** (153 mg, 0.47 mmol, 1.2 eq.) and 2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxylic acid (65 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.). The compound of interest was purified on by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). Pure compound was obtained as a colorless oil (140 mg, 97 % isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H₁), 7.57 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.47 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H₁₅), 7.42 – 7.26 (m, 4H, H₁₆, H₁₇ and H₃), 6.98 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H₂), 6.94 (s, 1H, H₁₀), 6.88 – 6.84 (m, 2H, H₁₁ and H₁₂), 5.20 (s, 2H, H₁₄), 4.73 (t, J = 8.7 Hz, 2H, H₅), 4.09 – 3.98 (m, 1H, H₆), 3.90 (s, 3H, H₁₃), 3.44 (d, J = 20.1 Hz, 2H, H₉), 3.28 (t, J = 8.7 Hz, 3H, H₄), 2.78 (d, J = 9.8 Hz, 2H, H₈), 2.16 (t, J = 10.5 Hz, 2H, H₈), 2.08 – 1.90 (m, 2H, H₇), 1.56 (dt, J = 26.6, 13.2 Hz, 2H; H₇);

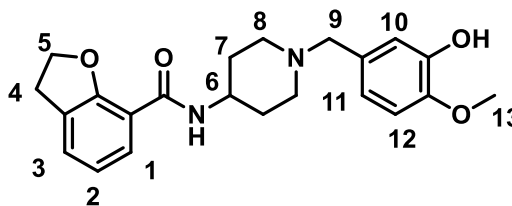
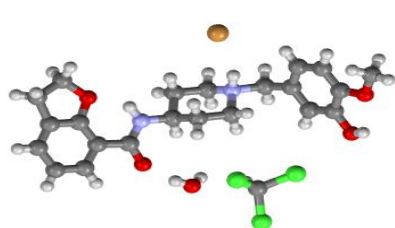
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 163.7, 157.4, 148.9, 147.8, 137.2, 129.1, 128.5 (2C), 128.1, 127.8, 127.6, 127.4(2C), 122.0, 121.1, 116.1, 115.3, 111.4, 72.2, 70.9, 62.5, 56.1, 51.9 (2C), 46.2, 35.3, 32.0 (2C), 29.1;

MS m/z [M+H]⁺ : 472.89;

IR (neat, cm⁻¹) : 3390, 2922, 2801, 2246, 1661, 1543, 1516;

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₃₂H₃₃N₂O₄ [M+H]⁺ 473.2440 found 473.2441.

N-(1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide (70a)



Chemical Formula: C₂₂H₂₆N₂O₄

Molecular Weight: 382,46

Following general procedure **B**, starting from N-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide **70** (80 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 80/20/2). The pure product was obtained as a yellow oil (3 mg, 5% isolated yield and 20 mg as hydrobromide salt, 31% isolated yield).

Spectral and analytical data

MS *m/z* [M+H]⁺ : 383.62

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇N₂O₄ [M+H]⁺ *in progress*

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.84 (m, 1H, H₁), 7.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.24 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H₃), 7.00 – 6.91 (m, 2H, H₁₀ and H₁₁), 6.91 – 6.83 (m, 1H, H₂), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 4.65 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₅), 4.06 (m, 1H, H₆), 3.82 (s, 3H, H₁₃), 3.76 (s, 2H, H₉), 3.18 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₄), 3.12 (s, 2H, H₈), 2.53 (t, *J* = 10.9 Hz, 2H, H₈), 2.15 – 1.80 (m, 4H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.2, 157.7, 147.4, 146.0, 129.1, 128.6, 128.0, 122.7, 121.2, 116.8, 115.6, 111.0, 72.6, 61.4, 56.1 (2C), 51.5, 46.1, 45.4, 30.4 (2C), 29.1;

Hydrobromide salt

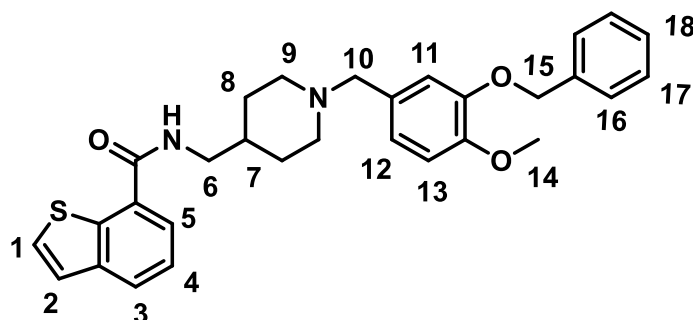
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.88 – 7.81 (m, 1H, H₁), 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.30 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H₃), 7.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁₀), 7.07 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H₁₁), 6.94 (m, 1H, H₂), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 4.72 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₄), 4.15 (m, 1H, H₆), 3.96 (s, 2H, H₉), 3.89 (s, 3H, H₁₃), 3.34 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H, H₈), 3.25 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₄), 2.71 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H, H₈), 2.19 (m, 4H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.3, 157.7, 147.8, 146.1, 129.1, 128.6, 128.0, 123.4, 121.2, 117.1, 115.4, 111.2, 72.7, 61.1, 56.1 (2C), 51.4, 46.1, 45.1, 29.8 (2C), 29.1;

XR (ORTEP): crystal system Triclinic, *P1* space group *P1*, *a* = 7.2284 (17) Å, *b* = 8.964 (2) Å, *c* = 20.564 (5) Å, α = 86.503(10)°, β = 89.713 (11)°, γ = 79.135(9)°, *V* = 1279.3 (5) Å³, *Z* = 4, calculated density = 1.560 g/cm³, μ = 1.96 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.159, *R*[*F*²>2σ(*F*²)] = 0.072, *wR*(*F*²) = 0.258, *S* = 1.04.

N-[(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methyl]-1-benzothiophene-7-carboxamide (72)Chemical Formula: C₃₀H₃₂N₂O₃S

Molecular Weight: 500,66



Following procedure **C** with 1-benzothiophene-7-carboxylic acid (100 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) and 1-(1-[[3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl]methyl]piperidin-4-yl)methanamine **27** (220 mg, 0.64 mmol, 1.2 eq.), the compound was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 90/10/1). The compound was obtained as a light beige powder (248 mg, 91% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.96 (dd, J = 7.9, 0.8 Hz, 1H, H₃), 7.63 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H₅), 7.59 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H₁), 7.45 – 7.27 (m, 7H, H₂, H₄ and H₁₆), 6.93 (s, 1H, H₁₁), 6.87 – 6.79 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 6.56 (br s, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, H₁₅), 3.87 (s, 3H, H₁₄), 3.47 – 3.38 (m, 4H, H₆ and H₁₀), 2.85 (br d, J = 11.4 Hz, 2H H₉), 1.93 (br t, J = 11.2 Hz, 2H, H₉), 1.77 – 1.62 (m, 3H, H₇ and H₈), 1.38 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.8, 148.9, 147.8, 141.3, 138.9, 137.2, 130.2 (2C), 128.5 (2C), 128.0, 127.8, 127.4 (2C), 126.9, 123.8, 123.0, 122.1, 121.7, 115.4, 111.4, 70.9, 62.6, 56.1, 52.9 (2C), 45.5, 35.8, 29.7 (2C);

MS m/z [M+H]⁺ : 501.65;

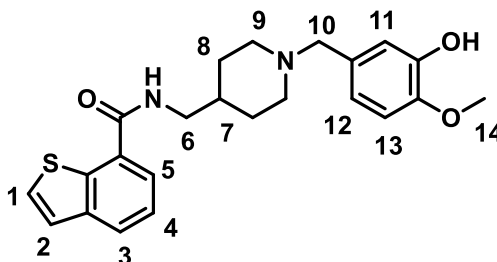
IR (neat, cm⁻¹) : 3376, 2922, 2804, 2759, 1664, 1532, 1264, 1024;

Mp: 115 - 118°C;

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₃₀H₃₃N₂O₃S [M+H]⁺ 501.2212, found 501.2209.

N-([1-([3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-1-benzothiophene-7-carboxamide (72a)Chemical Formula: C₂₃H₂₆N₂O₃S

Molecular Weight: 410,53



Following procedure **B** *N*-[([1-([3-(benzyloxy)-4-methoxyphenyl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-1-benzothiophene-7-carboxamide **72** (200 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.), the crude was obtained after solvent evaporation. Then it was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 90/10/0.1). The compound was obtained as a white powder (154 mg, 93% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₅), 7.58 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₁), 7.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₄), 7.37 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₂), 6.91 (m, 1H, H₁₁), 6.85 – 6.74 (m, 2H, H₁₂ and H₁₃), 6.57 (s, 1H, NH), 3.87 (s, 3H, H₁₄), 3.46 (s, 2H, H₁₀), 3.42 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₆), 2.95 (br d, *J* = 11.5 Hz, 2H, H₉), 2.01 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H, H₉), 1.83 – 1.62 (m, 3H, H₈ and H₇), 1.45 (m, 2H, H₈);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.9, 145.9, 145.4, 141.3, 138.9, 130.2 (2C), 127.9, 126.8, 123.8, 123.0, 121.7, 121.0, 115.7, 110.4, 62.6, 56.0, 53.0 (2C), 45.5, 35.8, 29.7 (2C);

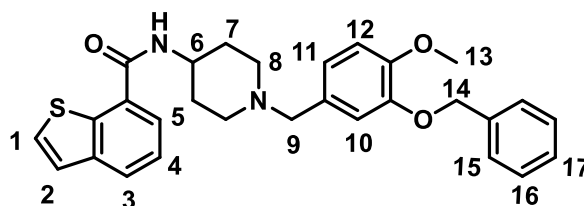
IR (neat, cm⁻¹): 3330, 2923, 2804, 2762, 1663, 1532, 1276, 1024;

Mp: 113 - 115°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₃H₂₇N₂O₃S [M+H]⁺ 411.1742, found 411.1743.

N-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)benzo[b]thiophene-7-carboxamide (73)Chemical Formula: C₂₉H₃₀N₂O₃S

Molecular Weight: 486,63



Following procedure **C** with 1-benzothiophene-7-carboxylic acid (70 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq.) and 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-amine **29** (157 mg, 0.47 mmol, 1.2 eq.), the compound was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH/NH₃ from 100/0/0 to 90/10/1). The compound was obtained as a light beige powder (186 mg, 98% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.96 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₃), 7.60 -7.55 (m, 2H, H₁ and H₅), 7.49 -7.42 (m, 3H, H₁₅ and H₂), 7.41 - 7.32 (m, 3H, H₁₆ and H₄), 7.30 (m, 1H, H₁₇), 6.93 (s, 1H, H₁₀), 6.86- 6.84 (m, 2H, H₁₁ and H₁₂), 6.24 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.17 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₁₄), 4.09 (m, 1H, H₆), 3.85 (s, 3H, H₁₃), 3.46 (s, 2H, H₉), 2.81 (m, 2H, H₈), 2.16 (m, 2H, H₈), 2.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₈), 1.91 (m, 1H, H₇), 1.64 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.0, 149.0, 147.8, 141.3, 138.9, 137.2, 130.1 (2C), 128.5 (2C), 128.0, 127.8 (2C), 127.4, 126.9, 123.8, 123.0, 122.1, 121.7, 115.3, 111.5, 70.9, 62.5, 56.1, 52.0 (2C), 47.0, 32.0 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 486.79;

IR (neat, cm⁻¹) : 3350, 3062, 3027, 2932, 2799, 2755, 1709, 1630, 1513, 1325, 1257, 1023;

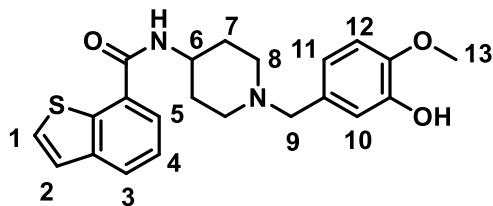
Mp: 117°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₁N₂O₃S [M+H]⁺ 487.2055, found 487.2059.

N-(1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)benzo[b]thiophene-7-carboxamide (73a)

Chemical Formula: C₂₂H₂₄N₂O₃S

Molecular Weight: 396,51



Following general procedure **B**, starting from *N*-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)benzo[b]thiophene-7-carboxamide **73** (166 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH/NH₃ (gradient from 100/0/0 to 94.5/5/0.5). The pure product was obtained as light beige powder (91 mg, 68,4% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.95 (dd, *J* = 7.9, 0.8 Hz, 1H, H₃), 7.65 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₅), 7.58 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H₁), 7.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₂), 7.37 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₂), 7.00 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₁₀), 6.88 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H₁₁), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₂), 6.55 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.18 (m, 1H, H₆), 3.87 (s, 3H, H₁₃), 3.61 (s, 2H, H₉), 3.05 (br d, *J* = 11.6 Hz, 2H, H₈), 2.35 (br t, *J* = 11.6 Hz, 2H, H₈), 2.10 (br d, *J* = 12.7 Hz, 2H, H₇), 1.90 (m, 2H, H₇);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 166.2, 146.5, 145.7, 141.2, 138.9, 130.1 (2C), 127.7, 127.0, 123.8, 123.0, 121.9, 121.5, 116.0, 110.6, 62.0, 56.0, 52.0 (2C), 46.5, 31.2 (2C);

MS *m/z* [M+H]⁺ : 396.91;

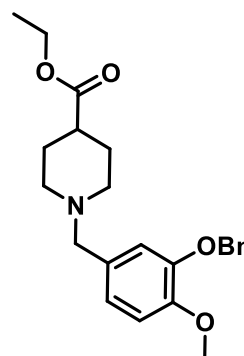
IR (neat, cm⁻¹) : 3292, 2933, 2835, 1634, 1533, 1274, 1027;

Mp: 113 - 115°C;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₂H₂₅N₂O₃S [M+H]⁺ *in progress*.

Ethyl 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxylate (74)Chemical Formula: C₂₃H₂₉NO₄

Molecular Weight: 383.49



Following general procedure **D**, starting from ethyl piperidine-4-carboxylate **3** (789 μ L, 5.12 mmol, 1.0 eq.). The product was purified by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (90/10/1 isocratic gradient). Evaporation of the solvent afforded of a clear, colourless oil. (1.33 mg, 71% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.51 - 7.49 (m, 2H), 7.43 - 7.39 (m, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.88 - 6.67 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.19 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.84 - 2.80 (m, 2H), 2.34 - 2.26 (m, 1H), 2.02 - 1.96 (m, 2H), 1.91 - 1.87 (m, 2H), 1.82 - 1.72 (m, 2H), 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 175.1, 148.6, 147.7, 137.14, 128.4 (2C), 127.7, 127.3 (2C), 121.6, 114.9, 111.3, 70.3, 70.7, 62.6, 60.1, 55.9, 52.6 (2C), 41.1, 28.2 (2C), 14.2;

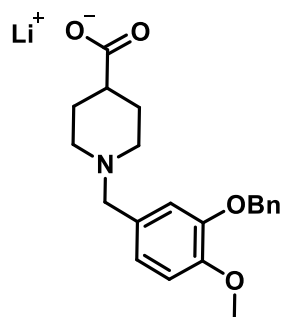
MS m/z [M+H]⁺ : 384.65;

IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

HRMS/ESI: m/z calcd. for C₂₃H₃₀NO₄ [M+H]⁺ *in progress*.

Lithium(I) 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxylate (75)Chemical Formula: C₂₁H₂₄LiNO₄

Molecular Weight: 361.37



To a stirred solution of ethyl 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxylate **74** (100 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) in THF (2 ml) and water (2 ml) cooled to 0 °C was added LiOH (6.2 mg, 0.29 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at rt for 16 h, the mixture was then concentrated under vacuum to afford that will be used as such for the next reaction. The salt was obtained as a white solid (95 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.60- 7.54 (m, 5H), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.11 - 7.08 (m, 2H), 5.40 (s, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 2.95 (m, 2H), 2.28 - 2.18 (m, 3H), 1.96 (m, 2H), 1.74 (m, 2H);

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ = 184.3, 149.1, 146.3, 136.7, 129.0 (2C), 128.5, 128.2 (2C), 124.4, 117.9, 112.7, 71.2, 61.3, 56.3, 52.0 (2C), 43.6, 28.1 (2C), 23.5;

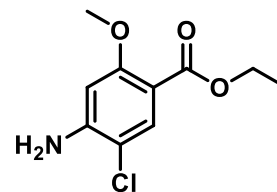
MS *m/z* [M+H]⁺ : 384.65;

IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₁H₂₅LiNO₄ [M+H]⁺ *in progress*.

Ethyl 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoate (77)Chemical Formula: C₁₀H₁₂ClNO₃

Molecular Weight: 229.66



To a stirred solution of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid **76** (500 mg, 2.48 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (15 ml) at 0 °C was added dropwisely SOCl₂ (3.8 ml). The mixture was heated under reflux for 16 h. Then, the solvent and SOCl₂ were removed under vacuum. The compound was obtained as a yellow solid (235 mg, 41% isolated yield).

Spectral and analytical data

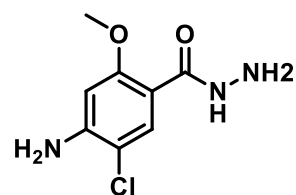
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.82 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.29 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 164.7, 160.4, 147.7, 133.3, 110.2, 110.0, 98.4, 60.5, 56.3, 14.5.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶⁷

4-amino-5-chloro-2-methoxybenzohydrazide (78)

Chemical Formula: C₈H₁₀ClN₃O₂
Molecular Weight: 215.64



To a suspension of ethyl 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoate **77** (235 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (10 ml) at rt was added hydrazine monohydrate (98+ %; 2 ml). The stirred mixture was stirred under reflux for 72 h until the ester was consumed. After that, the mixture was concentrated under vacuum. The crude was triturated with cHex and Et₂O, solubilized in MeOH and dried under vacuum. The compound was afforded as a grey solid (215 mg, quantitative yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.81 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.91 (s, 3H);

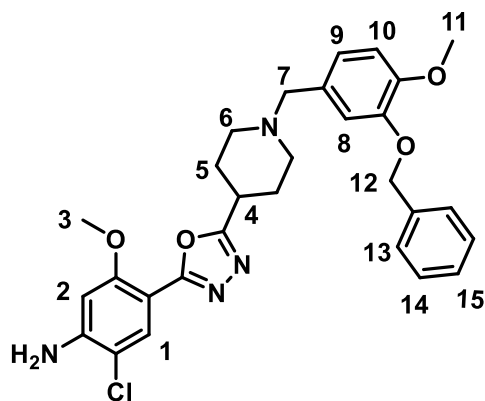
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 167.0, 159.3, 150.3, 132.9, 111.5, 110.2, 98.5, 56.5.

Spectral and analytical data matched with literature.²⁶⁸

4-(5-(1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2-chloro-5-methoxyaniline (79)

Chemical Formula: C₂₉H₃₁ClN₄O₄

Molecular Weight: 535.04



Lithium(I) 1-(3-(benzyloxy)-4-methoxybenzyl)piperidine-4-carboxylate **76** (470 mg, 1.3 mmol, 1.8 eq.) was stirred with 7 ml of POCl₃ for 15 min. 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzohydrazide **78** (153 mg, 0.71 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture heated to reflux for 30 min. The reaction was cooled to rt and triturated with cHex. The excess cHex was removed and the brown residue solubilised in DCM and MeOH. The product was purified by flash chromatography on silica with DCM/MeOH/NH₃ (100/0/0 to 94.5/5/0.5) and on neutral aluminium oxide with DCM/EtOAc (from 100/0 to 60/40). The compound was obtained as a colourless oil (13 mg, 3% isolated yield).

Spectral and analytical data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.70 (s, 1H, H₁), 7.37 (m, 2H, H₁₃), 7.29 (m, 2H, H₁₄), 7.22 (m, 1H, H₁₅), 6.84 (s, 1H, H₈), 6.77 - 6.76 (m, 2H, H₉ and H₁₀), 6.30 (s, 1H, H₂), 5.11 (s, 2H, H₁₂), 4.40 (br s, 2H, NH₂), 3.81 (m, 6H, H₃ and H₁₁), 3.35 (s, 2H, H₇), 2.84 (m, 1H, H₄), 2.78 (m, 2H, H₆), 2.01 - 1.93 (m, 4H, H₅ and H₆), 1.85 (m, 2H, H₅);

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 167.0, 161.5, 156.8, 147.5, 146.8, 145.7, 136.2, 134.2, 129.5, 127.5 (2C), 126.7, 126.3 (2C), 120.8, 114.0, 110.4, 109.6, 102.9, 97.3, 69.9, 61.7, 55.1, 55.0, 51.5 (2C), 32.4, 28.4 (2C);

MS *m/z* [M+ACN+H]⁺ : 577.68;

IR (neat, cm⁻¹) : *in progress*;

HRMS/ESI: *m/z* calcd. for C₂₉H₃₂ClN₄O₄ [M+H]⁺ *in progress*.

