



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 à visée anticancéreuse : applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants

Camille Denis

► **To cite this version:**

Camille Denis. Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 à visée anticancéreuse : applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants. Médicaments. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC424 . tel-04208430

HAL Id: tel-04208430

<https://theses.hal.science/tel-04208430>

Submitted on 15 Sep 2023

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 biologique d'inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 à visée anticancéreuse

**Présentée et soutenue par
Camille DENIS**

**Thèse soutenue publiquement le 21/11/2018
devant le jury composé de**

Mme ISABELLE BERQUE-BESTEL	Professeur des universités, Université de Bordeaux	Rapporteur du jury
Mme CÉCILE ENGUEHARD-GUEIFFIER	Professeur des universités, UNIVERSITE TOURS FRANCOIS RABELAIS	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE DENOYELLE	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Membre du jury
M. PASCAL MARCHAND	Professeur des universités, UNIVERSITE NANTES	Président du jury
Mme ANNE-SOPHIE VOISIN-CHIRET	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse
M. RONAN BUREAU	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Co-directeur de thèse

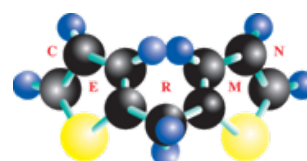
Thèse dirigée par ANNE-SOPHIE VOISIN-CHIRET et RONAN BUREAU, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



A Madame Isabelle Berque-Bestel,

Professeur à l'Université de Bordeaux

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets CBMN, UMR5248, Bordeaux

A Madame Cécile Enguehard-Gueiffier,

Professeur à l'Université de Tours

Laboratoire Synthèse et Isolement de Molécules Bio-Actives SIMBA, EA7502, Tours

A Monsieur Christophe Denoyelle,

Maitre de conférences HDR à l'Université de Caen Normandie

Unité de Recherche Interdisciplinaire pour la Prévention et le Traitement des Cancers ANTICIPE,

Inserm U1086, Caen

A Monsieur Pascal Marchand,

Professeur à l'Université de Nantes

Équipe Cibles et Médicaments des Infections et du Cancer, EA1155, Nantes

A Monsieur Ronan Bureau,

Professeur à l'Unité de Caen Normandie

Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie CERMN, EA4258, Caen

A Madame Anne Sophie Voisin-Chiret,

Professeur à l'Université de Caen Normandie

Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie CERMN, EA4258, Caen

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger mon travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de thèse, le Professeur Anne Sophie Voisin-Chiret, et le Professeur Ronan Bureau qui chacun à leur manière m'ont permis d'évoluer et progresser en tant que jeune chercheur. Merci d'avoir cru en moi, merci pour votre confiance qui m'a permis de gagner en autonomie avec sérénité car je vous savais présents.

Merci Anne Sophie pour ta disponibilité tout au long de ces trois années. Merci de m'avoir sensibilisée à l'importance de la communication dans la recherche et de m'avoir beaucoup appris dans ce domaine. C'est grâce à toi que j'ai acquis ce savoir-faire.

Merci Ronan pour tout ce que vous m'avez apporté dans l'apprentissage de la modélisation moléculaire. Merci pour ces discussions au cours desquelles vous laissez libre cours à votre imagination et votre créativité.

Je tiens également à remercier :

le Professeur Patrick Dallemagne, directeur du laboratoire CERMN pour son accueil pendant ces trois années.

le Professeur Jana Sopková-de Oliveira Santos. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, et la patience dont tu as fait preuve en supportant avec le sourire mes intrusions répétées.

l'équipe de biologie du laboratoire BioTICLA (Docteur Laurent Poulain, Docteur Christophe Denoyelle, Docteur Emilie Broutin, Docteur Siham Hedir et Docteur Louis-Bastien Weiswald). Merci d'avoir su prendre le temps de m'expliquer simplement les tests biologiques malgré leur complexité et d'avoir répondu à toutes mes questions.

le Docteur James A. Bull de m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire à l'Imperial College London. J'y ai acquis des compétences dans la mise en œuvre de nouvelles méthodologies synthétiques, avec une rigueur renforcée.

l'équipe de RMN du laboratoire COBRA (Professeur Hassan Oulyadi, Docteur Muriel Sebban et Asma Bourafai-Aziez) et le Docteur Ludovic Carlier de l'UPMC qui a assuré la production de la protéine indispensable aux travaux de l'équipe.

le Docteur Rémi Legay pour son aide à l'interprétation des spectres RMN et le Docteur Marie Jouanne pour la mise en place de l'analyse des molécules par la technique FPA.

Mes remerciements vont également à la Région Normandie qui a financé ma thèse et une partie de mon stage à Londres, ainsi que le Cancéropôle Nord-Ouest pour sa participation.

Je n'aurais pas pu imaginer mieux commencer ma thèse qu'aux côtés de Martina et Victor. On a partagé les bons moments comme les moins bons, et on a toujours été là les uns pour les autres. On forme une belle équipe, et ces années marqueront nos vies à tous les trois.

Martina, Marty, Martinoche, j'ai adoré partager le labo des filles, le CM042 avec toi. On s'est tout de suite entendues. Tu es cool, tu ne te prends pas la tête, tout est facile avec toi et je suis heureuse de t'avoir rencontrée. Tu m'as vraiment manqué lorsque tu es partie faire un stage au Canada et je suis vraiment contente de t'avoir retrouvée !

Victor, tu es unique et j'ai adoré apprendre à te connaître, partager des bons moments au labo et en dehors. Tu m'as ouvert les yeux sur beaucoup de choses et je t'en remercie. Tu es quelqu'un de bien, avec qui on peut discuter de tout et j'ai énormément de chance de t'avoir comme ami.

Charline, Chacha, ma besta, par quoi commencer ? Il y a tellement de bons souvenirs ! Travailler avec toi pendant les deux premières années de thèse, partager le labo en s'entendant à la perfection sur les choix musicaux, nos folies musicales en fin de journée, le partage du box et tous nos fous rires. C'est juste génial de travailler avec toi, tu donnes la pêche. Tu es une personne extraordinaire, généreuse et tu m'as poussée vers le haut. Tu es une personne travailleuse, enthousiaste, pleine de ressources et déterminée. Et je dois te dire aussi un énorme merci pour tout le temps que tu m'as consacré pour répondre à toutes mes questions pharma. Mais au-delà du travail, nous sommes devenues amies, c'était comme une évidence. On a fait beaucoup de sport ensemble (et d'ailleurs, je finirai par te battre au squash !). On a partagé des moments importants de la vie : tes 30 ans, ton pacs avec Sylvain et des vacances inoubliables à la Bouilladisse, mes premières vacances avec des amis. Bref, merci pour tout besta, merci d'être là pour moi et tu sais que j'y suis pour toi. Tu es une très belle rencontre, je te kiffe grave. Sylvain, mon marseillais préféré qui est venu en Normandie, reste comme tu es. Tu es quelqu'un de naturel, qui ne se prend pas la tête et qui apprécie la vie, je suis ravie de te connaître.

Yohann, mon Yoyo, qu'est-ce que c'était top le CERMN quand tu étais là ! Tu es un exemple pour moi. Tu es moteur, motivant et tu m'as poussée à être plus curieuse. Tu as réussi à souder le groupe du CERMN. Tu nous entraînaux jusqu'au bout de la nuit dans les soirées, tu profites de la vie à fond et tu as bien raison. Merci pour tout, merci de me bouger (je me rappelle bien les sorties running le midi au labo !). J'en profite aussi pour remercier Célia, qui fait aussi partie de la bande du CERMN.

Marie, je te remercie tout d'abord pour m'avoir aidée dans la dernière étape de ma thèse. Toujours présente dans les soirées et pour organiser des week-ends, c'était génial de partager ces moments en ta compagnie. Mais ce qui m'a marqué, ce sont nos discussions à propos de la façon de voir la vie (et la vieillesse notamment !) et je t'avoue que je commence à relativiser quant à ça (ou alors à vieillir ;).

Je tiens à remercier Anne-Claire, enfin MC, pour m'avoir initiée au regard expert du galéniste quant à la solubilité des molécules. Merci aussi d'avoir été moteur pour regrouper les personnes travaillant dans les différentes disciplines. On vit beaucoup mieux tous ensemble, et c'est en grande partie grâce à toi.

Cécé, un des piliers du labo, je t'apprécie énormément. J'aime ta façon de voir les choses, tu es une personne vraie et sincère et j'emporte avec moi de très bons souvenirs ! J'en profite pour remercier les autres « anciens », Rémi (parce que c'est toujours des soirées remarquables quand tu es présent), Stéphane, Jeff, Sophie (et Marc !), Xiao et Christoche.

Je tiens à remercier tous les doctorants et post-doc que j'ai côtoyés pendant ma thèse, en commençant par FX (parce que c'est vraiment cool de pouvoir discuter avec toi et j'ai aimé qu'on se charrie de temps en temps), Sébastien, JP, Willy, Caroline, Manu, Clémence, Damien, Alexandra, Reynald, Pauline, Julien, Line, Benjamin, Winbedma (et pardon à ceux que j'oublie). Je tiens également à souhaiter la bienvenue à Johanna et Clément.

Floflo, c'était vraiment sympa de travailler à tes côtés également. J'en garde de très bons souvenirs, on s'est bien amusés. Tu fais partie des personnes qui auront marqué ma thèse. Je tiens également à remercier Kévin (enfin je crois que je continuerai à t'appeler Kéké) et Laurianne.

Je tiens à remercier Bogdan, Momo et JP, les modalisateurs. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions, de m'avoir aidée et puis machin, machin, machin !

Je tiens à remercier Alban, Colette et Pascale, avec qui j'ai encadré mes premiers TP. Partager cette expérience avec vous a été très enrichissant et formateur.

Je tiens à remercier Peggy pour être la gardienne de mes bébés. Merci également à toi ainsi qu'à Sylvia et Audrey de m'avoir ouvert aussi souvent la barrière !

Merci à tous les membres du CERMN avec lesquels j'ai pu discuter pendant ma thèse, particulièrement Aurélie, Fred, Thomas, Christophe, Valérie et Marc. Travailler avec vous a été des plus agréable.

Je tiens également à remercier les doctorants que j'ai rencontrés pendant mon stage à Londres. Alex, Maryne (enfin Gertrude), Dani (mon cheerleader), Joe, Rosie et Sahra, merci de m'avoir tout de suite acceptée et intégrée dans le groupe.

Je tiens à remercier mes fidèles amies, Sophie (ma chérie), Didine et Martine. Vous avez toujours été présentes pour moi. Vous me connaissez, avec mes qualités et mes défauts et je peux être complètement moi-même avec vous. Merci pour tout, je sais que notre amitié n'est pas prête de s'arrêter.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma maman. Toujours présente, toujours prête à me rassurer quand j'en avais besoin, voulant toujours m'encourager. Tu as cru en moi, tu m'as conseillée, aidée et tu as su m'écouter en toutes circonstances. Tu me connais mieux que personne, je ne sais pas ce que je ferais sans toi. C'est grâce à TOI que je suis devenue celle que je suis aujourd'hui, et je ne pourrai jamais te remercier assez pour cela.

Merci pour tout maman, je t'aime infiniment et t'aimerai indéfiniment.

Ah ! J'allais oublier...Mais non je n'oublie pas le Canada, on se le fera notre voyage !

Alexandre, je n'aurais pas pu imaginer avoir un frère meilleur que toi. Je suis tellement fière de toi, de la personne que tu es. Tu as toujours été là pour moi et c'est rassurant de pouvoir compter sur toi. Préparant ma thèse à Caen, j'ai été très heureuse de pouvoir partager plus de moments avec toi et Léa.

Je tiens également à remercier toute ma famille, qui compte énormément pour moi. Mes grands-parents, pépère Jean-Claude et mamie Liliane, parce que depuis toute petite vous me gâtez, et que vous réunissez tous les dimanches notre famille. Merci également à tata Sabrina, tonton Jean-Luc, tata Nathalie et tonton Marco, qui, je le sais, seront toujours là pour moi. Enfin merci mes cousins, Pierre, Clémence, Charley, Paul, Léa et Tom, car les quatre cents coups nous les avons faits ensemble et nous avons des souvenirs plein la tête ! Je tiens à remercier plus généralement toute ma famille, merci pour votre soutien, je vous aime.

Gilbert, un grand MERCI. Quand j'étais petite, je croyais que tu étais de ma famille, et quand j'ai appris un peu plus tard que tu étais juste un ami de ma famille, je n'y ai pas cru. Pour moi, tu seras à jamais mon tonton. Je tiens à te remercier car si j'en suis là c'est aussi grâce à toi. Depuis le début tu m'aides, tu m'épaulés et tu es à mon écoute. J'adore travailler avec toi, être pointilleuse dans le choix des mots, à apprendre de ton savoir-faire. Mais au-delà de ça, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, d'écouter tes conseils (et d'essayer très difficilement de les suivre !). Promis, je persévérerai à faire des efforts ! En tout cas, merci pour tout.

Alex, merci pour tout. Merci d'être là pour moi et de me soutenir au quotidien. Tu es une personne merveilleuse, tu me fais rire, tu m'aimes comme je suis et je t'en remercie. You are my favourite (English) boy. Je suis heureuse de partager ta vie, la vie est simple et belle à tes côtés. Tu me rends heureuse et je suis épanouie grâce à toi. J'espère de tout cœur que le chemin que nous avons commencé à parcourir ensemble n'est que le début d'une belle histoire et d'une grande aventure.

A ma mère,

Lydie

A mon frère,

Alexandre

A mes grands-parents,

Liliane et Jean-Claude & Françoise et Yves

A mon oncle,

Gilbert

A mon oncle,

Jean-Charles

A toute ma famille

Sommaire

ABREVIATIONS.....	7
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	17
ETAT DE L'ART : DU CANCER DE L'OVAIRE AUX STRATEGIES THERAPEUTIQUES	29
I. Apoptose.....	32
1. Définition.....	32
2. Voies de signalisation	32
3. Protéines de la famille Bcl-2	34
3.1. <i>Structure des protéines de la famille Bcl-2.....</i>	<i>36</i>
3.2. <i>Contrôle de la voie de signalisation apoptotique.....</i>	<i>37</i>
3.3. <i>Interactions protéine-protéine entre les membres de la famille Bcl-2</i>	<i>39</i>
3.4. <i>Focus sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.....</i>	<i>42</i>
II. Études structurales des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L	43
1. Structures issues de la <i>Protein Data Bank</i>	43
2. Comparaison structurale des protéines Mcl-1 et Bcl-x _L	45
3. Études de mutagenèse.....	45
3.1. <i>Étude de mutagenèse du BH3-only Bim</i>	<i>46</i>
3.2. <i>Étude de mutagenèse du BH3-only Noxa.....</i>	<i>48</i>
3.3. <i>Étude de mutagenèse du BH3-only Bad.....</i>	<i>48</i>
3.4. <i>Discussion.....</i>	<i>49</i>
4. Études de simulations par Dynamique Moléculaire (DM).....	49
5. Études des complexes Bim/Mcl-1 et Bim/Bcl-x _L	50
6. Discussion	52
III. Interactions protéine-protéine.....	54
1. Définition de l'interaction protéine-protéine	54
2. Définition de l'interface protéine-protéine	56
3. Caractérisation des interactions protéine-protéine	56

IV. A la découverte de BH3-mimétiques	62
1. Méthode de Structure-Based Drug Design (SBDD)	63
1.1. Principe de l'approche.....	63
1.2. Découverte d'un inhibiteur de Mcl-1.....	66
2. Méthode de Fragment-Based Drug Design (FBDD).....	68
2.1. Principe de l'approche.....	68
2.2. Découverte d'un inhibiteur des protéines Bcl-x _L , Bcl-2 et Bcl-w, le Navitoclax (ABT-263)	71
V. Inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x _L	77
1. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Mcl-1	77
1.1. Groupe de Fesik.....	77
1.2. Groupe de Voisin-Chiret et Poulain.....	82
1.3. Inhibiteurs en cours d'évaluation clinique	84
2. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Bcl-x _L	85
3. Inhibiteurs à dualité d'action Mcl-1/Bcl-x _L	88
3.1. Molécule hybride du groupe de Tanaka.....	88
3.2. Inhibiteur à dualité d'action découvert par le groupe de Pellecchia	90
GENESE DU PROJET	91
TRAVAUX PERSONNELS.....	95
CHAPITRE 1	97
I. Choix des structures tridimensionnelles	99
1. Analyse par Composantes Principales des structures de la protéine Bcl-x _L	99
1.1. Complexe ABT-737 avec Bcl-x _L	101
1.2. Complexes molécule XX /Bcl-x _L et WEHI-539/Bcl-x _L	103
2. Analyse par Composantes Principales des structures de la protéine Mcl-1	104
2.1. Complexe molécule XII /Mcl-1	105
2.2. Complexe molécules XIII et XIV /Mcl-1	106
II. Le Pyridoclax : Étude de modélisation moléculaire	107
1. Comment le Pyridoclax inhibe-t-il la protéine Mcl-1 ?.....	107
2. Pourquoi le Pyridoclax est-il sélectif de la protéine Mcl-1 ?.....	111
2.1. Matériels et Méthodes.....	111

2.2.	<i>Alignement des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L</i>	112
2.3.	<i>Observation du Pyridoclast dans la protéine Bcl-x_L</i>	114
III.	Conception rationnelle de molécules à partir de la structure du Pyridoclast	115
1.1.	<i>Conception de molécules selon l'hypothèse 1</i>	116
1.2.	<i>Conception de molécules selon l'hypothèse 2</i>	118
IV.	Modélisation Moléculaire : Méthodes utilisées	119
1.	Numérotation des composés	119
2.	Matériels et Méthodes	119
2.1.	<i>Construction de la molécule et analyse conformationnelle</i>	119
2.2.	<i>Préparation de la protéine</i>	120
2.3.	<i>Docking</i>	120
2.4.	<i>Simulation par Dynamique Moléculaire (DM)</i>	122
2.5.	<i>Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind} par la méthode de MM-GBSA</i>	125
V.	Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast	127
1.	Selon l'hypothèse 1	127
1.1.	<i>Résultats et discussion sur le composé MR34911</i>	128
1.2.	<i>Résultats et discussion sur le composé MR34917</i>	131
1.3.	<i>Résultats et discussion sur le composé MR34913</i>	134
1.4.	<i>Résultats et discussion sur le composé MR34916</i>	137
1.5.	<i>Résultats et discussion sur le composé MR34937</i>	142
2.	Selon l'hypothèse 2	145
2.1.	<i>Résultats et discussion sur les molécules CDSMM007, -002 et -091</i>	145
3.	Discussion	146
CHAPITRE 2	149
I.	Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)	151
II.	Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités	159
1.	Synthèse des molécules à deux unités, R = H	160
2.	Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl	162

2.1. Voie synthétique 1.....	162
2.2. Voie synthétique 2.....	164
3. Synthèse des molécules à deux unités, R = CN ou CO ₂ H.....	166
3.1. A partir des travaux antérieurs du laboratoire.....	166
3.2. A partir d'une nouvelle voie rétrosynthétique.....	167
3.3. Réaction de cyanation en ortho de la pyridine.....	168
3.4. Synthèse de l'intermédiaire clé MR34988	169
3.5. Synthèse des molécules à deux unités, R = CN et R = CO ₂ H.....	174
4. Évaluation biologique des molécules à deux unités.....	176
III. Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à trois unités.....	178
1. MR34916 et MR34913.....	179
1.1. Synthèse et pharmacomodulation.....	179
1.2. Évaluation biologique.....	181
2. MR34937.....	183
2.1. Synthèse et pharmacomodulation.....	183
2.2. Évaluation biologique.....	185
3. Influence d'un second substituant sur la troisième unité.....	186
3.1. Influence du groupement méthyle.....	186
3.2. Influence de l'atome de chlore.....	188
4. Discussion.....	191
IV. Synthèse et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2.....	195
1. Synthèse.....	195
2. Évaluation biologique.....	196
CHAPITRE 3.....	197
I. Exploration de la poche P4 de Bcl-X_L à partir de la littérature.....	200
1. Conception de molécules à partir de la littérature.....	200
2. Études de modélisation moléculaire des composés CDSMM024 et CDSMM025	201
3. Étude de la voie de synthèse du composé CDSMM024	202
4. Synthèse du composé MR34935	204
5. Évaluation biologique du composé MR34935	205

II. Exploration de la poche P4 de Bcl-x _L à partir de fragments tridimensionnels.....	206
1. Fragments tridimensionnels.....	206
2. Azétidines	207
2.1. <i>Méthodologie, Exemplification et Dérivatisation</i>	208
2.2. <i>3,3-Diarylazétidines et nos cibles thérapeutiques</i>	209
3. 4,4-Diarylpipéridines et 3,3-diarylcyclobutanes	213
3.1. <i>Synthèse des 4-pipéridinols</i>	213
3.2. <i>Optimisation de la réaction de Friedel–Crafts à partir du MR34947</i>	213
3.3. <i>Optimisation de la réaction de Friedel–Crafts à partir du MR34958</i>	215
3.4. <i>Exemplification</i>	216
3.5. <i>Produits secondaires obtenus</i>	217
3.6. <i>Synthèse de 3,3-diarylcyclobutanes</i>	218
3.7. <i>Perspectives</i>	219
4. Collaboration et enrichissement de notre chimiothèque.....	220
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	221
PARTIE EXPERIMENTALE	227
ANNEXES.....	287
I. Cibler une autre protéine : la protéine HSP110	289
II. Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x _L et Mcl-1 issues de la <i>Protein Data Bank</i>	293
1. Structures tridimensionnelles de la protéine Bcl-x _L	293
2. Structures tridimensionnelles de la protéine Mcl-1	298
III. Acides aminés définissant les poches hydrophobes des protéines Bcl-x _L et Mcl-1	302
IV. Résultats bruts de l'évaluation biologique (impédancemétrie).....	303
1. Résultats du MR34923	303
2. Résultats du MR34934	304
3. Résultats du MR34921	305
4. Résultats du MR34963	306

5. Résultats du MR34937	307
6. Résultats du MR36102	308
7. Résultats du MR34944	309
V. Criblage des molécules par polarisation de fluorescence.....	310
VI. Résultats des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire.....	313
VII. Couplage de Suzuki–Miyaura.....	324

Abréviations

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
AA	Acide Aminé
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AML	Acute Myeloid Leukemia
AP-MS	Affinity Purification – Mass Spectrometry
Apaf-1	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
Bad	Bcl-x _L /Bcl-2 Associated Death protein
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist-Killer protein
Bax	Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	Bcl-2-like 2
Bcl-x _L	B cell lymphoma x Long isoform
Bfl-1/A1	Bcl-2-related protein A1
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist protein
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
Caspase	Apoptosis-related cysteine peptidase
Cbz	Carboxybenzyl
CE ₅₀	Concentration Effectrice médiane
CERMN	Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50 %
DIABLO	Direct IAP Binding protein with LOw Isosteric Point
DM	Dynamique Moléculaire
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FBDD	Fragment-Based Drug Design
FDA	Food Drug Administration
FPA	Fluorescence Polarization Assay
GI50	Growth Inhibition 50%
GIMP	GNU Image Manipulation
Glide	Grid-based Ligand Docking with Energetics
Hrk	Harakiri
HSA	Human Serum Albumine
HSP	Heat Shock Protein
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HtrA2/Omi	High temperature requirement protein 2

HTS	High Throughput Screening
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
INCa	Institut National du Cancer
IPP	Interaction Protéine-Protéine
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_A	Constante d'association à l'équilibre
K_d	Constante de dissociation à l'équilibre
K_i	Constante d'inhibition
K_{off}	Constante de dissociation
K_{on}	Constante d'association
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
<i>m</i> -CPBA	Acide métachloroperbenzoïque
MBP	Maltose Binding Protein
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MM-GBSA	Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area
MOM	Mitochondrial Outer Membrane
MW	Molecular Weight
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
Noxa	NADPH Oxidase Activator
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
OPLS-AA	Optimized Potentials for Liquid Simulations All Atoms
PC	Principal Component
PDB	Protein Data Bank
PRCG	Polak-Ribier Conjugate Gradient
PSA	Polar Surface Area
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PyMOL	Python-enhanced molecular graphics tool
R_f	Rapport Frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RMSF	Root-Mean-Square Fluctuation
RNA	RiboNucleic Acid
RSA	Relation Structure-Activité
RX	Rayon X
SAR	Structure-Activity Relationship
SBDD	Structure-Based Drug Design
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
siRNA	Small Interfering RNA
Smac	Second Mitochondrial Activator of Caspases
SPS	Simple Point-Charge
SPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl
SPMC	Systematic Pseudo Monte Carlo
SPR	Surface Plasmon Resonance
STD	Saturation Transfer Difference
TM	TransMembrane

TMSCN	Trimethylsilyl cyanide
TSA	Thermal Shift Assay
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultra Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Liste des acides aminés

Ala	A	Alanine	Leu	L	Leucine
Arg	R	Arginine	Leu _c		Leucine conservée
Arg _c		Arginine conservée	Lys	K	Lysine
Asn	N	Asparagine	Met	M	Méthionine
Asp	D	Acide Aspartique	Phe	F	Phénylalanine
Asp _c		Acide Aspartique conservé	Pro	P	Proline
Cys	C	Cystéine	Ser	S	Serine
Gln	Q	Glutamine	Thr	T	Thréonine
Glu	E	Acide Glutamique	Trp	W	Tryptophane
Gly	G	Glycine	Tyr	Y	Tyrosine
His	H	Histidine	Val	V	Valine
Ile	I	Isoleucine			

Tables des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Nombre de publications en fonction de l'année contenant les termes « Mcl-1 » (en jaune) et Bcl-x _L (en bleu) dans le titre, l'abstract ou les mots clés.	20
Figure 2 : Les voies de l'apoptose.	33
Figure 3 : Les membres de la famille Bcl-2 (Figure adaptée de Moldoveanu <i>et al.</i> ¹⁷).	35
Figure 4 : Structure tertiaire de la protéine Bcl-x _L . ¹⁷	36
Figure 5 : Les trois différents modèles de l'activation des protéines Bax et Bak.	38
Figure 6 : Structure cristallisée du complexe formé par la protéine Bax (domaine BH3) et la protéine Bcl-x _L (Code PDB : 2BID). ¹³	39
Figure 7 : Interaction entre le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques et la cavité hydrophobe des membres anti-apoptotiques (Figure adaptée de Luna-Vargas <i>et al.</i>).	40
Figure 8 : Les différentes affinités de liaison entre les membres pro-apoptotiques (en vert) et anti-apoptotiques (en bleu).	41
Figure 9 : Superposition de l'ABT-737 (en jaune) et de Bim (en violet). ³²	46
Figure 10 : Structures tertiaires des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 (à gauche) et Bcl-x _L (à droite).	50
Figure 11 : L'interactome humain établi par Rual <i>et al.</i>	54
Figure 12 : Représentation d'une IPP.	56
Figure 13 : Des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour rétablir l'apoptose (adaptée de Garner <i>et al.</i>).	62
Figure 14 : Les trois grandes étapes de l'approche par fragments.	70
Figure 15 : Structure RMN du <i>lead V</i> dans Bcl-x _L	73
Figure 16 : Complexe de l'ABT-737 et Bcl-x _L ; Structures de l'ABT-737 et de son analogue orobiodisponible, le Navitoclax. ¹³	75
Figure 17 : Structure du Vénétoclax.	76
Figure 18 : Composé XII dans la protéine Mcl-1 (Code PDB : 4WMU).	78
Figure 19 : Exploration des poches P2 et P4 de Mcl-1.	79
Figure 20 : Optimisation des composés en dérivés indoles tricycliques.	80
Figure 21 : Structure du composé VU661013.	81
Figure 22 : Structure du Pyridoclax et sa superposition avec une hélice α de polyalanines.	82
Figure 23 : Les relations structure-activité du Pyridoclax. ⁹⁵	83
Figure 24 : S63845, premier inhibiteur sélectif de Mcl-1 ayant une activité <i>in vivo</i>	84
Figure 25 : La découverte d'inhibiteurs sélectifs de Bcl-x _L par approche SBDD.	86
Figure 26 : Le <i>lead</i> WEHI-539 et la découverte d'inhibiteurs sélectifs de Bcl-x _L actifs <i>in vivo</i>	86
Figure 27 : Une stratégie d'hybridation pour la découverte d'un inhibiteur à dualité d'action Mcl-1/Bcl-x _L	88
Figure 28 : Structures cristallisées de la molécule XXII avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x _L	89
Figure 29 : Plan du projet de recherche.	93
Figure 30 : Analyse par composantes principales sur les structures de Bcl-x _L	100
Figure 31 : Structure de l'ABT-737 et le complexe ABT-737/Bcl-x _L	101
Figure 32 : Structure des molécules XX et WEHI-539 ; Complexes molécule XX /Bcl-x _L et WEHI-539/Bcl-x _L	103
Figure 33 : Analyse par composantes principales de Mcl-1.	104
Figure 34 : Complexe molécule XII /Mcl-1 (Code PDB : 4WMU).	105
Figure 35 : Structures des composés XIII et XIV ; Complexe des composés XIII et XIV /Mcl-1.	106
Figure 36 : Différentes poses de <i>docking</i> du Pyridoclax dans Mcl-1.	108