II. Protocoles des tests *in vitro* and *in cellulo*

1. *In vitro* experiments

a. DPPH radical scavenging activity

The antiradical activity of the tested compounds was assessed using a miniaturized DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay.^{231,232} The tested compounds were diluted from stock solution in absolute ethanol and incubated in the presence of 100 μM DPPH (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution at rt in a 96-wells microplate (Sterilin®, Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) in the dark. The absorbance at 517 nm was then measured every 10 minutes min using Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) and used to calculate the specific absorbance of DPPH in each solution subtracting absorbance of all other components in the solution as following:

$$A_{max}^{DPPH} = Abs_{DPPH\ alone} - Abs_{blank}$$

$$A_{sample}^{DPPH} = Abs_{mix\ DPPH/compound} - Abs_{compound}$$

$$A_{min}^{DPPH} = Abs_{mix\ DPPH/Trolox\ at\ 375\ \mu M} - Abs_{Trolox\ at\ 375\ \mu M}$$

where A_{max}^{DPPH} is the maximal absorbance of DPPH alone, A_{sample}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a tested compound at given concentration, A_{min}^{DPPH} is the specific absorbance of DPPH in a mix with a Trolox® from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) at 375 μM considered as the minimal absorbance. Then, the DPPH radical scavenging activity were calculated according to the following formula:

$$\% DPPH\ RSA = \frac{A_{max}^{DPPH} - A_{sample}^{DPPH}}{A_{max}^{DPPH} - A_{min}^{DPPH}} \times 100$$

Assays were conduct in triplicate at 10 concentration levels (0, 10, 12.5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 μM) of the tested compound. Absorbance calculations were carried out using Microsoft Excel and regressions were performed using GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). The kinetic absorbance data were fitted with a one-phase exponential association model allowing us to calculate the time of half-reaction and the plateau of the maximum effect at each concentration. The EC50 values (concentrations required to obtain 50% scavenging effect) were calculated plotting concentration versus % DPPH RSA at 60, 120, plateau and fitting the data with linear model for Trolox®,

one or two-phase exponential association model for other compounds. EC₅₀ and SD values were the mean of two independent experiments. Trolox® was tested as positive control.

b. ORAC assay

The antioxidant activity of the synthesized compounds was assessed using the Fluorescein Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORACFI) assay.^{231,232,269} Trolox® (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and other compounds stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO and diluted in 10 mM phosphate buffer to obtain working solution at 6 concentration levels. 25 µL of buffer or Trolox® or compounds solution were mixed in a black microplate with 150 µL of fluorescein (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 8 nM and incubated 30 min at 37°C in a multimodal microplate reader (Synergy 2, Biotek, Winooski, VT, USA). Then, 25 µL of AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, Sigma-Aldrich) solution at 75 mM were added and mixed in each well before the kinetic. Measurements of fluorescence (λ_{ex}=485/20 nm, λ_{em}=520/20 nm) were performed every minute during 2 hours. Each point was measured in triplicate. The AUC and the Net AUC of the standards and samples were determined using Gen5 Data Analysis Software using equations (1) and (2) respectively.

$$AUC = \frac{F_1}{F_1} + \frac{F_2}{F_1} + \frac{F_3}{F_1} + \dots + \frac{F_n}{F_1} \quad (1)$$

$$NetAUC = AUC_{sample} - AUC_{blank} \quad (2)$$

Where F1 is the fluorescence reading at the initiation of the reaction and F_n is the last measurement. The standard curve was obtained by plotting the Net AUC of different compound concentrations against their concentration using GraphPad® Prism statistical software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). ORAC values of samples were then calculated dividing the slope of standard curve of each compounds by value obtained for Trolox®. ORAC value are given as mean ± standard deviation of three independent experiments.

c. Affinity as Regards 5-HT₄ Receptors

For competition studies, 2.5 µg of proteins (5-HT₄B membrane preparations, HTS110M, Eurofins. Eurofins's 5-HT₄B membrane preparations are crude membrane preparations made by use of their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression.) were incubated in duplicate at 25 °C for 60 min in the absence or the presence of 10⁻⁶ or 10⁻⁸M of each

compound together with 0.2 nM [³H]-GR 113808 (NET 1152, Perkin Elmer) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25°C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 1 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4 °C). Non-specific binding was evaluated in parallel, in the presence of 30 μM serotonin.

For some of these compounds, affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the GraphPad Prism 6 software and expressed as $K_i \pm SD$.

2. *In cellulo* experiment

a. Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected by electroporation with plasmid encoding HA-tagged 5-HT₄R (100 ng/10⁶ cells), then seeded in 96-well plates (35,000 cells/well). 24 hours after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO201724, at 37°C in 100 μL of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%). Quantification of cAMP production was performed by HTRF[®] by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

b. MTT ASSAY

SH-SY5Y cells (ATCC, UK) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Euroclone, Milan, Italy) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (supplements were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA). Cells were grown in a humidified incubator with 95% air and 5% CO₂ at 37°C.

The effect of selected compounds on the growth of SH-SY5Y cell line was assessed by MTT-based cell viability test, previously described by Mosmann.²⁷⁰ Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a density of 5x10³ cells/well and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂ in humidified atmosphere to allow adhesion. After this time, cells were treated for 24 hours with the compounds or vehicle (DMSO) at different concentrations, ranging from 0.5 μM to 50μM, dissolved in complete DMEM.

Then, cells were carefully washed with PBS and treated with 300 μM MTT dissolved in DMEM and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO_2 . Then, the aqueous solution was removed and the intracellular formazan salts were dissolved in DMSO for 15 minutes at rt. Finally, the formazan absorbance from each well was measured at $\lambda = 570 \text{ nm}$, using a microplate reader (Victor2 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

c. ROS assay

SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates (OptiPlate black, Perkin Elmer) at 5×10^3 cells/well and incubated overnight at 37°C and 5% CO_2 to allow adhesion in complete culture medium. After this time, cells were treated for 24 hours with 10 μM of desired compounds 100 μM Trolox or vehicle (DMSO). Then, cells were carefully washed and treated for 30 minutes with 100 μM TBH (*tert*-Butyl hydroperoxide solution, Luperox, Sigma-Aldrich) to induce oxidative stress. After this time, cells were washed with PBS and stained for 30 minutes with 10 μM H_2DCFDA probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher) for ROS detection.

Finally, cells were washed three times with PBS supplemented with Glucose 5 mM and CaCl_2 1 mM. The DCF fluorescence was measured ($\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) with a plate reader (Enspire, PerkinElmer). Data were normalized on protein content determined by Lowry method.

d. Neuroprotection assay

HT-22 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Cells were passaged every 2 days and incubated at 37°C with 5% CO_2 in a humidified incubator. Compounds were dissolved in DMSO, (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and diluted with medium. Generally, 80% confluent cells were seeded with 5000 cells per well into sterile 96-well plates and were incubated for 24 h.

For the neurotoxicity assay, the previous medium was discarded, and different concentrations of the compound were added to the wells. DMSO (0.5%) in DMEM served as control. Cells were incubated for 24 h. After incubation, an MTT assay was performed.

For neuroprotection, 5 mM glutamate (mono-sodium-L-glutamate, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was co-incubated with different concentrations of respective compounds for 24h. Quercetin

Méthodologie

(25 μ M, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) served as a positive control. After 24 h of incubation, an MTT assay was performed.

Cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) assay. MTT solution (4 mg/mL in PBS) was diluted 1:10 with medium and added to the wells after removal of the previous medium. Cells were incubated for 3 h when the supernatant was removed and lysis buffer (10% SDS) was applied. The next day, absorbance at 560 nm was determined with a multiwell plate photometer (Tecan, SpectraMax 250).

Results are presented as percentage to untreated control cells. Data are expressed as means \pm SD of three different independent experiments, and each was performed in sextuplicate. Analysis was accomplished using GraphPad Prism 5 software applying one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test. Levels of significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Annexes

I. Publications et communications

1. Publications scientifiques:

Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's Disease.

Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeyssen, S.; Dallemagne, P.; Bolognesi, M.L., Rochais, C*.

European Journal of Medicinal Chemistry, **2019**, 182, 111596.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>

Therapeutic modulators of the serotonin 5-HT₄ receptor: a patent review (2014-present).

Lanthier, C.; Dallemagne, P.; Claeyssen, S.; Rochais, C*.

Expert Opinion On Therapeutic Patents, **2020**, 495-508

<https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1767587>

Three are better than one: A multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent Alzheimer's disease.

Hatat, B.; Ismeurt, C.; Lanthier, C.; Davis, A.; Lecoutey, C.; Freret, T.; Marin, P.; Boulouard, M.; Crozet, C.; Rochais, C.; Dallemagne, P.; Claeyssen, S*.

Manuscript in preparation – en Annexe

Benzisoxazoles targeting 5-HT₄ receptors with *in cellulo* antioxidant properties as promising compound in Alzheimer's Disease.

Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeyssen, S.; Dallemagne, P.; Bolognesi, M.L., Rochais, C*.

Manuscript in preparation – Article 2 de la partie Résultat

2. Communications orales:

- Conception and synthesis of new pleiotropic compounds that both display 5-HT₄R agonist activity and antioxidant property in Alzheimer's disease.
 - GP2A/JFB (Group of Medicinal Chemists of the Atlantic Arc and Journées Franco-Belges); Asnelles sur mer, 13-15 June 2018
 - Scientific day INC3M, 24 June 2018
- Design and synthesis of new polypharmacological compounds with antioxidant properties in Alzheimer's disease.
 - Drug discovery days, Lille, 18 January 2019

- Development of novel MTDLs combining 5-HT₄R agonism and antioxidant properties in Alzheimer's disease.
 - o MuTaLig 3rd WG meeting Paris, 23-24 February 2019
- Polypharmacological compounds in Alzheimer's Disease: innovative 5-HT₄R agonist with promising *in cellulo* antioxidant properties.
 - o GP2A, Nottingham, 21-23 August 2019
- New potent benzisoxazole derivatives as pleiotropic compounds with 5-HT₄R agonism and *in cellulo* antioxidant properties to fight Alzheimer's disease.
 - o Young researcher fellow meetings of SCT (YRFM), Caen, 29-31 January 2020

3. Communications par poster:

En tant que première auteure:

- **[Best Poster award]** Design of new pleiotropic compounds that both displays 5-HT₄R agonist activity and antioxidant property
 - o YRFM, Orléans, 5-7 March 2018.
- Conception and synthesis of new pleiotropic compounds that both display 5-HT₄R agonist activity and antioxidant property in Alzheimer's disease.
 - o GP2A/JFB, Asnelles sur mer, 13-15 June 2018.
 - o Scientific day INC3M, Mont saint Aignant, 24 June 2018.
- Design of new MDTL that both display 5-HT₄R agonist activity and antioxidant property in Alzheimer's disease.
 - o JEDNC 2018, Le Havre, 21 June 2018.
- Design and synthesis of new polypharmacological compounds with antioxidant properties in Alzheimer's disease.
 - o XVII Giornata della chimica dell'Emilia Romana, Parma (Italy), 1 December 2018.
- Design and synthesis of new polypharmacological compounds with antioxidant properties in Alzheimer's disease.
 - o Drug discovery days, Lille, 18 January 2019.
- Design and synthesis of novel Benzisoxazole compounds with antioxidant properties in Alzheimer's disease.
 - o YRFM, Paris 22-24 February 2019.
- Polypharmacology in Alzheimer disease: innovative MTDLs combining 5-HT₄R agonism and promising *in cellulo* activity.
 - o EFMC-ACSMEDI, Krakow (Poland), 10-13 June 2019.
 - o JNRB, Caen, 19 November 2019.

Annexes

- **[Best Poster award]** Development of new promising 2-in-1 molecules to fight Alzheimer's disease with *in cellulo* effect.
 - o JEDNC, Caen, 5 July 2019

En tant que co-auteure:

Development of TrkB/5-HT4 receptors ligands, a new approach in the treatment of neurodegenerative diseases.

M. Antonijevic, D. Charou, T. Rogdakis, M. Papadopoulou, C. Lanthier, A. Gravanis, I. Charalampopoulos, P. Dallemagne, C. Rochais.

- o YRFM, Caen, 29-31 January 2020

II. Article 3 : Three are better than one: A multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent Alzheimer's disease

Three are better than one: A multi-target directed ligand with triple activity presents superior potential than donepezil to prevent Alzheimer's disease

Short title: A Triple MTDL is better than donepezil

B er nice Hatat^{a,b,c}, Caroline Ismeurt^a, Caroline Lanthier^{b,c}, Etudiante C. Crozet^e, Etudiante T. Freret^{b,d}, Audrey Davis^{b,c}, Cédric Lecoutey^{b,c}, Thomas Freret^{b,d}, Philippe Marin^a, Michel Boulouard^{b,d,†}, Carole Crozet^{e,†}, Christophe Rochais^{b,c,†}, Patrick Dallemagne^{b,c,*}, Sylvie Claeysen^{a,*}

^aIGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, F-34094, Montpellier, France

^bNormandie Université, F-14032 Caen, France

^cUNICAEN, CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie), F-14032 Caen, France

^dUNICAEN, INSERM U1075 COMETE F-14032 Caen, France

^eAix-Marseille University, CNRS, INP, Inst Neurophysiopathol, F-13344, Marseille, France

[†]Michel Boulouard, Carole Crozet and Christophe Rochais contributed equally to this work.

*Patrick Dallemagne and Sylvie Claeysen contributed equally to this work.

Corresponding authors:

Patrick Dallemagne

CERMN – EA4258

Boulevard Becquerel, 14032 Caen, France

+33 231 566 813

Email: patrick.dallemagne@unicaen.fr

Sylvie Claeysen

IGF – CNRS UMR5203 – INSERM U1191 – Univ. Montpellier

141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France

+33 434 359 215

Email: sylvie.claeyesen@igf.cnrs.fr

Author contributions: T.F., M.B., C.C, C.R., P.D., and S.C. designed research; B.H., C.I., C.L., X.X., X.X., A.D. and C.L. performed research; T.F., P.M., M.B., C.C., C.R., P.D., and S.C. analyzed data; and C.C., C.R., S.C., and P.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia which mainly affects the elderly. Mostly designed to target cholinergic and glutamatergic neurotransmission, current drugs are only improving symptoms while the pathology is still spreading all over the brain. Even if efforts are done to find treatment against amyloid aggregation and neurofibrillary tangles, the two main hallmarks of AD, most of these drugs have failed in clinical trials [1, 2]. This could be explained by the selectivity of such drugs which are designed to be active against one biological target [3]. However, AD is a multifactorial disease and involved the abnormality of several systems. Therefore, targeting more than one biological has become essential in order to have a disease-modifying effect [4]. Combining several drugs can be managed using the multiple-medication therapy (MMT) or the multiple-compound medication (MCM) but these therapeutic strategies are always related to poor patient compliance, drug-drug interactions and problems of bioavailability and metabolism. To avoid this kind of inconvenience, new drugs known as multi-target-directed ligands (MTDLs) are being developed [5]. MTDLs are sole molecules which are designed to be active against several biological targets with different mechanisms of action. Besides making easier the pharmacokinetic studies, it has been demonstrated that they show synergistic effects on their targets. Their use seems to be really promising in the treatment of neurodegenerative disorders such as AD [6, 7].

In a previous work, we described the synthesis of dual MTDLs combining acetylcholinesterase inhibitory (AChEI) activity with serotonergic type 4 receptors (5-HT₄R) agonism [8, 9] and also dual compounds behaving as antagonists of serotonergic type 6 receptors (5-HT₆R) and agonists of serotonergic type 4 receptors [10]. Indeed, chronic administration of 5-HT₄R agonists leads to a decrease of the amyloid pathology and cerebral inflammation and is also able to prevent cognitive deficits in 5XFAD mice, an AD mouse model [11, 12]. These disease-modifying effects are linked to the promotion of the α -secretase cleavage of APP that induces the production of sAPP α , a neurotrophic and neuroprotective soluble fragment, and precludes the production of the amyloid- β peptide [13-15]. The 5-HT₆ receptor, another serotonin receptor subtype, has also aroused curiosity for the treatment of AD. Unlike 5-HT₄R, it is its blockade which can lead to beneficial effects on cognition [16-18]. In rodents, the administration of 5-HT₆R antagonists is followed by improved cognitive performance in several behavioral tests [19-22]. Its activity is thought to be mediated by the release of neurotransmitters such as acetylcholine and glutamate [23-26]. Inhibition of the mTOR pathway may also be involved in the procognitive effects [27].

Because of these properties, we consider that engaging these three therapeutic targets in the treatment of AD is a reliable strategy. Indeed, we recently reported the synthesis of new MTDLs designed to be at the same time AChEI, 5-HT₄R agonist and 5-HT₆R inverse agonist [28]. In this study, the first *in vivo* experiments using compound **5k/10** have demonstrated promising results which conducted us at designing donecopirdine. This compound, with a slight decrease in AChE affinity, presented better affinity for the serotonergic receptors 5-HT₄ and 5-HT₆ compared to compound **5k/10**. The present work aimed at demonstrating the potency of this new MTDL to prevent AD in cellular and animal models.

2. Material and Methods

2.1. Chemistry

All chemical reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined on a Kofler melting point apparatus. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a BRUKER AVANCE III 400MHz with chemical shifts expressed in parts per million (in chloroform-d, methanol-d₄ or DMSO-d₆) downfield from TMS as an internal standard and coupling in Hertz. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer BX FT-IR apparatus using KBr pellets. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray on a Bruker maXis. The purities of all tested compounds were analyzed by LC-MS, with the purity all being higher than 95%. Analyses were performed using a Waters Alliance 2695 as separating module (column XBridge C18 2.5 μM /4.6 x 50 mM) using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H₂O, B = CH₃CN; each containing HCOOH: 0.1%). MS were obtained on a SQ detector by positive ESI.

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-(2-bromo-5-hydroxybenzyl)piperidin-4-yl)propan-1-one (Donecopirdine). Yellow powder (26%); ^1H NMR (MeOD-d₄, 399.8 MHz) δ 7.65 (s, 1H), 7.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, 1H), 6.96 (d, $^4J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, 1H), 6.62 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 2.97-2.88 (m, 4H), 2.17-2.11 (m, 2H), 1.72-1.70 (m, 2H), 1.58-1.53 (m, 2H), 1.34-1.28 (m, 3H); ^{13}C NMR (MeOD-d₄, 100 MHz) δ 201.1, 161.7, 158.2, 151.7, 138.8, 134.3, 132.9, 119.2, 117.9, 117.2, 114.6, 111.6, 98.1, 61.9, 56.1, 55.0, 41.7, 36.7, 33.0, 32.8; MS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 481.59 – 483.58 – 485.59; HRMS (m/z) calcd for C₂₂H₂₇N₂O₃ClBr $[\text{M}+\text{H}]^+$ 481.0894, found 481.0889;

2.2. *In vitro* biological studies

2.2.1. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT₄R

The method was validated from saturation studies: six concentrations of [^3H]-GR113808 (Perkin Elmer) were used to give final concentrations of 0.0625-2 nM, and nonspecific binding of [^3H]-GR113808 was defined in the presence of 30 μM serotonin to determine the K_d and the B_{max} . For competition studies, 2.5 μg of proteins (5-HT_{4(b)}) membrane preparations, HTS110M, Millipore. Millipore's 5-HT_{4(b)} membrane preparations are crude membrane preparations made from their proprietary stable recombinant cell lines to ensure high-level of GPCR surface expression) were incubated in duplicate at 25°C for 60 min in the absence or the presence of 10⁻⁶ or 10⁻⁸ M of each drug (RS 67333 was used as a reference standard) and 0.2 nM [^3H]-GR113808 (VT 240, ViTrax) in 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 25°C). At the end of the incubation, homogenates were filtered through Whatman GF/C filters (Alpha Biotech) presoaked with 0.5% polyethylenimine using a Brandel cell harvester. Filters were subsequently washed three times with 4 mL of ice-cold 25 mM Tris buffer (pH 7.4, 4°C). Non-specific binding was evaluated in parallel in the presence of 30 μM serotonin.

Affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the EBDA-Ligand software and expressed as $K_i \pm \text{SD}$.

2.2.2. Pharmacological characterization of drugs on human 5-HT₆R

Drugs were evaluated through their possibility to compete for the binding of [³H]-LSD on membranes of HEK-293 cells transiently expressing the human 5-HT₆ receptor (ref. RBHS6M, Perkin Elmer Life Sciences). In brief, 4 µg of proteins were incubated at 37°C for 60 min in duplicate in the absence or the presence of 10⁻⁷ M of each drug (idalopirdine was used as a reference standard) and 2.5 nM [³H]-LSD (ref. NET638250UC, Perkin Elmer Life Sciences), in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) supplemented with 10 mM MgCl₂ and 0.5 mM EDTA. At the end of the incubation, the homogenates were then filtered through Whatman GF/C filters and washed five times with ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer. Non-specific binding was evaluated in the presence of 100 µM serotonin. Radioactivity associated to proteins was then quantified and expressed as the percentage of inhibition of the drugs under study.

The method was validated from saturation studies: 6 concentrations of [³H]-LSD were used to give final concentrations of 0.25-8 nM, non-specific binding of [³H]-LSD was defined in the presence of 100 µM serotonin to determine the K_d and the B_{max}.

Affinity constants were calculated from five-point inhibition curves using the EBDA-Ligand software and expressed as K_i ± SD.

2.2.3. Determination of cAMP production

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFCS) and antibiotics. Cells were transiently transfected with plasmid encoding HA-tagged 5-HT₄R or HA-tagged 5-HT₆R, then seeded in 96-well plates (16,000 cells/well).

5-HT₄R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₄R ligands in the presence of 0.1 mM of the phosphodiesterase inhibitor RO 20 1724, at 37°C in 100 µL of HBS (20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 4.2 mM KCl; 0.9 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂; 0.1% glucose; 0.1% BSA). After 10 min, cells were then lysed by addition of the same volume of Triton-X100 (0.1%).

Blockade of the 5-HT₆R-induced cAMP production: 24 hrs after transfection, cells were exposed to the indicated concentrations of 5-HT₆R ligands at 37°C in 50 µl of HBS. After 7 min, 5-HT (5.10⁻⁷M final concentration) in the presence of 0.1 mM (final concentration) of RO 20 1724, in 50 µl HBS, was added to the wells. After 10 min at 37°C, cells were then lysed by addition of 100µl of Triton-X100 (0.1%).

Quantification of cAMP production was performed by HTRF® by using the cAMP Dynamic kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

Idalopirdine was synthesized by the CERMN. RS 67333 (1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy-phenyl)-3-(1-butyl-4-piperidinyl)-1-propa-none), and SB 271046 (5-Chloro-N-[4-methoxy-3-(1-piperazinyl)phenyl]-3-methylbenzo[b]thiophen-2-sulfonamide) were purchased from Tocris Bioscience (R&D Systems Europe, Lille, France).

2.2.4. *In vitro* tests of AChE biological activity

Inhibitory capacity of compounds on AChE biological activity was evaluated through the use of the spectrometric method of Ellman [29]. Acetylthiocholine iodide and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma Aldrich. AChE from human erythrocytes (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma Aldrich) was diluted in 20 mM HEPES buffer pH 8, 0.1% Triton X-100 such as to have enzyme solution with 0.25 unit/mL enzyme activity. In the procedure, 100 µL of 0.3 mM DTNB dissolved in phosphate buffer pH 7.4 were added into the 96 wells plate followed by 50 µL of test compound solution and 50

μL of enzyme (0.05 U final). After 5 min of preincubation at 25°C, the reaction was then initiated by the injection of 50 μL of 10 mM acetylthiocholine iodide solution. The hydrolysis of acetylthiocholine was monitored by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine, at a wavelength of 412 nm using a 96-well microplate plate reader (TECAN Infinite M200, Lyon, France). Test compounds were dissolved in analytical grade DMSO. Donepezil (DPZ) was used as a reference standard. The rate of absorbance increase at 412 nm was followed every minute for 10 min. Assays were performed with a blank containing all components except acetylthiocholine, in order to account for non-enzymatic reaction. The reaction slopes were compared and the percent inhibition due to the presence of test compounds was calculated by the following expression: $100 - (v_i/v_0 \times 100)$ where v_i is the rate calculated in the presence of inhibitor and v_0 is the enzyme activity.

First screening of AChE activity was carried out at a 10^{-6}M concentration of compounds under study. For the compounds with significant inhibition ($\geq 50\%$), IC_{50} values were determined graphically by plotting the % inhibition versus the logarithm of six inhibitor concentrations in the assay solution using the Origin software.

2.3. *In vivo* biological studies

2.3.1. Animals

2.3.1.1. Toxicology, locomotion and spatial working memory

Adult male NMRI mice (3 months old, weighing 35-40g) from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used to perform experiments. Mice were housed by ten in standard polycarbonate cages in standard controlled conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ humidity) with a reversed 12 h light/dark cycle (light on at 7 pm). Food and water were available ad libitum in the home cage. All experiments were conducted (between 9 am and 3 pm) during the active - dark - phase of the cycle and were in agreement with the European Directives and French law on animal experimentation (personal authorization n° 14-17 for MB and 14-60 for TF).

2.3.1.2. Chronic treatments

Animal experiments were carried out in accordance with the Directive by the Council of the European Communities of November 24, 1986 (86/609/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of mice used. The generation of 5XFAD mice was described previously (Oakley *et al.*, 2006). These transgenic mice overexpress both human APP (695) harboring the Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V) and London (V717I) familial AD (FAD) mutations and human Presenilin 1 (PS1) harboring the two FAD mutations M146L and L286V. Expression of both transgenes is regulated by neuronal-specific elements of the mouse Thyl promoter. The 5XFAD strain (B6/SJL genetic background) was backcrossed over more than 10 generation in the C57BL/6J genetic background by crossing hemizygous transgenic mice with C57BL/6J F1 breeders (Janvier). 5XFAD heterozygous transgenic mice were used for the experiments and Wild type (WT) littermates as controls. All animals were genotyped by PCR using tail genomic DNA. WT and 5XFAD female C57BL/6 mice (6-week-old) were bred in the Plateau Central d'Élevage et d'Archivage (CNRS, MONTPELLIER). Transgenic and WT mice were experimented in our animal facility, had access to food and water ad libitum and were housed under a 12 h light-dark cycle at $22-24^\circ\text{C}$. Female 5XFAD mice were used in this study. For each experiment, the age of mice is indicated in weeks (with a 4-day range).

2.3.2. Drugs and animal treatment

2.3.2.1. Toxicology, locomotion and spatial working memory

Amphetamine (+)- α -Methylphenethylamine hemisulfate, chlorpromazine hydrochloride, imipramine hydrochloride and scopolamine hydrobromide were purchased from Sigma (France). All those pharmacological compounds were dissolved in NaCl 0.9% as the vehicle and were administered i.p. 30 min before tests, except scopolamine which was subcutaneously administered 20 min before spontaneous alternation test.

2.3.2.2. Chronic treatments

Donecopirdine and donepezil were synthesized in CERMN, resuspended in DMSO (37.5 mg/ml, stored at -20°C) and freshly diluted 1:250 in 0.9% NaCl prior administration.

5XFAD mice and WT littermates received chronic treatments with drugs or vehicle intraperitoneally (i.p.), twice a week (1 mg/kg) and for 18 weeks, from 6-week old to 6 months of age. At the end of the protocol, mice were anesthetized with a mixture of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine in saline solution and perfused transcardially with PBS. Brains were quickly isolated on ice, the olfactory bulbs and cerebellum removed and the two hemispheres divided. One hemisphere was frozen on dry ice and stored at -80°C for biochemical analysis, while the other was post-fixed in 4% PFA for immunohistochemistry (IHC).

2.3.3. CNS-activity and acute toxicity test

Behavioral and neurological changes induced by graded doses (1, 10, 100 mg/kg) of the tested derivatives were evaluated in mice, in groups of four, by a standardized observation technique at different times (30 min, 3 and 24 h) after intraperitoneal administration. Major changes of behavioral data (for example, hypo- or hyperactivity, ataxia, tremors, convulsion, etc.) were noted in comparison to the control group. The approximate DL_{50} of the compounds were also calculated through the quantification of mortality after 24 h. Amphetamine (2 mg/kg), chlorpromazine (10 mg/kg) were used as stimulant and depressive references, respectively.

2.3.4. Locomotor activity

Locomotion of mice was measured using an actimeter (Imetronic®) through infrared detection. Eight individual removable polycarbonate cages (21-cm length, 7-cm wide and 12-cm high), where each mouse was placed, are disposed in the actimeter. Locomotor activity was measured by recording the number of interruption of beams of the red light over a period of 30 min through an attached recording system to the actimeter. Donecopirdine was tested at 1, 3 and 10 mg/kg. Amphetamine (2 mg/kg), chlorpromazine (3 mg/kg) were used as stimulant and depressive references, respectively.

2.3.5. Spatial working memory

Anti-amnesiant activity of tested compounds was evaluated by reversal of scopolamine (0.5 mg/kg) - induced deficit on spontaneous alternation behavior in the Y maze test. The Y maze made of grey plastic consisted of three equally spaced arms (21-cm long, 7-cm wide with walls 15-cm high). The mouse was placed at the end of one of the arms and allowed to move freely through the maze during a 5 min session while the sequence of arm entries was recorded by an observer. An arm entry was scored when all four feet crossed into the arm. An alternation was defined as entries into all three arms on a consecutive occasion. The number of possible alternation is thus the total number of arm entries minus two; the percentage of alternation was calculated as (actual alternation/possible alternation) [30]. Donecopirdine was tested at 0.3, 1 and 3 mg/kg.

2.3.6. Novel object recognition test

The recognition memory of mice was tested using the novel object recognition (NOR) test [31]. Animals were extensively handled during drug treatment prior to the test onset. Each day, mice were allowed to familiarize with the test room for at least 1 h prior to the test. Testing was carried out in a V-maze (5-cm wide, 33-cm length, 15-cm height) placed in a dimly lit room (15-20 Lx). On day 1, each mouse was habituated to the empty V-maze for 5 min. On day 2, two objects (constructed out of plastic toys) were positioned at the bottom of each arm. During the acquisition session, each animal was placed in the hollow of the V-maze, facing the wall and then was allowed to explore each arm and each object for 5 min. Mice were then returned to their home cage and 24 h later, on day 3, went through a 5 min restitution session in which one of the two (familiar) objects was replaced by a new one (novel). The whole experiment was video-recorded and object exploration (time spent by the mouse nose in contact with the object or by sniffing it at a distance ≤ 1 cm) was blindly measured. Two parameters were considered: (1) the exploration time (s) spent by the animal interacting with the two familiar objects during the training session and (2) the exploration time spent by the animal interacting with the novel object relative to the total exploration time $\{[\text{novel}/(\text{familiar} + \text{novel})] \times 100\}$ during the test. A discrimination index was also calculated $\{[\text{novel} - \text{familiar}]/[\text{familiar} + \text{novel}]\}$. Mice that failed to explore either of the two objects or explored both objects for less than 10 s during the training session were excluded from the data analysis (four WT and four 5XFAD mice from a total of 43 mice).

2.3.7. Barnes Maze

Learning and memory performance of 5XFAD mice and WT littermate were assessed using the Barnes maze. The Barnes maze consisted of a white circular PVC slab (92-cm diameter and 10-mm thickness) with twenty circular holes (5-cm diameter) located at 2 cm from the edge of the maze. Each hole was equidistant from each other (8 cm). Metal rails were positioned just under the white platform so that an escape cage could be placed under four holes (number 1, 5, 10 and 15). This escape cage was made with black plastic and included a ramp to allow mice to get down from the maze to the escape cage. A sheet of black cardboard was put at the bottom of the escape cage to make easier the cleaning between each mouse. The maze was elevated 100 cm above the ground on a rotating stool. The maze was placed in the center of a room and two lights were placed 110 cm above the center of the maze (320 Lx). For aversive motivation, noise was made with the sound of fire alarm (85 dB). In addition to the room itself, other visual cues were added around the room (circles, triangles...). A black plastic cylinder of 8-cm diameter and 12.5 cm height was used to keep mice at the center of the maze at the start of each trial. Between each trial, the Barnes maze and the escape cage were cleaned with 20% ethanol. All sessions were video-recorded and tracked using Noldus EthoVision software.

On the habituation day (Day 1), each mouse was placed in the black cylinder in the center of the Barnes maze during 30 s while noise and light were activated. Then, mice were slowly guided to the escape cage with the hands. At the escape cage, mice were given 1 min to enter by themselves the target hole, then they were nudged with the hands to enter. Mice were left alone in the escape cage for 1 min without light and/or noise and then returned in their home cage. During a training session, each mouse was placed again in the center of the Barnes maze for 15 s still with noise and light. Then, the plastic cylinder was removed and mice were given 2 min to explore and enter (or not) the escape cage. If mice found the escape cage and enter it during the 2 min allowed, they were allowed to stay in it for 1 min. If they didn't find the escape cage or found it but didn't enter they were guided to it with the hands and nudged to enter it. Then, they were left alone in the escape cage for 1 min and taken back to their home cage. Every time a mouse entered the escape cage, with help or not, noise and light were

cut off. Three training sessions were performed on day 1 and two training sessions on day 2. On day 3, mice were left in their home cage without any training session. During the probe test on day 4, 48h after the last training session, mice were placed again in the center of the Barnes mice for 15 s with noise and light on and the escape cage was removed. Mice were given 2 min to explore the Barnes maze.

2.3.8. Immunohistochemistry

Thirty-micrometer-thick sections were cut using a vibratome (Leica VT1000 S) and stored in cryoprotectant medium at -20°C. For the labeling of amyloid plaques and astrogliosis, three sections/animal of hippocampus and entorhinal cortex (coordinates from the bregma: hippocampus = -1.94 mm, entorhinal cortex = -3.08 mm) were extensively washed in TBS, incubated in blocking solution (TBS; 3% BSA; 0.1% Triton X-100) for 1 hour, then incubated with the polyclonal rabbit anti-GFAP antibody (1:1000, Z0334, Dako, Les Ullis, France) in TBS; 1% BSA; 0,1% Triton X-100 at 4°C overnight. Sections were then incubated with Thioflavin T solution (#T3516-5G, Sigma-Aldrich) (final concentration: 1 mg/mL in the antibody buffer) for 15 minutes. After washing in 70% ethanol for 5 minutes and in TBS for 30 minutes, sections were incubated with the AlexaFluor 594 goat anti-rabbit antibody (1:1000, A11012, Life Technologies) for 2 hours. After TBS washes and cell nuclei staining with Hoechst dye (1:5000, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 5 minutes, sections were mounted on poly-L-lysine slides.

2.3.9. Image acquisition and analysis

Images were acquired with an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss S.A.S., Marly le Roi, France). All analysis was performed blindly and automatically with the Image J software. For Thioflavin T and GFAP staining, data are respectively presented as the mean number of particles per mm² and as the mean intensity in area fractions. For representative images, mosaic sequential scans with a 10X objective were taken.

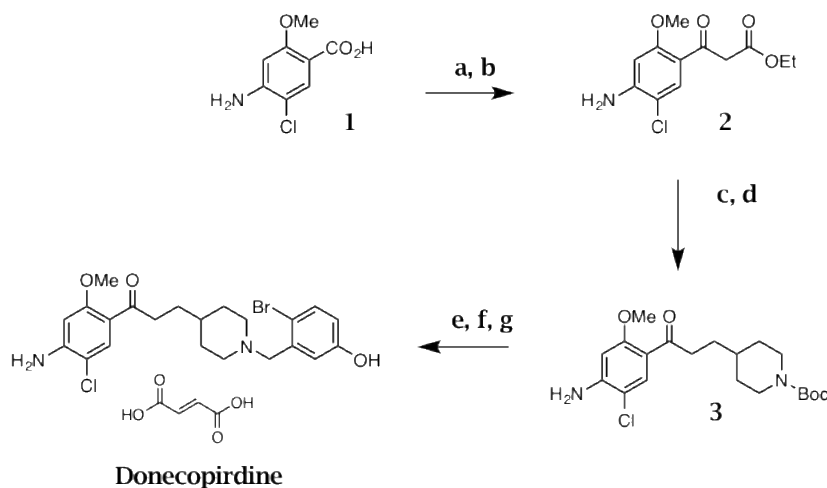
2.3.10. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Significant effects of treatments were determined by ANOVA analysis followed by post hoc test (Student-Newman-Keuls or Bonferroni's) in the case of multiple comparison groups, as indicated in the legends of the figures. In case of missing values, a mixed-effect model with Geisser-Greenhouse correction, followed by Dunnett's test was used. When the distribution was not Gaussian, non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test were used. In all other cases, the unpaired Student's t test was used. For all statistical tests, $p < 0.05$ was considered significant. Analysis was performed with Statview® software and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. Results

3.1 Synthesis of donecopirdine

Donecopirdine was obtained following a multi-step sequence which was previously reported in [28]. Briefly, this sequence starts with the carbonyldiimidazole (CDI) activation of 4-amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid (**1**) (Scheme 1) [9] followed by the synthesis of a β -ketoester (**2**) with a 62% yield. A nucleophilic substitution with *N*-Boc 4-(iodomethyl)piperidine allowed us to install the methylpiperidine moiety at rt in order to prevent a double substitution from happening. This nucleophilic substitution was immediately followed by a saponification–decarboxylation with hydroalcoholic potassium hydroxide which gave **3** in a 86% yield. Finally, donecopirdine was obtained by releasing the nitrogen atom through TFA-*N*-deprotection of **3**, immediately followed by another nucleophilic substitution with 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol. The fumaric acid salt of donecopirdine was synthesized using fumaric acid in *i*PrOH.



Scheme 1: Synthetic pathways for access to donecopirdine. Conditions and reagents: (a) CDI, THF; (b) $\text{KO}_2\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, MgCl_2 , THF; (c) *N*-Boc 4-iodomethylpiperidine, K_2CO_3 , DMF; (d) KOH, EtOH/ H_2O ; (e) TFA, 1,4-dioxane or DCM; (f) 4-bromo-3-(iodomethyl)phenol, K_2CO_3 , 1,4-dioxane or DMF; (g) fumaric acid, *i*PrOH.

3.2 Donecopirdine is a potent MTDL towards AChE, 5HT₄R and 5HT₆R

In the following tests, donepezil (DPZ) was used as a reference AChE inhibitor (AChEI), idalopirdine as a selective 5-HT₆R ligand and RS 67333 as a reference 5-HT₄R ligand (Figure 1). Donecopirdine was evaluated as a potential inhibitor of human AChE, using the Ellman assay [29], as well as a potential ligand for human 5-HT₆R and 5-HT₄R using a radioligand displacement assay (Table 1).

Annexes

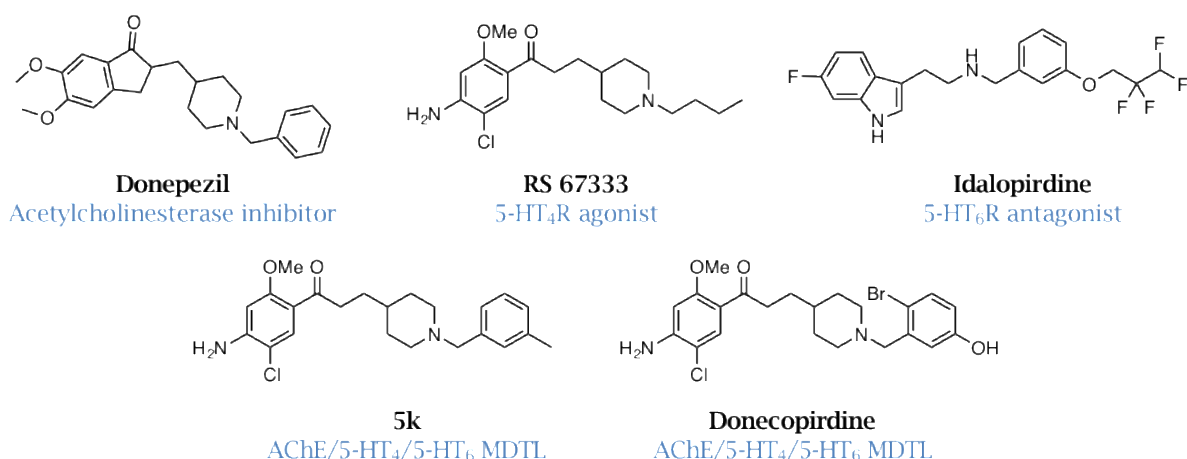


Figure 1: Structure of donepezil, RS 67333, idalopirdine and **5k**.

	(h)A	(h)5-HT ₆ R		(h)5-HT ₄ R	
	ChE				
	%10 ⁻⁶ M	%10 ⁻⁶ M	%10 ⁻⁸ M	%10 ⁻⁶ M	%10 ⁻⁸ M
Donepezil*	97	-	-	-	-
Idalopirdine*	-	106	88	-	-
RS 67333*	-	-	-	100	42
5k*	89	80	9	98	25
Donecopirdine	86	98	19	100	45

Table 1. (h)AChE inhibitory activity, (h)5-HT₆R and (h)5-HT₄R affinity for donepezil, idalopirdine, RS 67333, our previously described compound **5k** and donecopirdine (% inhib at 10⁻⁶M, 10⁻⁸M and 10⁻⁸M respectively). * Data previously reported in [28]

Donecopirdine displayed submicromolar activities towards (h)AChE, 5-HT₄R and 5-HT₆R (Table 2). Its activity is quite better for the two serotonergic receptors than for AChE. Nevertheless, AChE inhibitory is acceptable since getting three activities towards three distinct targets is very challenging.

	(h)AChE	(h)5-HT ₆ R	(h)5-HT ₄ R
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	K _i (nM)
	(n = 2)	(n = 3)	(n = 3)
Donepezil*	7 ± 1.5	ND	ND
Idalopirdine*	ND	6.9 ± 1.2	ND
RS 67333*	ND	ND	5.1 ± 0.5
5k*	161 ± 43	230 ± 49	168 ± 15
Donecopirdine	274 ± 8	91 ± 11	29 ± 12

Table 2. (*h*)AChE inhibitory activity (IC₅₀) and (*h*)5-HT₆R and (*h*)5-HT₄R affinity (K_i) for donepezil, idalopirdine, RS 67333, our previously described compound **5k** and donecopirdine. ND, not determined.

On the basis of these results, the pharmacological profiles of donecopirdine towards 5-HT₄R and 5-HT₆R were determined in COS-7 transiently expressing one or the other receptor. SB 271046 was used as a control 5-HT₆R full antagonist and 5-HT as control 5-HT₄R full agonist. Donecopirdine acted as a partial agonist towards (*h*)5-HT₄R, slightly more potent than RS 67333 (Table 3 and figure 2A), and as an inverse agonist towards (*h*)5-HT₆R in the same way as idalopirdine (Figure 2B). As a 5-HT₄R partial agonist, donecopirdine should promote the non-amyloidogenic processing of APP and thus the release of sAPP α . The capacity of donecopirdine to promote sAPP secretion was evaluated on COS-7 cells expressing 5-HT₄R. To the same extend as RS 67333, donecopirdine dose-dependently induced the release of APP extracellular domain (Table 3 and figure 2C). Interestingly, we demonstrated that donecopirdine was able to reverse the constitutive activity of the 5-HT₆R, thus behaving as an inverse agonist (Figure 2D). SB 271046 and idalopirdine are also inverse agonists towards 5-HT₆R.