Figure 37 : Stabilité des complexes Pyridoclax/Mcl-1 au cours de la simulation par DM.	110
Figure 38 : Trois poses du Pyridoclax dans Mcl-1 à envisager.....	110
Figure 39 : Alignement des protéines Mcl-1 (en cyan) et Bcl-x _L (en fuchsia) à partir du BH3- <i>only</i> Bim (en gris).	112
Figure 40 : Alignement des complexes molécule XII /Mcl-1 et ABT-737/Bcl-x _L	113
Figure 41 : Visualisation du Pyridoclax dans la protéine Bcl-x _L	114
Figure 42 : Pyridoclax.....	115
Figure 43 : Fragment issu du Pyridoclax, conservé dans toutes les molécules conçues par la suite.	115
Figure 44 : Structure des cinq composés conçus.	117
Figure 45 : Définition de la pose du Pyridoclax dans Mcl-1 selon l'hypothèse 1.....	127
Figure 46 : Structure du MR34911	128
Figure 47 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34911	129
Figure 48 : Structure du MR34917	131
Figure 49 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34917	132
Figure 50 : Structure du MR34913	134
Figure 51 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34913	135
Figure 52 : Structure du MR34916	137
Figure 53 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34916 , application à la protéine Mcl-1.	139
Figure 54 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34916 , application à la protéine Bcl-x _L	140
Figure 55 : Structure du MR34937	142
Figure 56 : Modélisation moléculaire sur le composé MR34937	143
Figure 57 : Définition de la pose du Pyridoclax dans Mcl-1 selon l'hypothèse 2.....	145
Figure 58 : Structure des composés conçus à partir de l'hypothèse 2.....	145
Figure 59 : Résultats de l'évaluation biologique du Pyridoclax par impédancemétrie.	153
Figure 60 : Résultats de l'activité cellulaire au cours du temps (impédancemétrie) de l'exposition de la lignée cellulaire IGROV1-R10 à l'ABT-737 (5 μM), au S63845 (1 μM) et à la combinaison des deux.	155
Figure 61 : Profils types de courbes obtenues par le test d'impédancemétrie.	156
Figure 62 : Graphique de représentation simplifiée des résultats biologiques.....	157
Figure 63 : Pharmacomodulation des composés MR34911 et MR34917	159
Figure 64 : Voie rétrosynthétique guidée par les travaux antérieurs du laboratoire pour accéder aux molécules à deux unités, R = CN ou CO ₂ H.....	166
Figure 65 : Structure du MR34988	168
Figure 66 : Structures des composés à deux unités.	176
Figure 67 : Résultats de l'évaluation biologique des composés MR34911 , MR34917 et dérivés.	177
Figure 68 : Pharmacomodulations des molécules MR34913 , MR34916 et MR34937	178
Figure 69 : Résultats de l'évaluation biologique des composés MR34916 , MR34913 et dérivés.	181
Figure 70 : Résultats de l'évaluation biologique du MR34937 et dérivés.....	185
Figure 71 : Influence du groupement méthyle sur l'activité.	187
Figure 72 : Influence de l'atome de chlore sur l'activité biologique.	189
Figure 73 : A gauche – Résultats de l'évaluation biologique du composé MR36102 . A droite – Structure des composés MR34937 et MR34938	190
Figure 74 : Influence des pharmacomodulations sur l'activité pro-apoptotique.....	191
Figure 75 : Structures et évaluation biologique des molécules étudiées en modélisation moléculaire et molécules disubstituées.	192
Figure 76 : Structure du MR36102	193
Figure 77 : Evaluation de l'activité de MR36102 sur les cellules IGROV-R10 en association avec un inhibiteur de Bcl-x _L (ABT-737).	193
Figure 78 : Résultats de l'évaluation biologique des molécules MR34912 , MR34930 et MR34933 . .	196
Figure 79 : Structure de WEHI-539 et le complexe WEHI-539/Bcl-x _L	200
Figure 80 : Structure des composés CDSMM025 et CDSMM024	200
Figure 81 : Résultats de modélisation moléculaire du composé CDSMM024	201

Figure 82 : Étude de l'effet de l'ajout d'un "bras" sur les tétrahydroisoquinolines sur l'affinité pour Bcl-x _L . ¹³⁹	203
Figure 83 : Résultats de l'évaluation biologique du composé MR34935	205
Figure 84 : <i>Abstract</i> de la publication intitulée <i>Synthesis of 3,3-Diarylazetidines by Calcium-Catalyzed Friedel-Crafts Reactions of Azetidins with Unexpected Cbz Enhanced Reactivity</i> en cours de soumission dans le journal <i>Organic Letters</i>	208
Figure 85 : Structure générale des dérivés azétidines.....	209
Figure 86 : Représentations 2D et 3D de la structure du composé MR34973	209
Figure 87 : Structure des 3,3-diarylazétidines testées biologiquement.....	210
Figure 88 : Résultats de l'évaluation biologique des dérivés 3,3-diarylazétidines.....	210
Figure 89 : Evaluation de l'activité de MR34944 sur les cellules IGROV-R10 en association avec un inhibiteur de Bcl-x _L (ABT-737) et un inhibiteur de Mcl-1 (S63845).....	211
Figure 90 : Structure générale de 4,4-diarylpipéridines et 3,3-diarylcyclobutanes.....	213
Figure 91 : Hydroarylation catalysée au calcium d'un alcène. ¹⁴⁸	218
Figure 92 : Étude réalisée sur les dérivés diarylés.....	219
Figure 93 : Exemple d'une nouvelle structure de molécule pour la conception d'un inhibiteur des protéines Mcl-1 et Bcl-x _L	225
Figure 94 : Structure des trois composés potentiellement inhibiteurs de la protéine HSP110.....	289
Figure 95 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34923 par impédancemétrie.....	303
Figure 96 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34934 par impédancemétrie.....	304
Figure 97 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34921 par impédancemétrie.....	305
Figure 98 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34963 par impédancemétrie.....	306
Figure 99 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34937 par impédancemétrie.....	307
Figure 100 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR36102 par impédancemétrie.....	308
Figure 101 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du MR34944 par impédancemétrie.....	309
Figure 102 : The structure of fragments.	313
Figure 103: 1D ¹ H spectra of MR34911 , MR34916 , MR34917 in absence and in presence of unlabelled protein Mcl-1. Ratio (1:100) in PBS buffer (pH 7) at 298 K.	316
Figure 104: Off-resonance and STD spectra of MR34911 , MR34916 and MR34917 , respectively, in the presence of unlabelled Mcl-1. NMR spectra were recorded at 298 K, 2.5 s saturation time. ratio protein-to-ligands (1:100) in PBS buffer (pH 7) at 600 MHz.	318
Figure 105: Overlay of ¹ H- ¹⁵ N HSQC spectra of ¹⁵ N Mcl-1 in absence and in presence of MR34911 (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.	319
Figure 106: ¹⁵ N and ¹ H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ¹⁵ N hMcl-1 after addition of MR34911 (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.....	320
Figure 107 : Titration curves of MR34911	321
Figure 108: Overlay of ¹ H- ¹⁵ N HSQC spectra of ¹⁵ N Mcl-1 in absence and in presence of MR34916 (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.	322
Figure 109: ¹⁵ N and ¹ H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ¹⁵ N hMcl-1 after addition of MR34916 (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.....	322
Figure 110: Overlay of ¹ H- ¹⁵ N HSQC spectra of ¹⁵ N Mcl-1 in absence and in presence of MR34917 (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.	323
Figure 111: ¹⁵ N and ¹ H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ¹⁵ N hMcl-1 after addition of MR34917 (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.....	323

Table des schémas

Schéma 1 : L'approche de <i>Structure-Based Drug Design</i> . ⁵⁵	64
Schéma 2 : La stratégie de SBDD pour découvrir un inhibiteur sélectif de Mcl-1 : A-1210477.	66
Schéma 3 : Fragments <i>hits</i> III et IV identifiés par criblage de bibliothèques de fragments et composé <i>lead</i> V.	72

Schéma 4 : Découverte d'un inhibiteur de Mcl-1 par FBDD et SBDD.....	77
Schéma 5 : Découverte du composé XXV , inhibiteur à dualité d'action.....	90
Schéma 6 : Conception de molécules selon l'hypothèse 1.....	116
Schéma 7 : Conception de molécules selon l'hypothèse 2.....	118
Schéma 8 : Synthèse des molécules conçues selon l'hypothèse 1.....	146
Schéma 9 : Synthèse de la molécule MR27830	160
Schéma 10 : Synthèse des molécules à deux unités, R = H.....	161
Schéma 11 : Synthèse de la molécule MR34901	162
Schéma 12 : Voie rétrosynthétique 1.....	162
Schéma 13 : Synthèse de l'intermédiaire clé 2	163
Schéma 14 : Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl, par la voie synthétique 1.....	163
Schéma 15 : Voie rétrosynthétique 2.....	164
Schéma 16 : Synthèse de la molécule MR36101	165
Schéma 17 : Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl.....	166
Schéma 18 : Essai d'iodation de la 5-bromopicolinonitrile.....	167
Schéma 19 : Voie rétrosynthétique pour accéder aux molécules à deux unités, R = CN ou CO ₂ H...	167
Schéma 20 : Réaction de cyanation du <i>N</i> -oxyde 3-bromopyridine selon Sakamoto. ¹³³	168
Schéma 21 : Mécanisme proposé pour la réaction de cyanation. ¹³³	168
Schéma 22 : Réaction d'oxydation du MR27830	169
Schéma 23 : Réaction d'oxydation de la 3,5-dibromopyridine.....	169
Schéma 24 : Synthèse du MR34988 – essai 1.....	170
Schéma 25 : Transhalogénéation par échange halogène–métal sur la 3,5-dibromopyridine.....	171
Schéma 26 : Réaction d'oxydation de la 3-bromo-5-iodopyridine.....	171
Schéma 27 : Synthèse du MR34988 – essai 2.....	171
Schéma 28 : Réaction de cyanation de la molécule 7	172
Schéma 29 : Essai de transhalogénéation par échange halogène–métal du composé MR36100	172
Schéma 30 : Synthèse de la molécule MR34988	172
Schéma 31 : Synthèse de l'intermédiaire clé MR34988	173
Schéma 32 : Synthèse des molécules à deux unités où R = CN.....	174
Schéma 33 : Synthèse des molécules à deux unités où R = CO ₂ H.....	175
Schéma 34 : Rétrosynthèse envisagée pour les molécules à trois unités.....	178
Schéma 35 : Voie de synthèse générale et pharmacomodulation des MR34916 et MR34913 (encadré en pointillé).....	179
Schéma 36 : Hydrolyse basique des dérivés cyanés.....	180
Schéma 37 : Voie de synthèse générale.....	183
Schéma 38 : Hydrolyse basique des composés cyanés.....	184
Schéma 39 : Synthèse des composés MR34918 et MR34928	186
Schéma 40 : Synthèse de molécules disubstituées.....	188
Schéma 41 : Hydrolyse basique du composé MR34922	188
Schéma 42 : Synthèse du composé MR36102	190
Schéma 43 : Synthèse du composé MR34912	195
Schéma 44 : Synthèse du composé MR34930	195
Schéma 45 : Synthèse du composé MR34933	196
Schéma 46 : Voie de synthèse envisagée pour accéder au composé CDSMM024	202
Schéma 47 : Synthèse du composé MR34935	204
Schéma 48 : Réaction générale de Friedel–Crafts pour la préparation de 3,3-diarylazétidines.....	208
Schéma 49 : Synthèse des 4-pipéridinols.....	213
Schéma 50 : Synthèse des composés 13 et 15	217
Schéma 51 : Etude de la synthèse de la pipéridine 16	218
Schéma 52 : Synthèses des 3,3-diarylcyclobutanes.....	218
Schéma 53 : Perspective de la combinaison des molécules issues de la structure du Pyridoclox et des 3,3-diarylazétidines.....	225

Schéma 54 : Perspective de conception de <i>dual</i> Mcl-1/Bcl-2 inhibiteurs.....	226
Schéma 55 : Synthèse du composé MR31378	290
Schéma 56 : Rétrosynthèse pour accéder aux composés MR30847 et MR30850	290
Schéma 57 : Synthèse du composé MR29061	291
Schéma 58 : Synthèse du composé MR30847	291
Schéma 59 : Synthèse de l'intermédiaire 20	292
Schéma 60 : Synthèse du composé MR30850	292
Schéma 61 : Cycle catalytique général de la réaction de couplage de Suzuki–Miyaura.....	324

Table des tableaux

Tableau 1 : Nombre de structures 3D des protéines Bcl-x _L et Mcl-1 dans la PDB.....	44
Tableau 2 : Acides aminés principaux des poches hydrophobes et arginines conservées de Mcl-1 et Bcl-x _L	51
Tableau 3 : Les principales techniques biophysiques de caractérisation des interactions protéine-protéine.....	60
Tableau 4 : Définition d'un fragment selon la règle de 3 et comparaison avec la règle de 5.....	69
Tableau 5 : Scores de <i>docking</i> des ligands d'origine.....	122
Tableau 6 : Energies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues pour les ligands d'origine.....	126
Tableau 7 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.....	130
Tableau 8 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.....	133
Tableau 9 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.....	136
Tableau 10 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.....	140
Tableau 11 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.....	144
Tableau 12 : Optimisation de la synthèse du MR34948	214
Tableau 13 : Optimisation de la synthèse de MR34964	215
Tableau 14 : Nucléophiles testés dans la réaction de Friedel–Crafts pour la synthèse de 4,4-diarylpipéridines.....	216
Tableau 15 : Structures tridimensionnelles de la protéine Bcl-x _L en forme apo ou compléxées déterminées par RMN ou diffraction RX.....	297
Tableau 16 : Structures tridimensionnelles de la protéine Mcl-1 en forme apo ou compléxées déterminées par RMN ou diffraction RX.....	301
Tableau 17 : Acides aminés définissant les poches hydrophobes de la protéine Bcl-x _L (P1 en saumon, P2 en cyan, P3 en orange, P4 en vert) à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Bcl-x _L et les acides aminés dans l'environnement de la molécule (en blanc).....	302
Tableau 18 : Acides aminés définissant les poches hydrophobes de la protéine Mcl-1 (P1 en saumon, P2 en cyan, P3 en orange, P4 en vert) à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Mcl-1 et les acides aminés dans l'environnement de la molécule (en blanc).....	302
Tableau 19 : Résultats du criblage des composés par FPA.....	310

Introduction

Introduction

Mes travaux de thèse ont été réalisés au Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), sous la direction du Professeur Anne Sophie Voisin-Chiret et du Professeur Ronan Bureau. Ils ont été financés par la région Normandie.

Ingénieure chimiste de formation, j'ai réalisé mes études à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand (ENSCCF). En parallèle, j'ai également suivi le Master 2 Recherche Sciences de la Matière spécialité Synthèse Organique et Biocatalyse à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. Mon stage de deuxième année (équivalent au Master 1) s'est déroulé dans l'équipe de Chimie Médicinale de l'*Institute of Cancer Therapeutics* de Bradford (UK). Encadrée par le Docteur Helen Sheldrake, j'ai travaillé sur la synthèse totale d'un produit naturel, la Nigramide Q, issu d'espèces de poivre noir. Mon stage de fin d'études (équivalent au Master 2) s'est déroulé au sein des laboratoires Servier à Croissy-sur-Seine. Dans l'équipe de recherche de Chimie Médicinale dirigée par le Docteur Anne-Marie Chollet, j'ai participé à la synthèse de dérivés hétérocycliques d'intérêt potentiel dans le traitement du diabète de type II.

J'ai ensuite poursuivi mes études par une thèse réalisée au CERMN. Ce laboratoire, dirigé par le Professeur Patrick Dallemagne, est une unité de recherche orientée vers le *drug design*. Elle est constituée de quatre plateformes : Chimie Organique et Médicinale, Chémoinformatique, Chimiothèque et Screening et Druggabilité. Les axes de recherche actuellement développés dans l'unité sont la cancérologie et les neurosciences avec, comme adressages scientifiques prioritaires, la polypharmacologie, les interactions protéine-protéine (IPPs) et les outils chimiques pour le diagnostic et l'imagerie.

Mon projet de recherche s'intéresse plus particulièrement aux IPPs dans le domaine de la cancérologie. L'approche utilisée dans ce projet, combinant les méthodes de *Fragment-Based Drug Design* et de *Structure-Based Drug Design*, est pionnière dans ce laboratoire. Ancrée dans une démarche de *Drug Design*, ma thèse s'articule autour de plusieurs disciplines. Ainsi, une partie de mes travaux a été réalisée en Chémoinformatique et l'autre en Chimie Organique et Médicinale.

Mes travaux de thèse ont consisté à concevoir et synthétiser des molécules inhibitrices des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L. En effet, ces protéines, surexprimées dans les cancers de l'ovaire chimiorésistants, séquestrent les protéines pro-apoptotiques et empêchent ainsi la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses. Inhiber simultanément Mcl-1 et Bcl-x_L permet de restaurer l'apoptose. Mon objectif est de concevoir des molécules à dualité d'action visant les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Introduction

Ces protéines sont d'un intérêt majeur et sont définies comme cibles thérapeutiques prioritaires par de nombreux groupes de recherche. Le nombre de publications croissant concernant les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L reflète un fort développement des travaux de recherche (Figure 1).

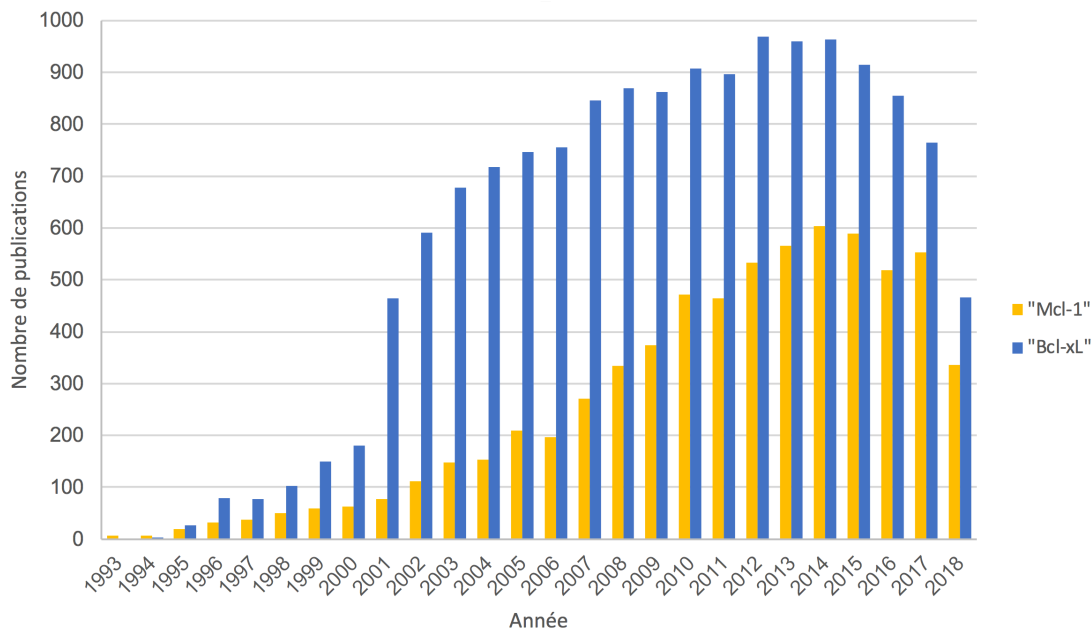


Figure 1 : Nombre de publications en fonction de l'année contenant les termes « Mcl-1 » (en jaune) et Bcl-x_L (en bleu) dans le titre, l'abstract ou les mots clés.
Données obtenues avec le moteur de recherche Reaxys en août 2018.

Le nombre de publications concernant la protéine Bcl-x_L a explosé depuis les années 2000 et concernant la protéine Mcl-1, cible thérapeutique plus récente, le nombre de publications est croissant depuis les années 2010.

Ces cibles étant très étudiées, la bibliographie évolue rapidement. L'état de l'art de ce manuscrit a été réalisé avec les publications les plus récentes parues ces dernières années et jusqu'en 2018.

Dans la première partie de ce manuscrit, les travaux réalisés à partir du *lead* issu des travaux du CERMN, le Pyridoclax, un inhibiteur sélectif de Mcl-1 seront présentés. Par une approche qui combine le *Fragment-Based Drug Design* et le *Structure-Based Drug Design*, nous avons conçu et synthétisé de nouvelles molécules, en se basant sur la structure du Pyridoclax, dans le but de conserver une inhibition initiale de la protéine Mcl-1 et obtenir une inhibition supplémentaire de la protéine Bcl-x_L.

Introduction

Mes travaux menés au CERMN ont permis la préparation d'une librairie de fragments centrés sur l'utilisation de composés aromatiques bidimensionnels. Compte tenu de la structure tridimensionnelle des protéines, l'ajout du paramètre 3D apporterait une diversité dans la forme et dans la connectivité des fragments, permettant ainsi de promouvoir l'accès à un espace chimique plus large. Lors de ma thèse, j'ai répondu à un appel d'offre « Programme de Soutien à la Mobilité » auprès du Cancérôpole Nord-Ouest et mon projet a été sélectionné. La synthèse d'une librairie de fragments tridimensionnels était l'objectif de mon projet de mobilité. Pour une période de trois mois (mai-juillet 2017), le groupe du Docteur James A. Bull, à l'*Imperial College London* (Londres, UK), m'a chaleureusement accueillie. Les recherches du Docteur Bull et de son équipe portent sur le développement de nouvelles méthodes synthétiques dans le but de concevoir de nouveaux fragments diversifiés et d'intérêt pour la chimie médicinale. En collaboration avec l'industrie pharmaceutique Pfizer, nous avons travaillé sur une méthodologie de synthèse pour obtenir des 3,3-diarylazétidines et 4,4-diarylpipéridines, nouveaux motifs tridimensionnels. Ces dérivés, également intéressants pour nos cibles thérapeutiques, ont fait l'objet d'une évaluation biologique. Ces travaux seront présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Pendant mon doctorat, des composés de notre chimiothèque ont été testés par l'équipe du Docteur Carmen Garrido de l'unité Inserm UMR866 avec laquelle nous avons tissé une collaboration. Cette équipe étudie les protéines HSP comme cibles thérapeutiques, et notamment la protéine HSP110 qui est surexprimée dans le cancer colorectal et associée à un mauvais pronostic. Un criblage *in vitro* réalisé avec les molécules du CERMN a permis de mettre en évidence trois composés qui auraient un effet sur l'activité antiagrégante de la protéine HSP110. Dans la perspective de réaliser des tests *in vivo*, la synthèse à l'échelle du gramme de ces trois composés m'a été confiée et sera présentée en annexe 1. Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise et fait l'objet actuellement d'un brevet européen déposé le 6 août 2018.

Pendant ces trois années, j'ai eu la possibilité d'effectuer 128 heures d'enseignement au sein de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen Normandie dans le cadre d'un avenant au contrat doctoral. J'ai encadré les travaux pratiques de chimie médicinale de 3^{ème} et 4^{ème} années des études pharmaceutiques (64 h), les travaux pratiques de fonction physiologique - biophysique de 2^{ème} année (24 h), les travaux pratiques de modélisation moléculaire de 2^{ème} année (27 h), les travaux pratiques d'informatique de 2^{ème} année (9 h) et les travaux pratiques de sciences analytiques de 2^{ème} année (3 h).

Introduction

J'ai encadré une étudiante en stage d'initiation professionnelle de fin de seconde (Alexandra Caignard) et une étudiante en stage de Master 1 (Laurianne Hardy, étudiante en M1 *Drug Design* à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen Normandie).

J'ai également suivi deux formations : la formation hygiène et sécurité en laboratoire de recherche (20 h) et la formation pour l'utilisation du logiciel GIMP (12 h).

J'ai participé à des séminaires mensuels, à des réunions scientifiques avec nos partenaires biologistes (Laurent Poulain, Christophe Denoyelle, Emilie Brotin, Siham Hedir, Louis-Bastien Weiswald de l'unité Inserm U1086 ANTICIPE, Caen) et biophysiciens (Hassan Oulyadi, Muriel Sebban, Asma Bourafai-Amez du laboratoire Cobra, Rouen et Ludovic Carlier de l'UPMC, Paris).

Ce travail de thèse a été valorisé par la rédaction de trois publications.

Publications :

Hedir, S.; De Giorgi, M.; Fogha, J.; De Pascale, M.; Weiswald, L.-B.; Brotin, E.; Marekha, B.; Denoyelle, C.; **Denis, C.**; Suzanne, P.; Gautier, F.; Juin, P.; Ligat, L.; Lopez, F.; Carlier, L.; Legay, R.; Bureau, R.; Rault, S.; Poulain, P.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Voisin-Chiret, A.S. Structure-guided design of Pyridoclox derivatives based on Noxa/Mcl-1 interaction mode. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**. *Acceptée*.

Gozzi, G.J.; Gonzalez, D.; Boudesco, C.; Dias, A.; Uyanik, B.; Gotthard, G.; Marcion, G.; **Denis, C.**; Hardy, L.; Suzanne, P.; Douhard, R.; Demidov, O.; Neiers, F.; Seigneuric, R.; Briand, L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Voisin-Chiret, A.S.; Garrido, C.; Abiotic foldamer targeting HSP110: a lead compound for colorectal cancer therapy. *Cancer Research*. *Soumise le 04/07/2018*.