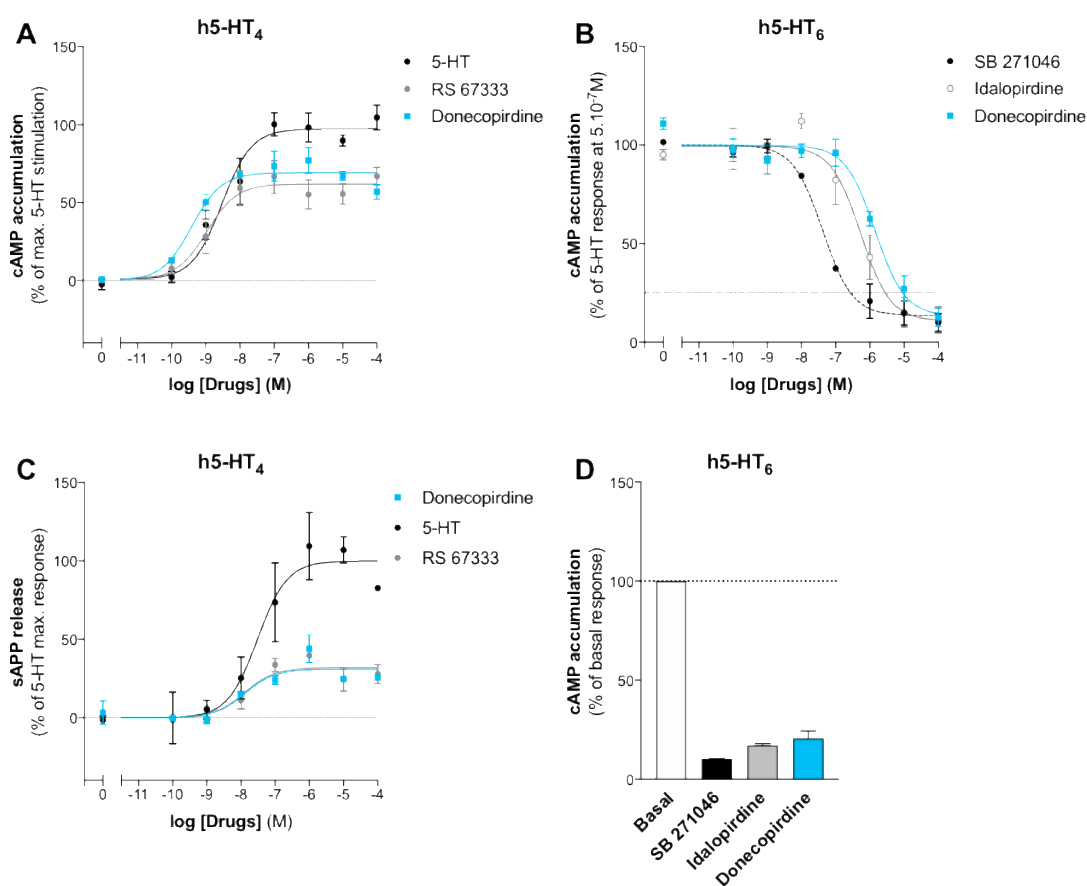


Figure 2: Pharmacological profile of donecopirdine. Experiments demonstrating partial agonist activities of RS 67333 and donecopirdine towards (*h*)5-HT_{4(a)}R (A) and antagonist activities of SB 271046, idalopirdine and donecopirdine towards (*h*)5-HT₆R stimulated with 5.10⁻⁷M of 5-HT (B); data are means \pm standard error of the mean (SEM); n = 3. (C) Representative experiment illustrating the promotion of sAPP secretion by RS 67333 and donecopirdine in COS-7 cells expressing (*h*)5-HT_{4(a)}R. (D) Inverse agonist activities of SB 271046, idalopirdine and donecopirdine (10⁻⁴M) towards (*h*)5-HT₆R in absence of 5-HT (means \pm SEM of two independent experiments performed in duplicates).

(*h*)5-HT₄R(*h*)5-HT₆R

Annexes

	cAMP	sAPP	cAMP
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)
5-HT	6.3 ± 4.9	32.3 ± 4.4	ND
RS 67333	2.6 ± 2.1	15.4 ± 8.1	ND
SB 271046	ND	ND	41.9 ± 8.0
Idalopirdine	ND	ND	595 ± 308
Donecopirdine	0.4 ± 0.1	19.6 ± 6.5	1484 ± 282

Table 3. Functional pharmacological profile of donecopirdine. (*h*)5-HT₄R agonist activity (EC₅₀) towards cAMP production and sAPP release for 5-HT, RS 67333 and donecopirdine. (*h*)5-HT₆R antagonist activity (IC₅₀) towards cAMP production for SB 271046, idalopirdine and donecopirdine. ND, not determined.

3.3 Donecopirdine presents antioxidant properties

Donecopirdine antioxidant ability was evaluated in two tests, DPPH, and ORAC [32]. The ORAC_{FI} assay was conducted in an aqueous medium according to well-described procedure. It evaluates the antioxidant activity via a Hydrogen Atom Transfert (HAT) mechanism. Calculating the AUC of the fluorescence decrease for 1.5 hours, quantitative and kinetic aspects are both taken into account. In that test, donecopirdine showed a noticeable antioxidant activity which appeared to be 3-fold more potent than Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid), a widely used antioxidant reference compound. (Table 4). The DPPH assay was performed in an organic solvent and enabled the evaluation of antioxidant activity following a Single-Electron-Transfer (SET) mechanism as described in [33]. Here, donecopirdine presented no activity.

	ORAC	DPHH
	($\mu\text{M}_{\text{compound}} /$ $\mu\text{M}_{\text{Trolox}^{\circledR}}$)	EC ₅₀ at 60 min (nM)
Donecopirdine	2.88 ± 0.15	> 250
Quercetin	6.50 ± 0.73	xx ± xx
Trolox®	1	22.5 ± 0.9

Table 4: *In vitro* antioxidant activities of donecopirdine

3.4 Donecopirdine presents a safe toxicological profile

In Swiss male mice (8-week-old), donecopirdine (fumarate salt) showed a slight and transient hyperactivity at subtoxic doses 1-10 mg/kg and a slight and transient hypoactivity at 100 mg/kg (i.p. administration). At toxic dose, 100 mg/kg, no mortality was observed over 24 hours, which suggests that lethal dose is higher than 100 mg/kg (a weight loss of 1.2 g average has been noticed 24 hours after the injection). The spontaneous locomotor activity was not affected by the tested doses of 1, 3 and 10 mg/kg (Figure 3).

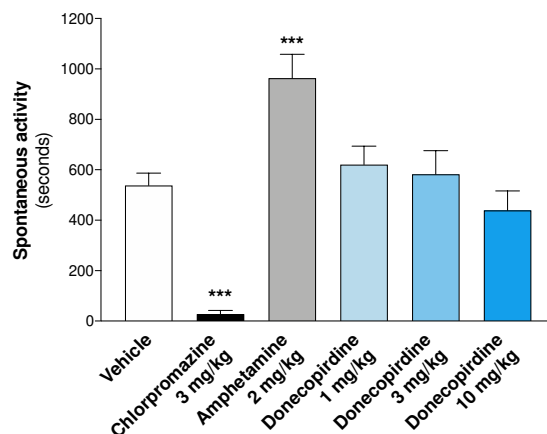


Figure 3: Donecopirdine does not modify the spontaneous activity of Swiss mice. Chlorpromazine and amphetamine were used as controls. Data are expressed as means \pm SEM (n = 8/group). ***p < 0.0001 (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test)

3.5 Donecopirdine partially counteracts the scopolamine-induced impairment

In Swiss male mice (8-week-old), donecopirdine (fumarate salt) exhibited an anti-amnesic effect at 1 and 10 mg/kg in regards to scopolamine-induced spontaneous alternation deficits (Figure 4). No significant effect was seen at the 3 mg/kg dose.

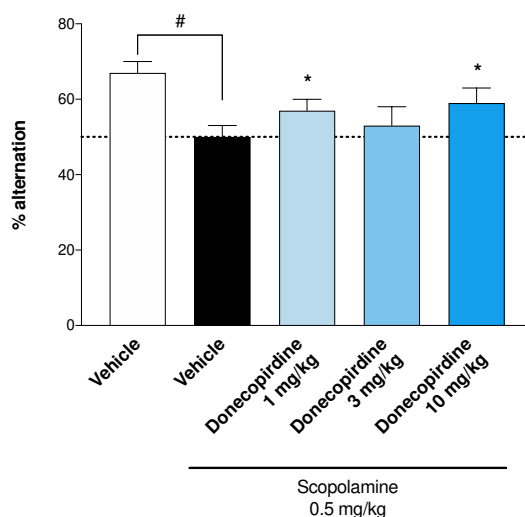
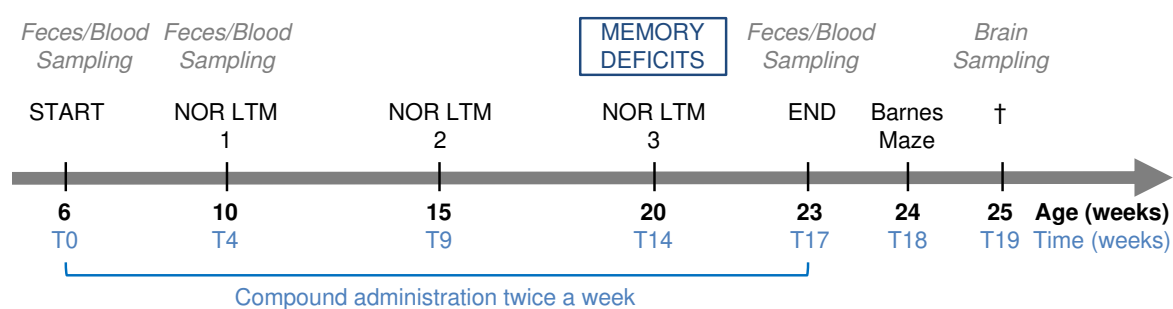


Figure 4: Effect of donecopirdine on scopolamine-induced impairment during the spontaneous alternation test. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 10). Drugs were administered i.p. 30 min before the test, and scopolamine was administered s.c. 20 min before the test. *p < 0.05 vs. 50%; univariate t-test. #p < 0.05; ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

3.6 Chronic donecopirdine administration prevents cognitive deficits in 5XFAD mice

It is now well documented that administration of 5-HT₄R agonists or 5-HT₆R antagonists can improve memory and learning performance [11, 12, 21, 34-37]. Therefore, we investigated whether chronic administration

of donecopirdine could also exert pro-cognitive and/or preventive effects in 5XFAD mice, a mouse model of AD. 5XFAD mice and WT littermates, both treated with vehicle, were used as control groups. 5XFAD mice treated with DPZ were included as comparison with a symptomatic treatment currently available. Each group was injected twice a week at 1 mg/kg for 6-week-old to 6-month-old (18 weeks of treatment). Longitudinal monitoring of the episodic-like memory of the mice was assessed at 10, 15 and 20-week-old using the NOR (Novel Object Recognition) paradigm (Scheme 2). Of importance, these experiments were conducted using animals bred in SOPF (Specific and Opportunist Pathogen Free) animal housing. The amyloid pathology is dependent of the microbiota composition and animal housing status [38]. Consequently, the appearance of memory impairment is delayed in SOPF 5XFAD mice in comparison with conventionally bred mice (memory impairment at 16 weeks of age, [11]) and in the current experiments, the cognitive deficits were only detectable at the age of 20 weeks (Scheme 2).



Scheme 2: Design of the chronic administration experiment in 5XFAD mice. NOR LTM, Novel Object Recognition; LTM, Long Term Memory

The NOR test was performed in a V-maze [39] after 14 weeks of treatment, as depicted in figure 5A. To evaluate the long-term recognition memory performances of the mice, an inter-trial interval of 24h was applied between two exploration trials of 5 min. In this paradigm, the 5XFAD mice are unable to discriminate between familiar and novel object (Figure 5B-C). The transgenic mice that received donecopirdine present memory performances similar to WT mice treated with vehicle (Figure 5B-C) with a discrimination index that is close to significance ($p = 0.052$). However, in the same conditions, donepezil was unable to prevent the cognitive impairment of the 5XFAD mice. Mice treated with Donepezil and donecopirdine presented a slight decrease in the total exploration time in comparison with WT mice (Figure 5D). Nevertheless, their exploratory ability was not different from the total exploration time of the 5XFAD treated with vehicle. As a result, donecopirdine showed superior potential than donepezil to preserve episodic-like memory in the NOR test.

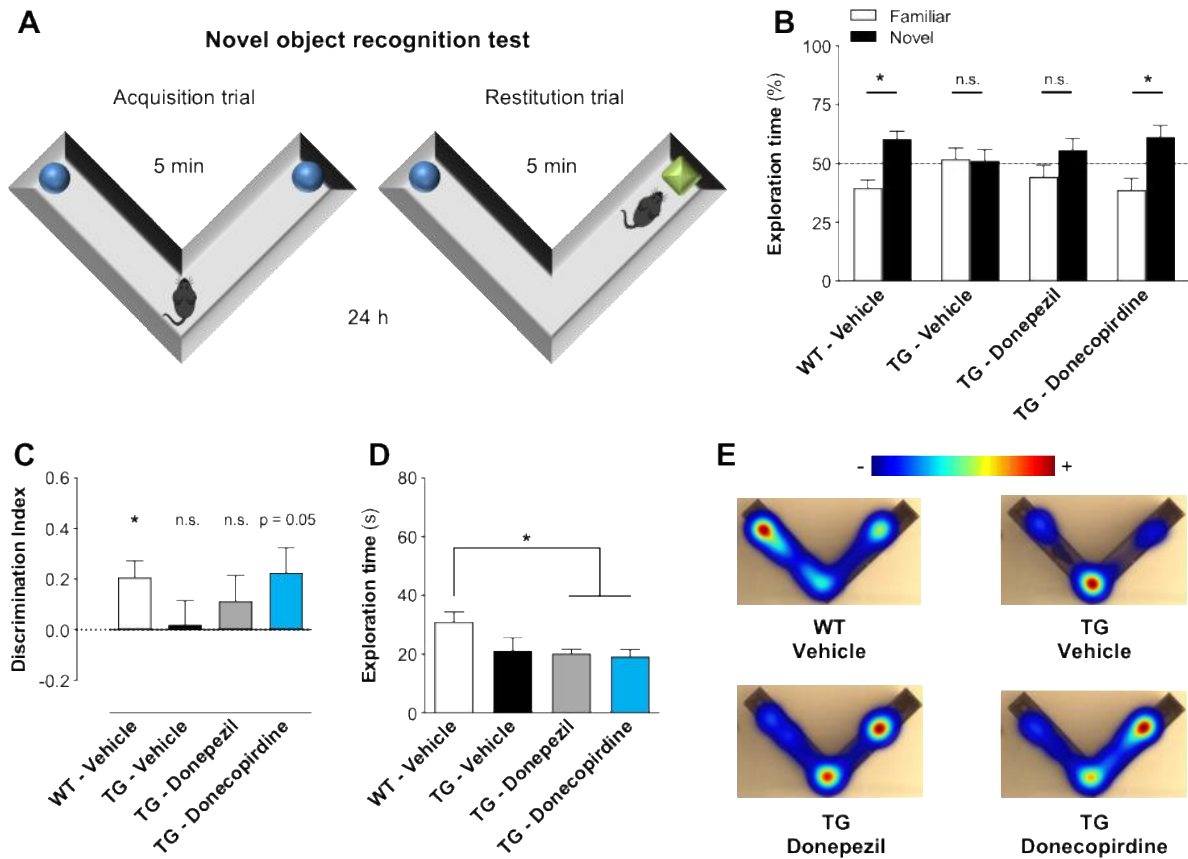


Figure 5. Chronic administration of donecopirdine prevents object recognition memory loss in 5XFAD mice. Six-week-old 5XFAD females (TG) and WT littermates were treated with donecopirdine, donepezil or vehicle (1 mg/kg) twice a week for 14 weeks. Recognition memory was assessed with the novel object recognition (NOR) test. The interval between training session and test was of 24 h. **(A)** Scheme of the experimental paradigm. NOR test was performed in a V-maze. **(B)** Donecopirdine-treatment prevents cognitive impairment as indicated by the higher percentage of time devoted to the exploration of the novel object in comparison to mice treated with vehicle. Data are the mean \pm SEM ($n = 7-9$ mice/group for TG, $n = 11$ for WT). * $p < 0.05$ versus familiar object (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). **(C)** This finding was also confirmed by calculating the discrimination index [(novel - familiar)/(familiar + novel)]. Data are the mean \pm SEM. Indices different from zero: * $p < 0.05$ (unpaired Student's t test). **(D)** WT mice explore slightly more than TG mice treated with the compounds. No difference within the TG groups. **(E)** Representative images showing occupancy of V-maze during the restitution trial for the 4 groups of mice. The novel object was placed on the left for the WT group and on the right for the TG groups.

Two days after the last administration of the drugs (T18, Scheme 2), Barnes maze experiment was performed to assess for learning and memory performances of the mice. We used a shortened protocol developed by Attal *et al.* that was proven efficient in mouse model of AD (Figure 6A) [40]. After 5 training sessions, 5XFAD mice demonstrated clear impairment in learning compared to WT mice, with a primacy latency to target of 42-47 seconds in average for 5XFAD mice and 14 seconds for WT mice. However, the group effect is only significant for 5XFAD mice treated with vehicle or with donepezil ($p = 0.0284$ and $p = 0.0281$, respectively, Mixed-effect model with Geisser-Greenhouse correction, followed by Dunnett's test). Indeed, donecopirdine-treated animals presented a learning slope similar to the WT mice during the 3 first training sessions. Moreover, donecopirdine was capable to partially prevent the memory deficits of 5XFAD mice, as attested by a slower primary latency to

target (Figure 6C) and more occupancy of the target quadrant (Figure 6D-E) in the probe test. Conversely, donepezil was unable to prevent learning and memory impairment in this paradigm, as donepezil-treated mice presented cognitive deficits similar to the 5XFAD control mice (Figure 6B-D).

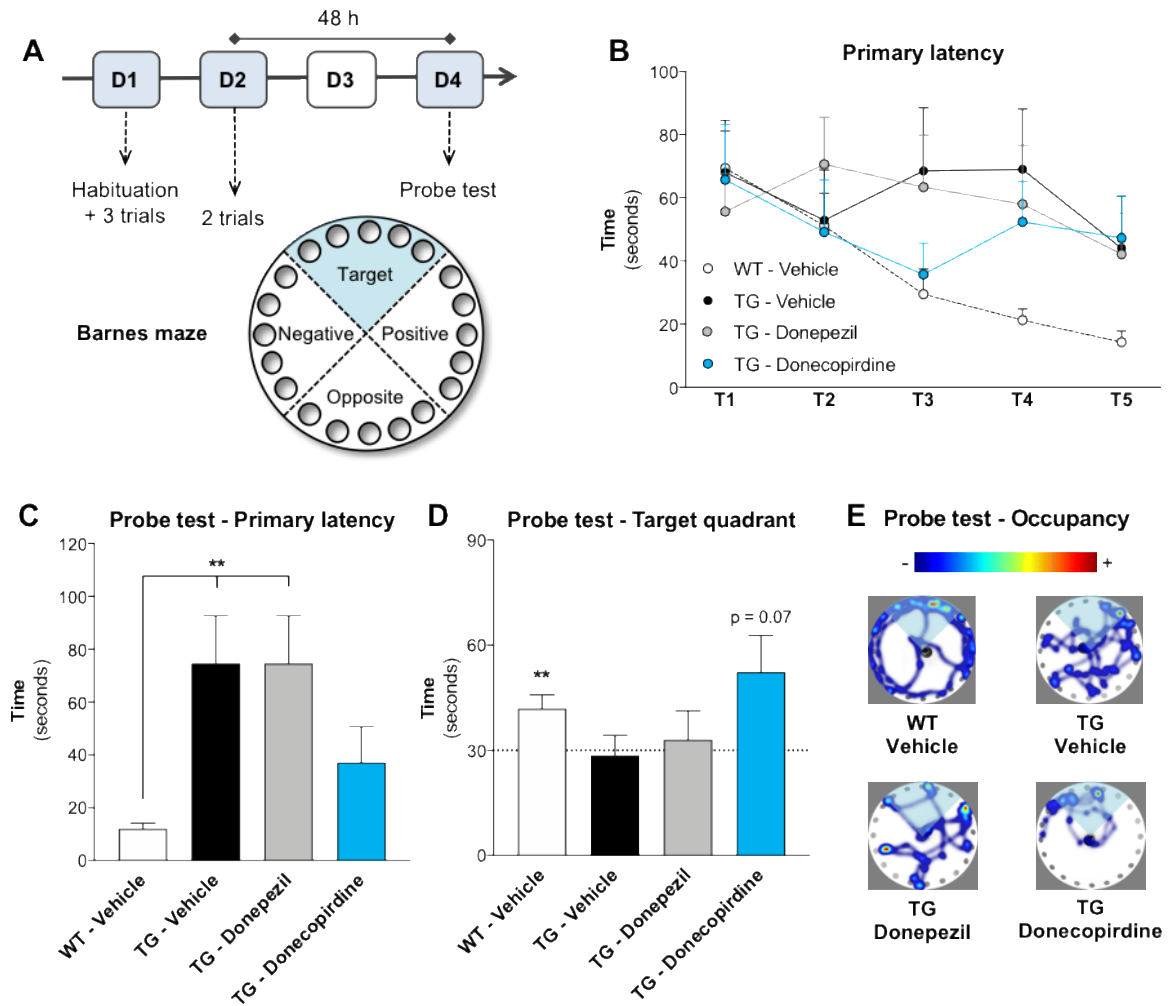


Figure 6. Chronic administration of donecopirdine prevents memory deficit of 5XFAD mice in the Barnes maze. 5XFAD females (TG) and WT littermates were treated with donecopirdine, donepezil or vehicle (1 mg/kg) twice a week for 18 weeks before the test. (A) Scheme of the experimental paradigm. (B) Learning curves representing the primary latency to target during the 5 training days. Data are the mean \pm SEM ($n = 8$ mice/group for TG, $n = 14$ for WT). (C-D) Probe trial performance 48 h after the last training session. Data are the mean \pm SEM. (C) Primary Latency to target $**p < 0.01$ versus WT treated with vehicle (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test). (D) Time spent in target quadrant. $**p < 0.05$ different from chance level indicated with a dashed line (unpaired Student's t test). (E) Representative images showing quadrant occupancy during the probe test for the 4 groups of mice. Target quadrant is indicated in shaded blue.

3.7 Analysis of amyloid pathology and astrogliosis

Our preliminary analysis of the amyloid plaque load in the brains of the 5XFAD mice showed a significant decrease in compact amyloid plaques in the entorhinal cortex of donecopirdine-treated animals compared with mice that received the vehicle (Figure 7A, C). No significant effect was detected with donepezil treatment. GFAP staining revealed no change in the astrogliosis extend in mouse brains (Figure 7B).