Denis, C.; Dubois, M. A. J.; Voisin-Chiret, A.S.; Bureau, R.; Choi, C.; Mousseau, J. J.; Bull, J. A. Synthesis of 3,3-Diarylazetidines by Calcium-Catalyzed Friedel–Crafts Reaction of Azetidins with Unexpected Cbz Enhanced Reactivity. *Org. Lett.* *En cours de soumission*.

Ces travaux ont été présentés dans cinq communications orales dont l'une m'a valu le prix de la meilleure communication orale en septembre 2017 lors des Journées Franco-Belges de Pharmacochimie à Spa (Belgique) et dans seize communications par affiche lors de congrès nationaux et internationaux de chimie organique, chimie médicinale, chémoinformatique et oncologie.

Communications orales :

1. **Denis, C.**; Dubois, M.; Voisin-Chiret, A.S.; Bureau, R.; Choi, C.; Mousseau, J.J.; Bull, J.A. *Exploring Chemical Space with 3,3-Diarylazetidone Derivatives Towards the Discovery of Anti-apoptotic Protein Inhibitors*. 25th Young Research Fellow Meeting, 5-7 mars **2018**, Orléans (France).

2. **Denis, C.**; Marekha, B.; Hedir, S.; Legay, R.; Abeilard, E.; Brotin, E.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins*. 31st meeting des Journées Franco-Belges de Pharmacochimie (JFB), 14-15 septembre **2017**, Spa (Belgique).

Prix de la meilleure communication orale. doi: 10.3390/ph10040094

3. **Denis, C.**; Marekha, B.; Hedir, S.; Legay, R.; Abeilard, E.; Brotin, E.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Fragment-Based Library Generation for the Discovery of Dual Mcl-1/Bcl-x_L Inhibitors*. 24th Young Research Fellow Meeting (YRFM), 8-10 février **2017**, Châtenay-Malabry (France).

4. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *New Series of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors for the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 24^{ème} conférence du Groupement des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique (GP2A), 25-26 août **2016**, Angers (France).

5. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret A.S. *Fragment-Based Drug Design of a Series of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors used in the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 13rd Anglo-Norman colloquium on organic chemistry (ANORCQ), 24-27 avril **2016**, Rouen (France).

Communications par affiche :

1. **Denis, C.**; De Pascale, M.; Marekha, B.; Jouanne, M.; Kieffer, C.; Brotin, E.; Weiswald, L.B.; Denoyelle, C.; Poulain, L.; Bourafai Aziez, A.; Sebban, M.; Oulyadi, H.; Sopkova De Oliveira Santos, J.; Voisin-Chiret A.S.; Bureau, R. *Structure-Based Drug Design from a Selective Inhibitor of Anti-Apoptotic Proteins*. 22nd European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships (EuroQSAR), 16-20 septembre **2018**, Thessalonique (Grèce).
2. **Denis, C.**; De Pascale, M.; Kieffer, C.; Jouanne, M.; Hedir, S.; Brotin, E.; Weiswald, L.B.; Denoyelle, C.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret A.S. *Design, Synthesis and Biological Evaluation of Inhibitors of Anti-apoptotic Proteins*. Normandy Doctoral School of Chemistry Day, 21 juin **2018**, Le Havre (France).
3. **Denis, C.**; De Pascale, M.; Marekha, B.; Jouanne, M.; Kieffer, C.; Brotin, E.; Weiswald, L.B.; Denoyelle, C.; Poulain, L.; Bourafai Aziez, A.; Sebban, M.; Oulyadi, H.; Bureau, R.; Voisin-Chiret A.S. *Discovery of a Novel Series of Inhibitors of Anti-Apoptotic Proteins for Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. Joint 26th Groupement des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique (GP2A) / 32nd Journées Franco-Belges de Pharmacochimie (JFB) Conferences, 13-15 juin **2018**, Asnelles sur Mer (France).
4. **Denis, C.**; Dubois, M.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S.; Bureau, R.; Bull, J.A. *Synthèse et Évaluation Biologique de Nouveaux Fragments Tridimensionnels vers la Découverte d'Inhibiteurs des Protéines Anti-apoptotiques*. 11^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 23-25 mai **2018**, Deauville (France).
5. **Denis, C.**; De Pascale, M.; Marekha, B.; Kieffer, C.; Jouanne, M.; Hedir, S.; Brotin, E.; Weiswald, L.B.; Denoyelle, C.; Poulain, L.; Bourafai Aziez, A.; Sebban, M.; Oulyadi, H.; Bureau, R.; Voisin-Chiret A.S. *Design, Synthesis and Biological Results of Mcl-1/Bcl-x_L Inhibitors for the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 17^{èmes} Rencontres de Chimie Organique Biologique (RECOB), 18-22 mars **2018**, Aussois (France).
6. **Denis, C.**; Dubois, M.; Voisin-Chiret, A.S.; Bureau, R.; Choi, C.; Mousseau, J.J.; Bull, J.A. *Exploring Chemical Space with 3,3-Diarylazetidine Derivatives Towards the Discovery of Anti-apoptotic Protein Inhibitors*. 25th Young Research Fellow Meeting (YRFM), 5-7 mars **2018**, Orléans (France).
7. **Denis, C.**; Marekha, B.; Hedir, S.; Legay, R.; Abeilard, E.; Brotin, E.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Fragment-Based Library Generation for the Development of Dual Mcl-1/Bcl-x_L Inhibitors*. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), 14 novembre **2017**, Caen (France).

8. **Denis, C.**; Marekha, B.; Hedir, S.; Legay, R.; Abeillard, E.; Brotin, E.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Génération d'une librairie de fragments pour la découverte d'inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L vers un traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants*. 10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 10-12 mai **2017**, Deauville (France).
9. **Denis, C.**; Marekha, B.; Hedir, S.; Legay, R.; Abeillard, E.; Brotin, E.; Poulain, L.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Fragment-Based Library Generation for the Discovery of Dual Mcl-1/Bcl-x_L Inhibitors*. 24th Young Research Fellow Meeting (YRFM), 8-10 février **2017**, Châtenay-Malabry (France).
10. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *New Series of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors for the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 24^{ème} conférence of the Groupement des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique (GP2A), 25-26 août **2016**, Angers (France).
11. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Design of a Series of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors using Fragment-Based Drug Design*. 52^{ème} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT), 6-8 juillet **2016**, Caen (France).
12. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Conception Rationnelle d'Inhibiteurs à Dualité d'Action visant les Protéines Mcl-1 & Bcl-x_L*. 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 18-20 mai **2016**, Deauville (France).
13. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Fragment-Based Drug Design of a Series of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors used in the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 13rd Anglo-Norman colloquium on organic chemistry (ANORCQ), 24-27 avril **2016**, Rouen (France).
14. **Denis, C.**; De Pascale, M.; Ronan, B.; Voisin-Chiret, A.S. *Design and synthesis of Mcl-1/Bcl-x_L dual inhibitors for treatment of chemoresistant ovarian cancer*. 16^{èmes} Rencontres de Chimie Organique Biologique (RECOB), 13-17 mars **2016**, Aussois (France).
15. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Development of Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors for the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 19^{èmes} journées de l'école doctorale EdNBISE, 10-11 mars **2016**, Caen (France).
16. **Denis, C.**; Legay, R.; Bureau, R.; Voisin-Chiret, A.S. *Design of Innovative Mcl-1 & Bcl-x_L Dual Inhibitors using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design. Foldamers as Potential Protein-Protein Interactions Disruptors for the Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancers*. 23rd Young Research Fellow Meeting (YRFM), 15-17 février **2016**, Lille (France).

Ma participation aux projets de l'équipe de l'axe Intéraction Protéine-Protéine m'a permis d'être citée lors de trois communications orales et huit communications par affiche réalisées par des membres de l'équipe.

Communications orales :

1. De Pascale, M.; **Denis, C.**; Marekha, B.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Design of dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancers*. Joint 26th Groupement des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique (GP2A) / 32nd Journées Franco-Belges de Pharmacochimie (JFB) Conferences, 13-15 juin **2018**, Asnelles sur Mer (France).

2. De Pascale, M.; **Denis, C.**; Marekha, B.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Conception de perturbateurs d'interactions protéine-protéine agissant sur l'apoptose cellulaire pour le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants*. 17^{èmes} Rencontres de Chimie Organique Biologique (RECOB), 18-22 mars **2018**, Aussois (France).

3. De Pascale, M.; **Denis, C.**; Marekha, B.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Discovery of dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancers*. 25th Young Research Fellows meeting (YRFM), 5-7 Mars **2018**, Orléans (France).

Communications par affiche :

1. De Pascale, M.; **Denis, C.**; Marekha, B.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Discovery of dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancers*. Normandy Doctoral School of Chemistry Day, 21 juin **2018**, Le Havre (France).

2. De Pascale, M.; **Denis, C.**; Marekha, B.; Brotin, E.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Discovery of Mcl-1/Bcl-x_L dual inhibitors for treatment of chemoresistant ovarian cancers*. 11^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 23-25 mai **2018**, Deauville (France).

3. Bourafai, A.; Sebban, M.; **Denis, C.**; Coadou, G.; Voisin-Chiret, A.S.; Ravault, D.; Carlier, L.; Oulyadi, H. *NMR characterization of the interaction between Mcl-1 and MR34911*. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), 14 novembre **2017**, Caen (France).

4. Benabderrahmane, M.; Marekha, B.; **Denis, C.**; Voisin-Chiret, A.S.; Bureau, R.; Sopková-de Oliveira Santos, J. *Etude de relation structure-activité des ligands de Mcl-1 : application au traitement des cancers de l'ovaire*. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), 14 novembre **2017**, Caen (France).

5. Kieffer, C.; Siebert, F.; **Denis, C.**; De Pascale, M.; Hedir, S.; Jouanne, M.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Searching for new antiproliferative agents: From the rational drug design to the synthesis of Smac-mimetics*. 31st meeting des Journées Franco-Belges de Pharmacochimie (JFB), 14-15 septembre **2017**, Spa (Belgique).
6. Kieffer, C.; Siebert, F.; **Denis, C.**; De Pascale, M.; Hedir, S.; Jouanne, M.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Smac-mimétiques : à la recherche de nouveaux agents à visée anticancéreuse. De la conception rationnelle à la synthèse de foldamères abiotiques*. 10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 10-12 mai **2017**, Deauville (France).
7. Jouanne, M.; **Denis, C.**; De Pascale, M.; Corvaisier, S.; Marekha, B.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Hedir, S.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Mesure de l'affinité de liaison par polarisation de fluorescence entre les protéines de la famille Bcl-2 et des petites molécules synthétiques appelés foldamères*. 10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 10-12 mai **2017**, Deauville (France).
8. Jouanne, M.; **Denis, C.**; De Pascale, M.; Corvaisier, S.; Marekha, B.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Hedir, S.; Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S. *Screening binding affinities between Bcl-2 family proteins and foldamers by fluorescence polarization*. 24th Young Research Fellow Meeting (YRFM), 8-10 février **2017**, Châtenay-Malabry (France).

Etat de l'art : Du cancer de l'ovaire aux stratégies thérapeutiques

Le cancer de l'ovaire est le septième cancer le plus commun et la huitième cause de décès par cancer chez la femme.¹ Chaque année, le cancer de l'ovaire compte 239 000 nouveaux cas et 152 000 décès dans le monde. En France, selon le rapport de l'Institut National du Cancer (INCa), 4 600 femmes sont diagnostiquées par an et le cancer de l'ovaire tue plus de 3 200 femmes annuellement. Il représente le taux de survie le plus faible de tous les cancers gynécologiques, et chaque femme peut déclarer un cancer de l'ovaire, quel que soit son âge. Le traitement de référence est la chirurgie suivie d'une chimiothérapie à base d'un dérivé de platine (carboplatine) et d'un taxane (paclitaxel). Malheureusement, une récurrence à court terme est très souvent observée due à la résistance aux traitements. La survie globale à cinq ans est inférieure à 30 %. L'identification des patientes chimiorésistantes et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles de surmonter la chimiorésistance constituent des enjeux majeurs, reconnus par les instances sanitaires.

Parmi de nombreuses causes, cette chimiorésistance peut être due à un défaut d'apoptose, processus physiologique de mort cellulaire essentiel pour maintenir l'équilibre d'un tissu sain en éliminant les cellules endommagées ou en excès. Ainsi, ce type de mort cellulaire est impliqué dans le développement embryonnaire et dans le développement du système nerveux central et immunitaire.² Une dérégulation de l'apoptose conduit à différentes pathologies. Un excès de mort cellulaire programmée est impliqué dans les maladies neurodégénératives³ et auto-immunes alors que son absence peut contribuer au développement de cancers.⁴

¹Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136* (5), 359–386.

²Czabotar, P. E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J. M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 49–63.

³Shafi, O. Inverse Relationship between Alzheimer's Disease and Cancer, and Other Factors Contributing to Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *BMC Neurol.* **2016**, *16*, 236.

⁴Thompson, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* **1995**, *267* (5203), 1456–1462.

I. Apoptose

1. Définition

La mort de la cellule peut être induite par différentes voies : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Nous nous intéresserons uniquement à la voie de l'apoptose dans cette thèse.

Le terme apoptose a été introduit pour la première fois en 1972, par Kerr, Wyllie et Currie.⁵ L'apoptose,⁶ également appelée mort cellulaire programmée, est un processus physiologique qui joue un rôle primordial dans le développement et l'homéostasie des organismes pluricellulaires. Contrairement aux autres formes de mort cellulaire telle que la nécrose, divers mécanismes sont mis en place et conduisent à une mort cellulaire ordonnée. En effet, la condensation de la cellule, le bourgeonnement de sa membrane plasmique qui ne se rompt pas et la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques caractérisent la mort d'une cellule par apoptose. L'intégrité de la membrane plasmique est toujours maintenue ce qui conduit à un impact minimal sur les cellules environnantes.

2. Voies de signalisation

Il existe plusieurs voies d'activation de l'apoptose dont trois ont été décrites : la voie extrinsèque d'une part, qui fait intervenir un signal extérieur perçu par des récepteurs de mort et les voies intrinsèques d'autre part, qui comprennent notamment la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique.⁷ Ces différentes voies convergent toutes vers l'activation d'une cascade de caspases, qui conduit à la mort de la cellule. Nous développerons ici uniquement la voie mitochondriale.

La voie mitochondriale⁸ est déclenchée de manière directe *via* des signaux de stress internes (dégradation de l'ADN, UV, activation d'oncogènes, etc.) ou de manière indirecte à la suite de l'activation de la voie des récepteurs de mort (Figure 2).

⁵Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257.

⁶Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516.

⁷Kim, I.; Xu, W.; Reed, J. C. Cell Death and Endoplasmic Reticulum Stress: Disease Relevance and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (12), 1013–1030.

⁸Czabotar, P. E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J. M. Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (1), 49–63.

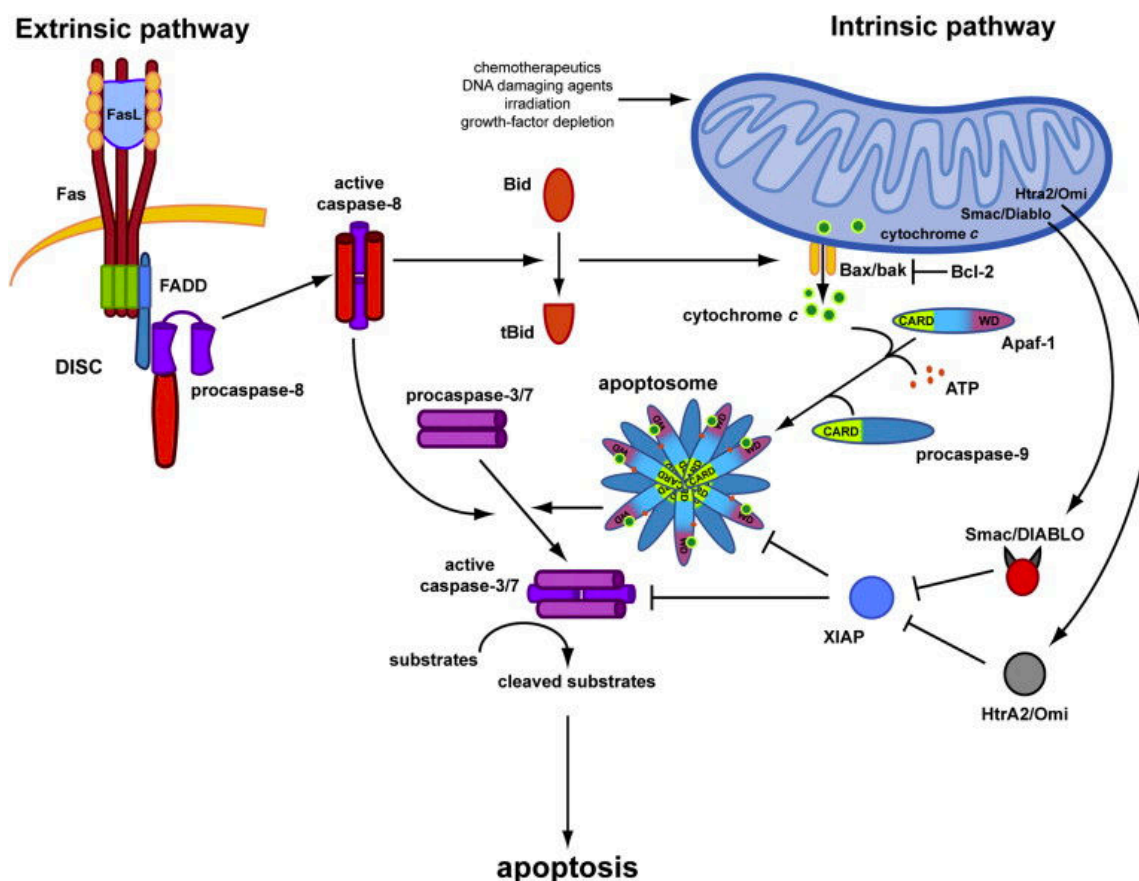


Figure 2 : Les voies de l'apoptose.⁹

L'activation de cette voie conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale appelée MOM (*Mitochondrial Outer Membrane*) et au relargage des facteurs apoptogènes, tel que le cytochrome *c*, de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol. Dans le cytosol, le cytochrome *c* se lie aux protéines adaptatrices Apaf-1, formant ainsi un hexamère qui se lie à la procaspase-9 conduisant à son activation. La caspase-9 activée clive et active à son tour les caspases effectrices (-3 et -7), induisant ainsi la mort par apoptose.¹⁰

En plus du cytochrome *c*, il existe d'autres activateurs de caspases tel que par exemple la protéine Smac/DIABLO.¹¹ Smac/DIABLO a pour fonction d'inhiber les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs), dont X-linked IAP (XIAP), qui est la protéine la plus étudiée dans cette famille. Les IAPs se lient à différentes caspases et les empêchent ainsi de déclencher la mort par apoptose. Smac/DIABLO, en inhibant XIAP, rétablit l'activation de la cascade de caspases conduisant ainsi à la mort de la cellule par apoptose. Il en est de même pour les protéines HtrA2/Omi.

⁹Lamkanfi, M.; Dixit, V. M. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host Microbe* **2010**, 8 (1), 44–54.

¹⁰Shi, Y. Review Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell* **2002**, 9, 459–470.

¹¹Martinez-Ruiz, G.; Maldonado, V.; Ceballos-Cancino, G.; Grajeda, J.; Melendez-Zajgla, J. Role of Smac/DIABLO in Cancer Progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2008**, 27 (1), 48.

Le relargage des facteurs apoptogènes dépend de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, principalement contrôlée par une famille de protéines : la famille Bcl-2.^{12,13,14}

3. Protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent et régulent la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose. On distingue deux principales classes dans cette famille de protéines : les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques sont respectivement responsables de la survie cellulaire ou de la mort cellulaire. Un déséquilibre de la concentration des membres de cette famille est souvent relié à l'apparition de pathologies cancéreuses et à des résistances aux traitements chimiothérapeutiques.¹⁵ Dans cette partie, la composition des membres de la famille de protéines Bcl-2, ainsi que leurs structures et leurs mécanismes d'action vont être décrits.

Le premier membre de la famille Bcl-2, Bcl-2 lui-même, a été décrit pour la première fois en 1986. Le gène Bcl-2 a d'abord été identifié dans les cellules de patients atteints de lymphome folliculaire avec une translocation des chromosomes 14 et 18 (t14; 18), ce qui a entraîné une augmentation du niveau d'expression de la protéine.¹⁶ La découverte de la séquence de la protéine Bcl-2 a permis une identification rapide d'une trentaine de protéines apparentées par homologie de séquence, en particulier celles des domaines d'homologie Bcl-2 conservés (BH). Il y a au total quatre domaines BH (BH1 à BH4), numérotés selon leur date de découverte. En dehors des domaines BH, la famille montre une divergence dans l'identité de la séquence, souvent inférieure à 30 %, impliquant des rôles fonctionnels clés pour les domaines BH. Les membres de la famille Bcl-2 sont donc divisés en fonction de leur activité en deux grandes classes (Figure 3).¹⁷

¹²Brunelle, J. K.; Letai, A. Control of Mitochondrial Apoptosis by the Bcl-2 Family. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 437–441.

¹³Birkinshaw, R. W.; Czabotar, P. E. The BCL-2 Family of Proteins and Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 152–162.

¹⁴Roy, M. J.; Vom, A.; Czabotar, P. E.; Lessene, G. Cell Death and the Mitochondria: Therapeutic Targeting of the BCL-2 Family-Driven Pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (8), 1973–1987.

¹⁵Reed, J. C. Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins and Its Role in Cancer and Chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.* **1995**, *7* (6), 541–546.

¹⁶Bakhshi, A.; Jensen, J. P.; Goldman, P.; Wright, J. J.; McBride, O. W.; Epstein, A. L.; Korsmeyer, S. J. Cloning the Chromosomal Breakpoint of t(14;18) Human Lymphomas: Clustering around J_H on Chromosome 14 and near a Transcriptional Unit on 18. *Cell* **1985**, *41* (3), 899–906.

¹⁷Moldoveanu, T.; Follis, A. V.; Kriwacki, R. W.; Green, D. R. Many Players in BCL-2 Family Affairs. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39* (3), 101–111.

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les protéines anti-apoptotiques comprennent les protéines Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1 (connue sous le nom A1 chez la souris) et Bcl-B. Ces protéines anti-apoptotiques contiennent les quatre domaines BH (BH1 à BH4) et le domaine transmembranaire (TM) nécessaire à leur localisation au niveau de la membrane mitochondriale.

Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

Parmi les protéines pro-apoptotiques, on distingue les protéines à multi-domaines et les protéines à domaine unique appelées BH3-only. Les BH3-only contiennent le domaine BH3 et le domaine TM. Les protéines multi-domaines, Bak, Bax et Bok sont les protéines effectrices de l'apoptose, nommées *les effecteurs*. Elles possèdent les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 ainsi que le domaine TM.

Les protéines BH3-only sont subdivisées en deux catégories : les protéines activatrices Bid, Bim et Puma et les protéines sensibilisatrices Bad, Bik, Bmf, Hrk et Noxa, respectivement appelées *les activateurs* et *les sensibilisateurs*.¹⁸

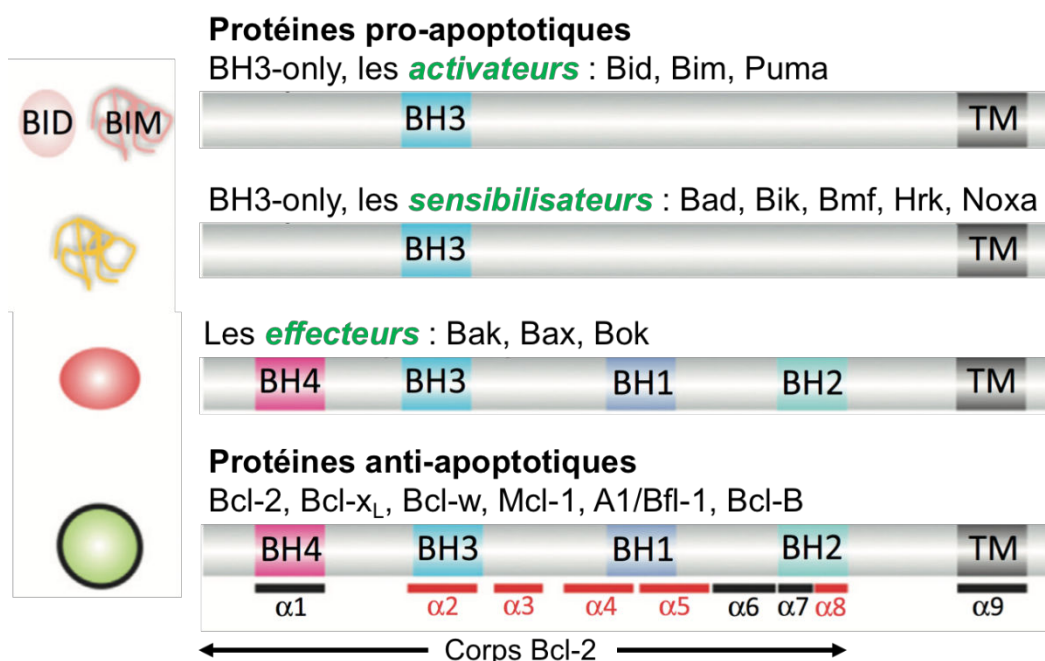


Figure 3 : Les membres de la famille Bcl-2 (Figure adaptée de Moldoveanu *et al.*¹⁷).

¹⁸Hockings, C.; Anwari, K.; Ninnis, R.; Brouwer, J.; O'hely, M.; Evangelista, M.; Hinds, M.; Czabotar, P.; Lee, E.; Fairlie, W.; Dewson, G.; Kluck, R. Bid Chimeras Indicate That Most BH3-Only Proteins Can Directly Activate Bak and Bax, and Show No Preference for Bak versus Bax. *Cell Death and Disease*, **2015**, 6, e1735.

3.1. Structure des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines multi-domaines de la famille Bcl-2 sont typiquement des protéines globulaires hélicoïdales composées de neuf hélices α reliées par des boucles de longueurs variables (Figure 4).⁸

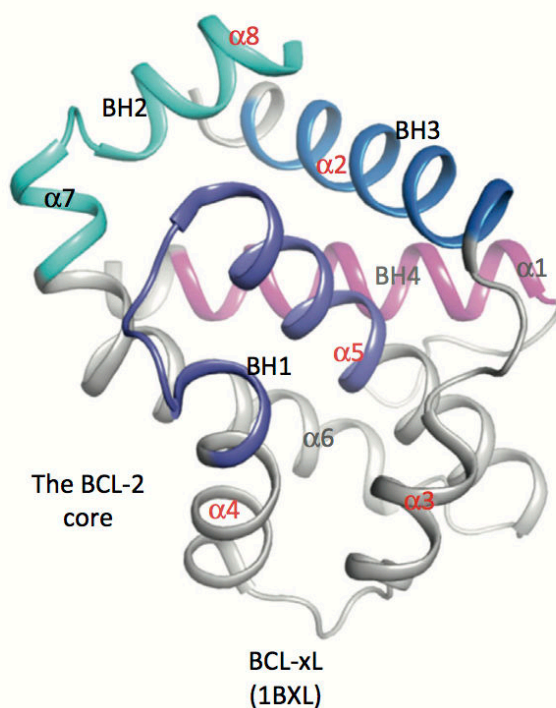


Figure 4 : Structure tertiaire de la protéine Bcl-xL.¹⁷

Les neuf hélices sont majoritairement amphipathiques (faces hydrophile et hydrophobe), à l'exception des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 9$ qui sont hydrophobes. Huit des neuf hélices ($\alpha 1-8$) constituent la structure entière des protéines multi-domaines. L'hélice $\alpha 9$ est séparée du reste de la protéine et correspond au domaine transmembranaire TM. Son rôle est de servir de point d'ancrage dans la membrane externe mitochondriale. L'hélice $\alpha 5$ constitue le cœur de la protéine et est protégée de l'environnement aqueux par les hélices amphipathiques environnantes ($\alpha 1$ et $\alpha 2$ d'un côté et $\alpha 3$ et $\alpha 4$ de l'autre). Pour les protéines multi-domaines, le domaine BH4 correspond à l'hélice $\alpha 1$, le domaine BH3 correspond à l'hélice $\alpha 2$, le domaine BH1 relie les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et le domaine BH2 couvre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$.

Les protéines BH3-only possèdent uniquement le domaine BH3, qui est une hélice α . Seul le BH3-only Bid sous sa forme entière adopte un repliement structural similaire à celui des protéines à multi-domaines.

3.2. Contrôle de la voie de signalisation apoptotique

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle clé dans l'apoptose : la survie ou la mort d'une cellule se décide par l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques ont un rôle inhibiteur de l'apoptose (survie de la cellule) tandis que les protéines pro-apoptotiques ont un rôle promoteur. Cette famille, régulatrice de l'apoptose, agit selon un mécanisme bien précis.¹⁹

Les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines (Bak et Bax) sont les effecteurs de l'apoptose. Dans une cellule saine, ces protéines se trouvent initialement sous forme de monomères inactifs, Bax dans le cytosol et Bak intégré dans la membrane mitochondriale. En réponse aux signaux cytotoxiques, Bax se déplace dans la membrane mitochondriale. Bak et Bax, activées, changent alors de conformation et forment des homo-oligomères. Ces oligomères, formant pores et canaux, perméabilisent alors la membrane externe mitochondriale, conduisant à la libération du cytochrome c.

L'activation des protéines pro-apoptotiques à multi-domaines se fait par les protéines BH3-*only*. Chez les mammifères, dans les cellules saines, les protéines BH3-*only* sont inactives. En réponse à la perception de signaux de mort, elles sont activées par divers mécanismes (phosphorylation, régulation transcriptionnelle, protéolyse). Par exemple, le clivage par protéolyse de Bid par la caspase 8 conduit à deux fragments dont t-Bid, forme active de la protéine Bid. Les BH3-*only* activent ensuite les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines suivant trois modèles : l'activation directe, l'activation indirecte et le modèle intégré (Figure 5).

¹⁹Danial, N. N. BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (24), 7254–7263.

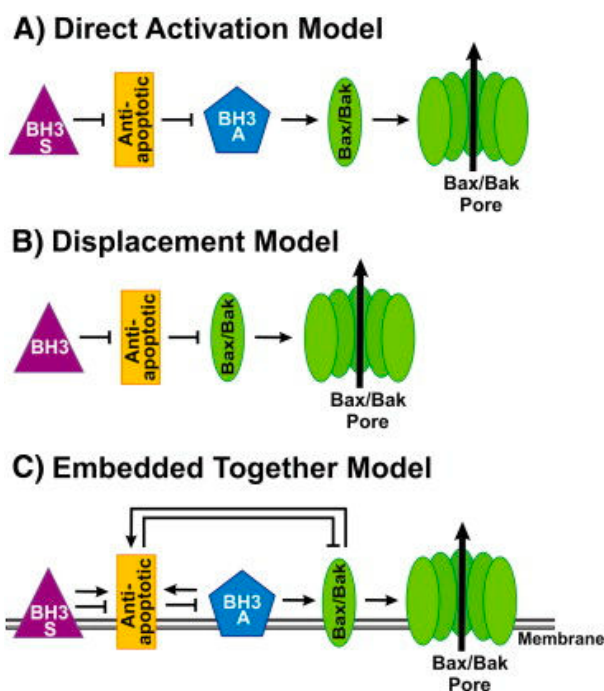


Figure 5 : Les trois différents modèles de l'activation des protéines Bax et Bak.²⁰

(A) L'activation directe

Les BH3-*only* activateurs tels que Bim et t-Bid se fixent aux protéines Bak ou Bax et induisent directement leur oligomérisation, qui conduit à la perméabilisation de la membrane. Dans ce modèle, les BH3-*only* sensibilisateurs (Bad, Bik, etc.) sont séquestrés par les protéines anti-apoptotiques. Ainsi, les BH3-*only* activateurs sont libres de leur action (Figure 5A). Ce modèle d'activation est relativement peu puissant car l'interaction entre les effecteurs et leur activateur est transitoire, favorisant ainsi la séquestration des activateurs par les protéines anti-apoptotiques.

(B) L'activation indirecte ou de déplacement

Dans certains cas, les protéines anti-apoptotiques se fixent sur les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et les séquestrent. Par conséquent, l'oligomérisation de Bax et Bak ne peut se faire. Les BH3-*only* sensibilisateurs, peuvent agir en se fixant aux protéines anti-apoptotiques, libérant ainsi Bax et Bak. Bax et Bak pourront donc s'oligomériser et induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Ce modèle d'action est efficace à condition que toutes les protéines anti-apoptotiques résidant dans la membrane mitochondriale soient inhibées par les BH3-*only* (Figure 5B).

²⁰Shamas-Din, A.; Brahmabhatt, H.; Leber, B.; Andrews, D. W. BH3-Only Proteins: Orchestrators of Apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2011**, *1813* (4), 508–520.

(C) Le modèle intégré

Dans ce modèle sont regroupés les aspects majeurs des modèles direct et indirect. Le sort de la cellule est dicté par la concentration des protéines anti- et pro-apoptotiques. Les protéines BH3-*only* activateurs peuvent directement activer Bax et Bak et favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Les BH3-*only*, activateurs et sensibilisateurs, peuvent interagir et inhiber les protéines anti-apoptotiques. Enfin, les protéines anti-apoptotiques inhibent l'apoptose en séquestrant les effecteurs et leurs activateurs au niveau de la membrane mitochondriale (Figure 5C). Ce modèle montre qu'il existe un équilibre et que celui-ci peut être rompu en fonction de la proportion des différents membres protéiques.

Les protéines de la famille Bcl-2 ont donc un rôle fondamental dans les voies de signalisation. Elles sont décisives dans le sort de vie ou de mort d'une cellule. Les membres pro- et anti-apoptotiques de cette famille interagissent par des interactions protéine-protéine.

3.3. Interactions protéine-protéine entre les membres de la famille Bcl-2

Les domaines BH1, BH2 et BH3 des protéines anti-apoptotiques forment une cavité hydrophobe. Dans cette cavité hydrophobe se lie, par la face hydrophobe, le domaine BH3 hélicoïdal des partenaires pro-apoptotiques.

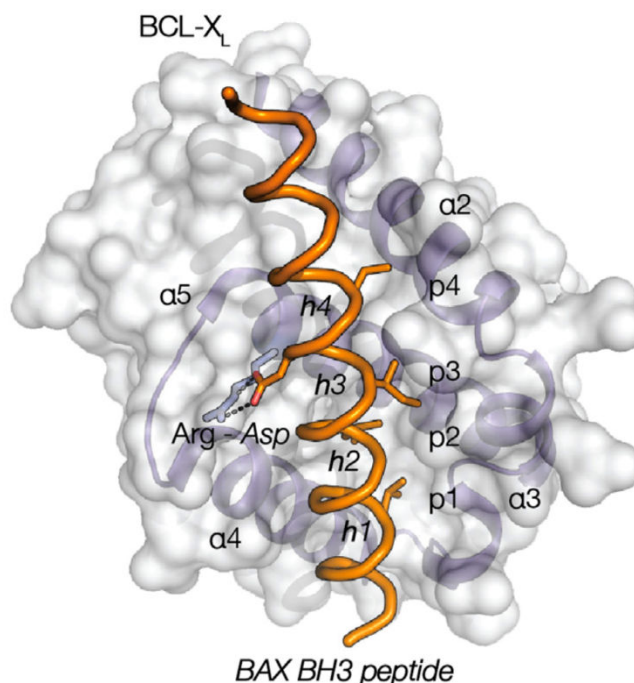


Figure 6 : Structure cristallisée du complexe formé par la protéine Bax (domaine BH3) et la protéine Bcl-x_L (Code PDB : 2BID).¹³

Plus précisément, quatre résidus hydrophobes (h1, h2, h3 et h4) situés sur une face de l'hélice des BH3-only viennent interagir dans quatre poches hydrophobes (P1 à P4) à la surface des protéines anti-apoptotiques. Un pont salin se forme également entre un acide aspartique Asp_c conservé sur l'autre face de l'hélice du BH3-only et une arginine conservée Arg_c du domaine BH1 de la protéine anti-apoptotique (exemple de ces interactions pour le complexe Bax/Bcl-x_L en Figure 6). Au-delà de ces résidus, les interactions entre membres de la famille Bcl-2 s'étendent sur toute la surface du domaine BH3 des protéines, créant ainsi des interactions de surface.

Les interactions entre les différents membres de la famille Bcl-2 se produisent à travers ces interactions hélice/cavité.

Sur la partie supérieure de la Figure 7 sont alignées les séquences d'acides aminés des domaines hélicoïdaux BH3 des protéines pro-apoptotiques.

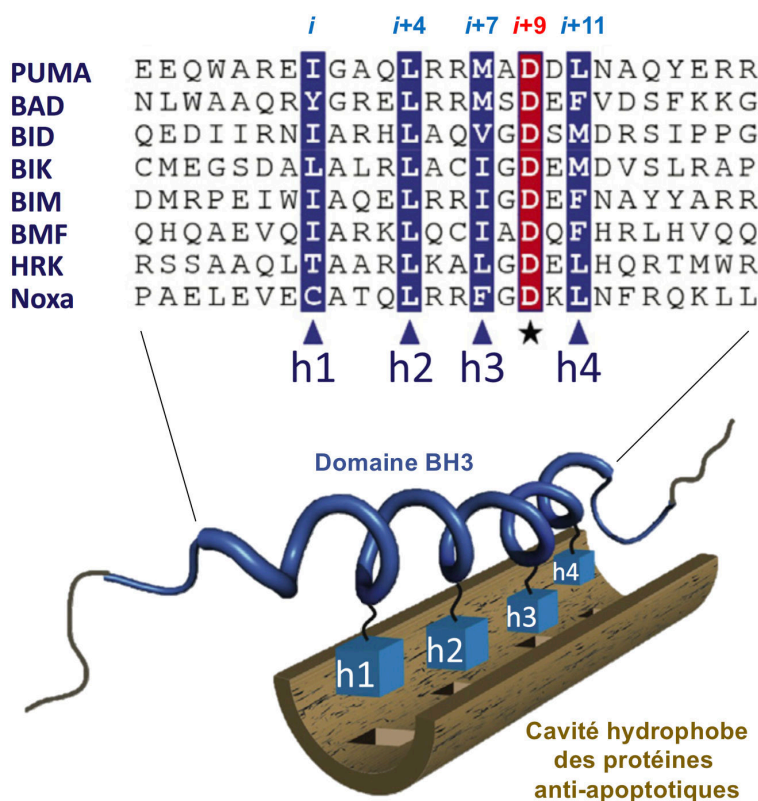


Figure 7 : Interaction entre le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques et la cavité hydrophobe des membres anti-apoptotiques (Figure adaptée de Luna-Vargas *et al.*²¹).

Les résidus hydrophobes (en bleu) des protéines pro-apoptotiques nécessaires à l'interaction se situent sur une même face de l'hélice. Par définition, les résidus h1, h2, h3 et h4 se trouvent aux positions *i* pour h1, *i+4* (*i.e.* quatre résidus après) pour h2, *i+7* pour h3 et *i+11* pour h4.

²¹Luna-Vargas, M. P. A.; Chipuk, J. E. Physiological and Pharmacological Control of Bak, Bax, and Beyond. *Trends Cell Biol.* **2016**, 26, 906–917.

Le résidu h2 est une leucine Leu_c qui est conservée pour tous les membres pro-apoptotiques. Pour les trois autres résidus hydrophobes (h1, h3 et h4), les acides aminés fréquemment retrouvés sont une isoleucine, une leucine, une valine, une méthionine ou un résidu aromatique.

A la position $i+9$, l'acide aspartique conservé Asp_c (en rouge) est impliqué dans un pont salin avec le partenaire arginine conservée Arg_c présent sur les protéines anti-apoptotiques. Aux positions $i+1$ et $i+8$ sont quasiment toujours retrouvés une glycine ou une alanine et à la position $i+10$ un résidu chargé.

Ces éléments clés sont caractéristiques et sont des points de ressemblance entre les protéines de la famille Bcl-2. Ils définissent les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques. Ces éléments ont été mis en évidence par des études réalisées à partir de structures tridimensionnelles entre les membres anti-apoptotiques et les domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques.^{22,23,24,25}

Outre toutes ces caractéristiques communes aux membres de la famille Bcl-2, les membres pro-apoptotiques ne se lient pas avec la même affinité aux membres anti-apoptotiques (Figure 8). Cette différence d'affinité induit une sélectivité (affinité pour plusieurs protéines de la famille Bcl-2 mais pas la totalité) ou une spécificité d'interaction (affinité pour une seule protéine).

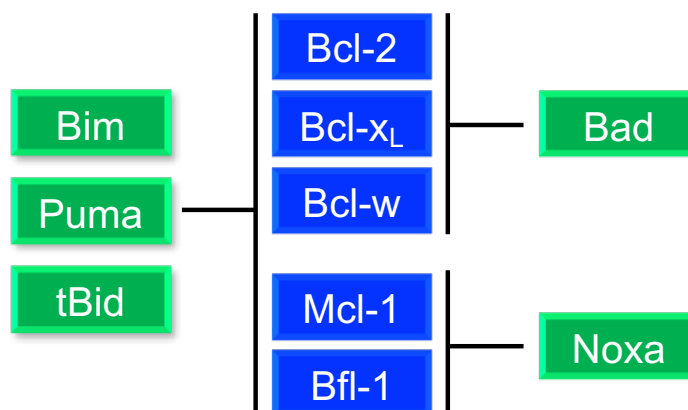


Figure 8 : Les différentes affinités de liaison entre les membres pro-apoptotiques (en vert) et anti-apoptotiques (en bleu).

²²Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. Structure of Bcl-x_L-Bak Peptide Complex: Recognition between Regulators of Apoptosis. *Science* **1997**, 275 (5302), 983–986.

²³Petros, A. M.; Nettesheim, D. G.; Wang, Y.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Mack, J.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Zhang, H.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. Rationale for Bcl-x_L/Bad Peptide Complex Formation from Structure, Mutagenesis, and Biophysical Studies. *Protein Sci.* **2000**, 9 (12), 2528–2534.

²⁴Liu, X.; Dai, S.; Zhu, Y.; Marrack, P.; Kappler, J. W. The Structure of a Bcl-x_L/Bim Fragment Complex: Implications for Bim Function. *Immunity* **2003**, 19, 341–352.

²⁵Petros, A. M.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Structural Biology of the Bcl-2 Family of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2004**, 1644 (2–3), 83–94.

Les protéines Bim, Puma et t-Bid sont capables de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques. Tandis que Bad se lie sélectivement aux protéines Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w ; et Noxa se lie sélectivement aux protéines Mcl-1 et Bfl-1.^{26,27} Les constantes d'affinité K_d sont de l'ordre du nM.

Par ces sélectivités, nous distinguons deux sous-groupes de protéines anti-apoptotiques : d'un côté les protéines Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w et de l'autre les protéines Mcl-1 et Bfl-1.

Bien qu'il y ait tous ces éléments de similarité entre les protéines de la famille Bcl-2 (domaine BH conservé), il existe néanmoins des différences qui impliquent d'une part la fonction (pro- ou anti-apoptotique) des protéines et d'autre part une spécificité d'interaction entre les membres de cette famille.

3.4. Focus sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L

Nous avons montré l'importance de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose. Parmi les protéines anti-apoptotiques, il a été montré que les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 sont des cibles pertinentes : leur inhibition **concomitante** permet de restaurer l'apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes.²⁸ Par ailleurs, la surexpression de Mcl-1 est directement impliquée dans la résistance aux différentes thérapies anticancéreuses approuvées par la FDA, comme la vincristine, le taxol, la gemcitabine et le cisplatine.^{29,30} C'est pourquoi la stratégie d'inhiber Mcl-1 et Bcl-x_L semble être prometteuse pour rétablir l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Notre intérêt se porte donc plus particulièrement sur les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L.

²⁶Chen, L.; Willis, S. N.; Wei, A.; Smith, B. J.; Fletcher, J. I.; Hinds, M. G.; Colman, P. M.; Day, C. L.; Adams, J. M.; Huang, D. C. S. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol. Cell* **2005**, *17*, 393–403.

²⁷Certo, M.; Del Gaizo Moore, V.; Nishino, M.; Wei, G.; Korsmeyer, S.; Armstrong, S. A.; Letai, A. Mitochondria Primed by Death Signals Determine Cellular Addiction to Antiapoptotic BCL-2 Family Members. *Cancer Cell* **2006**, *9* (5), 351–365.

²⁸Brotin, E.; Meryet-Figuière, M.; Simonin, K.; Duval, R. E.; Villedieu, M.; Leroy-Dudal, J.; Saison-Behmoaras, E.; Gauduchon, P.; Denoyelle, C.; Poulain, L. Bcl-x_L and MCL-1 Constitute Pertinent Targets in Ovarian Carcinoma and Their Concomitant Inhibition Is Sufficient to Induce Apoptosis. *Int. J. Cancer* **2010**, *126* (4), 885–895.

²⁹Wei, S.-H.; Dong, K.; Lin, F.; Wang, X.; Li, B.; Shen, J.; Zhang, Q.; Wang, R.; Zhang, H.-Z. Inducing Apoptosis and Enhancing Chemosensitivity to Gemcitabine via RNA Interference Targeting Mcl-1 Gene in Pancreatic Carcinoma Cell. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *62* (6), 1055–1064.

³⁰Wertz, I. E.; Kusam, S.; Lam, C.; Okamoto, T.; Sandoval, W.; Anderson, D. J.; Helgason, E.; Ernst, J. A.; Eby, M.; Liu, J.; Belmont, L. D.; Kaminker, J. S.; O'Rourke, K. M.; Pujara, K.; Kohli, P. B.; Johnson, A. R.; Chiu, M. L.; Lill, J. R.; Jackson, P. K.; Fairbrother, W. J.; Seshagiri, S.; Ludlam, M. J.; Leong, K. G.; Dueber, E. C.; Maecker, H.; Hueang, D. C.; Dixit, V. M. Sensitivity to Antitubulin Chemotherapeutics Is Regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **2011**, *471* (7336), 110–114.

II. Études structurales des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L

A partir des données bibliographiques disponibles dans la littérature, nous allons exposer les similitudes et les différences entre les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L.

Pour ce faire, nous utilisons les structures tridimensionnelles des protéines comme outil de travail. Ces structures, répertoriées dans une banque de données, la *Protein Data Bank* (PDB), vont être présentées. Les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L vont tout d'abord être comparées au niveau structural. Puis, à partir des structures protéiques, le degré d'implication des acteurs majeurs (h1-h4) de l'interaction entre les membres pro- et anti-apoptotiques sera analysé par trois différentes études de la littérature :

- Les études de mutagenèse
- Les études de simulations par dynamique moléculaire
- Les études des complexes Bim/Bcl-x_L et Bim/Mcl-1

La première partie de mon travail a été d'analyser ces données de la littérature afin de mettre en exergue les *hot-spots* des protéines anti-apoptotiques pour lesquelles les inhibiteurs ont été conçus.

1. Structures issues de la *Protein Data Bank*

Dans un travail préliminaire, nous avons recensé toutes les structures tridimensionnelles (3D) des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Ces protéines sont sous la forme apo (non complexées) ou sous la forme holo (complexées). Elles peuvent être complexées par un ligand peptidique (BH3-*only*, BAD, BAX) ou par un ligand synthétique (Annexe 2).

Ces structures ont été résolues grâce à des techniques de diffraction des rayons X ou de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces structures, présentes dans la base de données PDB,³¹ ont des séquences protéiques issues de différents organismes, les plus présents étant *Homo sapiens* (humain) et *Mus musculus* (souris). Dans notre étude, nous choisirons de travailler uniquement sur le modèle humain.

³¹<https://www.rcsb.org>

Dans le Tableau 1 sont présentés les nombres de structures 3D des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 issus de la PDB.

Année de la première structure	Bcl-x_L		Mcl-1	
	1996		2007	
Nombre de structures	En 2015	En 2018	En 2015	En 2018
Apo	13	14	3	3
Complexées à une protéine	2	3	0	0
Complexées à un domaine BH3	11	13	6	10
Complexées à un domaine BH3 muté	2	3	4	7
Complexées à un peptide non naturel	7	8	4	6
Complexées à une molécule synthétique	23	23	15	26
Total	58	64	32	52

Tableau 1 : Nombre de structures 3D des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 dans la PDB.

La protéine Bcl-x_L est étudiée depuis plus longtemps comparée à la protéine Mcl-1 : la première structure de Bcl-x_L a été publiée en 1996 tandis que la première structure de Mcl-1 a été résolue plus de 10 ans après. Pour les deux protéines, nous pouvons trouver leur structure 3D sous forme apo. Il faut noter que pour Mcl-1 sous forme apo, la protéine est cristallisée en présence de *Maltose Binding Protein* (MBP). La MBP est une protéine qui aide à l'obtention d'un cristal de la protéine désirée. Les deux protéines sont également complexées à leurs partenaires naturels tels que les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines et les BH3-*only*. Également, des BH3-*only* mutés cristallisés avec Mcl-1 ou Bcl-x_L ont permis de rechercher les acides aminés essentiels à l'interaction entre ces protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Pour inhiber ces deux protéines, des peptides non-naturels ont été synthétisés, mimant le domaine BH3 des protéines BH3-*only*. Nous pouvons les trouver en complexe avec les protéines d'intérêt. Enfin, ces protéines ont été complexées avec des molécules synthétiques. En 2018, au total, 64 structures sont référencées pour la protéine Bcl-x_L et 52 structures pour la protéine Mcl-1.

Nous avons choisi d'étudier les chiffres de 2015, année de début de ma thèse. En 2015, il y avait presque deux fois plus de structures 3D de Bcl-x_L que de Mcl-1. C'est à partir de ces données que l'analyse des protéines a été conduite.

2. Comparaison structurale des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L

Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w partagent plus de similarités entre elles qu'avec la protéine Mcl-1. Si l'on considère le *backbone* des protéines (C α , N, C'), Mcl-1 et les autres membres ont une structure tertiaire très similaire, avec un *root-mean-square deviation* (RMSD) de 1,74 Å avec Bcl-2, 1,88 Å avec Bcl-x_L et 1,96 Å avec Bcl-w.³⁷ En revanche, leur séquence partage uniquement environ 25 % d'identité (à l'exclusion de la partie N-terminale). Par conséquent, les caractéristiques de surface diffèrent.

Mcl-1 contient de nombreux résidus lysines exposés au solvant à l'exception d'un. Ces résidus contribuent aux propriétés électrostatiques de Mcl-1, dont la surface est plus électropositive que celles des autres protéines de la famille Bcl-2. En particulier, des résidus chargés positivement sont présents dans la cavité d'interaction de Mcl-1 ce qui engendre un potentiel électrostatique positif à celle-ci. De plus, des histidines sont présentes dans la cavité d'interaction de Mcl-1. En comparaison, Bcl-x_L a une cavité essentiellement non chargée. Les différences dans la cavité BH3 contribuent à la spécificité de liaison de Mcl-1.

3. Études de mutagenèse

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à des études de mutagenèse dans le but de déterminer les acides aminés majeurs de l'interaction entre les protéines anti-apoptotiques et les BH3-*only*. Pour cela, les affinités de liaison entre les BH3-*only* mutés et les protéines anti-apoptotiques ont été mesurées. A l'issue d'une mutation individuelle, en comparaison au *wild-type*, les valeurs d'affinité de liaison peuvent :

- Diminuer, indiquant l'importance du résidu à cette position pour l'affinité de liaison,
- Demeurer stables, la mutation est tolérée à cette position et n'influence pas l'affinité,
- Augmenter et stabiliser le complexe.

Dans ces études de mutagenèse, nous allons nous poser la question de savoir si les quatre résidus (h1, h2, h3 et h4) sont tous aussi importants les uns que les autres pour l'interaction. Les études seront présentées selon le BH3-*only* étudié.

3.1. Étude de mutagenèse du BH3-only Bim

Bim est un BH3-only qui a une affinité pour Mcl-1 et pour Bcl-x_L.

En 2007, Lee *et al.*³² publient une étude de mutation individuelle des résidus h2 (position *i*+4) et h4 (position *i*+11). Ces mutations ont été réalisées à ces positions car, pour l'ABT-737, inhibiteur sélectif de Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, deux groupes principaux, le chloro-biphényle et le thiophényle aux extrémités de la molécule, occupent les poches P2 et P4 où se lient les résidus h2 et h4 de Bim (Figure 9).

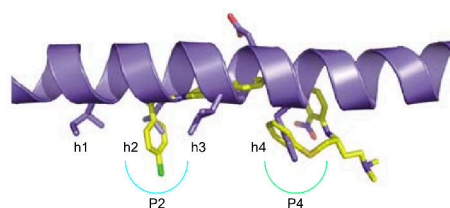


Figure 9 : Superposition de l'ABT-737 (en jaune) et de Bim (en violet).³²

Pour comprendre la sélectivité de l'ABT-737 pour ces trois protéines et non pour la protéine Mcl-1, ils ont substitué la Leu_c (h2) et la Phe (h4) de Bim par d'autres acides aminés. L'affinité de liaison entre le Bim muté et des protéines anti-apoptotiques (dont Bcl-x_L et Mcl-1) a ensuite été mesurée.

En 2008, Boersma *et al.*³³ présentent des résultats sur les mutations des résidus clés (h1, h2, h3 et h4) de Bim en résidus hydrophiles (Lys et Glu).

- **Concernant les mutations du résidu h2**

L'étude de Lee *et al.*³² montre que Bcl-x_L est plus sensible que Mcl-1. Pour Mcl-1, seuls les quatre acides aminés chargés (Glu, Asp, Lys, Arg) et la tyrosine ont causé une diminution d'un facteur 10 de la constante d'affinité : les résidus acides ou basiques ne sont pas tolérés à cette position si l'on veut conserver une forte affinité. La poche P2 de Mcl-1 est donc différente des autres protéines anti-apoptotiques. La structure 3D du complexe Bim/Mcl-1 montre que le repliement du *backbone* de la protéine sur le côté de la poche P2, formé par l'hélice α 3, est vraiment très différent pour Mcl-1 comparé à Bcl-x_L. Cela conduit à une surface moléculaire différente pour la poche P2.

³²Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. Crystal Structure of ABT-737 Complexed with Bcl-x_L: Implications for Selectivity of Antagonists of the Bcl-2 Family. *Cell Death Differ.* **2007**, *14* (9), 1711–1713.