Annexes

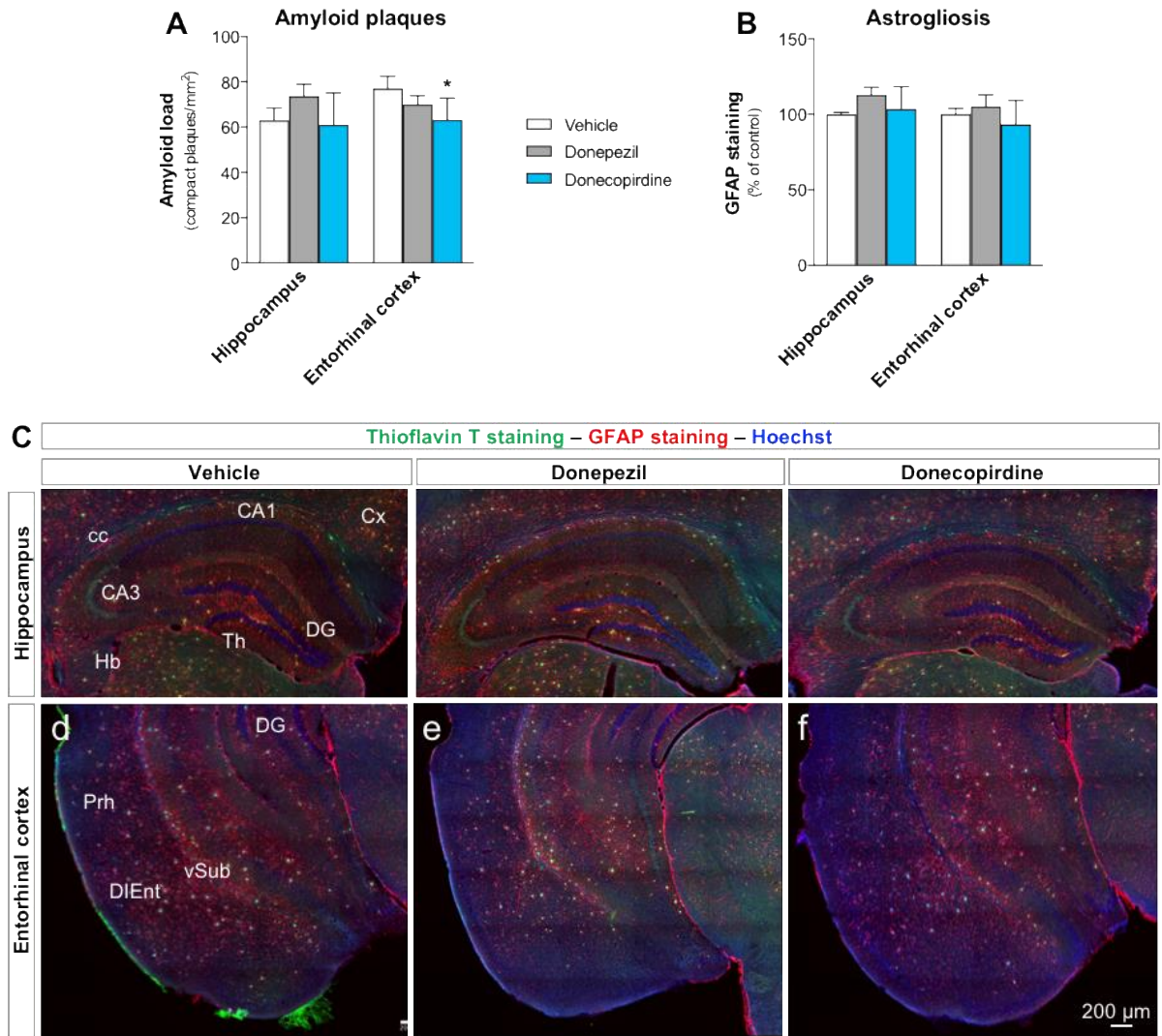


Figure 7: Chronic administration of donecopirdine reduces the amyloid plaque load in the entorhinal cortex of 5xFAD mice. Quantification of amyloid plaque load (number of plaques/mm², Thioflavin T staining) (A) and of astrogliosis (GFPA staining) (B) in the hippocampus and entorhinal cortex. Values are the mean ± SEM (n = 7-9 mice per group). **p*<0.05, ANOVA followed by post-hoc Fisher's LSD test. (C) Representative epifluorescence microphotographs of thioflavin T staining of amyloid plaques in the hippocampus (a-c) and entorhinal cortex (d-f) from 5XFAD mice treated with vehicle, donepezil or donecopirdine according to scheme 2. Scale bars: 200 μm. Cx: cortex; DG: hippocampal dentate gyrus; PRh: Perirhinal cortex; DIEnt: dorsal intermediate entorhinal field; CA1-CA3: *Cornu Ammonis* 1 to 3 of the hippocampus; Th: thalamus; cc: corpus callosum.

Annexes

This article will be further completed by on-going experiments assessing the following items:

- Complementary analysis of amyloid load by dosage of A β species in brain extracts
- Analysis of neuroinflammation (microglial staining and cytokine dosage)
- Analysis of synaptic integrity (staining of key proteins involved in synapse functioning)
- Analysis of neurogenesis (KI67 and DCX staining)
- Effect of donecopirdine in IPS cells derived from genetic AD patients (in collaboration with Carole Crozet)
- Effect of donecopirdine on intestinal microbiota composition (16S RNA sequencing of fecal samples that have been collected during chronic treatments).

4. References

1. Andrieu, S., Coley, N., Lovestone, S., Aisen, P. S. & Vellas, B. (2015) Prevention of sporadic Alzheimer's disease: lessons learned from clinical trials and future directions, *Lancet Neurol.* **14**, 926-944.
2. Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M. & Zhong, K. (2019) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019, *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* **5**, 272-293.
3. Cummings, J., Lee, G., Mortsdorf, T., Ritter, A. & Zhong, K. (2017) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017, *Alzheimers Dement (N Y)*. **3**, 367-384.
4. Cummings, J., Aisen, P. S., DuBois, B., Frolich, L., Jack, C. R., Jr., Jones, R. W., Morris, J. C., Raskin, J., Dowsett, S. A. & Scheltens, P. (2016) Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025, *Alzheimers Res Ther.* **8**, 39.
5. de Freitas Silva, M., Dias, K. S. T., Gontijo, V. S., Ortiz, C. J. C. & Viegas, C., Jr. (2018) Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: An Update, *Curr Med Chem.* **25**, 3491-3525.
6. Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D. & Malawska, B. (2015) Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *Curr Med Chem.* **22**, 373-404.
7. Wang, T., Liu, X. H., Guan, J., Ge, S., Wu, M. B., Lin, J. P. & Yang, L. R. (2019) Advancement of multi-target drug discoveries and promising applications in the field of Alzheimer's disease, *Eur J Med Chem.* **169**, 200-223.
8. Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., Bouet, V., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert Freon, A., Mignani, S., Cresteil, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2014) Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, E3825-30.
9. Rochais, C., Lecoutey, C., Gaven, F., Giannoni, P., Hamidouche, K., Hedou, D., Dubost, E., Genest, D., Yahiaoui, S., Freret, T., Bouet, V., Dauphin, F., Sopkova de Oliveira Santos, J., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert-Freon, A., Legay, R., Boulouard, M., Claeysen, S. & Dallemagne, P. (2015) Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride, *J Med Chem.* **58**, 3172-87.
10. Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J. S., Freret, T., Boulouard, M., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2016) Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease, *Eur J Med Chem.* **121**, 283-293.
11. Giannoni, P., Gaven, F., de Bundel, D., Baranger, K., Marchetti-Gauthier, E., Roman, F. S., Valjent, E., Marin, P., Bockaert, J., Rivera, S. & Claeysen, S. (2013) Early administration of RS 67333, a specific 5-HT4 receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Front Aging Neurosci.* **5**, 96.
12. Baranger, K., Giannoni, P., Girard, S. D., Girot, S., Gaven, F., Stephan, D., Migliorati, M., Khrestchatsky, M., Bockaert, J., Marchetti-Gauthier, E., Rivera, S., Claeysen, S. & Roman, F. S. (2017) Chronic treatments with a 5-HT4 receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *Neuropharmacology.* **126**, 128-141.
13. Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R. & Lezoualc'h, F. (2003) Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha, *Nat Cell Biol.* **5**, 633-9.
14. Cho, S. & Hu, Y. (2007) Activation of 5-HT4 receptors inhibits secretion of beta-amyloid peptides and increases neuronal survival, *Exp Neurol.* **203**, 274-8.
15. Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A. & Claeysen, S. (2013) 5-HT(4) Receptors Constitutively Promote the Non-Amyloidogenic Pathway of APP Cleavage and Interact with ADAM10, *ACS chemical neuroscience.* **4**, 130-40.
16. Upton, N., Chuang, T. T., Hunter, A. J. & Virley, D. J. (2008) 5-HT6 receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease, *Neurotherapeutics.* **5**, 458-69.

17. Claeysen, S., Bockaert, J. & Giannoni, P. (2015) Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease?, *ACS chemical neuroscience*. **6**, 940-3.
18. Khoury, R., Grysman, N., Gold, J., Patel, K. & Grossberg, G. T. (2018) The role of 5-HT₆-receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update, *Expert Opin Investig Drugs*. **27**, 523-533.
19. Hirst, W. D., Stean, T. O., Rogers, D. C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S. F., Bromidge, S. M., Riley, G., Smith, D. R., Bartlett, S., Heidbreder, C. A., Atkins, A. R., Lacroix, L. P., Dawson, L. A., Foley, A. G., Regan, C. M. & Upton, N. (2006) SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models, *Eur J Pharmacol*. **553**, 109-19.
20. Da Silva Costa-Aze, V., Quiedeville, A., Boulouard, M. & Dauphin, F. (2012) 5-HT₆ receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice, *Psychopharmacology (Berl)*. **222**, 99-115.
21. de Bruin, N. M., Prickaerts, J., van Loevezijn, A., Venhorst, J., de Groote, L., Houba, P., Reneerkens, O., Akkerman, S. & Kruse, C. G. (2011) Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats, *Neurobiol Learn Mem*. **96**, 392-402.
22. de Bruin, N. M. & Kruse, C. G. (2015) 5-HT₆ Receptor Antagonists: Potential Efficacy for the Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia, *Curr Pharm Des*. **21**, 3739-59.
23. Marcos, B., Gil-Bea, F. J., Hirst, W. D., Garcia-Alloza, M. & Ramirez, M. J. (2006) Lack of localization of 5-HT₆ receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT₆ receptor-mediated acetylcholine release, *Eur J Neurosci*. **24**, 1299-306.
24. Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J. R., Poli, S., Porter, R. H. & Bos, M. (2003) Influence of the 5-HT₆ receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT₆ receptor antagonist, *J Med Chem*. **46**, 1273-6.
25. Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. & Li, P. (2000) In vivo effects of the 5-HT₆ antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate, *Br J Pharmacol*. **130**, 23-6.
26. Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. & Li, P. (2001) The 5-HT₆ receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus, *Neuropsychopharmacology*. **25**, 662-8.
27. Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J., Dekeyne, A., Seveno, M., Rivet, J. M., Gaven, F., Deleris, P., Herve, D., Fone, K. C., Bockaert, J., Millan, M. J. & Marin, P. (2012) 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia, *EMBO Mol Med*. **4**, 1043-56.
28. Hatat, B., Yahiaoui, S., Lecoutey, C., Davis, A., Freret, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2019) A Novel in vivo Anti-amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT₆R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*. **11**.
29. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. & Feather-Stone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol*. **7**, 88-95.
30. Freret, T., Bouet, V., Quiedeville, A., Nee, G., Dallemagne, P., Rochais, C. & Boulouard, M. (2012) Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT₄ receptor activation (RS67333) on object recognition in mice, *Behav Brain Res*. **230**, 304-8.
31. Bevins, R. A. & Besheer, J. (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory', *Nat Protoc*. **1**, 1306-11.
32. Gunesch, S., Schramm, S. & Decker, M. (2017) Natural antioxidants in hybrids for the treatment of neurodegenerative diseases: a successful strategy?, *Future Med Chem*. **9**, 711-713.
33. Lanthier, C., Payan, H., Liparulo, I., Hatat, B., Lecoutey, C., Since, M., Davis, A., Bergamini, C., Claeysen, S., Dallemagne, P., Bolognesi, M. & Rochais, C. (2019) Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT₄ receptors with in cellulo antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, In press.

Annexes

34. Quiedeville, A., Boulouard, M., Hamidouche, K., Da Silva Costa-Aze, V., Nee, G., Rochais, C., Dallemagne, P., Fabis, F., Freret, T. & Bouet, V. (2015) Chronic activation of 5-HT₄ receptors or blockade of 5-HT₆ receptors improve memory performances, *Behav Brain Res.* **293**, 10-7.
35. Mohler, E. G., Baker, P. M., Gannon, K. S., Jones, S. S., Shacham, S., Sweeney, J. A. & Ragozzino, M. E. (2012) The effects of PRX-07034, a novel 5-HT₆ antagonist, on cognitive flexibility and working memory in rats, *Psychopharmacology (Berl)*. **220**, 687-96.
36. Galimberti, D. & Scarpini, E. (2015) Idalopirdine as a treatment for Alzheimer's disease, *Expert Opin Investig Drugs.* **24**, 981-7.
37. King, M. V., Marsden, C. A. & Fone, K. C. (2008) A role for the 5-HT(1A), 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory, *Trends Pharmacol Sci.* **29**, 482-92.
38. Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K. D., Frisoni, G., Neher, J. J., Fak, F., Jucker, M., Lasser, T. & Bolmont, T. (2017) Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota, *Sci Rep.* **7**, 41802.
39. Puighermanal, E., Busquets-Garcia, A., Gomis-Gonzalez, M., Marsicano, G., Maldonado, R. & Ozaita, A. (2013) Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade, *Neuropsychopharmacology.* **38**, 1334-43.
40. Attar, A., Liu, T., Chan, W. T., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K. & Bitan, G. (2013) A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *PLoS One.* **8**, e80355.

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

- (1) Alzheimer, A. Über Einen Eigenartigen Schweren Erkrankungsprozeb Der Himrinde. *Neurol Zentralbl* **1906**, *23*, 1129–1136.
- (2) Strassnig, M.; Ganguli, M. About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex. *Psychiatry Edgmont* **2005**, *2* (9), 30–33.
- (3) Pescosolido, N.; Pascarella, A.; Buomprisco, G.; Rusciano, D. Critical Review on the Relationship between Glaucoma and Alzheimer’s Disease. *Adv. Ophthalmol. Vis. Syst.* **2014**, *Volume 1* (Issue 4). <https://doi.org/10.15406/aovs.2014.01.00024>.
- (4) Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali. A Review on Alzheimer’s Disease Pathophysiology and Its Management: An Update. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67* (2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>.
- (5) Thalhauser, C. J.; Komarova, N. L. Alzheimer’s Disease: Rapid and Slow Progression. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (66), 119–126. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0134>.
- (6) Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Cummings, J. L.; DeKosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Delacourte, A.; Frisoni, G.; Fox, N. C.; Galasko, D.; Gauthier, S.; Hampel, H.; Jicha, G. A.; Meguro, K.; O’Brien, J.; Pasquier, F.; Robert, P.; Rossor, M.; Salloway, S.; Sarazin, M.; de Souza, L. C.; Stern, Y.; Visser, P. J.; Scheltens, P. Revising the Definition of Alzheimer’s Disease: A New Lexicon. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (11), 1118–1127. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70223-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70223-4).
- (7) Ownby, R. L.; Crocco, E.; Acevedo, A.; John, V.; Loewenstein, D. Depression and Risk for Alzheimer Disease: Systematic Review, Meta-Analysis, and Metaregression Analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* **2006**, *63* (5), 530–538. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.5.530>.
- (8) Troubles cognitifs du sujet âgé <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle/troubles-cognitifs-du-sujet-age> (accessed Jul 10, 2020).
- (9) Mattson, M. P. Pathways towards and Away from Alzheimer’s Disease. *Nature* **2004**, *430* (7000), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nature02621>.
- (10) Soto-Rojas, L. O.; Cruz-López, F. de la; Ontiveros-Torres, M. A.; Viramontes-Pintos, A.; Cárdenas-Aguayo, M. del C.; Meraz-Ríos, M. A.; Salinas-Lara, C.; Florán-Garduño, B.; Luna-Muñoz, J. Neuroinflammation and Alteration of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer’s Disease. In *Alzheimer’s Disease - Challenges for the Future*; Zerr, I., Ed.; InTech, 2015. <https://doi.org/10.5772/60024>.
- (11) Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. An English Translation of Alzheimer’s 1907 Paper, “Über Eine Eigenartige Erkankung Der Hirnrinde.” *Clin. Anat.* **1995**, *8* (6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- (12) Lee, V. M.-Y.; Goedert, M.; Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24* (1), 1121–1159. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1121>.
- (13) Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q. Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease and Related Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (9), 663–672. <https://doi.org/10.1038/nrn2194>.
- (14) Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer’s Disease. *Mt. Sinai J. Med. J. Transl. Pers. Med.* **2010**, *77* (1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
- (15) Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimers Dement.* **2013**, *9* (1), 63–75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>.
- (16) Alzheimer (maladie d’) | Inserm - La science pour la santé <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie> (accessed Sep 26, 2019).
- (17) Prince, M. J. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015> (accessed Jun 26, 2020).
- (18) Wolters, F. J.; Chibnik, L. B.; Waziry, R.; Anderson, R.; Berr, C.; Beiser, A.; Bis, J. C.; Blacker, D.; Bos, D.; Brayne, C.; Dartigues, J.-F.; Darweesh, S. K. L.; Davis-Plourde, K. L.; de Wolf, F.; Debette, S.; Dufouil, C.; Fornage, M.; Goudsmit, J.; Grasset, L.; Gudnason, V.; Hadjichrysanthou, C.; Helmer, C.; Ikram, M. A.; Ikram, M. K.; Joas, E.; Kern, S.; Kuller, L. H.; Launer, L.; Lopez, O. L.; Matthews, F. E.; McRae-McKee, K.; Meirelles, O.; Mosley, T. H.; Pase, M. P.; Psaty, B. M.;

- Satizabal, C. L.; Seshadri, S.; Skoog, I.; Stephan, B. C. M.; Wetterberg, H.; Wong, M. M.; Zettergren, A.; Hofman, A. Twenty-Seven-Year Time Trends in Dementia Incidence in Europe and the United States. *Neurology* **2020**, *95* (5), e519–e531. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010022>.
- (19) What is the role of acetylcholinesterase at a synapse? | Socratic <https://socratic.org/questions/what-is-the-role-of-acetylcholinesterase-at-a-synapse-1> (accessed Apr 9, 2020).
- (20) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* **1992**, *256* (5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.
- (21) Claeysen, S.; Bockaert, J.; Giannoni, P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (7), 940–943. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00135>.
- (22) Cheng, P.-N.; Liu, C.; Zhao, M.; Eisenberg, D.; Nowick, J. S. Amyloid β -Sheet Mimics That Antagonize Protein Aggregation and Reduce Amyloid Toxicity. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (11), 927–933. <https://doi.org/10.1038/nchem.1433>.
- (23) Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S.; Malinow, R. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* **2003**, *37* (6), 925–937. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00124-7).
- (24) Bourgade, K.; Le Page, A.; Bocti, C.; Witkowski, J. M.; Dupuis, G.; Frost, E. H.; Fülöp Jr., T. Protective Effect of Amyloid- β Peptides Against Herpes Simplex Virus-1 Infection in a Neuronal Cell Culture Model. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *50* (4), 1227–1241. <https://doi.org/10.3233/JAD-150652>.
- (25) Bourgade, K.; Dupuis, G.; Frost, E. H.; Fülöp Jr., T. Anti-Viral Properties of Amyloid- β Peptides. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *54* (3), 859–878. <https://doi.org/10.3233/JAD-160517>.
- (26) Hubin, E.; Deroo, S.; Schierle, G. K.; Kaminski, C.; Serpell, L.; Subramaniam, V.; van Nuland, N.; Broersen, K.; Raussens, V.; Sarroukh, R. Two Distinct β -Sheet Structures in Italian-Mutant Amyloid-Beta Fibrils: A Potential Link to Different Clinical Phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (24), 4899–4913. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1983-2>.
- (27) Fändrich, M. Oligomeric Intermediates in Amyloid Formation: Structure Determination and Mechanisms of Toxicity. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421* (4), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.006>.
- (28) Takahashi, T.; Mihara, H. Peptide and Protein Mimetics Inhibiting Amyloid β -Peptide Aggregation. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1309–1318. <https://doi.org/10.1021/ar8000475>.
- (29) Szczepankiewicz, O.; Linse, B.; Meisl, G.; Thulin, E.; Frohm, B.; Sala Frigerio, C.; Colvin, M. T.; Jacavone, A. C.; Griffin, R. G.; Knowles, T.; Walsh, D. M.; Linse, S. N-Terminal Extensions Retard A β 42 Fibril Formation but Allow Cross-Seeding and Coaggregation with A β 42. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (46), 14673–14685. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b07849>.
- (30) Törnquist, M.; T. Michaels, T. C.; Sanagavarapu, K.; Yang, X.; Meisl, G.; A. Cohen, S. I.; J. Knowles, T. P.; Linse, S. Secondary Nucleation in Amyloid Formation. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (63), 8667–8684. <https://doi.org/10.1039/C8CC02204F>.
- (31) Huang, Y.; Liu, R. The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (12), 4477. <https://doi.org/10.3390/ijms21124477>.
- (32) Mroczko, B.; Groblewska, M.; Litman-Zawadzka, A.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. Cellular Receptors of Amyloid β Oligomers (A β O) in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (7), 1884.
- (33) Bode, D. C.; Freeley, M.; Nield, J.; Palma, M.; Viles, J. H. Amyloid- β Oligomers Have a Profound Detergent-like Effect on Lipid Membrane Bilayers, Imaged by Atomic Force and Electron Microscopy. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (19), 7566–7572. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.007195>.
- (34) Yasumoto, T.; Takamura, Y.; Tsuji, M.; Watanabe-Nakayama, T.; Imamura, K.; Inoue, H.; Nakamura, S.; Inoue, T.; Kimura, A.; Yano, S.; Nishijo, H.; Kiuchi, Y.; Teplow, D. B.; Ono, K. High Molecular Weight Amyloid B1-42 Oligomers Induce Neurotoxicity via Plasma Membrane Damage. *FASEB J.* **2019**, *33* (8), 9220–9234. <https://doi.org/10.1096/fj.201900604R>.