³³Boersma, M. D.; Sadowsky, J. D.; Tomita, Y. A.; Gellman, S. H. Hydrophile Scanning as a Complement to Alanine Scanning for Exploring and Manipulating Protein-Protein Recognition: Application to the Bim BH3 Domain. *Protein Sci.* **2008**, *17* (7), 1232–1240.

En 2008, Lee *et al.*³⁴ confirment le fait que la mutation individuelle du résidu h2 par une Ala n'a aucun effet sur l'affinité pour Mcl-1.

La même année, Boersma *et al.*³³ présentent des résultats quelque peu contradictoires avec l'étude de Lee *et al.* En effet, la mutation de h2 par des résidus hydrophiles (Lys et Glu) aurait un effet délétère sur l'affinité comme démontré dans les études de Lee *et al.* mais la mutation de h2 par une Ala aurait aussi un effet délétère. Le résidu h2 semble être un acteur majeur de la contribution de l'interaction avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

- **Concernant les mutations du résidu h4**

Toutes les protéines anti-apoptotiques ont été plus tolérantes comparées aux mutations réalisées sur le résidu h2.³² Cela reflète la plus grande diversité de résidus en *i*+11 des domaines BH3 pro-apoptotiques. Pour les mutations du résidu h4, Mcl-1 est encore plus tolérante puisque l'affinité n'est pas affectée par les différentes mutations d'acides aminés réalisées. Par conséquent, la poche P4 de Mcl-1 ne semble pas être essentielle pour l'affinité de liaison avec Bim. En effet, la structure du complexe Bim/Mcl-1 montre que la poche P4 est relativement ouverte et exposée au solvant comparée à celle de Bcl-x_L.

Concernant l'ABT-737, il se pourrait que le groupement thiophényle ne trouve pas de point d'ancrage dans la poche P4 de la protéine Mcl-1, ce qui expliquerait son manque d'affinité pour celle-ci.

En 2008, Lee *et al.*³⁴ confirment le fait que la mutation individuelle du résidu h4 par une Ala n'a aucun effet sur l'affinité pour Mcl-1.

Les deux études sur les mutations du résidu h4 montrent un effet similaire sur l'affinité pour Mcl-1.^{32,33} Dans l'étude de Lee *et al.*, la mutation de la Phe par la Gly diminue l'affinité pour Bcl-x_L alors que dans la seconde étude, cette mutation n'a pas d'impact. Ces différences pourraient s'expliquer par la différence de longueur du peptide Bim^{BH3} utilisé dans les études.

- **Concernant les mutations du résidu h1**

Les résultats des deux équipes concordent : la mutation du résidu h1 en Ala ou en résidus hydrophiles n'a aucun effet sur l'affinité du BH3-only Bim pour Mcl-1 et Bcl-x_L.

³⁴Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; van Delft, M. F.; Michalak, E. M.; Boyle, M. J.; Willis, S. N.; Puthalakath, H.; Bouillet, P.; Colman, P. M.; Huang, D. C. S.; Fairlie, W. D. A Novel BH3 Ligand That Selectively Targets Mcl-1 Reveals That Apoptosis Can Proceed without Mcl-1 Degradation. *J. Cell Biol.* **2008**, *180* (2), 341–355.

En 2010, Fire *et al.*³⁵ s'intéressent au résidu h1. Ils décident de le remplacer par une Ala, résidu plus petit, puis par un plus gros, une Tyr (référence à Bad). Chacune de ces mutations n'a d'effets ni sur l'affinité ni sur la spécificité, en comparaison du *wild-type*.

- **Concernant les mutations du résidu h3**

Une faible diminution de l'affinité pour Mcl-1 et Bcl-x_L est observée à la suite de la mutation du résidu h3 en Ala ou en résidus hydrophiles.

3.2. Étude de mutagenèse du BH3-only Noxa

Noxa est un BH3-only qui se lie à la protéine Mcl-1 mais pas à la protéine Bcl-x_L.

Fire *et al.* ont muté le résidu h1 (Cys) de Noxa par une Tyr, mais ce mutant reste sélectif de Mcl-1. Le résidu h1 ne semble pas être déterminant pour la sélectivité.

Concernant l'interaction entre Mcl-1 et Noxa, BH3-only qui se lie à Mcl-1 mais qui ne se lie pas à Bcl-x_L, Day *et al.*³⁶ démontrent que des mutations individuelles en Ala des résidus Asp_c, h2, h3 et h4 de Noxa ont des effets délétères et ces résidus semblent donc importants pour l'affinité de liaison.

Une mutation du résidu h3 (Phe) de Noxa en une Ile à la position *i*+7 a augmenté l'affinité pour Bcl-x_L.²⁶ Un résidu de plus petite taille est donc préférable à cette position pour Bcl-x_L.

3.3. Etude de mutagenèse du BH3-only Bad

Bad est un BH3-only qui se lie à la protéine Bcl-x_L mais pas à la protéine Mcl-1.

A la position *i*, le résidu h1 (Tyr) a été substitué par une Ile, résidu de taille moyenne. Cette mutation a eu pour effet d'augmenter l'affinité de liaison pour Mcl-1.³⁷

³⁵Fire, E.; Gullá, S. V.; Grant, R. A.; Keating, A. E. Mcl-1-Bim Complexes Accommodate Surprising Point Mutations via Minor Structural Changes. *Protein Sci.* **2010**, *19* (3), 507–519.

³⁶Day, C. L.; Smits, C.; Fan, F. C.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Hinds, M. G. Structure of the BH3 Domains from the p53-Inducible BH3-Only Proteins Noxa and Puma in Complex with Mcl-1. *J. Mol. Biol.* **2008**, *380* (5), 958–971.

³⁷Day, C. L.; Chen, L.; Richardson, S. J.; Harrison, P. J.; Huang, D. C. S.; Hinds, M. G. Solution Structure of Prosurvival Mcl-1 and Characterization of Its Binding by Proapoptotic BH3-Only Ligands. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (6), 4738–4744.

3.4. Discussion

Il n'est pas aisé de donner plus d'importance à l'un de ces quatre résidus hydrophobes par rapport à un autre. Les résultats présentés semblent varier en fonction du BH3-*only* utilisé pour l'étude.

- En règle générale, les résidus hydrophiles ne sont pas très bien tolérés pour Bcl-x_L et Mcl-1.
- Le résidu **h1** semblerait contribuer plus faiblement à l'affinité de liaison que le résidu h2. La sélectivité des BH3-*only* engendrée par le résidu h1 n'est pas établie ici.
- Pour le résidu **h2**, les résidus hydrophiles ne sont pas acceptés à cette position et la protéine Bcl-x_L semble plus sensible aux mutations que la protéine Mcl-1. Ce résidu h2 semble d'une importance notable.
- Pour le résidu **h3**, il semblerait que Bcl-x_L ne tolère pas de résidu de grosse taille.
- Le résidu **h4** semble plus tolérant aux mutations, et notamment dans l'interaction avec Mcl-1. Ce résidu h4 semble important pour Bcl-x_L et moins pour Mcl-1, car la poche P4 de cette protéine est ouverte et exposée au solvant.
- Concernant les mutations de l'**Asp_c** de Bim, les résultats des études convergent pour une diminution de l'affinité d'interaction pour toutes les protéines anti-apoptotiques, y compris Mcl-1 et Bcl-x_L.³² Cet Asp_c, qui interagit avec une Arg_c sur les protéines anti-apoptotiques, et donc d'une importance majeure pour l'interaction.

4. Études de simulations par Dynamique Moléculaire (DM)

Ces études de mutagenèse montrent que la spécificité d'interaction pour les protéines Mcl-1 ou Bcl-x_L n'est pas totalement bien comprise. Notre laboratoire s'est orienté vers une stratégie *in silico*, basée sur des simulations par dynamique moléculaire (DM) pour élucider la spécificité d'interaction de Mcl-1.³⁸ Nous avons étudié les IPPs entre Mcl-1 et ses différents partenaires BH3-*only* tels que les complexes Bim/Mcl-1, Noxa/Mcl-1, Puma/Mcl-1.

A la suite de ces simulations, tous les résidus clés des BH3-*only* (Asp_c et h1-h4) ont été retrouvés comme éléments essentiels à l'interaction. La plus forte contribution polaire a été trouvée pour l'Asp_c et les plus fortes contributions non polaires pour les quatre résidus hydrophobes h1-h4.

³⁸Fogha, J.; Marekha, B.; De Giorgi, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Rault, S.; Bureau, R.; Sopkova-de Oliveira Santos, J. Toward Understanding Mcl-1 Promiscuous and Specific Binding Mode. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57* (11), 2885–2895.

Plus en détail, l'interaction polaire entre l'Asp_c des BH3-*only* et l'Arg_c de Mcl-1 est accompagnée d'une interaction électrostatique avec l'Asn260 de Mcl-1.

Le résidu h4 à la position $i+11$ apparaît être important pour l'affinité de liaison contrairement aux études de mutagenèse. Il est en contact avec des *hot-spots* de Mcl-1, la Val220 et la Phe319. De plus, le résidu hydrophobe à la position $i+15$ du BH3-*only* interagit également avec la Phe319 et semble contribuer significativement à l'interaction.

Enfin, des résidus chargés négativement sur la partie N-terminale du BH3-*only*, interagissant avec l'Arg248 et/ou la Lys234 de Mcl-1, semblent être importants pour lier Mcl-1. Ces deux résidus, positivement chargés, sont présents à cette position uniquement sur Mcl-1. Ces différences pourraient expliquer la spécificité d'interaction de Mcl-1.

5. Études des complexes Bim/Mcl-1 et Bim/Bcl-x_L

Une analyse des structures tridimensionnelles des complexes Bim/Mcl-1 (Codes PDB : 2PQK) et Bim/Bcl-x_L (Code PDB : 3FDL) a été entreprise. Nous avons choisi ces complexes puisque Bim est un BH3-*only* ayant une affinité à la fois pour Mcl-1 et Bcl-x_L. Il est donc possible de comparer *via* ces complexes, les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

L'objectif est d'identifier les acides aminés clés à cibler sur la protéine anti-apoptotique pour obtenir une interaction avec celle-ci. Nous allons donc étudier les poches hydrophobes des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L (Figure 10).

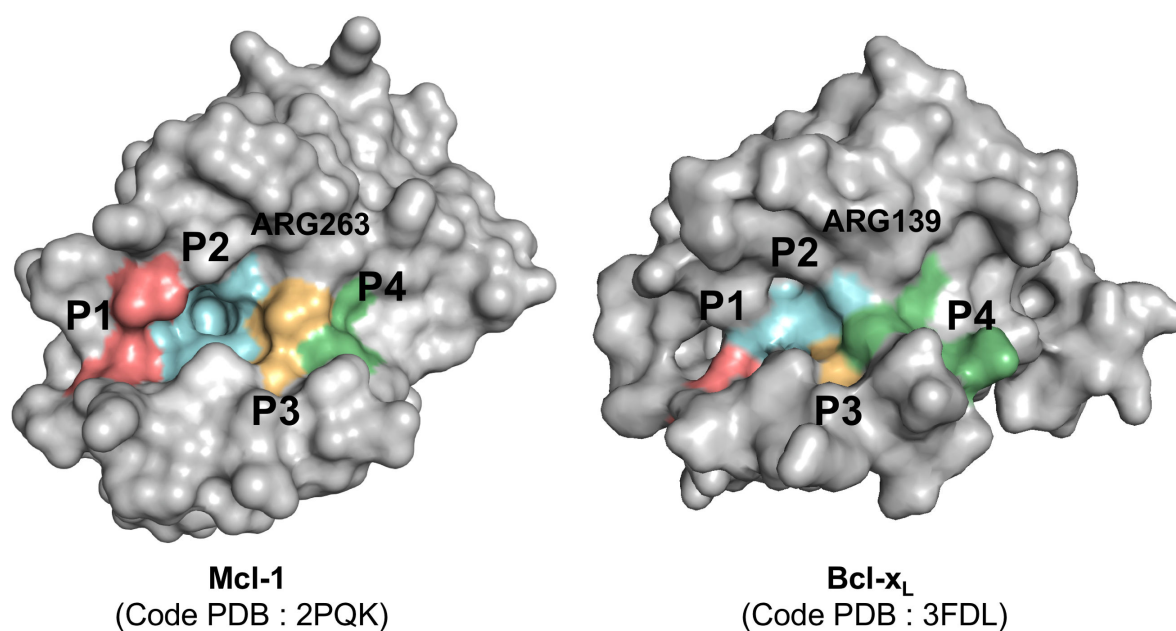


Figure 10 : Structures tertiaires des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 (à gauche) et Bcl-x_L (à droite). Les poches hydrophobes (P1 en rouge, P2 en cyan, P3 en orange et P4 en vert) et les Arg_c sont indiquées sur la figure.

Plus précisément, la composition des poches P1, P2, P3 et P4 où se lient les résidus essentiels, respectivement h1, h2, h3 et h4 des protéines pro-apoptotiques est présentée dans le Tableau 2.

Poche P1		Poche P2		Poche P3		Poche P4		Arg _c	
<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-x_L</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-x_L</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-x_L</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-x_L</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-x_L</i>
Leu235 Val249 Leu246	Leu112 Thr109 Val126	Met250 Leu267 Phe270 Met231 Gly271 Val274 Leu290 Ile294	Ala142 Phe146 Leu108 Leu130 Ser145	Phe228 Thr266 Val253 His224	Phe105 Tyr101	Val220 Val265 Val216	Glu96 Phe97 Val141 Gly138 Tyr195	Arg263	Arg139

Tableau 2 : Acides aminés principaux des poches hydrophobes et arginines conservées de Mcl-1 et Bcl-x_L.

Les résidus en gras définissent les poches hydrophobes lorsque Bim est lié à la protéine. Nous avons élargi notre étude de la composition des poches aux complexes molécule/protéine. En effet, dans le but de concevoir des inhibiteurs synthétiques, nous avons observé visuellement ces complexes. Quand une protéine est liée à un inhibiteur synthétique, ses poches sont plus grandes et plus profondes que lorsqu'elle est liée à un peptide naturel. Les résidus composant les poches sont donc plus nombreux et correspondent à l'ensemble des résidus présentés dans le Tableau 2. L'annexe 3 présente des tableaux plus détaillés sur cette analyse.

Ce tableau met en évidence les différences au niveau de la structure primaire des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. En effet, les poches hydrophobes ne sont pas définies par la même nature de résidus. La composition des poches dépend du complexe étudié, ce tableau représente les acides aminés trouvés majoritairement dans les complexes. De plus, les quatre poches sont contiguës, certains acides aminés sont à la frontière de deux poches et participent à la formation de plusieurs poches hydrophobes.

Concernant l'analyse des complexes molécule/protéine, nous avons mis en évidence des caractéristiques des inhibiteurs de Bcl-x_L et de Mcl-1. Les molécules complexées à Bcl-x_L occupent la poche P2 de celle-ci. Pour gagner en affinité, il est important d'occuper également la poche hydrophobe P4. Les molécules complexées à Mcl-1 occupent la poche P2 de celle-ci. La poche P4 de Mcl-1 est moins bien définie et plus exposée au solvant. En tant que telle, cette poche est moins profonde et moins hydrophobe que la poche P4 de Bcl-x_L. Les inhibiteurs synthétiques de Mcl-1 et Bcl-x_L possèdent comme autre point commun un groupement polaire dans le but d'interagir avec l'arginine conservée (Arg139 pour Bcl-x_L et Arg263 pour Mcl-1).

6. Discussion

Les protéines anti-apoptiques Mcl-1 et Bcl-x_L de la famille Bcl-2 ont une structure tertiaire très similaire. Composées des domaines d'homologie BH1, BH2, BH3 et BH4, elles présentent des **points communs** :

- Le site d'interaction est une cavité hydrophobe formée par le domaine BH3.
- Les partenaires pro-apoptotiques se lient par leur domaine BH3. Les acteurs majeurs de l'interaction sont l'Asp_c et les résidus hydrophobes h1, h2, h3 et h4.
- L'Asp_c crée un pont salin avec l'Arg_c de ces protéines anti-apoptotiques. Cette interaction est identifiée comme fondamentale à la liaison entre une protéine pro- et anti-apoptotique.
- D'après les études de mutagenèse et de simulations par DM, le résidu h2 contribue le plus à l'interaction.

Les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L comportent également des différences, qui induisent une sélectivité des membres pro-apoptotiques. Nous pouvons noter comme **différences** :

- Le résidu h1 pourrait participer à la sélectivité des membres pro-apoptotiques, mais cela reste discutable (cf. mutagenèse/simulations par DM).
- Le résidu h3 doit être de taille moyenne ou petite pour permettre une interaction avec Bcl-x_L.
- Le résidu h4 est essentiel pour l'interaction avec Bcl-x_L et important pour l'interaction avec Mcl-1. Les poches P4 de Bcl-x_L et Mcl-1 sont différentes ; celle de Bcl-x_L est bien définie tandis que celle de Mcl-1 est ouverte et exposée au solvant.
- Pour l'interaction avec Mcl-1, la Lys234 est potentiellement importante ainsi que le résidu à la position $i+15$.
- La surface du site d'interaction de la protéine : la surface de Mcl-1 est plutôt électropositive tandis que celle de Bcl-x_L est neutre.
- La nature des acides aminés qui composent les poches hydrophobes est différente. Par conséquent les poches de Mcl-1 et Bcl-x_L sont différentes.

État de l'Art – Études structurales des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L

Ces deux premières parties nous ont permis de comprendre le rôle primordial des interactions protéine-protéine au sein des protéines de la famille Bcl-2 qui régulent l'apoptose. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux interactions entre les BH3-*only* et les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L en analysant les différents résidus clés de ces interactions à partir des données de la littérature.

Nous nous proposons dans la partie suivante de définir les IPPs et les techniques de caractérisation d'interaction protéine-protéine et molécule/protéine. Ces données en main, la partie IV s'intéressera à la découverte des BH3-mimétiques, inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

III. Interactions protéine-protéine

1. Définition de l'interaction protéine-protéine

L'ensemble des interactions protéine-protéine (IPPs) d'un organisme constitue un réseau appelé interactome (Figure 11). L'interactome de différents organismes a pu être établi. L'interactome humain, estimé à plus de 130 000 interactions binaires entre 20 000 protéines, est sans cesse actualisé par de nouvelles études. Récemment, Rolland *et al.* ont rapporté 13 944 interactions binaires entre 4303 protéines.³⁹

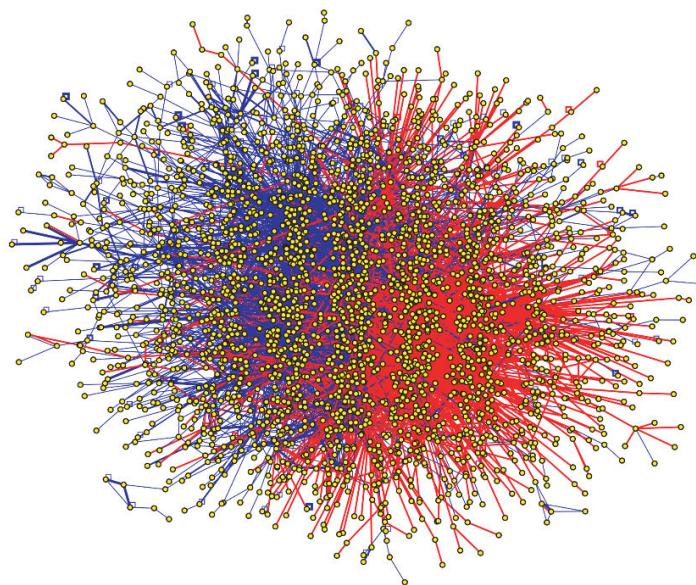


Figure 11 : L'interactome humain établi par Rual *et al.*⁴⁰
(Cercle jaune : protéine ; segments bleu et rouge : interaction)

³⁹Rolland, T. ; Tasxan, M. ; Charlotiaux, B. ; Pevzner, S. J. ; Zhong, Q. ; Sahni, N. ; Yi, S. ; Lemmens, I. ; Fontanillo, C. ; Mosca, R. ; Kamburov, A. ; Ghiassian, S. D. ; Yang, X. ; Ghamsari, L. ; Balcha, D. ; Begg, B. E. ; Braun, P. ; Brehme, M. ; Broly, M. P. ; Carvunis, A. R. ; Convery-Zupan, D. ; Corominas, R. ; Coulombe-Huntington, J. ; Dann, E. ; Dreze, M. ; Dricot, A. ; Fan, C. ; Franzosa, E. ; Gebreab, F. ; Gutierrez, B. J. ; Hardy, M. F. ; Jin, M. ; Kang, S. ; Kiros, R. ; Lin, G. N. ; Luck, K. ; MacWilliams, A. ; Menche, J. ; Murray, R. R. ; Palagi, A. ; Poulin, M. M. ; Rambout, X. ; Rasla, J. ; Reichert, P. ; Romero, V. ; Ruysinck, E. ; Sahalie, J. M. ; Scholz, A. ; Shah, A. A. ; Sharma, A. ; Shen, Y. ; Spirohn, K. ; Tam, S. ; Tejada, A. O. ; Trigg, S. A. ; Twizere, J.-C. ; Vega, K. ; Walsh, J. ; Cusick, M. E. ; Xia, Y. ; Barabási, A. L. ; Iakoucheva, L. M. ; Aloy, P. De Las Rivas, J. ; Tavernier, J. ; Calderwood, M. A. ; Hill, D. E. ; Hao, T. ; Roth, F. P. ; Vidal, M. A Proteome-Scale Map of the Human Interactome Network. *Cell* **2014**, *159*, 1212–1226.

⁴⁰Rual, J.-F. ; Venkatesan, K. ; Hao, T. ; Hirozane-Kishikawa, T. ; Dricot, A. ; Li, N. ; Berriz, G. F. ; Gibbons, F. D. ; Dreze, M. ; Ayivi-Guedehoussou, N. ; Niels Klitgord, N. ; Christophe Simon, C. ; Mike Boxem, M. ; Stuart Milstein, S. ; Rosenberg, J. ; Goldberg, D. S. ; Zhang, L. V. ; Wong, S. L. ; Franklin, G. ; Albala, S. L. S. ; Lim, J. ; Fraughton, C. ; Llamasos, E. ; Cevik, S. ; Bex, C. ; Lamesch, P. ; Sikorski, R. S. ; Vandenhaute, J. ; Zoghbi, H. Y. ; Smolyar, A. ; Bosak, S. ; Sequerra, R. ; Doucette-Stamm, L. ; Cusick, M. E. ; Hill, D. E. ; Roth, F. P. ; Vidal, M. Towards a Proteome-Scale Map of the Human Protein-Protein Interaction Network. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1173–1178.

Les IPPs peuvent être classifiées selon différents critères : la composition, la stabilité et l'affinité.⁴¹

L'IPP basée sur la **composition** : les complexes peuvent être homo-oligomériques ou hétéro-oligomériques. Si les protéines d'un complexe sont identiques (l'interaction se produit entre deux chaînes identiques de protéines), elles forment un homo-oligomère. Alors que si l'interaction prend place entre deux chaînes non identiques, c'est un hétéro-oligomère.

L'IPP basée sur la **stabilité** : les interactions peuvent être obligatoires ou non obligatoires. Afin de classer les interactions comme obligatoires ou non obligatoires, il est nécessaire de connaître la stabilité dans le complexe et en forme monomérique des protéines. Si les protéines (monomères) d'un complexe sont instables sous leur forme libre *in vivo* alors c'est une interaction obligatoire ; alors que les protéines d'une interaction non obligatoire peuvent exister indépendamment du complexe.

L'IPP basée sur l'**affinité** (la durée de vie) : les interactions peuvent être transitoires ou permanentes. Cette classification, basée sur le temps de vie du complexe, est pertinente seulement pour les complexes non obligatoires. Les interactions permanentes sont généralement très stables : une fois que les deux protéines interagissent, elles restent en permanence en complexe. Les protéines, dans une interaction transitoire, s'associent et se dissocient temporairement *in vivo*.

Il est difficile de différencier les complexes transitoires/permanents et obligatoires/non obligatoires. Généralement, les interactions obligatoires sont permanentes alors que les interactions non obligatoires peuvent être transitoires ou permanentes.

Pour les protéines de la famille Bcl-2, on peut trouver des complexes homo-oligomériques (Bak/Bak) comme hétéro-oligomériques (Noxa/Mcl-1). Ces IPPs sont non obligatoires et transitoires.

⁴¹Keskin, O.; Tuncbag, N.; Gursoy, A. Predicting Protein-Protein Interactions from the Molecular to the Proteome Level. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (8), 4884–4909.

2. Définition de l'interface protéine-protéine

Les propriétés structurales et fonctionnelles des interfaces protéiques sont à présent de mieux en mieux connues : les interfaces protéine-protéine sont généralement larges (1 300 à 3 000 Å²), et leurs surfaces hydrophobes sont relativement planes. L'une des caractéristiques les plus frappantes de l'interaction entre protéines est la distribution hétérogène de l'énergie dans la région d'interface. Certains résidus, appelés *hot-spots*, contribuent significativement à l'énergie libre de liaison et sont essentiels pour l'interaction protéine-protéine (Figure 12).^{42,43}

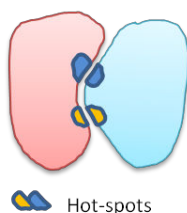


Figure 12 : Représentation d'une IPP.
(En rose : protéine 1, en bleu clair : protéine 2, en bleu et jaune : hot-spots).

Ils sont situés sur les deux côtés de l'interface et sont hautement complémentaires. Ces résidus peuvent être identifiés par des études de mutagenèse dirigée (*alanine scanning*). En effet, s'il y a un changement de l'affinité de liaison, généralement une variation de l'énergie de liaison supérieure à 2 kcal.mol⁻¹, quand un résidu est muté en alanine, alors celui-ci est désigné comme étant un *hot-spot*.

Les *hot-spots* sont des cibles thérapeutiques potentielles, et les molécules ont tendance à se lier à ces régions de l'interface.

3. Caractérisation des interactions protéine-protéine

- La détection des interactions protéine-protéine

La prédiction des IPPs peut se faire de manière expérimentale ou *in silico*. La technique du double hybride et la technique AP–MS (*Affinity Purification – Mass Spectrometry*) sont les méthodes les plus courantes pour prédire expérimentalement les interactions protéine-protéine.^{41,44} L'identification et l'analyse des IPPs par ces méthodes contribuent à l'amélioration de la compréhension des mécanismes cellulaires.

⁴²Keskin, O.; Gursoy, A.; Ma, B.; Nussinov, R. Principles of Protein–Protein Interactions: What Are the Preferred Ways For Proteins To Interact? *Chem. Rev.* **2008**, *108* (4), 1225–1244.

⁴³Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280* (1), 1–9.

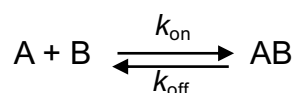
⁴⁴Cafarelli, T.; Desbuleux, A.; Wang, Y.; Choi, S.; De Ridder, D.; Vidal, M. Mapping, Modeling, and Characterization of Protein–Protein Interactions on a Proteomic Scale. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 201–210.

- La caractérisation des interactions protéine-protéine

Dans ce manuscrit, nous développerons les principales méthodes de caractérisation des IPPs.⁴⁵ En effet, ces méthodes sont utilisées pour caractériser les IPPs mais également en *drug discovery* pour la découverte de perturbateurs d'interactions protéine-protéine. Ces techniques biophysiques peuvent fournir un haut débit et par conséquent être adéquates pour le criblage de molécules, et notamment de fragments.⁴⁶

Ces techniques biophysiques aident à la détermination de plusieurs paramètres de l'IPP dont le principal est l'affinité.

L'affinité de liaison définit la force d'interaction entre deux protéines qui se lient entre elles physiquement. De ce fait, l'affinité des protéines détermine si l'interaction aura lieu dans des conditions données. Pour une interaction binaire, l'affinité de liaison est une fonction de la force d'interaction de l'attraction entre les protéines A et B et par conséquent elle décrit la force du complexe AB.



Tandis que les constantes sous-jacentes, la constante d'association k_{on} et la constante de dissociation k_{off} rendent compte de la cinétique de la réaction. Elles sont utilisées pour déterminer la constante de dissociation à l'équilibre K_d qui rend compte de l'affinité.

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{C_A C_B}{C_{AB}}$$

Une association rapide avec une concentration C faible des protéines A et B dans l'environnement peut améliorer l'affinité de liaison. Une affinité élevée peut également être obtenue par une dissociation lente, c'est-à-dire qu'une fois que le complexe AB est formé, il ne revient pas rapidement aux protéines libres A et B.

Nous pouvons également définir la constante d'association à l'équilibre K_A par l'inverse de la constante K_d .

$$K_A = \frac{1}{K_d} = \frac{C_{AB}}{C_A C_B}$$

⁴⁵Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J. Small Molecules, Big Targets: Drug Discovery Faces the Protein-Protein Interaction Challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (8), 533–550.

⁴⁶Scott, D. E.; Coyne, A. G.; Hudson, S. A.; Abell, C. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry* **2012**, *51* (25), 4990–5003.

La constante d'association à l'équilibre K_A peut être utilisée pour la détermination de l'énergie libre de liaison par la relation :

$$\Delta G = -RT \ln K_A \text{ (avec } R : \text{ constante des gaz parfaits et } T : \text{ température).}$$

La constante K_A peut être utilisée pour différencier les interactions fortes et faibles. Les constantes K_A des complexes permanents sont de l'ordre du micromolaire alors que les complexes transitoires sont de l'ordre du nanomolaire. Plus la valeur de la constante K_A est élevée, plus la formation du complexe est favorisée.

Les méthodes biophysiques les plus couramment utilisées pour caractériser les IPPs et les complexes molécule/protéine en *Drug Design* sont détaillées ci-après.

La technique Thermal Shift Assay (TSA) est probablement la plus rapide des méthodes de criblage.⁴⁷ Elle consiste à apprécier la dénaturation thermique d'une protéine en présence ou en l'absence de ligand, grâce à un colorant fluorescent, le Sypro orange, capable de se lier aux régions hydrophobes des protéines. Plus la protéine étudiée est dénaturée, plus l'intensité de fluorescence mesurée est importante. La présence d'un ligand lié à la protéine étudiée rend cette protéine plus stable et donc plus difficile à dénaturer : il en résulte une augmentation de la température de dénaturation (ΔT_m) de la protéine, proportionnel à l'affinité du ligand étudié pour la protéine. Le TSA est une technique de criblage qui transmet une information binaire uniquement : le ligand se fixe le ligand / le ligand ne se fixe pas à la protéine.

La résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance*, SPR) est une méthode qui détecte les changements dans l'indice de réfraction d'une couche superficielle, provoqués par les événements de liaison.⁴⁸ La SPR permet la mesure d'affinité du ligand (K_d) et, dans certains cas, la détermination de la cinétique de liaison (k_{on} et k_{off}). Plus précisément, la protéine cible est immobilisée sur la surface d'or, appelée *sensor ship*. L'autre partenaire circulant est amené au contact de la *sensor ship* par un système de flux continu. Quand l'analyte se lie à la protéine immobilisée, une augmentation de la masse est détectée en temps réel. A partir du temps de réponse association/dissociation du ligand à la protéine, les constantes cinétiques (k_{on} et k_{off}) peuvent être mesurées et la constante d'affinité calculée.

⁴⁷Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (9), 2212–2221.

⁴⁸Navratilova, I.; Hopkins, A. L. Fragment Screening by Surface Plasmon Resonance. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1 (1), 44–48.

La titration calorimétrique isotherme (*isothermal titration calorimetry*, ITC) mesure directement la chaleur associée à la liaison du ligand à la protéine. Cette technique permet de déterminer la constante de dissociation à l'équilibre (K_d), la stœchiométrie et les propriétés cinétiques (k_{on} et k_{off}) et thermodynamiques de l'interaction (l'entropie ΔS et l'enthalpie ΔH).

L'anisotropie de fluorescence (*fluorescence polarization assay*, FPA) est une méthode de criblage rapide et adaptée au haut débit.⁴⁹ C'est une analyse de la dépolarisation de fluorescence. L'utilisation d'un ligand marqué par une sonde fluorescente, afin de la protéine cible est nécessaire. Le ligand marqué, mis en contact de la protéine en solution, se lie à celle-ci. Si le ligand étudié se lie à la protéine cible, il libérera alors le ligand marqué, et nous pourrions alors mesurer une dépolarisation de fluorescence. Par cette technique, nous pouvons déterminer trois grandeurs : la constante de dissociation à l'équilibre K_d entre la protéine et le ligand marqué, la concentration inhibitrice à 50 % (CI_{50}) et la constante d'inhibition K_i pour la molécule testée.

La CI_{50} est la concentration permettant d'inhiber 50 % de la liaison entre la protéine et le ligand marqué. La détermination de la CI_{50} se fait par une étude de liaison dite de compétition. Dans ce cas, deux ligands sont en compétition, l'un des ligands est marqué et connu pour être affiné de la protéine et l'autre est le ligand que l'on veut étudier. La CI_{50} est dépendante des conditions de l'expérience et elle ne peut donc pas être comparée d'une étude à une autre ; tandis que le K_i est indépendant des conditions expérimentales est peut donc être utilisé comme élément de comparaison.

La cristallographie RX est une méthode qui détermine la structure du ligand lié à la protéine.⁵⁰ Cette méthode permet à la fois de valider un *hit* et de fournir des données structurales sur l'interaction.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) peut être basée sur l'étude du ligand ou de la protéine.⁵¹ L'interaction du ligand avec la protéine est détectée par les changements de déplacement chimique des signaux du spectre RMN du ligand ou de la protéine.

⁴⁹Lea, W. A.; Simeonov, A. Fluorescence Polarization Assays in Small Molecule Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, 6 (1), 17–32.

⁵⁰Davies, T. G.; Tickle, I. J. Fragment Screening Using X-Ray Crystallography. In *Topics in current chemistry*; 2011; Vol. 317, pp 33–59.

⁵¹Barile, E.; Pellecchia, M. NMR-Based Approaches for the Identification and Optimization of Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (9), 4749–4763.

Les expériences RMN ^1H , dont l'expérience STD (*saturation transfer difference*), sont les méthodes les plus simples et les plus rapides de criblage par RMN. Dans l'expérience STD, le ligand est irradié, ce qui résulte en un transfert de la magnétisation du ligand libre vers le complexe ligand/protéine (ligand lié). Les signaux de résonance du ligand lié *versus* ligand libre deviennent facilement distinguables. Le spectre STD est la différence entre le spectre après irradiation et le spectre de référence (ligand libre). L'acquisition du spectre est relativement rapide et plusieurs fragments peuvent être mis en compétition. Des informations sur le site d'interaction et sur l'affinité du ligand peuvent également être obtenues.

Les fragments peuvent être criblés et validés simultanément par des expériences 2D plus complexes comme les expériences HSQC ^{15}N - ^1H , qui suivent le changement de déplacement chimique de la protéine induit par le ligand quand celui-ci est lié à la protéine cible marquée au ^{15}N . Bien que cette méthode nécessite beaucoup de temps et de protéine, elle fournit des informations sur la localisation et la caractérisation du site d'interaction du ligand.

Le Tableau 3 regroupe les différentes grandeurs obtenues pour chaque technique et les avantages et inconvénients que ces techniques présentent.

Méthode	Détermination	Données obtenues	Avantages	Inconvénients
TSA	Liaison du ligand	ΔT_m	-Rapide -Peu coûteux	-Peu d'informations
SPR	Affinité Cinétique Spécificité	K_d k_{on} , k_{off}	-Rapide -Pas de marquage -Faibles quantités -Données cinétiques	-Coûteux -Immobilisation d'un des deux partenaires
ITC	Affinité Cinétique Thermodynamique Stoechiométrie	K_d k_{on} , k_{off} ΔS , ΔH	-Pas de marquage -Pas d'immobilisation -Compatible avec solvants organiques -Données cinétiques, thermodynamiques	-Analyse complexe des résultats
FPA	Affinité	K_d K_i CI_{50}	-Haut débit -Peu coûteux -Pas d'immobilisation	-Marquage fluo -Uniquement données d'affinité
RX	Structure du complexe	Coordonnées 3D du complexe à l'échelle atomique	-Très précise -Obtention de la structure tridimensionnelle, du site interaction, des <i>hot-spots</i>	-Difficile d'obtenir un cristal -Quantité importante de protéines
RMN	Affinité Structure du complexe	K_d	-Analyse en solution -Alternative pour les protéines qui ne cristallisent pas -Obtention de la structure tridimensionnelle, du site interaction, des <i>hot-spots</i>	-Solubilité des ligands -Conditions (pH, T, solvant) -Peu sensible

Tableau 3 : Les principales techniques biophysiques de caractérisation des interactions protéine-protéine.

État de l'Art – Interactions protéine-protéine

Ces techniques sont complémentaires les unes des autres. La technique à utiliser doit être choisie selon les besoins de l'expérimentateur. Par exemple, si l'on veut cribler une librairie de molécules, les techniques de TSA et FPA, rapides et peu coûteuses, sont adaptées. En revanche, si l'on veut des informations sur la structure du complexe molécule/protéine, les techniques de RMN et diffraction par RX le permettront. La SPR et l'ITC sont des techniques qui fournissent un grand panel d'informations mais elles sont coûteuses et moins rapides pour réaliser un criblage.

IV. A la découverte de BH3-mimétiques

Une des stratégies utilisées pour restaurer l'apoptose dans les cellules cancéreuses chimiorésistantes est l'utilisation d'inhibiteurs des membres anti-apoptotiques, appelés BH3-mimétiques (Figure 13). Ces BH3-mimétiques sont capables de se lier aux protéines anti-apoptotiques, libérant les protéines pro-apoptotiques et restaurant de ce fait l'apoptose.

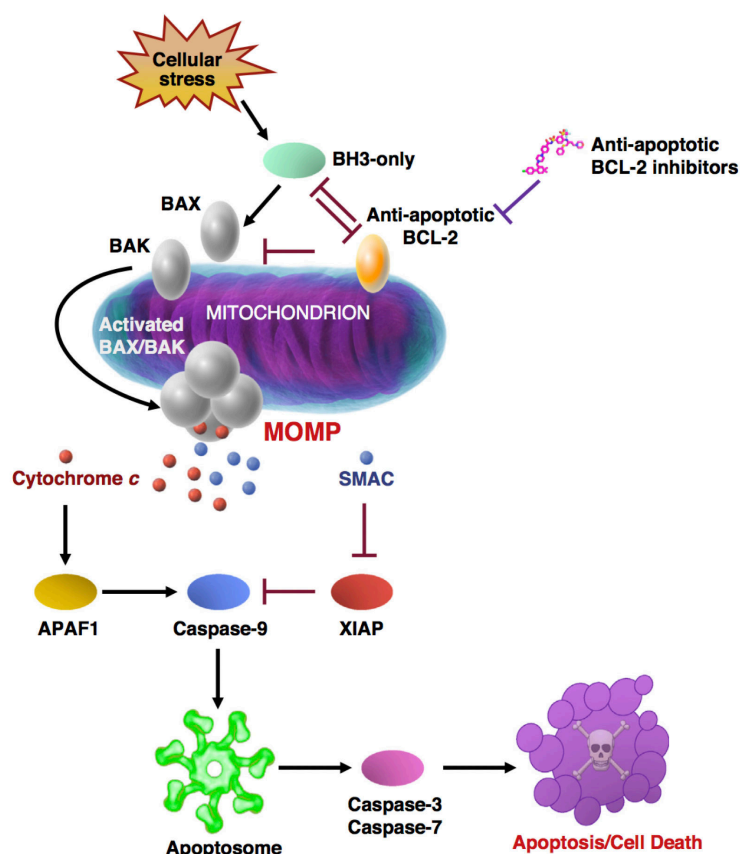


Figure 13 : Des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour rétablir l'apoptose (adaptée de Garner *et al.*⁵²).

L'objectif est de cibler Mcl-1 et Bcl-x_L, à l'aide de molécules synthétiques. Pour ce faire, différentes méthodes de *Drug Design* ont été utilisées et deux d'entre elles vont être détaillées. Premièrement, la méthode de *Structure-Based Drug Design* (SBDD) va être développée par la découverte d'un inhibiteur sélectif de Mcl-1 ; et dans un second temps, la méthode de *Fragment-Based Drug Design* (FBDD) va être présentée par la découverte d'inhibiteurs sélectifs de Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, l'ABT-737 et son analogue oralement disponible l'ABT-263.

Dans cette thèse, la numérotation des molécules décrites dans la littérature est en chiffre romain.

⁵²Garner, T. P.; Lopez, A.; Reyna, D. E.; Spitz, A. Z.; Gavathiotis, E. Progress in Targeting the BCL-2 Family of Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 39, 133–142.

1. Méthode de Structure-Based Drug Design (SBDD)

1.1. Principe de l'approche

Dans les années 1980, l'explosion de la génomique et de la protéomique a fourni des centaines de nouvelles cibles thérapeutiques. La détermination de structures tridimensionnelles a drastiquement augmenté grâce à l'amélioration des techniques expérimentales comme la diffraction par RX et la RMN. L'outil informatique est également en plein essor. C'est dans ce contexte que l'approche *Structure-Based Drug Design* (SBDD) a émergé.⁵³

Le SBDD est une méthode, née dans les années 90, qui permet de rationaliser la conception de médicaments qui ne pouvait se faire sans la connaissance d'informations structurales. Le SBDD est une stratégie qui peut se décomposer en trois étapes clés : (1) la détermination tridimensionnelle de la protéine cible, l'identification du site actif et la préparation d'une librairie de molécules ; (2) l'identification d'un *hit* et enfin ; (3) l'optimisation du *hit* pour obtenir un *lead* (Schéma 1).⁵⁴

La première étape de ce procédé est la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle peut être obtenue par diffraction des RX, RMN ou modélisation par homologie. La diffraction des RX est la technique de choix pour résoudre une structure tridimensionnelle suivie de la RMN. Si la structure de la protéine n'est pas obtenue par ces deux techniques, il est possible de construire un modèle informatique par homologie en s'appuyant sur la structure tridimensionnelle d'une protéine similaire.

⁵³Congreve, M.; Murray, C. W.; Blundell, T. L. Keynote Review: Structural Biology and Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (13), 895–907.

⁵⁴Kalyaanamoorthy, S.; Chen, Y.-P. P. Structure-Based Drug Design to Augment Hit Discovery. *Drug Discov. Today* **2011**, *16* (17–18), 831–839.

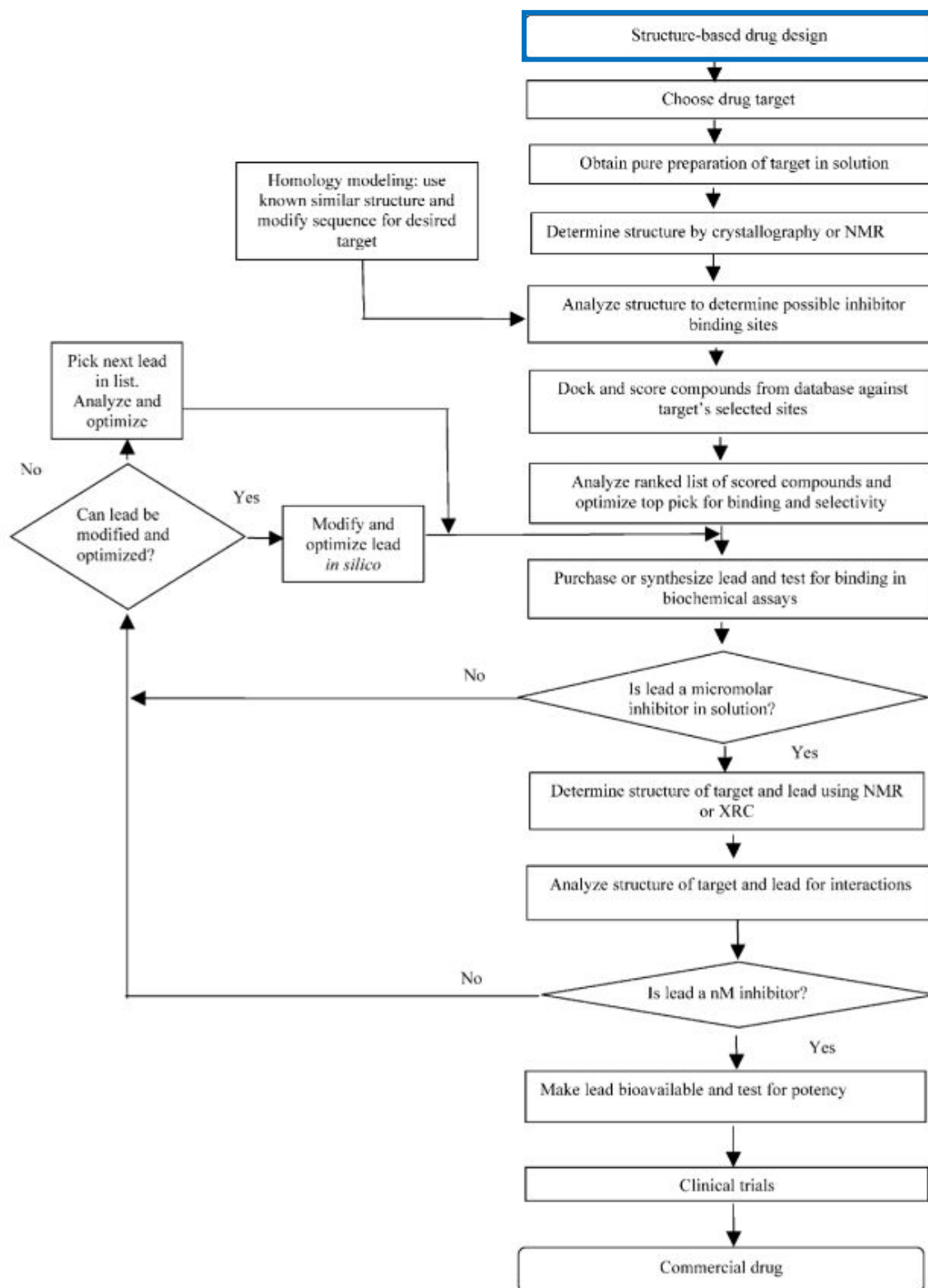


Schéma 1 : L'approche de Structure-Based Drug Design.⁵⁵

Une fois le site d'interaction validé, l'identification de *hits* peut alors débuter. Différentes stratégies sont mises en place pour la découverte de *hits* : par criblage réel (HTS) ou bien *in silico* par criblage virtuel et génération *de novo*.⁵⁵

- Pour le criblage réel, le HTS est la technique la plus utilisée. Une grande collection de composés est interrogée dans un test haut débit. L'objectif est d'identifier des molécules avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 10 μ M. Par exemple, un criblage pour identifier des inhibiteurs de Mcl-1, réalisé sur plus de 200 000 composés, a permis d'identifier plus de 3 000 molécules actives.⁵⁶ Néanmoins, générer des *hits* de qualité reste difficile. Le criblage réel, coûteux, peut être substitué par des techniques *in silico*.
- Lors d'un criblage HTS virtuel, une banque de données de molécules est dockée dans le site actif de la cible ; les molécules sont classées selon un score de *docking*. Les meilleures molécules seront alors sélectionnées.
- Pour la génération *de novo* d'un *hit*, des petits « morceaux » de molécules comme un benzène, un groupe carbonyle, une amine sont positionnés dans le site actif et liés *in silico*. Une molécule finale est donc créée *in silico* par ces « morceaux » liés et doit ensuite être synthétisée. Néanmoins, cette stratégie fournit des molécules très souvent non faisables chimiquement et n'est donc pas la stratégie de choix de l'approche SBDD.

L'affinité pour la cible des molécules *hits* que l'on vient d'identifier est évaluée. Le *hit* sera ensuite optimisé en un *lead*, l'objectif étant d'obtenir une activité de l'ordre du nM. Cette optimisation peut se faire *in silico* en étudiant le *hit* dans le site d'interaction de la cible, par pharmacomodulation et enfin par détermination de la structure du complexe *hit*/protéine.

Cette approche a fait ses preuves avec la découverte d'inhibiteurs de VIH-1, utilisés dans le traitement et la prévention du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), approuvés par la FDA et mis sur le marché dans les années 1990.⁵⁷

De nos jours, cette stratégie continue d'être utilisée, et notamment pour la découverte d'inhibiteurs de la protéine Mcl-1.

⁵⁵Anderson, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.* **2003**, 10 (9), 787–797.

⁵⁶<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1022>

⁵⁷Wlodawer, A.; Vondrasek, J. Inhibitors of HIV-1 Protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27 (1), 249–284.

1.2. Découverte d'un inhibiteur de Mcl-1

Les laboratoires AbbVie,⁵⁸ dans le but de découvrir une petite molécule inhibitrice de la protéine Mcl-1, ont identifié un *hit* à partir d'un criblage HTS réalisé par FPA (Schéma 2).

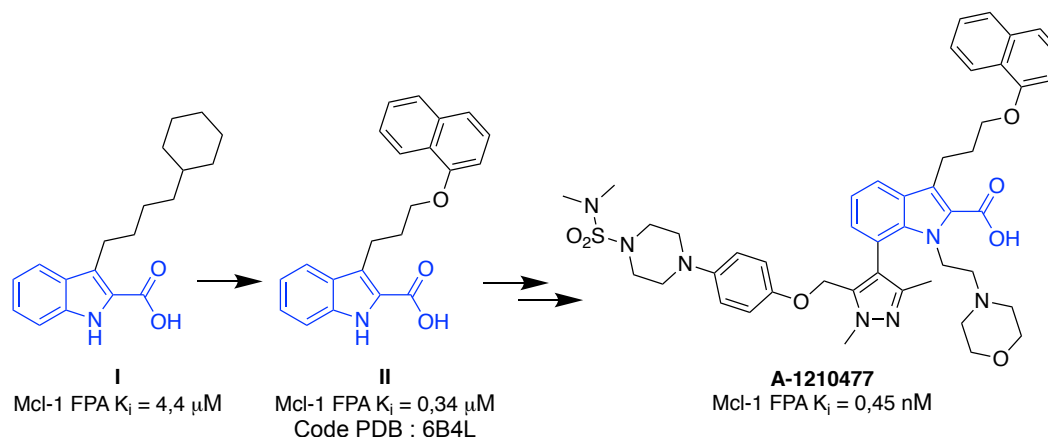


Schéma 2 : La stratégie de SBDD pour découvrir un inhibiteur sélectif de Mcl-1 : A-1210477.

Le dérivé indolique **I** a été premièrement identifié avec une affinité pour Mcl-1 de 4,4 μM . D'autres indoles et hétérocycles sans acide carboxylique ne sont pas ressortis de ce HTS, ce qui a suggéré que cette fonction est critique pour l'affinité. Par conséquent, les auteurs ont retenu ce *scaffold* pour explorer dans un premier temps l'importance du groupement cyclohexylbutyle. La substitution de ce groupement par un 4-(1-naphthoxypropyle) sur la molécule **II** a augmenté de 10 fois l'affinité d'interaction.

Une structure cocrystallisée de **II** avec Mcl-1 a été résolue et a permis d'acquérir des connaissances fondamentales sur l'interaction. La molécule **II** se lie dans le centre de la cavité BH3 de Mcl-1. La formation d'une liaison hydrogène entre le carboxylate et l'Arg263 est observée. Le cœur indolique occupe la poche P2 de la même façon que la chaîne latérale de la Leu_c de Bim et le naphthalène pénètre plus profondément dans la poche P2. L'obtention de ces données structurales par diffraction RX va permettre de rationaliser la conception d'un inhibiteur sélectif de Mcl-1.

⁵⁸Bruncko, M.; Wang, L.; Sheppard, G. S.; Phillips, D. C.; Tahir, S. K.; Xue, J.; Erickson, S.; Fidanze, S.; Fry, E.; Hasvold, L.; Jenkins, G. J.; Jin, S.; Judge, R. A.; Kovar, P. J.; Madar, D.; Nimmer, P.; Park, C.; Petros, A. M.; Rosenberg, S. H.; Smith, M. L.; Song, X.; Sun, C.; Tao, Z.-F.; Wang, X.; Xiao, Y.; Zhang, H.; Tse, C.; Leverson, J. D.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. Structure-Guided Design of a Series of MCL-1 Inhibitors with High Affinity and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (5), 2180–2194.

Une étude de RSA guidée par *Structure-Based* a permis de découvrir A-1210477 avec une affinité pour Mcl-1 10 000 fois supérieure au *hit* I ($K_i = 0,45$ nM). Le naphthalène de A-1210477 s'enfouit profondément dans la poche P2, l'indole occupe la place centrale de la poche P2 tandis que la partie liée à la pipérazine s'allonge dans les poches P3/P4 de Mcl-1.

Cet inhibiteur, mimant le BH3-*only* Bim, est capable de perturber l'IPP Bim/Mcl-1 et d'induire l'apoptose dans des cellules de myélome multiple et dans différentes lignées cellulaires tumorales en combinaison au Navitoclax.⁵⁹ Bien que A-1210477 ne présente pas de propriétés pharmacocinétiques appropriées pour l'utilisation *in vivo*, il est le premier BH3-mimétique conçu rationnellement pour cibler sélectivement Mcl-1 et possédant une activité *in vitro*.

Dans les années 1990, la chimie combinatoire et l'approche HTS ont été couramment exploitées pour l'identification de *lead* dans les industries pharmaceutiques. Dans cette méthode, des millions de molécules sont criblées sur la cible d'intérêt dans l'espoir de trouver un potentiel *hit* avec une activité de l'ordre du μ M. Malgré de nombreux succès provenant de l'approche HTS, des candidats ont échoué en phase préclinique, et ce en partie à cause de leurs propriétés physico-chimiques inadaptées au développement d'un médicament. En effet, les bibliothèques utilisées pour le HTS, composées de molécules à haut poids moléculaire, très souvent lipophiles et de faible solubilité, représentent une limite de cette technique. Ces molécules ne constituent pas un point de départ idéal pour aboutir facilement et rapidement à un candidat médicament. De plus, les chimiothèques utilisées pour ces approches ne représentent qu'une faible partie de l'espace chimique aboutissant ainsi à une incapacité à augmenter le nombre de nouvelles entités chimiques mises sur le marché. Pour ces raisons, de nouvelles approches ont été développées.