Bibliographie

- (35) Kaye, R.; Lasagna-Reeves, C. A. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33* (s1), S67–S78. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129001>.
- (36) Swerdlow, R. H. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *62* (3), 1403–1416. <https://doi.org/10.3233/JAD-170585>.
- (37) Zhang, F.; Gannon, M.; Chen, Y.; Yan, S.; Zhang, S.; Feng, W.; Tao, J.; Sha, B.; Liu, Z.; Saito, T.; Saido, T.; Keene, C. D.; Jiao, K.; Roberson, E. D.; Xu, H.; Wang, Q. β -Amyloid Redirects Norepinephrine Signaling to Activate the Pathogenic GSK3 β /Tau Cascade. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12* (526). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay6931>.
- (38) Herrup, K. The Case for Rejecting the Amyloid Cascade Hypothesis. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18* (6), 794–799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>.
- (39) Makin, S. The Amyloid Hypothesis on Trial. *Nature* **2018**, *559*, S4–S7. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05719-4>.
- (40) Panza, F.; Lozupone, M.; Logroscino, G.; Imbimbo, B. P. A Critical Appraisal of Amyloid- β -Targeting Therapies for Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (2), 73–88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>.
- (41) Selkoe, D. J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8* (6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.
- (42) Wang, H.-W.; Pasternak, J. F.; Kuo, H.; Ristic, H.; Lambert, M. P.; Chromy, B.; Viola, K. L.; Klein, W. L.; Stine, W. B.; Krafft, G. A.; Trommer, B. L. Soluble Oligomers of β Amyloid (1-42) Inhibit Long-Term Potentiation but Not Long-Term Depression in Rat Dentate Gyrus. *Brain Res.* **2002**, *924* (2), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03058-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03058-X).
- (43) Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R. A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1989**, *3* (4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9).
- (44) Mazanetz, M. P.; Fischer, P. M. Untangling Tau Hyperphosphorylation in Drug Design for Neurodegenerative Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (6), 464–479. <https://doi.org/10.1038/nrd2111>.
- (45) Ward, S. M.; Himmelstein, D. S.; Lancia, J. K.; Binder, L. I. Tau Oligomers and Tau Toxicity in Neurodegenerative Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (4), 667–671. <https://doi.org/10.1042/BST20120134>.
- (46) Frost, B.; Jacks, R. L.; Diamond, M. I. Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (19), 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- (47) Brundin, P.; Melki, R.; Kopito, R. Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (4), 301–307. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>.
- (48) Clavaguera, F.; Bolmont, T.; Crowther, R. A.; Abramowski, D.; Frank, S.; Probst, A.; Fraser, G.; Stalder, A. K.; Beibel, M.; Staufienbiel, M.; Jucker, M.; Goedert, M.; Tolnay, M. Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (7), 909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- (49) Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (7), 2821–2831. <https://doi.org/10.1021/jm400970m>.
- (50) Heneka, M. T.; Carson, M. J.; Khoury, J. E.; Landreth, G. E.; Brosseron, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A. H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzold, G. C.; Town, T.; Morgan, D.; Shinohara, M. L.; Perry, V. H.; Holmes, C.; Bazan, N. G.; Brooks, D. J.; Hunot, S.; Joseph, B.; Deigendesch, N.; Garaschuk, O.; Boddeke, E.; Dinarello, C. A.; Breitner, J. C.; Cole, G. M.; Golenbock, D. T.; Kummer, M. P. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **2015**, *14* (4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).

Bibliographie

- (51) Ayton, S.; Bush, A. I. L-8 - Iron and Ferroptosis in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, S8. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.037>.
- (52) Dominy, S. S.; Lynch, C.; Ermini, F.; Benedyk, M.; Marczyk, A.; Konradi, A.; Nguyen, M.; Haditsch, U.; Raha, D.; Griffin, C.; Holsinger, L. J.; Arastu-Kapur, S.; Kaba, S.; Lee, A.; Ryder, M. I.; Potempa, B.; Mydel, P.; Hellvard, A.; Adamowicz, K.; Hasturk, H.; Walker, G. D.; Reynolds, E. C.; Faull, R. L. M.; Curtis, M. A.; Draganow, M.; Potempa, J. Porphyromonas Gingivalis in Alzheimer's Disease Brains: Evidence for Disease Causation and Treatment with Small-Molecule Inhibitors. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (1), eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>.
- (53) Singhrao, S. K.; Olsen, I. Assessing the Role of Porphyromonas Gingivalis in Periodontitis to Determine a Causative Relationship with Alzheimer's Disease. *J. Oral Microbiol.* **2019**, *11* (1), 1563405. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563405>.
- (54) Iliovski, V.; Zuchowska, P. K.; Green, S. J.; Toth, P. T.; Ragozzino, M. E.; Le, K.; Aljewari, H. W.; O'Brien-Simpson, N. M.; Reynolds, E. C.; Watanabe, K. Chronic Oral Application of a Periodontal Pathogen Results in Brain Inflammation, Neurodegeneration and Amyloid Beta Production in Wild Type Mice. *PLoS ONE* **2018**, *13* (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>.
- (55) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M. Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study. *The Lancet* **2005**, *366* (9503), 2112–2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0).
- (56) Hebert, L. E.; Weuve, J.; Scherr, P. A.; Evans, D. A. Alzheimer Disease in the United States (2010–2050) Estimated Using the 2010 Census. *Neurology* **2013**, *80* (19), 1778–1783. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>.
- (57) Fratiglioni, L.; Viitanen, M.; Strauss, E. von; Tontodonati, V.; Herlitz, A.; Winblad, B. Very Old Women at Highest Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: Incidence Data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology* **1997**, *48* (1), 132–138. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.1.132>.
- (58) Lerner, A. J. Women and Alzheimer's Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84* (6), 1830–1834. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5725>.
- (59) Zandi, P. P.; Carlson, M. C.; Plassman, B. L.; Welsh-Bohmer, K. A.; Mayer, L. S.; Steffens, D. C.; Breitner, J. C. S.; Investigators, for the C. C. M. S. Hormone Replacement Therapy and Incidence of Alzheimer Disease in Older Women: The Cache County Study. *JAMA* **2002**, *288* (17), 2123–2129. <https://doi.org/10.1001/jama.288.17.2123>.
- (60) Bekris, L. M.; Yu, C.-E.; Bird, T. D.; Tsuang, D. W. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, *23* (4), 213–227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>.
- (61) Ryan, N. S.; Rossor, M. N. Correlating Familial Alzheimer's Disease Gene Mutations with Clinical Phenotype. *Biomark. Med.* **2010**, *4* (1), 99–112. <https://doi.org/10.2217/bmm.09.92>.
- (62) Lott, I. T.; Dierssen, M. Cognitive Deficits and Associated Neurological Complications in Individuals with Down's Syndrome. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (6), 623–633. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70112-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70112-5).
- (63) Prasher, V. P.; Farrer, M. J.; Kessling, A. M.; Fisher, E. M. C.; West, R. J.; Barber, P. C.; Butler, A. C. Molecular Mapping of Alzheimer-Type Dementia in Down's Syndrome. *Ann. Neurol.* **1998**, *43* (3), 380–383. <https://doi.org/10.1002/ana.410430316>.
- (64) Yamazaki, Y.; Zhao, N.; Caulfield, T. R.; Liu, C.-C.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Pathobiology and Targeting Strategies. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (9), 501–518. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>.
- (65) Farrer, L. A.; Cupples, L. A.; Haines, J. L.; Hyman, B.; Kukull, W. A.; Mayeux, R.; Myers, R. H.; Pericak-Vance, M. A.; Risch, N.; Duijn, C. M. van. Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-Analysis. *JAMA* **1997**, *278* (16), 1349–1356. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550160069041>.

- (66) Rönnekaa, E.; Rönnekaa, E.; Zethelius, B.; Lannfelt, L.; Kilander, L. Vascular Risk Factors and Dementia: 40-Year Follow-Up of a Population-Based Cohort. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2011**, *31* (6), 460–466. <https://doi.org/10.1159/000330020>.
- (67) Meng, X.-F.; Yu, J.-T.; Wang, H.-F.; Tan, M.-S.; Wang, C.; Tan, C.-C.; Tan, L. Midlife Vascular Risk Factors and the Risk of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *42* (4), 1295–1310. <https://doi.org/10.3233/JAD-140954>.
- (68) Craft, S. The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Two Roads Converged. *Arch. Neurol.* **2009**, *66* (3), 300–305. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.27>.
- (69) Mahley, R. W. Apolipoprotein E: From Cardiovascular Disease to Neurodegenerative Disorders. *J. Mol. Med.* **2016**, *94* (7), 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1427-y>.
- (70) Evans, D. A.; Hebert, L. E.; Beckett, L. A.; Scherr, P. A.; Albert, M. S.; Chown, M. J.; Pilgrim, D. M.; Taylor, J. O. Education and Other Measures of Socioeconomic Status and Risk of Incident Alzheimer Disease in a Defined Population of Older Persons. *Arch. Neurol.* **1997**, *54* (11), 1399–1405. <https://doi.org/10.1001/archneur.1997.00550230066019>.
- (71) Anstey, K. J.; Mack, H. A.; Cherbuin, N. Alcohol Consumption as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: Meta-Analysis of Prospective Studies. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2009**, *17* (7), 542–555. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e3181a2fd07>.
- (72) Rusanen, M.; Kivipelto, M.; Quesenberry, C. P.; Zhou, J.; Whitmer, R. A. Heavy Smoking in Midlife and Long-Term Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Arch. Intern. Med.* **2011**, *171* (4), 333–339. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.393>.
- (73) Seo, D.; Boros, B. D.; Holtzman, D. M. The Microbiome: A Target for Alzheimer Disease? *Cell Res.* **2019**, *29* (10), 779–780. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0227-7>.
- (74) Peters, R.; Ee, N.; Peters, J.; Booth, A.; Mudway, I.; Anstey, K. J. Air Pollution and Dementia: A Systematic Review. *J. Alzheimers Dis.* **2019**, *70* (s1), S145–S163. <https://doi.org/10.3233/JAD-180631>.
- (75) Holth, J. K.; Patel, T. K.; Holtzman, D. M. Sleep in Alzheimer's Disease—Beyond Amyloid. *Neurobiol. Sleep Circadian Rhythms* **2017**, *2*, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2016.08.002>.
- (76) Stern, Y. What Is Cognitive Reserve? Theory and Research Application of the Reserve Concept. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2002**, *8* (3), 448–460. <https://doi.org/10.1017/S1355617702813248>.
- (77) Gómez Gallego, M.; Gómez García, J. Music Therapy and Alzheimer's Disease: Cognitive, Psychological, and Behavioural Effects. *Neurol. Engl. Ed.* **2017**, *32* (5), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.12.001>.
- (78) Grasset, L.; Joly, P.; Jacqmin-Gadda, H.; Letenneur, L.; Wittwer, J.; Amieva, H.; Helmer, C.; Dartigues, J. F. Real Benefit of a Protective Factor against Dementia: Importance of Controlling for Death. Example of Sport Practice. *PLOS ONE* **2017**, *12* (4), e0174950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174950>.
- (79) Santos, C. Y.; Snyder, P. J.; Wu, W.-C.; Zhang, M.; Echeverria, A.; Alber, J. Pathophysiologic Relationship between Alzheimer's Disease, Cerebrovascular Disease, and Cardiovascular Risk: A Review and Synthesis. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* **2017**, *7*, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.01.005>.
- (80) Shah, R. The Role of Nutrition and Diet in Alzheimer Disease: A Systematic Review. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2013**, *14* (6), 398–402. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.01.014>.
- (81) Ritchie, C. W.; Bajwa, J.; Coleman, G.; Hope, K.; Jones, R. W.; Lawton, M.; Marven, M.; Passmore, P. Souvenaid®: A New Approach to Management of Early Alzheimer's Disease. *J. Nutr. Health Aging* **2014**, *18* (3), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s12603-013-0411-2>.
- (82) Cummings, J.; Passmore, P.; McGuinness, B.; Mok, V.; Chen, C.; Engelborghs, S.; Woodward, M.; Manzano, S.; Garcia-Ribas, G.; Cappa, S.; Bertolucci, P.; Chu, L.-W. Souvenaid in the Management of Mild Cognitive Impairment: An Expert Consensus Opinion. *Alzheimers Res. Ther.* **2019**, *11* (1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0528-6>.

- (83) Cacabelos, R.; Takeda, M.; Winblad, B. The Glutamatergic System and Neurodegeneration in Dementia: Preventive Strategies in Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **1999**, *14* (1), 3–47. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1166\(199901\)14:1<3::AID-GPS897>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1166(199901)14:1<3::AID-GPS897>3.0.CO;2-7).
- (84) Parsons, C. G.; Stöffler, A.; Danysz, W. Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic System - Too Little Activation Is Bad, Too Much Is Even Worse. *Neuropharmacology* **2007**, *53* (6), 699–723. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>.
- (85) Médicaments de la maladie d'Alzheimer : un intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale https://www.has-sante.fr/jcms/c_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer-un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite-nationale (accessed Apr 9, 2020).
- (86) Arrêté du 29 mai 2018 portant radiation de spécialités pharmaceutiques de la liste mentionnée au premier alinéa de l'article L. 162-17 du code de la sécurité sociale | Legifrance <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/5/29/SSAS1804466A/jo/texte> (accessed Apr 9, 2020).
- (87) Ma, X.; Tan, C.; Zhu, D.; Gang, D. R.; Xiao, P. Huperzine A from Huperzia Species—An Ethnopharmacological Review. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113* (1), 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.030>.
- (88) Little, J. T.; Walsh, S.; Aisen, P. S. An Update on Huperzine A as a Treatment for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2008**, *17* (2), 209–215. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.2.209>.
- (89) Syed, Y. Y. Sodium Oligomannate: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (4), 441–444. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01268-1>.
- (90) Wang, X.; Sun, G.; Feng, T.; Zhang, J.; Huang, X.; Wang, T.; Xie, Z.; Chu, X.; Yang, J.; Wang, H.; Chang, S.; Gong, Y.; Ruan, L.; Zhang, G.; Yan, S.; Lian, W.; Du, C.; Yang, D.; Zhang, Q.; Lin, F.; Liu, J.; Zhang, H.; Ge, C.; Xiao, S.; Ding, J.; Geng, M. Sodium Oligomannate Therapeutically Remodels Gut Microbiota and Suppresses Gut Bacterial Amino Acids-Shaped Neuroinflammation to Inhibit Alzheimer's Disease Progression. *Cell Res.* **2019**, *29* (10), 787–803. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0216-x>.
- (91) Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2020. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2020**, *6* (1), e12050. <https://doi.org/10.1002/trc2.12050>.
- (92) Tagami, S.; Yanagida, K.; Kodama, T. S.; Takami, M.; Mizuta, N.; Oyama, H.; Nishitomi, K.; Chiu, Y.; Okamoto, T.; Ikeuchi, T.; Sakaguchi, G.; Kudo, T.; Matsuura, Y.; Fukumori, A.; Takeda, M.; Ihara, Y.; Okochi, M. Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. *Cell Rep.* **2017**, *21* (1), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.032>.
- (93) Egan, M. F.; Kost, J.; Tariot, P. N.; Aisen, P. S.; Cummings, J. L.; Vellas, B.; Sur, C.; Mukai, Y.; Voss, T.; Furtek, C.; Mahoney, E.; Harper Mozley, L.; Vandenberghe, R.; Mo, Y.; Michelson, D. Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378* (18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706441>.
- (94) Kennedy, M. E.; Stamford, A. W.; Chen, X.; Cox, K.; Cumming, J. N.; Dockendorf, M. F.; Egan, M.; Ereshefsky, L.; Hodgson, R. A.; Hyde, L. A.; Jhee, S.; Kleijn, H. J.; Kuvelkar, R.; Li, W.; Mattson, B. A.; Mei, H.; Palcza, J.; Scott, J. D.; Tanen, M.; Troyer, M. D.; Tseng, J. L.; Stone, J. A.; Parker, E. M.; Forman, M. S. The BACE1 Inhibitor Verubecestat (MK-8931) Reduces CNS β -Amyloid in Animal Models and in Alzheimer's Disease Patients. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8* (363), 363ra150–363ra150. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9704>.
- (95) Doggrell, S. A. Lessons That Can Be Learnt from the Failure of Verubecestat in Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, *20* (17), 2095–2099. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1654998>.

Bibliographie

- (96) Panza, F.; Lozupone, M.; Watling, M.; Imbimbo, B. P. Do BACE Inhibitor Failures in Alzheimer Patients Challenge the Amyloid Hypothesis of the Disease? *Expert Rev. Neurother.* **2019**, *19* (7), 599–602. <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1621751>.
- (97) Sevigny, J.; Chiao, P.; Bussière, T.; Weinreb, P. H.; Williams, L.; Maier, M.; Dunstan, R.; Salloway, S.; Chen, T.; Ling, Y.; O’Gorman, J.; Qian, F.; Arastu, M.; Li, M.; Chollate, S.; Brennan, M. S.; Quintero-Monzon, O.; Scannevin, R. H.; Arnold, H. M.; Engber, T.; Rhodes, K.; Ferrero, J.; Hang, Y.; Mikulskis, A.; Grimm, J.; Hock, C.; Nitsch, R. M.; Sandrock, A. The Antibody Aducanumab Reduces A β Plaques in Alzheimer’s Disease. *Nature* **2016**, *537* (7618), 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>.
- (98) Aducanumab : l’espoir renaît pour les patients Alzheimer. *Fondation Vaincre Alzheimer*, 2019.
- (99) Panza, F.; Lozupone, M.; Seripa, D.; Imbimbo, B. P. Amyloid- β Immunotherapy for Alzheimer Disease: Is It Now a Long Shot? *Ann. Neurol.* **2019**, *85* (3), 303–315. <https://doi.org/10.1002/ana.25410>.
- (100) Kunkle, F. Biogen’s potential new drug for Alzheimer’s disease gets cautiously optimistic review following presentation <https://www.washingtonpost.com/dc-md-va/2019/12/05/biogens-potential-new-drug-alzheimers-disease-gets-cautiously-optimistic-review-following-presentation/> (accessed Apr 9, 2020).
- (101) Tsai, R. M.; Miller, Z.; Koestler, M.; Rojas, J. C.; Ljubenkov, P. A.; Rosen, H. J.; Rabinovici, G. D.; Fagan, A. M.; Cobigo, Y.; Brown, J. A.; Jung, J. I.; Hare, E.; Geldmacher, D. S.; Natelson-Love, M.; McKinley, E. C.; Luong, P. N.; Chuu, E. L.; Powers, R.; Mumford, P.; Wolf, A.; Wang, P.; Shamloo, M.; Miller, B. L.; Roberson, E. D.; Boxer, A. L. Reactions to Multiple Ascending Doses of the Microtubule Stabilizer TPI-287 in Patients With Alzheimer Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Corticobasal Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* **2020**, *77* (2), 215–224. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.3812>.
- (102) Budelier, M. M.; Bateman, R. J. Biomarkers of Alzheimer Disease. *J. Appl. Lab. Med.* **2020**, *5* (1), 194–208. <https://doi.org/10.1373/jalm.2019.030080>.
- (103) Hampel, H.; Lista, S.; Khachaturian, Z. S. Development of Biomarkers to Chart All Alzheimer’s Disease Stages: The Royal Road to Cutting the Therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement.* **2012**, *8* (4), 312–336. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>.
- (104) Janelidze, S.; Zetterberg, H.; Mattsson, N.; Palmqvist, S.; Vanderstichele, H.; Lindberg, O.; van Westen, D.; Stomrud, E.; Minthon, L.; Blennow, K.; the Swedish BioFINDER study group; Hansson, O. CSF A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 Ratios: Better Diagnostic Markers of Alzheimer Disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2016**, *3* (3), 154–165. <https://doi.org/10.1002/acn3.274>.
- (105) Andreasen, N.; Minthon, L.; Davidsson, P.; Vanmechelen, E.; Vanderstichele, H.; Winblad, B.; Blennow, K. Evaluation of CSF-Tau and CSF-A β 42 as Diagnostic Markers for Alzheimer Disease in Clinical Practice. *Arch. Neurol.* **2001**, *58* (3), 373–379. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.3.373>.
- (106) Blennow, K.; Dubois, B.; Fagan, A. M.; Lewczuk, P.; de Leon, M. J.; Hampel, H. Clinical Utility of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in the Diagnosis of Early Alzheimer’s Disease. *Alzheimers Dement.* **2015**, *11* (1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.004>.
- (107) Leon, M. J. D.; Mosconi, L.; Blennow, K.; DeSANTI, S.; Zinkowski, R.; Mehta, P. D.; Pratico, D.; Tsui, W.; Louis, L. a. S.; Sobanska, L.; Brys, M.; Li, Y.; Rich, K.; Rinne, J.; Rusinek, H. Imaging and CSF Studies in the Preclinical Diagnosis of Alzheimer’s Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1097* (1), 114–145. <https://doi.org/10.1196/annals.1379.012>.
- (108) Aschenbrenner, A. J.; Gordon, B. A.; Benzinger, T. L. S.; Morris, J. C.; Hassenstab, J. J. Influence of Tau PET, Amyloid PET, and Hippocampal Volume on Cognition in Alzheimer Disease. *Neurology* **2018**, *91* (9), e859. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006075>.
- (109) McMahan, P. M.; Araki, S. S.; Neumann, P. J.; Harris, G. J.; Gazelle, G. S. Cost-Effectiveness of Functional Imaging Tests in the Diagnosis of Alzheimer Disease. *Radiology* **2000**, *217* (1), 58–68. <https://doi.org/10.1148/radiology.217.1.r00se1358>.
- (110) Mitka, M. PET Imaging for Alzheimer Disease: Are Its Benefits Worth the Cost? *JAMA* **2013**, *309* (11), 1099–1100. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2101>.