⁵⁹Leverson, J. D.; Zhang, H.; Chen, J.; Tahir, S. K.; Phillips, D. C.; Xue, J.; Nimmer, P.; Jin, S.; Smith, M.; Xiao, Y.; Kovar, P.; Tanaka, A.; Bruncko, M.; Sheppard, G. S.; Wang, L.; Gierke, S.; Kategaya, L.; Anderson, D. J.; Wong, C.; Eastham-Anderson, J.; Ludlam, M. J. C.; Sampath, D.; Fairbrother, W. J.; Wertz, I.; Rosenberg, S. H.; Tse, C.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. Potent and Selective Small-Molecule MCL-1 Inhibitors Demonstrate on-Target Cancer Cell Killing Activity as Single Agents and in Combination with ABT-263 (Navitoclax). *Cell Death Dis.* **2015**, 6 (1), 1590–1590.

2. Méthode de Fragment-Based Drug Design (FBDD)

Dans les années 2000, une nouvelle approche a fait son apparition pour la découverte de nouveaux médicaments : l'approche par fragments.^{60,61,62} Cette méthode est basée sur le criblage d'un millier de molécules solubles et possédant un faible poids moléculaire, appelés fragments. Les fragments possèdent une faible affinité avec la cible, de l'ordre du mM. Ces fragments sont ensuite optimisés afin d'augmenter leur affinité et d'obtenir une activité pour la cible.

2.1. Principe de l'approche

- **Naissance de l'approche par fragments**

Le concept de base du FBDD a été introduit il y a plus de 30 ans par Jencks *et al.*⁶³ Ils ont décrit en 1981 que l'affinité globale d'une molécule avec sa cible pouvait être le résultat de la somme de différentes petites parties de la molécule, appelées fragments, reliées entre elles par un *linker*.

C'est en 1996 que le premier exemple expérimental de FBDD, appelé « SAR by NMR », a été publié par Abbott, et concernait la protéine FK506.⁶⁴ Dans cette approche, Fesik *et al.* ont utilisé le criblage par RMN pour mesurer des interactions faibles afin d'identifier des fragments et de déterminer leurs sites d'interaction, ce qui a permis de déterminer comment lier ces fragments.

Depuis, cette approche s'est généralisée à l'ensemble des industries pharmaceutiques, et se développe parallèlement dans les groupes de recherches académiques. Le Zelboraf[®], premier médicament issu de cette approche FBDD a été accepté par la FDA en août 2011. Il s'agit de la molécule vemurafenib (PLX4032), un anticancéreux ciblant la protéine kinase B-Raf (mutation de l'oncogène B-Raf).⁶⁵

⁶⁰Hajduk, P. J.; Greer, J. A Decade of Fragment-Based Drug Design: Strategic Advances and Lessons Learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (3), 211–219.

⁶¹Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty Years on: The Impact of Fragments on Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (9), 605–619.

⁶²Davis, B. J.; Roughley, S. D. Fragment-Based Lead Discovery. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2017**, *50*, 371–439.

⁶³Jencks, W. P. On the Attribution and Additivity of Binding Energies. *Biochemistry* **1981**, *78* (7), 4046–4050.

⁶⁴Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, *274* (5292), 1531–1534.

⁶⁵Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: The First Drug Approved for BRAF-Mutant Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (11), 873–886.

- **Définition d'un fragment**

Acteur principal de cette approche, le fragment doit présenter des propriétés physico-chimiques bien définies.

Un fragment est une entité de faible poids moléculaire, soluble et respectant la règle de 3,⁶⁶ par analogie à la règle de 5 de Lipinski.⁶⁷ Les règles de Lipinski ont été écrites pour prédire si les propriétés physico-chimiques d'une molécule sont assez bonnes pour que celle-ci devienne un médicament présentant notamment une bonne biodisponibilité par voie orale. Les critères de la règle de 3, émise par Congreve *et al.*, sont rapportés dans le Tableau 4. Les règles de Lipinski, communément utilisées dans l'approche HTS, y sont également comparées.

	Mw (g.mol⁻¹)	H Accepteurs	H Donneurs	clogP	PSA (Å²)	Liaisons rotatives
Règle de 3	< 300	≤ 3	≤ 3	≤ 3	< 60	≤ 3
Règle de 5	< 500	≤ 10	≤ 5	≤ 5	< 140	≤ 10

Tableau 4 : Définition d'un fragment selon la règle de 3 et comparaison avec la règle de 5.

Selon ces critères, un fragment est défini comme une entité de masse moléculaire inférieure à 300 g.mol⁻¹, ayant un coefficient de partage octanol/eau logP inférieur ou égal à 3, et un nombre de donneurs ainsi que d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur ou égal à 3. D'autres paramètres physicochimiques ont aussi été proposés par la suite, tels que la surface polaire des molécules (PSA) et le nombre de liaisons rotatives.

- **Les grandes étapes de l'approche par fragments**

Les trois étapes de l'approche par fragments sont (Figure 14) :^{46,68}

- 1) La conception d'une librairie de fragments.
- 2) Le criblage sur une cible thérapeutique, l'identification et la sélection de fragments *hits*.
- 3) L'optimisation des fragments *hits* en molécules *lead*.

⁶⁶Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A "Rule of Three" for Fragment-Based Lead Discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, 8 (19), 876–877.

⁶⁷Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46 (1–3), 3–26.

⁶⁸Rees, D. C.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Carr, R. Fragment-Based Lead Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (8), 660–672.

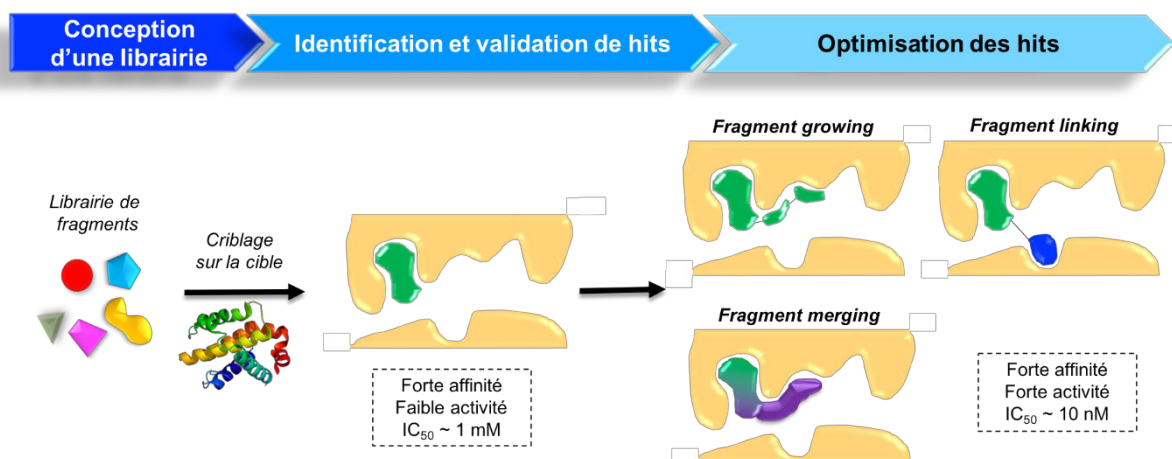


Figure 14 : Les trois grandes étapes de l'approche par fragments.

La chimiothèque de fragments peut être issue de librairies commerciales ou de librairies « maisons ». Au sein de notre laboratoire, nous avons une chimiothèque de plus de 19 000 molécules qui participent à la collection de la chimiothèque nationale. Ces molécules peuvent participer à la conception d'une chimiothèque de fragments. En outre, la librairie de fragments peut être conçue par le laboratoire pour répondre aux critères d'une cible d'intérêt.

Les outils de criblage doivent être suffisamment sensibles pour détecter des affinités de l'ordre de 0,1–10 mM.⁶⁹ Pour détecter l'interaction, des méthodes de criblage telles que le TSA et la FPA sont utilisées. D'autres techniques biophysiques comme la RMN et la diffraction des RX sont également très couramment utilisées et permettent d'obtenir des données structurales sur le mode de fixation et ainsi faciliter le développement d'une molécule *lead*. Depuis quelques années, les techniques *in silico* sont plus sophistiquées et disponibles.⁷⁰ Le *docking* peut être utilisé de différentes façons : déterminer le mode de fixation d'un *hit* validé en l'absence de données structurales mais aussi être utilisé pour un criblage virtuel.

Les fragments *hits* identifiés et sélectionnés sont alors optimisés selon différentes stratégies. Les trois principales approches pour augmenter l'activité des fragments sont *fragment merging*, *fragment linking* et *fragment growing* (Figure 14).⁶⁸

La stratégie *fragment merging* est la fusion de deux fragments entre eux. Cette stratégie est adéquate lorsque deux fragments se chevauchent dans le site d'interaction.

⁶⁹Johnson, C. N.; Erlanson, D. A.; Jahnke, W.; Mortenson, P. N.; Rees, D. C. Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2016. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (5), 1774–1784.

⁷⁰Murray, C. W.; Blundell, T. L. Structural Biology in Fragment-Based Drug Design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20 (4), 497–507.

Le *fragment growing* est l'approche la plus utilisée. Elle consiste à ajouter des groupements fonctionnels sur le fragment *hit* identifié afin d'améliorer son activité. Le vemurafenib a été découvert par cette approche.

La dernière stratégie, très répandue également, est le *fragment linking*. Elle consiste à relier par un *linker* des fragments *hits* entre eux, se liant dans deux sites distincts et adjacents de la cible. C'est par cette technique que l'ABT-737 et son analogue orodisponible, l'ABT-263 ont été découverts.

2.2. Découverte d'un inhibiteur des protéines Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, le Navitoclax (ABT-263)

La découverte du Navitoclax, inhibiteur des protéines Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, issue du *Fragment-Based Drug Design* va être présentée ci-dessous.^{71,72}

Un criblage HTS des composés d'Abbott sur la protéine Bcl-x_L a été réalisé par FPA. A partir d'une librairie de plus de 100 000 molécules, 6 composés sont ressortis du criblage avec une CI₅₀ inférieure à 10 µM. Malheureusement, tous ces *hits* ont un haut poids moléculaire et sont lipophiles, même ceux comportant un acide carboxylique dans leur structure. Corrélié à cela, leur affinité de liaison est très faible. L'obtention de structures RMN permettant d'obtenir des informations sur le mode de liaison a échoué. Il est probable que ces molécules ne se lient pas dans le site d'interaction mais agrègent ou dénaturent la protéine.

Une démarche alternative, le *Fragment-Based Drug Design*, a été mise en place.⁷³ Les interactions protéine-protéine sont très difficiles à cibler à cause de leur large surface d'interaction. Les fragments, de faibles poids moléculaires, ont pour avantage de se lier plus profondément aux *hot-spots* de la protéine.

Pour rappel, les *hot-spots* de Bcl-x_L ont été déterminés par une étude de mutation. Cette étude a mis en évidence l'importance de quatre poches hydrophobes (P1–P4) et une Arg_c. Les deux poches les plus essentielles à l'interaction sont la poche P2 et ensuite la poche P4. Le pont salin entre un Asp_c des BH3-*only* et l'Arg139 de Bcl-x_L est également primordial.

⁷¹Wendt, M. D. Discovery of ABT-263, a Bcl-Family Protein Inhibitor: Observations on Targeting a Large Protein-Protein Interaction. *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**, 3 (9), 1123–1143.

⁷²Wendt, M. D. The Discovery of Navitoclax, a Bcl-2 Family Inhibitor; Springer, Berlin, Heidelberg, **2012**, 231–258.

⁷³Coyne, A. G.; Scott, D. E.; Abell, C. Drugging Challenging Targets Using Fragment-Based Approaches. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14 (3), 299–307.

Sur Bcl-x_L, un criblage par RMN d'une chimiothèque de 10 000 fragments avec un poids moléculaire moyen de 210 g.mol⁻¹ a permis de découvrir un premier fragment : l'acide fluorobiphényle **III** (Schéma 3).

L'acide carboxylique de **III** joue un rôle important pour l'affinité puisqu'il interagit avec l'Arg139 de Bcl-x_L. La constante K_d est de 0,3 mM. Un second criblage de 3 500 composés de poids moléculaire moyen de 125 g.mol⁻¹, en présence du fragment **III**, a permis de mettre en évidence un second fragment, le tétrahydronaphthole **IV**. Son affinité est de 4,3 mM. Le complexe des fragments **III** et **IV** dans Bcl-x_L obtenu par RMN a permis d'identifier les deux sites de fixation. Il s'avère que les sites sont les poches P2 et P4, correspondant aux deux *hot-spots* hydrophobes majeurs identifiés précédemment. Ces fragments constituent un point de départ encourageant pour la conception d'un *lead*.⁷⁴

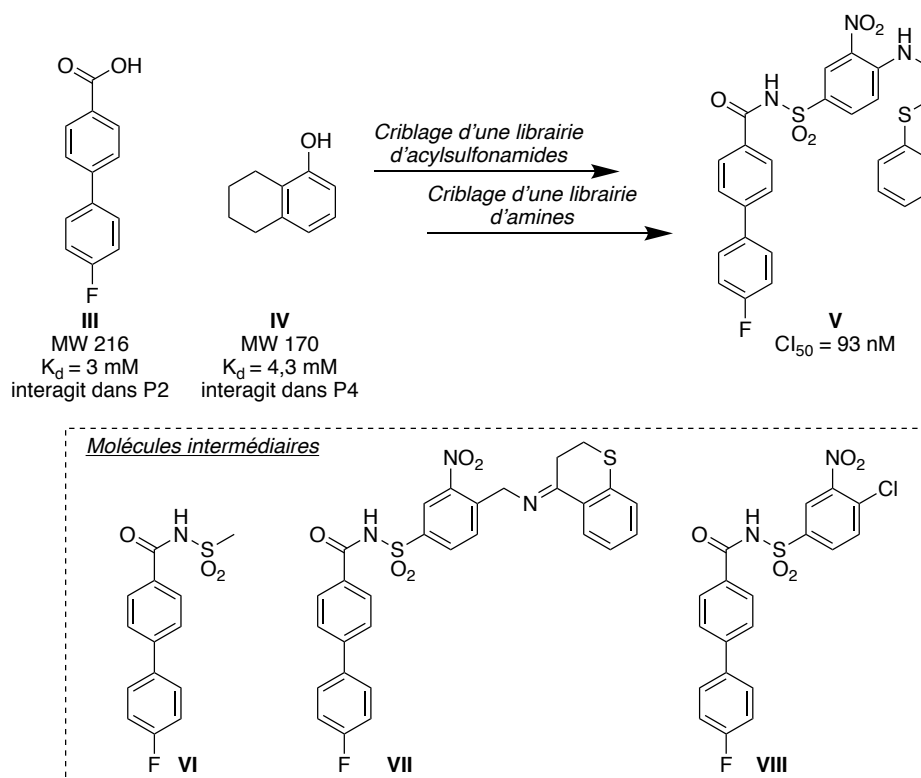


Schéma 3 : Fragments *hits* **III** et **IV** identifiés par criblage de bibliothèques de fragments et composé *lead* **V**.

⁷⁴Petros, A. M.; Dinges, J.; Augeri, D. J.; Baumeister, S. A.; Betebenner, D. A.; Bures, M. G.; Elmore, S. W.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Landis, S. K.; Nettlesheim, D. G.; Rosenberg, S. H.; Shen, W.; Thomas, S.; Wang, X.; Zanze, I.; Zhang, H.; Fesik, S. W. Discovery of a Potent Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-x_L from NMR and Parallel Synthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (2), 656–663.

Pour améliorer l'affinité de ces fragments, il est nécessaire de les lier entre eux. Cependant, tous les efforts mis en place pour lier ces fragments, en utilisant une grande variété de *linkers* connectés en *ortho* de l'acide benzoïque **III**, ont échoué. La chaîne latérale de la Phe97 force le *linker* à prendre une trajectoire défavorable pour atteindre le second site P4.

En tant que bioisostère de l'acide carboxylique, l'acysulfonamide **VI**, analogue de **III**, a une affinité comparable au fragment **III**. L'avantage de ce groupement est que, en plus de permettre une interaction électrostatique clé avec l'Arg139, il peut jouer le rôle de *linker*. Il propose un « chemin » vers la poche P4 différent des précédents *linkers*, qui ne semble pas être bloqué par la chaîne latérale de la Phe97.

Les deux criblages suivants ont permis d'isoler la molécule *lead* **V**. La première librairie a été conçue à partir du composé **III** et d'une variété de sulfonamides, préparés par synthèse parallèle dirigée, et présente un total de 120 nouveaux acysulfonamides. Le composé **VII** résultant, plus efficace que tous les composés précédemment conçus pour lier **III** et **IV**, présente une hydrazone. Cependant, aucune analyse structurale n'a permis de mettre en évidence l'interaction entre cette hydrazone et la protéine. Le groupement nitroaryle occupe une partie de la poche P4. Il siège entre la Phe97 et la Tyr94, formant ainsi un arrangement hydrophobe en π -*stacking*. Le criblage d'une deuxième librairie de 125 composés, conçus en faisant réagir la molécule **VIII** avec une centaine d'amines, a permis d'identifier la molécule **V**, avec une CI_{50} de 0,093 μ M.

Une structure RMN de la molécule **V** liée à Bcl-x_L montre que sa structure s'étend sur la longueur du site d'interaction BH3 de Bcl-x_L (Figure 15).

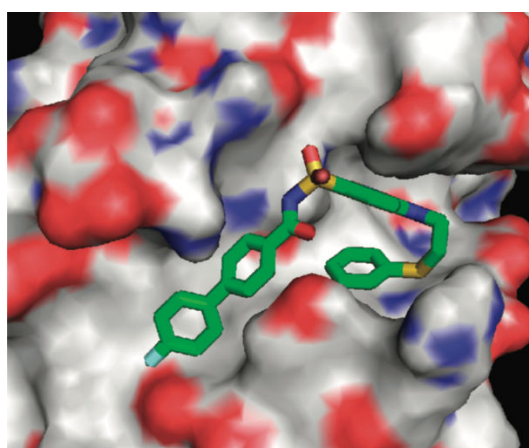


Figure 15 : Structure RMN du *lead* **V** dans Bcl-x_L.

L'acylsulfonamide pousse le groupement biphényle en dehors de la poche P2. De plus, l'acylsulfonamide est loin de l'Arg139 comparé à l'acide carboxylique du fragment **III**, empêchant un pont salin de se former. Un π -stacking se forme entre le nitrophényle et le thiophényle, occupant la poche P4.

Bien que la molécule **V** se lie à Bcl-x_L avec un K_i de 36 nM (obtenu par FPA), le même test réalisé avec 1 % d'albumine du sérum humain a pour conséquence de diminuer de 69 fois la valeur de l'affinité.

L'albumine, protéine abondante dans le sérum humain, possède trois domaines d'homologie (I, II et III). Le domaine III de l'albumine est connu pour se lier aux acides gras à chaîne moyenne/longue et a une grande affinité pour les petits composés aromatiques anioniques. Si un *lead* se lie à l'albumine, il présentera une activité nettement réduite *in vivo* par rapport à son efficacité *in vitro*. Il est donc important de prendre en compte cette interaction avec l'albumine pour développer des inhibiteurs puissants *in vivo*.

Pour parer la chute d'affinité pour Bcl-x_L, l'étude des structures RMN des complexes **V**/Bcl-x_L et d'un analogue du composé **V**/HSA-III (domain III of Human Serum Albumin) a permis d'identifier deux sites de modifications de la molécule **V** pour diminuer l'affinité pour HSA-III tout en maintenant l'affinité pour Bcl-x_L.⁷⁵

⁷⁵Mao, H.; Hajduk, P. J.; Craig, R.; Bell, R.; Borre, T.; Fesik, S. W. Rational Design of Diflunisal Analogues with Reduced Affinity for Human Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (43), 10429–10435.

Une approche par *Structure-Based Drug Design* a permis de concevoir l'ABT-737, inhibiteur sélectif de Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w ($K_i < 1$ nM) (Figure 16).^{76,77}

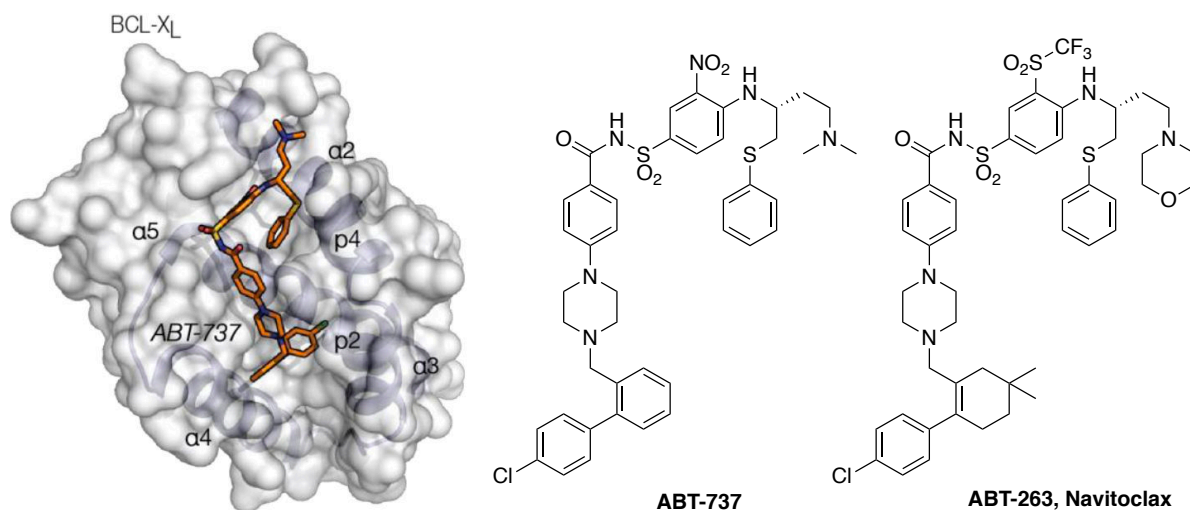


Figure 16 : Complexe de l'ABT-737 et Bcl-x_L ; Structures de l'ABT-737 et de son analogue orobiodisponible, le Navitoclax.¹³

Pour améliorer la biodisponibilité par voie orale de l'ABT-737, l'optimisation des propriétés pharmacocinétiques a été menée afin de concevoir l'ABT-263, appelé Navitoclax.^{78,79} Cette molécule a été conduite en essai clinique jusqu'en phase II, mais cet essai a été interrompu.

⁷⁶Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettlesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H. An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Induces Regression of Solid Tumours. *Nature* **2005**, 435 (7042), 677–681.

⁷⁷Wendt, M. D.; Shen, W.; Kunzer, A.; McClellan, W. J.; Bruncko, M.; Oost, T. K.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Zhang, H.; Nimmer, P. M.; Ng, S.-C.; Shoemaker, A. R.; Petros, A. M.; Oleksijew, A.; Marsh, K.; Bauch, J.; Oltersdorf, T.; Belli, B. A.; Martineau, D.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. Discovery and Structure-Activity Relationship of Antagonists of B-Cell Lymphoma 2 Family Proteins with Chemopotential Activity in Vitro and in Vivo. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (3), 1165–1181.

⁷⁸Park, C.-M.; Bruncko, M.; Adickes, J.; Bauch, J.; Ding, H.; Kunzer, A.; Marsh, K. C.; Nimmer, P.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (21), 6902–6915.

⁷⁹Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S. K.; Xiao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **2008**, 68 (9), 3421–3428.

Cette approche a été reprise pour la conception d'autres molécules de la même famille, comme le Vénétoclax, inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-2 (Figure 17).⁸⁰

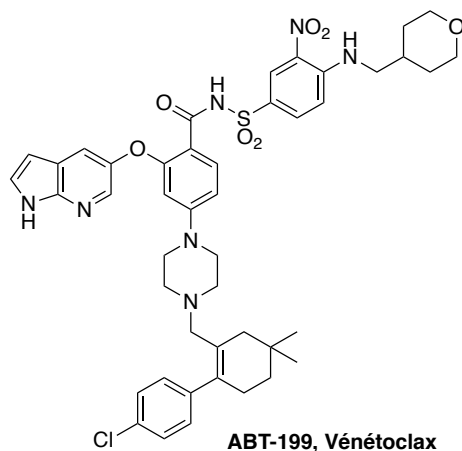


Figure 17 : Structure du Vénétoclax.

Le Vénétoclax a été approuvé pour la première fois par la FDA en avril 2016 pour le traitement de leucémie lymphoïde chronique (LLC) avec délétion d'un fragment du chromosome 17p.⁸¹ Ces indications ont à ce jour été étendues à l'ensemble des LLC.

⁸⁰Souers, A. J.; Levenson, J. D.; Boghaert, E. R.; Ackler, S. L.; Catron, N. D.; Chen, J.; Dayton, B. D.; Ding, H.; Enschede, S. H.; Fairbrother, W. J.; Huang, D. C. S.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Khaw, S. L.; Kovar, P. J.; Lam, L. T.; Lee, J.; Maecker, H. L.; Marsh, K. C.; Mason, K. D.; Mitten, M. J.; Nimmer, P. M.; Oleksijew, A.; Park, C. H.; Park, C.-M.; Phillips, D. C.; Roberts, A. W.; Sampath, D.; Seymour, J. F.; Smith, M. L.; Sullivan, G. M.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wendt, M. D.; Xiao, Y.; Xue, J. C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R. A.; Rosenberg, S. H. Elmore, S. W. ABT-199, a Potent and Selective BCL-2 Inhibitor, Achieves Antitumor Activity While Sparing Platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19* (2), 202–208.

⁸¹<https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm495351.htm> (consulté le 12/09/2018).

V. Inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L

1. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Mcl-1

Aujourd'hui, de nombreuses équipes de recherche académiques et industrielles ont focalisé leurs efforts sur la découverte d'inhibiteurs sélectifs de Mcl-1. Différentes approches telles que le *Fragment-Based Drug Design* et le *Structure-Based Drug Design* pour découvrir des petites molécules, ou encore les composés peptido-mimétiques et les molécules naturelles peuvent être le point de départ de la conception d'un puissant inhibiteur. Au cours des dernières années, de nombreuses revues ont recensé ces inhibiteurs.^{82,83,84} Dans ce manuscrit, je présenterai uniquement les travaux concernant les inhibiteurs de la littérature qui m'ont guidée dans la mise en oeuvre de ce projet.

1.1. Groupe de Fesik

Pionnier de l'approche par fragments, le groupe dirigé par le Professeur Fesik à l'université de Vanderbilt (USA) met en oeuvre un criblage par RMN d'une librairie de fragments suivi par un *Structure-Based Drug Design* pour générer un puissant inhibiteur de Mcl-1.⁸⁵ Ces fragments ont été séparés en deux classes (Schéma 4).

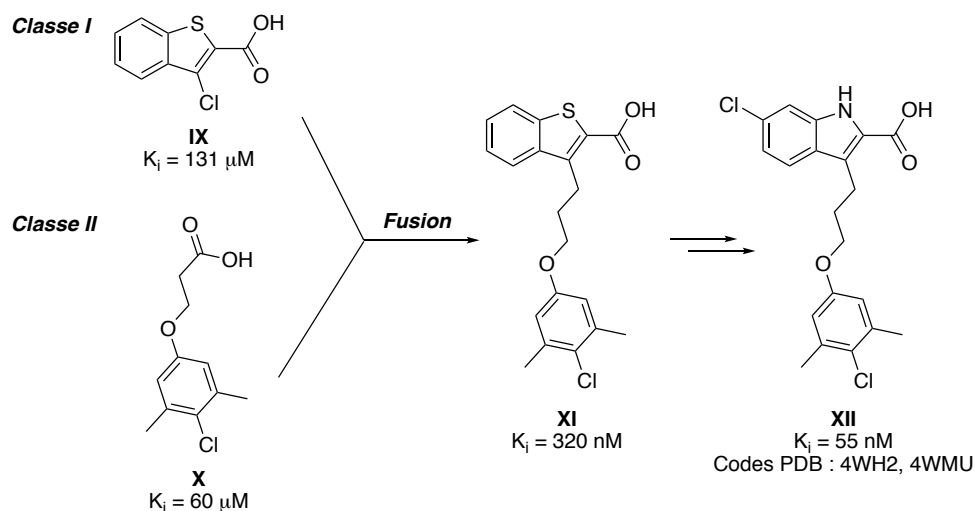


Schéma 4 : Découverte d'un inhibiteur de Mcl-1 par FBDD et SBDD.