Bibliographie

- (111) Karikari, T. K.; Pascoal, T. A.; Ashton, N. J.; Janelidze, S.; Benedet, A. L.; Rodriguez, J. L.; Chamoun, M.; Savard, M.; Kang, M. S.; Therriault, J.; Schöll, M.; Massarweh, G.; Soucy, J.-P.; Höglund, K.; Brinkmalm, G.; Mattsson, N.; Palmqvist, S.; Gauthier, S.; Stomrud, E.; Zetterberg, H.; Hansson, O.; Rosa-Neto, P.; Blennow, K. Blood Phosphorylated Tau 181 as a Biomarker for Alzheimer's Disease: A Diagnostic Performance and Prediction Modelling Study Using Data from Four Prospective Cohorts. *Lancet Neurol.* **2020**, *19* (5), 422–433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30071-5).
- (112) Thijssen, E. H.; La Joie, R.; Wolf, A.; Strom, A.; Wang, P.; Iaccarino, L.; Bourakova, V.; Cobigo, Y.; Heuer, H.; Spina, S.; VandeVrede, L.; Chai, X.; Proctor, N. K.; Airey, D. C.; Shcherbinin, S.; Duggan Evans, C.; Sims, J. R.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Karydas, A. M.; Teunissen, C. E.; Kramer, J. H.; Grinberg, L. T.; Seeley, W. W.; Rosen, H.; Boeve, B. F.; Miller, B. L.; Rabinovici, G. D.; Dage, J. L.; Rojas, J. C.; Boxer, A. L. Diagnostic Value of Plasma Phosphorylated Tau181 in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Nat. Med.* **2020**, *26* (3), 387–397. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0762-2>.
- (113) Janelidze, S.; Mattsson, N.; Palmqvist, S.; Smith, R.; Beach, T. G.; Serrano, G. E.; Chai, X.; Proctor, N. K.; Eichenlaub, U.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Reiman, E. M.; Stomrud, E.; Dage, J. L.; Hansson, O. Plasma P-Tau181 in Alzheimer's Disease: Relationship to Other Biomarkers, Differential Diagnosis, Neuropathology and Longitudinal Progression to Alzheimer's Dementia. *Nat. Med.* **2020**, *26* (3), 379–386. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>.
- (114) Dumuis, A.; Bouhelal, R.; Sebben, M.; Cory, R.; Bockaert, J. A Nonclassical 5-Hydroxytryptamine Receptor Positively Coupled with Adenylate Cyclase in the Central Nervous System. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34* (6), 880–887.
- (115) Bockaert, J.; Claeysen, S.; Compan, V.; Dumuis, A. 5-HT₄ Receptors: History, Molecular Pharmacology and Brain Functions. *Neuropharmacology* **2008**, *55* (6), 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.013>.
- (116) Lalut, J.; Karila, D.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0031>.
- (117) Brudeli, B.; Moltzau, L. R.; Nguyen, C. H. T.; Andressen, K. W.; Nilsen, N. O.; Levy, F. O.; Klaveness, J. Synthesis and Pharmacological Properties of a New Hydrophilic and Orally Bioavailable 5-HT₄ Antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 629–637. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.060>.
- (118) Maeyer, J. H. D.; Lefebvre, R. A.; Schuurkes, J. a. J. 5-HT₄ Receptor Agonists: Similar but Not the Same. *Neurogastroenterol. Motil.* **2008**, *20* (2), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.01059.x>.
- (119) Kamiya, K.; Niwa, R.; Morishima, M.; Honjo, H.; Sanguinetti, M. C. Molecular Determinants of HERG Channel Block by Terfenadine and Cisapride. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108* (3), 301–307. <https://doi.org/10.1254/jphs.08102fp>.
- (120) Giannoni, P.; Gaven, F.; De Bundel, D.; Baranger, K.; Marchetti-Gauthier, E.; Roman, F. S.; Valjent, E.; Marin, P.; Bockaert, J.; Rivera, S.; Claeysen, S. Early Administration of RS 67333, a Specific 5-HT₄ Receptor Agonist, Prevents Amyloidogenesis and Behavioral Deficits in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00096>.
- (121) Consolo, S.; Arnaboldi, S.; Giorgi, S.; Russi, G.; Ladinsky, H. 5-HT₄ Receptor Stimulation Facilitates Acetylcholine Release in Rat Frontal Cortex. *Neuroreport* **1994**, *5* (10), 1230–1232. <https://doi.org/10.1097/00001756-199406020-00018>.
- (122) Cho, S.; Hu, Y. Activation of 5-HT₄ Receptors Inhibits Secretion of β -Amyloid Peptides and Increases Neuronal Survival. *Exp. Neurol.* **2007**, *203* (1), 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.021>.
- (123) Lezoualc'h, F. 5-HT₄ Receptor and Alzheimer's Disease: The Amyloid Connection. *Exp. Neurol.* **2007**, *205* (2), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.02.001>.

- (124) Cachard-Chastel, M.; Lezoualc'h, F.; Dewachter, I.; Deloménie, C.; Croes, S.; Devijver, H.; Langlois, M.; Leuven, F. V.; Sicsic, S.; Gardier, A. M. 5-HT₄ Receptor Agonists Increase SAPP α Levels in the Cortex and Hippocampus of Male C57BL/6j Mice. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150* (7), 883–892. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707178>.
- (125) Spilman, P.; Jagodzinska, B.; Bredesen, D. E.; John, V. Enhancement of SAPP α as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimer's Neurodegener. Dis.* **2015**, *1*.
- (126) Park, T.; Chen, H.; Kevala, K.; Lee, J.-W.; Kim, H.-Y. N-Docosahexaenoyl ethanolamine Ameliorates LPS-Induced Neuroinflammation via CAMP/PKA-Dependent Signaling. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13* (1), 284. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0751-z>.
- (127) Baranger, K.; Giannoni, P.; Girard, S. D.; Girot, S.; Gaven, F.; Stephan, D.; Migliorati, M.; Khrestchatsky, M.; Bockaert, J.; Marchetti-Gauthier, E.; Rivera, S.; Claeysen, S.; Roman, F. S. Chronic Treatments with a 5-HT₄ Receptor Agonist Decrease Amyloid Pathology in the Entorhinal Cortex and Learning and Memory Deficits in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology* **2017**, *126*, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.031>.
- (128) Lanthier, C.; Dallemagne, P.; Lecoutey, C.; Claeysen, S.; Rochais, C. Therapeutic Modulators of the Serotonin 5-HT₄ Receptor: A Patent Review (2014-Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30* (7), 495–508. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1767587>.
- (129) Conlon, K.; Maeyer, J. H. D.; Bruce, C.; Schuurkes, J. A. J.; Christie, L.; McRedmond, J.; Derakhchan, K.; Wade, P. R. Nonclinical Cardiovascular Studies of Prucalopride, a Highly Selective 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *364* (2), 156–169. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244079>.
- (130) Johnson, D. E.; Drummond, E.; Grimwood, S.; Sawant-Basak, A.; Miller, E.; Tseng, E.; McDowell, L. L.; Vanase-Frawley, M. A.; Fisher, K. E.; Rubitski, D. M.; Stutzman-Engwall, K. J.; Nelson, R. T.; Horner, W. E.; Gorczyca, R. R.; Hajos, M.; Siok, C. J. The 5-Hydroxytryptamine₄ Receptor Agonists Prucalopride and PRX-03140 Increase Acetylcholine and Histamine Levels in the Rat Prefrontal Cortex and the Power of Stimulated Hippocampal θ Oscillations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341* (3), 681–691. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192351>.
- (131) Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Casamenti, F.; Malmberg-Aiello, P.; Pepeu, G.; Gualtieri, F.; Bartolini, A. Central Cholinergic Antinociception Induced by 5HT₄ Agonists: BIMU 1 and BIMU 8. *Life Sci.* **1996**, *58* (25), 2297–2309. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00230-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00230-5).
- (132) Meneses, A.; Hong, E. Effects of 5-HT₄ Receptor Agonists and Antagonists in Learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *56* (3), 347–351. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00224-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00224-9).
- (133) Wang, X.; Dergacheva, O.; Kamendi, H.; Gorini, C.; Mendelowitz, D. 5-Hydroxytryptamine 1A/7 and 4 α Receptors Differentially Prevent Opioid-Induced Inhibition of Brain Stem Cardiorespiratory Function. *Hypertension* **2007**, *50* (2), 368–376.
- (134) Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Shinde, A. K.; Gagginapally, S. R.; Kancharla, D. M.; Middekadi, V. R.; Bogaraju, N.; Ravella, S. R.; Singh, P.; Birangal, S. R.; Subramanian, R.; Palacharla, R. C.; Benade, V.; Muddana, N.; Jayarajan, P. Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Preclinical Evaluation of Heteroaromatic Amides and 1,3,4-Oxadiazole Derivatives as 5-HT₄ Receptor Partial Agonists. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (11), 4993–5008. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00457>.
- (135) Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Shinde, A. K.; GAGGINAPALLY, S. R.; Jasti, V. Indazole Compounds as 5-Ht₄ Receptor Agonists. WO2015092804A1, June 25, 2015.
- (136) Brodney, M. A.; Johnson, D. E.; Sawant-Basak, A.; Coffman, K. J.; Drummond, E. M.; Hudson, E. L.; Fisher, K. E.; Noguchi, H.; Waizumi, N.; McDowell, L. L.; Papanikolaou, A.; Pettersen, B. A.; Schmidt, A. W.; Tseng, E.; Stutzman-Engwall, K.; Rubitski, D. M.; Vanase-Frawley, M. A.; Grimwood, S. Identification of Multiple 5-HT₄ Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (21), 9240–9254. <https://doi.org/10.1021/jm300953p>.

Bibliographie

- (137) McKinnell, R. M.; Armstrong, S. R.; Beattie, D. T.; Choi, S.-K.; Fatheree, P. R.; Gendron, R. A. L.; Goldblum, A.; Humphrey, P. P.; Long, D. D.; Marquess, D. G.; Shaw, J. P.; Smith, J. A. M.; Turner, S. D.; Vickery, R. G. A Multivalent Approach to the Design and Discovery of Orally Efficacious 5-HT₄ Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (17), 5330–5343. <https://doi.org/10.1021/jm900881j>.
- (138) Yamamoto, T.; Tajimi, M.; Takahashi, N.; Nii, T.; Zai, H. Mo2080 First-in-Human Study of the Novel 5-HT₄ Agonist, RQ-00000010, Demonstrated Acceleration of Gastric Emptying Following Single and Multiple Oral Administration to Healthy Human Subjects. *Gastroenterology* **2013**, *144* (5), S-736. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(13\)62732-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(13)62732-8).
- (139) Bureau, R.; Boulouard, M.; Dauphin, F.; Lezoualc'h, F.; Rault, S. Review of 5-HT₄R Ligands: State of Art and Clinical Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (5), 527–553. <https://doi.org/10.2174/156802610791111551>.
- (140) Selye, H. Stress without Distress. In *Psychopathology of Human Adaptation*; Serban, G., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1976; pp 137–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2238-2_9.
- (141) Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49* (11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- (142) Haber, F.; Weiss, J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* **1932**, *20* (51), 948–950. <https://doi.org/10.1007/BF01504715>.
- (143) Koppenol, W. H. The Centennial of the Fenton Reaction. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15* (6), 645–651. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90168-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90168-T).
- (144) Devasagayam, T.; Tilak, J.; Boloor, K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **2004**, *52*, 12.
- (145) Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- (146) Lü, J.-M.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>.
- (147) Giles, G. I.; Tasker, K. M.; Jacob, C. Hypothesis: The Role of Reactive Sulfur Species in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31* (10), 1279–1283. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00710-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00710-9).
- (148) Hensley, K.; Hall, N.; Subramaniam, R.; Cole, P.; Harris, M.; Aksenov, M.; Aksenova, M.; Gabbita, S. P.; Wu, J. F.; Carney, J. M.; Lovell, M.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *J. Neurochem.* **1995**, *65* (5), 2146–2156. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x>.
- (149) Yatin, S. M.; Varadarajan, S.; Butterfield, D. A. Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid ß-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production. *J. Alzheimers Dis.* **2000**, *2* (2), 123–131. <https://doi.org/10.3233/JAD-2000-2212>.
- (150) Gilbert, T.; Draï, J.; Bonnefoy, M. Stress oxydant et maladie d'Alzheimer. In *Traité sur la maladie d'Alzheimer*; Vellas, B., Robert, P., Eds.; Springer: Paris, 2013; pp 175–194. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0443-9_10.
- (151) Singh, M.; Nam, D. T.; Arseneault, M.; Ramassamy, C. Role of By-Products of Lipid Oxidation in Alzheimer's Disease Brain: A Focus on Acrolein. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21* (3), 741–756. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100405>.
- (152) Lovell, M. A.; Markesbery, W. R. Oxidative DNA Damage in Mild Cognitive Impairment and Late-Stage Alzheimer's Disease. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7497–7504. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm821>.
- (153) Markesbery, W. R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23* (1), 134–147. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00629-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00629-6).

- (154) Sultana, R.; Butterfield, D. A. Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *19* (1), 341–353. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1222>.
- (155) Kim, T.-S.; Pae, C.-U.; Yoon, S.-J.; Jang, W.-Y.; Lee, N. J.; Kim, J.-J.; Lee, S.-J.; Lee, C.; Paik, I.-H.; Lee, C.-U. Decreased Plasma Antioxidants in Patients with Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2006**, *21* (4), 344–348. <https://doi.org/10.1002/gps.1469>.
- (156) Perry, G.; Cash, A. D.; Smith, M. A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2002/542340/> (accessed Sep 17, 2020). <https://doi.org/10.1155/S1110724302203010>.
- (157) Liang, N.; Kitts, D. D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods That Define Mechanisms of Action. *Molecules* **2014**, *19* (11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>.
- (158) Domenico, F. D.; Barone, E.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Strategy to Reduce Free Radical Species in Alzheimer's Disease: An Update of Selected Antioxidants. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15* (1), 19–40. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.955853>.
- (159) Maynard, C. J.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Li, Q.-X. Metals and Amyloid- β in Alzheimer's Disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86* (3), 147–159. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2005.00434.x>.
- (160) Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D. Copper, Zinc and Iron in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's, Parkinson's and Prion Diseases). *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19), 2129–2141. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.013>.
- (161) Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. Copper, Iron and Zinc in Alzheimer's Disease Senile Plaques. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158* (1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00092-6).
- (162) Butterfield, D. A.; Boyd-Kimball, D. The Critical Role of Methionine 35 in Alzheimer's Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1703* (2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.10.014>.
- (163) Ferreira, E.; Baldeiras, I.; Ferreira, I. L.; Costa, R. O.; Rego, A. C.; Pereira, C. F.; Oliveira, C. R. Mitochondrial-and Endoplasmic Reticulum-Associated Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Biomarkers. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*.
- (164) Mancuso, M.; Coppede, F.; Migliore, L.; Siciliano, G.; Murri, L. Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *10* (1), 59–73.
- (165) Ohta, S.; Ohsawa, I. Dysfunction of Mitochondria and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: On Defects in the Cytochrome c Oxidase Complex and Aldehyde Detoxification. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *9* (2), 155–166.
- (166) Lanzillotta, C.; Di Domenico, F.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Targeting Mitochondria in Alzheimer Disease: Rationale and Perspectives. *CNS Drugs* **2019**, *33* (10), 957–969. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00658-8>.
- (167) Aa, S.; Mm, B.; Md, M.; Ma, T.; Mm, P.-B. Mitochondrial Abnormalities in Cortical Dendrites from Patients with Alzheimer's Disease. *J. Submicrosc. Cytol.* **1985**, *17* (3), 459–464.
- (168) Hirai, K.; Aliev, G.; Nunomura, A.; Fujioka, H.; Russell, R. L.; Atwood, C. S.; Johnson, A. B.; Kress, Y.; Vinters, H. V.; Tabaton, M. Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21* (9), 3017–3023.
- (169) Saraiva, A. A.; Borges, M. M.; Madeira, M. D.; Tavares, M. A.; Paula-Barbosa, M. M. Mitochondrial Abnormalities in Cortical Dendrites from Patients with Alzheimer's Disease. *J. Submicrosc. Cytol.* **1985**, *17* (3), 459–464.
- (170) Zhao, Y.; Zhao, B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*.
- (171) Deibel, M. A.; Ehmann, W. D.; Markesbery, W. R. Copper, Iron, and Zinc Imbalances in Severely Degenerated Brain Regions in Alzheimer's Disease: Possible Relation to Oxidative Stress. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *143* (1), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(96\)00203-1](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(96)00203-1).
- (172) Budimir, A. Metal Ions, Alzheimer's Disease and Chelation Therapy. *Acta Pharm.* **2011**, *61* (1), 1–14. <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0006-6>.

- (173) Huang, X.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Cuajungco, M. P.; Gray, D. N.; Lim, J.; Moir, R. D.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. *Biochemistry* **1999**, *38* (24), 7609–7616. <https://doi.org/10.1021/bi990438f>.
- (174) Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer Disease: Driving Force, Bystander or Beneficial Response? *Nat. Med.* **2006**, *12* (9), 1005–1015. <https://doi.org/10.1038/nm1484>.
- (175) Heppner, F. L.; Ransohoff, R. M.; Becher, B. Immune Attack: The Role of Inflammation in Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, *16* (6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>.
- (176) Von Bernhardi, R. Glial Cell Dysregulation: A New Perspective on Alzheimer Disease. *Neurotox. Res.* **2007**, *12* (4), 215–232. <https://doi.org/10.1007/BF03033906>.
- (177) Kerkwick, C.; Willoughby, D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2005**, *2* (2), 38. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>.
- (178) Dodd, S.; Dean, O.; Copolov, D. L.; Malhi, G. S.; Berk, M. N-Acetylcysteine for Antioxidant Therapy: Pharmacology and Clinical Utility. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8* (12), 1955–1962. <https://doi.org/10.1517/14728220802517901>.
- (179) Zhu, X.; Perry, G.; Moreira, P. I.; Aliev, G.; Cash, A. D.; Hirai, K.; Smith, M. A. Mitochondrial Abnormalities and Oxidative Imbalance in Alzheimer Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *9* (2), 147–153. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9207>.
- (180) Sung, S.; Yao, Y.; Uryu, K.; Yang, H.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Praticò, D. Early Vitamin E Supplementation in Young but Not Aged Mice Reduces A β Levels and Amyloid Deposition in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *FASEB J.* **2004**, *18* (2), 323–325. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0961fje>.
- (181) Yallampalli, S.; Micci, M.-A.; Tagliamonte, G. Ascorbic Acid Prevents β -Amyloid-Induced Intracellular Calcium Increase and Cell Death in PC12 Cells. *Neurosci. Lett.* **1998**, *251* (2), 105–108.
- (182) Montilla-López, P.; Muñoz-Águeda, M. C.; Feijóo López, M.; Muñoz-Castañeda, J. R.; Bujalance-Arenas, I.; Túnez-Fiñana, I. Comparison of Melatonin versus Vitamin C on Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Alzheimer's Disease Induced by Okadaic Acid in Neuroblastoma Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *451* (3), 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02151-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02151-9).
- (183) Belkacemi, A.; Doggui, S.; Dao, L.; Ramassamy, C. Challenges Associated with Curcumin Therapy in Alzheimer Disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002055>.
- (184) Sreejayan; Rao, M. N. A. Curcuminoids as Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46* (12), 1013–1016. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03258.x>.
- (185) Strimpakos, A. S.; Sharma, R. A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *10* (3), 511–546. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1769>.
- (186) Mori, T.; Koyama, N.; Guillot-Sestier, M.-V.; Tan, J.; Town, T. Ferulic Acid Is a Nutraceutical β -Secretase Modulator That Improves Behavioral Impairment and Alzheimer-like Pathology in Transgenic Mice. *PLOS ONE* **2013**, *8* (2), e55774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055774>.
- (187) Srinivasan, M.; Sudheer, A. R.; Menon, V. P. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2007**, *40* (2), 92–100. <https://doi.org/10.3164/jcbn.40.92>.
- (188) Yan, J.-J.; Jung, J.-S.; Kim, T.-K.; Hasan, M. A.; Hong, C.-W.; Nam, J.-S.; Song, D.-K. Protective Effects of Ferulic Acid in Amyloid Precursor Protein Plus Presenilin-1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36* (1), 140–143. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00798>.

- (189) Sgarbossa, A.; Giacomazza, D.; Di Carlo, M. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients* **2015**, *7* (7), 5764–5782. <https://doi.org/10.3390/nu7075246>.
- (190) Moreira, P. I.; Harris, P. L. R.; Zhu, X.; Santos, M. S.; Oliveira, C. R.; Smith, M. A.; Perry, G. Lipoic Acid and N-Acetyl Cysteine Decrease Mitochondrial-Related Oxidative Stress in Alzheimer Disease Patient Fibroblasts. *J. Alzheimers Dis.* **2007**, *12* (2), 195–206. <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-12210>.
- (191) Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19* (2), 227–250. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00017-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00017-R).
- (192) Zhang, Y.-H.; Wang, D.-W.; Xu, S.-F.; Zhang, S.; Fan, Y.-G.; Yang, Y.-Y.; Guo, S.-Q.; Wang, S.; Guo, T.; Wang, Z.-Y.; Guo, C. α -Lipoic Acid Improves Abnormal Behavior by Mitigation of Oxidative Stress, Inflammation, Ferroptosis, and Tauopathy in P301S Tau Transgenic Mice. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.001>.
- (193) Dp, C.; Li, B.; C, L.; Am, F. The Use of Melatonin in Alzheimer's Disease. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2002**, *23 Suppl 1*, 20–23.
- (194) Reiter, R. J.; Cabrera, J.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Manchester, L. C.; TAN, D.-X. Melatonin as a Pharmacological Agent against Neuronal Loss in Experimental Models of Huntington's Disease, Alzheimer's Disease and Parkinsonism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *890* (1), 471–485.
- (195) Olcese, J. M.; Cao, C.; Mori, T.; Mamcarz, M. B.; Maxwell, A.; Runfeldt, M. J.; Wang, L.; Zhang, C.; Lin, X.; Zhang, G.; Arendash, G. W. Protection against Cognitive Deficits and Markers of Neurodegeneration by Long-Term Oral Administration of Melatonin in a Transgenic Model of Alzheimer Disease. *J. Pineal Res.* **2009**, *47* (1), 82–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00692.x>.
- (196) Dumont, M.; Kipiani, K.; Yu, F.; Wille, E.; Katz, M.; Calingasan, N. Y.; Gouras, G. K.; Lin, M. T.; Beal, M. F. Coenzyme Q10 Decreases Amyloid Pathology and Improves Behavior in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *27* (1), 211–223. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110209>.
- (197) Spindler, M.; Beal, M. F.; Henchcliffe, C. Coenzyme Q10 Effects in Neurodegenerative Disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2009**, *5*, 597.
- (198) Yang, X.; Dai, G.; Li, G.; Yang, E. S. Coenzyme Q10 Reduces β -Amyloid Plaque in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **2010**, *41* (1), 110–113. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9297-1>.
- (199) Young, A. J.; Johnson, S.; Steffens, D. C.; Doraiswamy, P. M. Coenzyme Q10: A Review of Its Promise as a Neuroprotectant. *CNS Spectr.* **2007**, *12* (1), 62–68. <https://doi.org/10.1017/S1092852900020538>.
- (200) Mehta, D.; Jackson, R.; Paul, G.; Shi, J.; Sabbagh, M. Why Do Trials for Alzheimer's Disease Drugs Keep Failing? A Discontinued Drug Perspective for 2010-2015. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26* (6), 735–739. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1323868>.
- (201) Valeur, E.; Jimonet, P. New Modalities, Technologies, and Partnerships in Probe and Lead Generation: Enabling a Mode-of-Action Centric Paradigm. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (20), 9004–9029. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00378>.
- (202) Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Gleevec (STI571, Imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 493–502. <https://doi.org/10.1038/nrd839>.
- (203) Morphy, R.; Rankovic, Z. The Physicochemical Challenges of Designing Multiple Ligands. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (16), 4961–4970. <https://doi.org/10.1021/jm0603015>.
- (204) Deardorff, W. J.; Grossberg, G. T. A Fixed-Dose Combination of Memantine Extended-Release and Donepezil in the Treatment of Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 3267–3279. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>.
- (205) Albertini, C.; Salerno, A.; de Sena Murteira Pinheiro, P.; Bolognesi, M. L. From Combinations to Multitarget-directed Ligands: A Continuum in Alzheimer's Disease Polypharmacology. *Med. Res. Rev.* **2020**.

- (206) Savelieff, M. G.; Nam, G.; Kang, J.; Lee, H. J.; Lee, M.; Lim, M. H. Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1221–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00138>.
- (207) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 347–372. <https://doi.org/10.1021/jm7009364>.
- (208) Lecoutey, C.; Rochais, C.; Genest, D.; Butt-Gueulle, S.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Dulin, F.; Lepailleur, A.; Santos, J. S. O.; Dallemagne, P. Synthesis of Dual AChE/5-HT₄ Receptor Multi-Target Directed Ligands. *MedChemComm* **2012**, *3* (5), 627–634. <https://doi.org/10.1039/C2MD20063E>.
- (209) Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Fréon, A. M.; Mignani, S.; Cresteil, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design of Donecopride, a Dual Serotonin Subtype 4 Receptor Agonist/Acetylcholinesterase Inhibitor with Potential Interest for Alzheimer's Disease Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (36), E3825–E3830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111>.
- (210) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Gaven, F.; Giannoni, P.; Hamidouche, K.; Hedou, D.; Dubost, E.; Genest, D.; Yahiaoui, S.; Freret, T.; Bouet, V.; Dauphin, F.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert-Fréon, A.; Legay, R.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Dallemagne, P. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3172–3187. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00115>.
- (211) Rochais, C.; Lecoutey, C.; Hamidouche, K.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Cem, E.; Mignani, S.; Baranger, K.; Freret, T.; Bockaert, J.; Rivera, S.; Boulouard, M.; Dallemagne, P.; Claeysen, S. Donecopride, a Swiss Army Knife with Potential against Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (9), 1988–2005. <https://doi.org/10.1111/bph.14964>.
- (212) Lalut, J.; Payan, H.; Davis, A.; Lecoutey, C.; Legay, R.; Santos, J. S. O.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Rational Design of Novel Benzisoxazole Derivatives with Acetylcholinesterase Inhibitory and Serotonergic 5-HT₄ Receptors Activities for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59805-7>.
- (213) Lalut, J.; Karila, D.; Dallemagne, P.; Rochais, C. Modulating 5-HT₄ and 5-HT₆ Receptors in Alzheimer's Disease Treatment. *Future Med. Chem.* **2017**, *9* (8), 781–795.
- (214) Ramírez, M. J. 5-HT₆ Receptors and Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2013**, *5* (2), 15. <https://doi.org/10.1186/alzrt169>.
- (215) Yahiaoui, S.; Hamidouche, K.; Ballandonne, C.; Davis, A.; de Oliveira Santos, J. S.; Freret, T.; Boulouard, M.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Multitarget-Directed Ligands with Both Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Partial Agonist and 5-HT₆R Antagonist Activities, as Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.048>.
- (216) Hatat, B.; Yahiaoui, S.; Lecoutey, C.; Davis, A.; Freret, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P. A Novel in Vivo Anti-Amnesic Agent, Specially Designed to Express Both Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory, Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT₄R) Agonist and Serotonergic Subtype 6 Receptor (5-HT₆R) Inverse Agonist Activities, With a Potential Interest Against Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00148>.
- (217) Toubllet, F.-X.; Lecoutey, C.; Lalut, J.; Hatat, B.; Davis, A.; Since, M.; Corvaisier, S.; Freret, T.; Sopkova de Oliveira Santos, J.; Claeysen, S. Inhibiting Acetylcholinesterase to Activate Pleiotropic Prodrugs with Therapeutic Interest in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2786.

Bibliographie

- (218) Persson, T.; Popescu, B. O.; Cedazo-Minguez, A. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 427318. <https://doi.org/10.1155/2014/427318>.
- (219) Ismaili, L.; Romero, A.; Carreiras, M. do C.; Marco-Contelles, J. 2 - Multitarget-Directed Antioxidants as Therapeutic Agents: Putting the Focus on the Oxidative Stress. In *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*; Decker, M., Ed.; Elsevier, 2017; pp 5–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101011-2.00002-7>.
- (220) Castro, A.; Martinez, A. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in Treatment of Alzheimer's Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1* (3), 267–272.
- (221) Melchiorre, C.; Andrisano, V.; Bolognesi, M. L.; Budriesi, R.; Cavalli, A.; Cavrini, V.; Rosini, M.; Tumiatto, V.; Recanatini, M. Acetylcholinesterase Noncovalent Inhibitors Based on a Polyamine Backbone for Potential Use against Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (22), 4186–4189.
- (222) Raina, A. K.; Templeton, D. J.; Deak, J. C.; Perry, G.; Smith, M. A. Quinone Reductase (NQO1), a Sensitive Redox Indicator, Is Increased in Alzheimer's Disease. *Redox Rep.* **1999**, *4* (1–2), 23–27.
- (223) Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lenaz, G.; Rosini, M.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Melchiorre, C. Toward a Rational Design of Multitarget-Directed Antioxidants: Merging Menquinone and Lipoic Acid Molecular Frameworks. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (23), 7883–7886. <https://doi.org/10.1021/jm901123n>.
- (224) Pérez-Areales, F. J.; Garrido, M.; Aso, E.; Bartolini, M.; De Simone, A.; Espargaro, A.; Ginex, T.; Sabaté, R.; Pérez, B.; Andrisano, V.; Puigoriol-Illamola, D.; Pallàs, M.; Luque, F. J.; Loza, M. I.; Brea, J. M.; Ferrer, I.; Ciruela, F.; Messegue, A.; Muñoz-Torrero, D. Centrally Active Multitarget Anti-Alzheimer Agents Derived from the Antioxidant Lead CR-6. *J. Med. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00528>.
- (225) Chen, X.; Zenger, K.; Lupp, A.; Kling, B.; Heilmann, J.; Fleck, C.; Kraus, B.; Decker, M. Tacrine-Silibinin Codrug Shows Neuro- and Hepatoprotective Effects in Vitro and Pro-Cognitive and Hepatoprotective Effects in Vivo. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (11), 5231–5242. <https://doi.org/10.1021/jm300246n>.
- (226) Grossman, C. J.; Kilpatrick, G. J.; Bunce, K. T. Development of a Radioligand Binding Assay for 5-HT₄ Receptors in Guinea-Pig and Rat Brain. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109* (3), 618–624. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13617.x>.
- (227) Glazer, A. N. [14] Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. In *Methods in Enzymology*; Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants; Academic Press, 1990; Vol. 186, pp 161–168. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86106-6).
- (228) Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00102-P](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00102-P).
- (229) H-ORAC Activity Assay Kit | [Analytical Chemistry]Products | Laboratory Chemicals-FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation <https://labchem-wako.fujifilm.com/us/category/00420.html> (accessed Sep 27, 2020).
- (230) Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181* (4617), 1199–1200.
- (231) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85* (5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
- (232) Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. Hurdles and Pitfalls in Measuring Antioxidant Efficacy: A Critical Evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC Assays. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.
- (233) Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader11Mention of a Trade Name, Proprietary Product, or Specific Equipment Does Not Constitute a Guarantee by the United States Department of Agriculture and Does Not

- Imply Its Approval to the Exclusion of Other Products That May Be Suitable. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27 (5), 612–616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0).
- (234) Held, P.; Newick, K. Using BioTek's Synergy™ HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells. *BioTechniques* **2009**, 46 (1), 61–62. <https://doi.org/10.2144/000113081>.
- (235) Murphy, T. H.; Miyamoto, M.; Sastre, A.; Schnaar, R. L.; Coyle, J. T. Glutamate Toxicity in a Neuronal Cell Line Involves Inhibition of Cystine Transport Leading to Oxidative Stress. *Neuron* **1989**, 2 (6), 1547–1558. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90043-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90043-3).
- (236) Schramm, S.; Huang, G.; Gunesch, S.; Lang, F.; Roa, J.; Högger, P.; Sabaté, R.; Maher, P.; Decker, M. Regioselective Synthesis of 7-O-Esters of the Flavonolignan Silibinin and SARs Lead to Compounds with Overadditive Neuroprotective Effects. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 146, 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.036>.
- (237) van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; Cree, I. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- (238) Lanthier, C.; Payan, H.; Liparulo, I.; Hatat, B.; Lecoutey, C.; Since, M.; Davis, A.; Bergamini, C.; Claeysen, S.; Dallemagne, P.; Bolognesi, M.-L.; Rochais, C. Novel Multi Target-Directed Ligands Targeting 5-HT4 Receptors with in Cellulo Antioxidant Properties as Promising Leads in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 182, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111596>.
- (239) Garegg, P. J. Some Aspects of Regio-, Stereo-, and Chemoselective Reactions in Carbohydrate Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1984**, 56 (7), 845–858.
- (240) Wang, J.; Xia, F.; Jin, W.-B.; Guan, J.-Y.; Zhao, H. Efficient Synthesis and Antioxidant Activities of N-Heterocyclyl Substituted Coenzyme Q Analogues. *Bioorganic Chem.* **2016**, 68 (Supplement C), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.08.008>.
- (241) Blanc, G. „Preparation of Aromatic Chloromethylenic Derivatives “. *Bull Soc Chim Fr.* **1923**, 33, 313.
- (242) Baell, J. B. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *J Nat Prod* **2016**, 13.
- (243) Daina, A.; Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **2016**, 11 (11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- (244) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (245) Hoare, D. G.; Olson, A.; Koshland, D. E. The Reaction of Hydroxamic Acids with Water-Soluble Carbodiimides. A Lossen Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90 (6), 1638–1643. <https://doi.org/10.1021/ja01008a040>.
- (246) Bandini, M. Electrophilicity: The “Dark-Side” of Indole Chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11 (32), 5206–5212. <https://doi.org/10.1039/C3OB40735G>.
- (247) Hitchcock, S. A. Structural Modifications That Alter the P-Glycoprotein Efflux Properties of Compounds. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (11), 4877–4895. <https://doi.org/10.1021/jm201136z>.
- (248) Desai, P. V.; Sawada, G. A.; Watson, I. A.; Raub, T. J. Integration of in Silico and in Vitro Tools for Scaffold Optimization during Drug Discovery: Predicting P-Glycoprotein Efflux. *Mol. Pharm.* **2013**, 10 (4), 1249–1261. <https://doi.org/10.1021/mp300555n>.
- (249) Bonifácio, M. J.; Palma, P. N.; Almeida, L.; Soares-da-Silva, P. Catechol-O-methyltransferase and Its Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Drug Rev.* **2007**, 13 (3), 352–379. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00020.x>.
- (250) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, 111 (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (251) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.

Bibliographie

- (252) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/B701677H>.
- (253) Tack, J.; Camilleri, M.; Chang, L.; Chey, W. D.; Galligan, J. J.; Lacy, B. E.; Müller-Lissner, S.; Quigley, E. M. M.; Schuurkes, J.; Maeyer, J. H.; Stanghellini, V. Systematic Review: Cardiovascular Safety Profile of 5-HT4 Agonists Developed for Gastrointestinal Disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35* (7), 745–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05011.x>.
- (254) Dhanoa, D.; Becker, O.; Noiman, S.; Wu, L.; Lobera, M.; Mohanty, P.; Marantz, Y.; Inbal, B.; Shacham, S.; Chen, D. Thienopyridinone Compounds and Methods of Treatment. US20060079547A1, April 13, 2006.
- (255) Kumari, S.; Carmona, A. V.; Tiwari, A. K.; Trippier, P. C. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *J. Med. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00530>.
- (256) Mondini, S.; Drago, C.; Ferretti, A. M.; Puglisi, A.; Ponti, A. Colloidal Stability of Iron Oxide Nanocrystals Coated with a PEG-Based Tetra-Catechol Surfactant. *Nanotechnology* **2013**, *24* (10), 105702. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/10/105702>.
- (257) Drew, S. L.; Lawrence, A. L.; Sherburn, M. S. Unified Total Synthesis of the Natural Products Endiandric Acid A, Kingianic Acid E, and Kingianins A, D, and F. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (7), 3886–3890. <https://doi.org/10.1039/C5SC00794A>.
- (258) Kelly, P. M.; Keely, N. O.; Bright, S. A.; Yassin, B.; Ana, G.; Fayne, D.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. Novel Selective Estrogen Receptor Ligand Conjugates Incorporating Endoxifen-Combretastatin and Cyclofenil-Combretastatin Hybrid Scaffolds: Synthesis and Biochemical Evaluation. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *22* (9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091440>.
- (259) Wang, S.; Jia, X.-D.; Liu, M.-L.; Lu, Y.; Guo, H.-Y. Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Activity of Ciprofloxacin Derivatives Containing a N-Substituted Benzyl Moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5971–5975. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.040>.
- (260) Romero, M. A.; González-Delgado, J. A.; Arteaga, J. F. Synthesis of Stilbene Derivatives: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10* (7), 1257–1262. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000731>.
- (261) Weigel, W. K.; Dennis, T. N.; Kang, A. S.; Perry, J. J. P.; Martin, D. B. C. A Heck-Based Strategy To Generate Anacardic Acids and Related Phenolic Lipids for Isoform-Specific Bioactivity Profiling. *Org. Lett.* **2018**, *20* (19), 6234–6238. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02705>.
- (262) Du, Y.; Huang, H.-Y.; Liu, H.; Ruan, Y.-P.; Huang, P.-Q. Studies towards the Total Asymmetric Synthesis of the Pentacyclic Indole Alkaloid Arboflorine: Asymmetric Synthesis of a Key Intermediate. *Synlett* **2011**, *2011* (04), 565–568.
- (263) Bowman, W. R.; Elsegood, M. R. J.; Stein, T.; Weaver, G. W. Radical Reactions with 3H-Quinazolin-4-Ones: Synthesis of Deoxyvasicinone, Mackinazolinone, Luotonin A, Rutaecarpine and Tryptanthrin. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *5* (1), 103–113. <https://doi.org/10.1039/B614075K>.
- (264) Nirogi, R.; Mohammed, A. R.; Jasti, V. Process for Large Scale Production of 1-Isopropyl-3-[5-[1-(3-Methoxypropyl) Piperidin-4-Yl]-[1,3,4]Oxadiazol-2-Yl]-1h-Indazole Oxalate. WO2016027277A1, February 25, 2016.
- (265) Adepu, R.; Sunke, R.; T. Meda, C. L.; Rambabu, D.; Rama Krishna, G.; Malla Reddy, C.; Singh Deora, G.; L. Parsa, K. V.; Pal, M. Facile Assembly of Two 6-Membered Fused N - Heterocyclic Rings: A Rapid Access to Novel Small Molecules via Cu-Mediated Reaction. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (2), 190–192. <https://doi.org/10.1039/C2CC37070K>.
- (266) Buckman, B.; Nicholas, J. B.; Seiwert, S.; Serebryany, V. Novel Macrocyclic Inhibitors of Hepatitis c Virus Replication. WO2012054874A1, April 26, 2012.
- (267) Quinones, M. P.; Pou, S. F.; Duran, C. P.; Amador, W. L.; Bosch, J. A. NEW CYCLOHEXYLAMINE DERIVATIVES HAVING B2 ADRENERGIC AGONIST AND M3 MUSCARINIC ANTAGONIST ACTIVITIES. WO2011141180A1, November 17, 2011.

Bibliographie

- (268) Jegham, S.; Lothead, A.; Nedelec, A.; Galli, F.; Gallet, T. Derives de 5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2(3h)-one et leur utilisation comme ligands 5-ht4. WO1998050383A1, November 12, 1998.
- (269) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
- (270) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Bibliographie

Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux composés à dualité d'action agoniste des récepteurs 5-HT₄ et antioxydante, d'intérêt thérapeutique pléiotrope dans la maladie d'Alzheimer.

Résumé :

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par des pertes de mémoire et des troubles cognitifs. Bien qu'à l'heure actuelle, les causes physiopathologiques de la MA ne soient pas entièrement connues, un certain nombre de causes moléculaires ont été identifiées telles que l'agrégation des peptides β -amyloïdes, les dégénérescences neurofibrillaires liées à la protéine Tau, le stress oxydant et les phénomènes de neuroinflammation. Les traitements actuels de la MA sont des traitements symptomatiques tels que les inhibiteurs d'acétylcholinestérase ne permettant pas de traiter les causes moléculaires profondes de la maladie. Il existe donc un réel besoin médical pour les patients atteints de la MA.

Dans ce contexte, le concept de médicaments pléiotropes (ou MTDL) a été envisagé afin d'agir sur plusieurs des causes moléculaires de la maladie et ainsi limiter sa progression. Les composés MTDL développés dans cette thèse visent à limiter la formation des plaques amyloïdes grâce à leur activité agoniste des récepteurs 5-HT₄ et d'autre part, à réduire le stress oxydant jouant un rôle central dans la MA.

Pour cela, différentes familles de composé ont été conçues, synthétisées et évaluées au travers de différents tests *in vitro* et *in cellulo* sur leur activité envers les récepteurs 5-HT₄ et leur capacité antioxydante. Cela nous a permis d'identifier de nouveaux composés prometteurs possédant de potentielles propriétés neuroprotectives.

Mots clés : *Maladie d'Alzheimer – Antioxydant – Ligands multicibles – 5-HT₄R*

Design, synthesis and biological evaluation of new pleiotropic compounds with 5-HT₄R agonism as well as antioxidant capacity for the treatment of Alzheimer's disease.

Summary:

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by memory loss and cognitive decline. Although the physiopathology of AD is not entirely known at the time, some molecular causes were identified such as the β -amyloid peptides aggregation, tau-dependent neurofibrillary tangles, as well as oxidative stress and neuroinflammation. Currently, treatments available for patients are mainly acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, which only have symptomatic benefits and do not cure AD. The medical need is thus strong in AD population.

In this context, the concept of Multi-Target Directed Ligands (MTDLs) was applied to design a drug active toward several therapeutic targets. The envisaged MTDL should be able in first hand, to limit the development of β -amyloid plaques by activating 5HT₄R and in another hand to reduce the oxidative stress that plays a central role in the disease's physiopathology.

To that end, different series of compounds were designed, synthesized and evaluated for their *in vitro/in vivo* properties regarding their agonist activity on 5-HT₄R and antioxidant properties. It led to the discovery of innovative molecules with potential promising neuroprotective properties.

Keywords: *Alzheimer's disease – Antioxidant– Multitarget Directed Ligands – 5-HT₄R*