⁸²Belmar, J.; Fesik, S. W. Small Molecule Mcl-1 Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *145*, 76–84.

⁸³Beekman, A. M.; Howell, L. A. Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. *ChemMedChem* **2016**, *11* (8), 802–813.

⁸⁴Yap, J. L.; Chen, L.; Lanning, M. E.; Fletcher, S. Expanding the Cancer Arsenal with Targeted Therapies: Disarmament of the Antiapoptotic Bcl-2 Proteins by Small Molecules. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 821–838.

⁸⁵Friberg, A.; Vigil, D.; Zhao, B.; Daniels, R. N.; Burke, J. P.; Garcia-Barrantes, P. M.; Camper, D.; Chauder, B. A.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of Potent Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (1), 15–30.

La *classe I* est constituée de fragments comportant un acide carboxylique sur une entité hétérocyclique, comprenant le fragment **IX** qui se lie à Mcl-1 avec une affinité de 131 μ M (K_i mesuré par FPA). La *classe II* rassemble les fragments composés d'un cycle aromatique lié à un groupement polaire, comme un acide carboxylique. Le fragment **X** en est l'illustration avec une constante d'affinité de 60 μ M.

Grâce aux expériences RMN qui ont guidé les études de modélisation moléculaire, Fesik et collaborateurs ont déduit que les composés de la *classe I* se liaient à Mcl-1 près de l'Arg263, qui est engagée dans un pont salin avec le carboxylate des fragments. De plus, il est apparu que le groupe aromatique des composés de la *classe II* occupait la poche P2 de Mcl-1 et que l'acide carboxylique était également proche de l'Arg263. Avec ces données en main, les fragments des deux classes ont été fusionnés (stratégie de FBDD pour obtenir une molécule plus affine pour la cible) conduisant à la molécule **XI**. La molécule **XI** a un K_i de 320 nM, ce qui représente une amélioration d'un facteur 200 comparé au fragment **X**. Une étude de RSA guidée par les données structurales a ensuite été menée et le composé **XII** en est ressorti avec un K_i de 55 nM. On peut trouver la molécule **XII** cristallisée dans Mcl-1 sous les codes PDB 4HW2 ($R = 2,8 \text{ \AA}$) et 4WMU ($R = 1,55 \text{ \AA}$), ce dernier est obtenu en présence de MBP (*Maltose Binding Protein*) et a été déposé par Clifton *et al.*⁸⁶

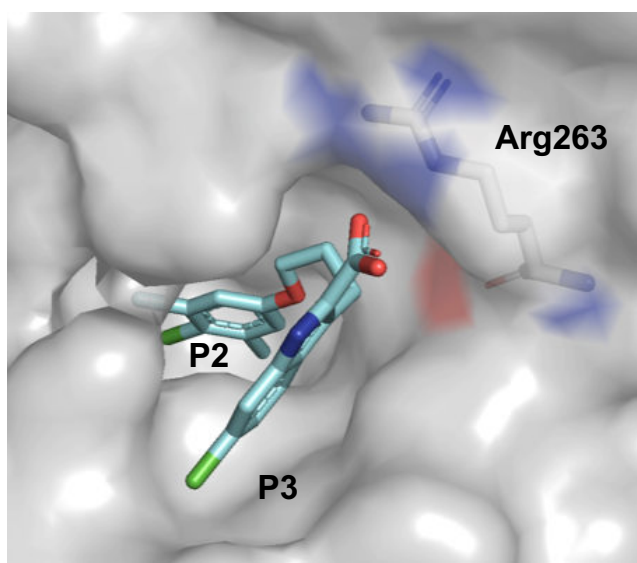


Figure 18 : Composé **XII** dans la protéine Mcl-1 (Code PDB : 4WMU).

⁸⁶Clifton, M. C.; Dranow, D. M.; Leed, A.; Fulroth, B.; Fairman, J. W.; Abendroth, J.; Atkins, K. A.; Wallace, E.; Fan, D.; Xu, G.; Ni, Z. J.; Daniels, D.; Van Drie, J.; Wei, G.; Burgin, A. B.; Golub, T. R. Hubbard, B. K.; Serrano-Wu, M. H. A Maltose-Binding Protein Fusion Construct Yields a Robust Crystallography Platform for MCL1. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0125010.

Dans le but de guider le *design* d'analogues qui pourraient, en plus d'occuper la poche P2, se lier dans la poche P4 de Mcl-1, Fesik *et al.* ont conduit un criblage par RMN de plus de 13 000 fragments, en saturant préalablement la poche P2 avec l'inhibiteur **XII**.⁸⁷ Plusieurs fragments ont été identifiés se liant à Mcl-1 en présence de **XII** avec des affinités de l'ordre du mM. Afin de lier ces nouveaux fragments avec le composé **XII**, la possibilité de remplacer l'acide carboxylique de **XII** par un acylsulfonamide (molécule **XIII**) a été explorée, ce qui introduirait un *linker* potentiel pour relier un autre fragment occupant la poche P4 (Figure 19).

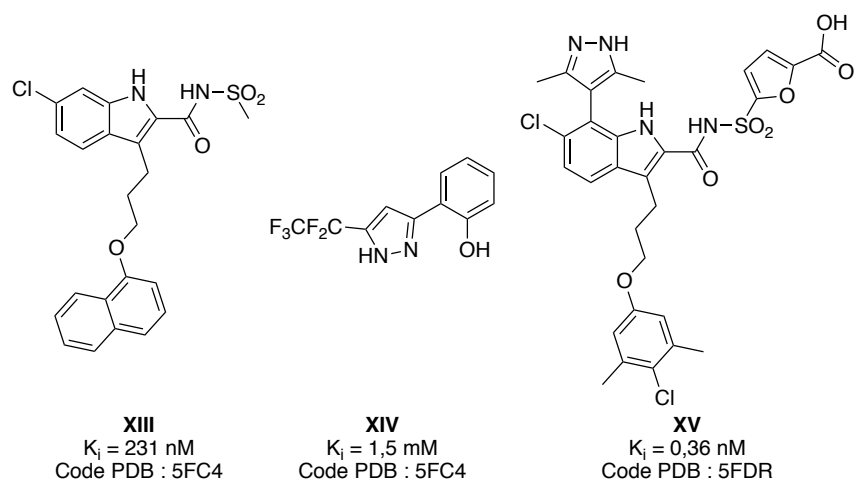


Figure 19 : Exploration des poches P2 et P4 de Mcl-1.

Le complexe de la molécule **XIII** en présence du fragment **XIV** avec Mcl-1 a été résolu (code PDB : 5FC4). Puis, une étude de RSA a permis de mettre en évidence des inhibiteurs puissants de Mcl-1 dont le composé **XV**, qui a également été cocrystallisé avec Mcl-1 (code PDB : 5FDR).

Jusqu'alors, ces composés et analogues, bien qu'ayant des affinités de l'ordre du subnanomolaire, ne sont pas actifs *in vitro*. De plus, ces composés présentent des paramètres pharmacocinétiques non optimaux.

⁸⁷Pelz, N. F.; Bian, Z.; Zhao, B.; Shaw, S.; Tarr, J. C.; Belmar, J.; Gregg, C.; Camper, D. V.; Goodwin, C. M.; Arnold, A. L.; Sensintaffar, J. L.; Friberg, A.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of 2-Indole-Acylsulfonamide Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (5), 2054–2066.

Très récemment, Fesik *et al.* ont publié une étude présentant l'optimisation de dérivés indoliques tricycliques en utilisant des stratégies de FBDD et de SBDD (Figure 20).^{88,89}

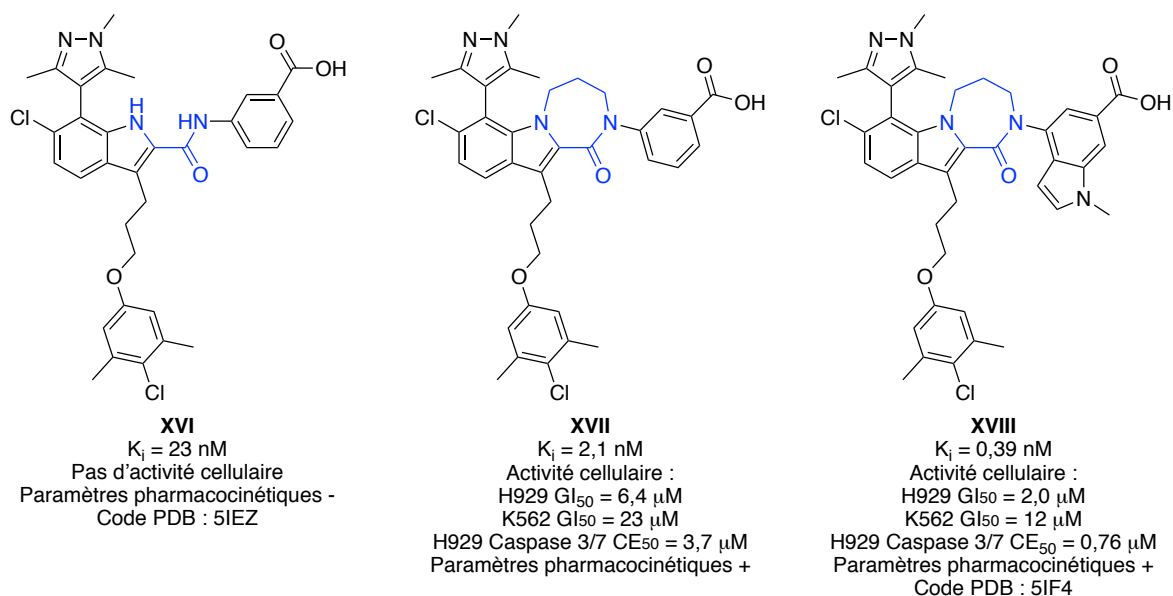


Figure 20 : Optimisation des composés en dérivés indoles tricycliques.

Les paramètres pharmacocinétiques des composés **XVII** et **XVIII** ont été améliorés par rapport à la molécule **XVI**. Concernant l'activité cellulaire,^{89,90} l'activité antiproliférative des composés a été évaluée sur les cellules H929, provenant d'une lignée cellulaire Mcl-1 dépendante du myélome multiple. Les cellules K562, issues d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique, pourraient être résistantes aux inhibiteurs de Mcl-1 et utilisées comme contrôle négatif pour évaluer la toxicité hors cible. La molécule **XVI** ne présente pas d'activité cellulaire. La molécule **XVII** a une GI_{50} (*Growth Inhibition 50%*) de $6,4 \text{ }\mu\text{M}$ sur H929 et une GI_{50} de $23 \text{ }\mu\text{M}$ sur K562. Le composé **XVIII** présente une meilleure activité cellulaire avec une GI_{50} de $2,0 \text{ }\mu\text{M}$ sur H929 et ne semble pas toxique ($GI_{50} = 12 \text{ }\mu\text{M}$ sur K562). Pour confirmer le mécanisme de la voie apoptotique, la capacité des composés à induire l'activation des caspases a également été testée dans les cellules K562. Les composés **XVII** et **XVIII** ont induit cette activation avec, respectivement des CE_{50} (Concentration Efficace) de $3,7$ et $0,76 \text{ }\mu\text{M}$.

⁸⁸Burke, J. P.; Bian, Z.; Shaw, S.; Zhao, B.; Goodwin, C. M.; Belmar, J.; Browning, C. F.; Vigil, D.; Friberg, A.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of Tricyclic Indoles That Potently Inhibit Mcl-1 Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3794–3805.

⁸⁹Shaw, S.; Bian, Z.; Zhao, B.; Tarr, J. C.; Veerasamy, N.; Jeon, K. O.; Belmar, J.; Arnold, A. L.; Fogarty, S. A.; Perry, E.; Sensintaffar, J. L.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Optimization of Potent and Selective Tricyclic Indole Diazepinone Myeloid Cell Leukemia-1 Inhibitors Using Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2410–2421.

⁹⁰Lee, T.; Bian, Z.; Zhao, B.; Hogdal, L. J.; Sensintaffar, J. L.; Goodwin, C. M.; Belmar, J.; Shaw, S.; Tarr, J. C.; Veerasamy, N.; Matulis, S. M.; Koss, B.; Fischer, M. A.; Arnold, A. L.; Camper, D. V.; Browning, C. F.; Rossanese, O. W.; Budhraj, A.; Opferman, J.; Boise, L. H.; Savona, M. R.; Letai, A.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery and Biological Characterization of Potent Myeloid Cell Leukemia-1 Inhibitors. *FEBS Lett.* **2017**, *591* (1), 240–251.

En septembre 2018, Savona *et al.* ont publié une étude décrivant la découverte d'un nouvel inhibiteur puissant et sélectif de la protéine Mcl-1, nommé VU661013.⁹¹

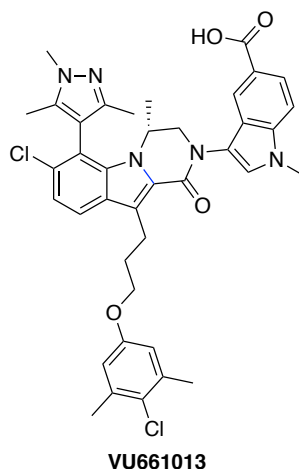


Figure 21 : Structure du composé VU661013.

Ce composé rompt le complexe Bim/Mcl-1, ce qui induit l'apoptose dans les cellules de leucémie myéloïde aigüe (AML). VU661013 a été associé au Vénétoclax pour obtenir une action synergique dans les modèles murins de leucémie AML. Un génotypage/phénotypage identifiant les patients sensibles aux agents ciblant le domaine BH3 et des tests de sensibilité aux médicaments *ex vivo* ont permis de prédire avec précision les réponses cellulaires aux inhibiteurs sélectifs de Mcl-1 ou Bcl-2. Dans ce travail, il a été montré l'intérêt de la combinaison VU661013/Vénétoclax.

Ces nouvelles découvertes suggèrent l'intérêt majeur d'appliquer une stratégie thérapeutique rationnelle et ciblée en utilisant des inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 dans les essais cliniques.

⁹¹Ramsey, H. E.; Fischer, M. A.; Lee, T.; Gorska, A. E.; Arrate, M. P.; Fuller, L.; Boyd, K. L.; Strickland, S. A.; Sensintaffar, J.; Hogdal, L. J.; Ayers, G. D.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W.; Savona, M. R. A Novel MCL-1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* **2018**. DOI: 10.1158/2159-8290.

1.2. Groupe de Voisin-Chiret et Poulain

Notre laboratoire étudie depuis plusieurs années la conception de mimes de forme des structures secondaires de protéines, plus précisément de mimes de forme de brins β ⁹² et d'hélices α .^{93,94}

Dans le but de découvrir un inhibiteur de Mcl-1, la stratégie est de mimer la forme de l'hélice α du domaine BH3 des membres pro-apoptotiques par une petite molécule non peptidique.

Pour ce faire, un *scaffold* quaterpyridine peut être utilisé comme plateforme. En effet, une quaterpyridine comparée à un quaterbenzène est plus rigide et permettra de limiter les variations d'orientation des substituants. L'orientation des substituants est due à l'angle de torsion entre les plans des hétérocycles. Cet angle est influencé par les interactions entre les orbitales π des cycles aromatiques et par la répulsion stérique entre les hydrogènes en position *ortho* de l'azote des pyridines et les substituants. Ces substituants sont alors projetés dans une direction précise qui mimera la distribution des chaînes latérales d'une hélice α .

Il a donc été construit une chimiothèque d'oligopyridines. Ces oligopyridines ont été conçues avec comme objectif de mimer l'hélice α du peptide Noxa, BH3-*only* qui interagit sélectivement avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1. L'évaluation biologique de la potentielle activité pro-apoptotique de ces oligopyridines a été menée et a conduit à la découverte du Pyridoclax en 2015 (Figure 22).^{95,96}

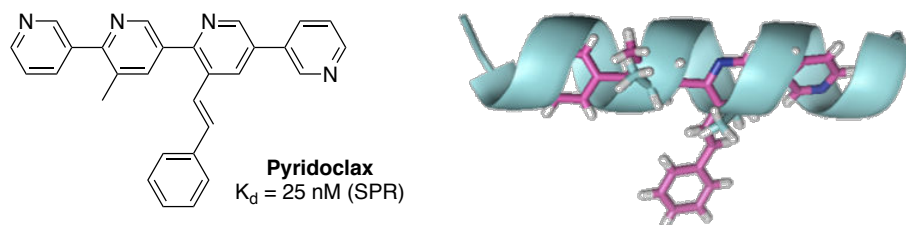


Figure 22 : Structure du Pyridoclax et sa superposition avec une hélice α de polyalanines.

⁹²Jouanne, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Legay, R.; Coufourier, S.; Rault, S.; Sopkova-de Oliveira Santos, J. β -Strand Mimicry: Exploring Oligothiopyridine Foldamers. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (34), 5686–5696.

⁹³Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Voisin-Chiret, A. S.; Burzicki, G.; Sebaoun, L.; Sebban, M.; Lohier, J.-F.; Legay, R.; Oulyadi, H.; Bureau, R.; Rault, S. Structural Characterizations of Oligopyridyl Foldamers, α -Helix Mimetics. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52 (2), 429–439.

⁹⁴Perato, S.; Fogha, J.; Sebban, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Oulyadi, H.; Rault, S. Conformation Control of Abiotic α -Helical Foldamers. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (10), 2671–2680.

⁹⁵Gloaguen, C.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Fogha, J.; Gautier, F.; De Giorgi, M.; Burzicki, G.; Perato, S.; Pétigny-Lechartier, C.; Simonin-Le Jeune, K.; Brotin, E.; Goux, D.; N'Diaye, M.; Lambert, B.; Louis, M.-H.; Ligat, L.; Lopez, F.; Juin, P.; Bureau, R.; Rault, S.; Poulain, L. First Evidence That Oligopyridines, α -Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-x_L-Targeting Strategies. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (4), 1644–1668.

⁹⁶Poulain, L.; Voisin-Chiret, A.S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Bureau, R.; Burzicki, G.; De Giorgi, M.; Perato, S.; Fogha, J.; Rault, S.; Juin, P.; Gautier, F. Mcl-1 modulating compounds for cancer treatment. **2014**. Numéro de dépôt : EP14305309.8.

Le Pyridoclax est un mime du BH3-only Noxa et inhibiteur sélectif de Mcl-1. Cette quaterpyridine est substituée par un groupement méthyle et un styryle, qui miment les chaînes latérales des acides aminés respectivement aux positions *i*+4 et *i*+7 d'une hélice α . Le styryle a été choisi comme substituant pour mimer la phénylalanine en position *i*+7 de Noxa, dans le but d'apporter de la sélectivité pour Mcl-1.

Une étude de RSA a été conduite pour mettre en évidence les éléments essentiels de la structure du Pyridoclax pour son activité pro-apoptotique (Figure 23).

Pyridoclax, inhibiteur sélectif de Mcl-1

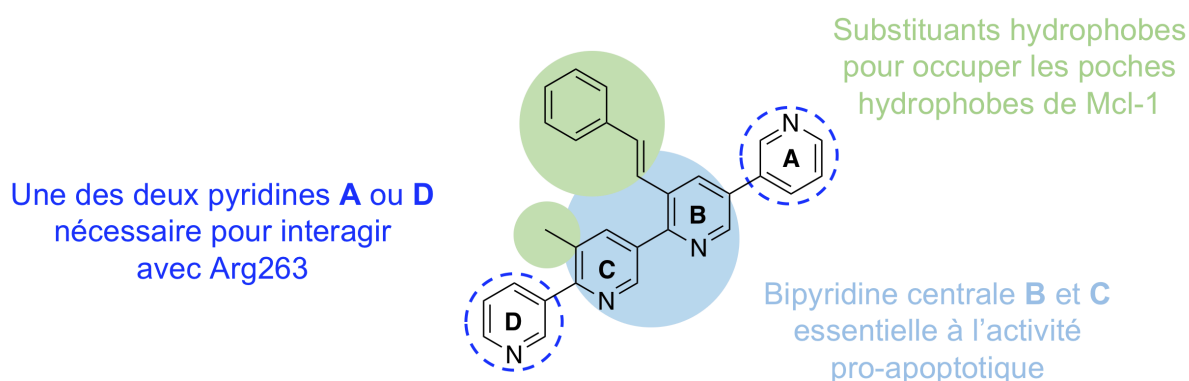


Figure 23 : Les relations structure-activité du Pyridoclax.⁹⁵

Il a été identifié que la présence du styryle et du méthyle en position 5 est cruciale pour l'activité pro-apoptotique. Remplacer le styryle par un groupement hydrophobe moins volumineux, comme un méthyle, fait chuter l'activité. Également, en l'absence du méthyle sur la pyridine **C**, l'activité pro-apoptotique n'est plus observée. A chaque extrémité du composé se trouve une pyridine (**A** et **D**), avec l'azote en *mé*ta de la liaison de jonction. Si les pyridines **A** et **D** sont remplacées par un benzène, l'activité chute. Cependant, si uniquement l'une des deux pyridines (**A** ou **D**) est substituée par un benzène, l'activité est conservée. Nous avons émis l'hypothèse que la pyridine **A** ou **D**, par l'intermédiaire de l'azote, interagirait avec l'Arg263.

Bien que le Pyridoclax soit prometteur quant à son inhibition sélective de Mcl-1, il possède des propriétés physico-chimiques non optimales, notamment pour ce qui est de la solubilité. C'est pourquoi un sel de chlorhydrate du Pyridoclax a été synthétisé. Il s'avère que ce sel conserve la même activité pro-apoptotique que le Pyridoclax sous sa forme neutre. Des études *in vivo* chez les souris xénogreffées sont en cours à l'heure actuelle.⁹⁷

⁹⁷Résultats non publiés.

1.3. Inhibiteurs en cours d'évaluation clinique

Cibler les protéines de la famille Bcl-2 se révèle être un véritable challenge. La forte affinité d'interaction entre les membres de cette famille et la large surface d'interaction rendent difficiles la conception d'une petite molécule capable de perturber ces IPPs. Malgré ces difficultés, les laboratoires Servier-Vernalis ont publié en 2016 le premier inhibiteur sélectif de Mcl-1 ayant une activité *in vivo* (Figure 24).⁹⁸

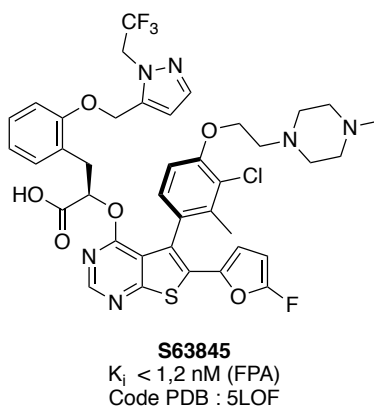


Figure 24 : S63845, premier inhibiteur sélectif de Mcl-1 ayant une activité *in vivo*.

S63845, en agent seul, a une remarquable activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses connues pour être dépendantes à Mcl-1, tout en épargnant les tissus sains à la dose efficace. Cette molécule est efficace pour de nombreuses applications thérapeutiques comme le myélome multiple, les lymphomes, les leucémies et les cellules primaires AML. Quelques modèles de tumeurs solides ont montré une sensibilité à la molécule S63845 en monothérapie, alors que de nombreux autres modèles ont été sensibles lorsque S63845 était combiné aux inhibiteurs de kinases oncogéniques. Les études du mécanisme d'action ont confirmé que cet inhibiteur de Mcl-1 induit l'apoptose par activation de la voie mitochondriale (libération du cytochrome c).

⁹⁸Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G. L.; Gong, J.; Moujalled, D. M.; Bruno, A.; Csekei, M.; Paczal, A.; Szable, Z. B.; Sipos, S.; Radics, G.; Proszenyak, A.; Balint, B.; Ondi, L.; Blasko, G.; Robertson, A.; Surgenor, A.; Dokurno, P.; Chen, I.; Matassova, N.; Smith, J.; Pedder, C.; Graham, C.; Studeny, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A. M.; Gravé, F.; Segal, D.; Riffkin, C. D.; Pomilio, G.; Galbraith, L. C. A.; Aubrey, B. J.; Brennan, M. S.; Herold, M. J.; Chang, C.; Guasconi, G.; Cauquil, N.; Melchiorre, F.; Guigal-Stephan, N.; Lockhart, B.; Colland, F.; Hickman, J. A.; Roberts, A. W.; Huang, D. C. S.; Wei, A. H.; Strasser, A.; Lessene, G.; Geneste, O. The MCL1 Inhibitor S63845 Is Tolerable and Effective in Diverse Cancer Models. *Nature* **2016**, 538 (7626), 477-482.

Récemment, Servier-Vernalis en collaboration avec Novartis ont développé un inhibiteur de la protéine Mcl-1, nommé S64315/MIK665⁹⁹ (NCT02979366/NCT02992483), actuellement en essai clinique. Deux autres inhibiteurs de Mcl-1, AMG176¹⁰⁰ de Amgen (NCT02675452) et AZD5991¹⁰¹ (NCT03218683) de AstraZeneca sont également en essais cliniques. Cependant, bien que des avancées significatives aient été récemment acquises dans le développement d'inhibiteurs de la protéine Mcl-1, aucun inhibiteur puissant ayant une forte activité sur les tumeurs solides n'a encore été décrit. Les efforts sont actuellement déployés dans de nombreux laboratoires pour répondre à ces besoins médicaux.

2. Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L

Les inhibiteurs de la protéine Bcl-x_L les plus connus sont l'ABT-737 et son analogue oralement biodisponible l'ABT-263, appelé Navitoclax (précédemment évoqués dans la partie IV.2.2). Ces inhibiteurs sont sélectifs des protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w.

Lessene *et al.* se sont également focalisés sur la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la protéine Bcl-x_L en utilisant une approche SBDD.¹⁰² Plus de 100 000 molécules ont été criblées et les *hits* sélectionnés ont été validés par un test basé sur leur capacité à rompre l'interaction Bim/Bcl-x_L. Ces analyses ont mis en évidence une série de molécules comprenant un corps benzothiazole-hydrazone. La synthèse d'analogues a permis d'obtenir le premier *hit* XIX, qui a une CI₅₀ de 2,2 µM pour Bcl-x_L (Figure 25).

⁹⁹a) Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Csekel, M.; Paczal, A.; Szabo, Z.; Sipos, S.; Radics, G.; Proszenyak, A.; Balint, B.; Bruno, A.; Geneste, O.; Davidson, J. E. P.; Murray, J. B.; Chen, I.; Perron-Sierra, F. *Eur. Pat. Appl.* **2015**, EP 2886545A1 20150624. b) Szlavik, Zoltan; Balint, B.; Kotschy, A.; Chanrion, M.; Geneste, O.; Davidson, J. E.P.; Murray, J. B.; Sipos, S.; Proszenyak, A. *PCT Int. Appl.* **2016**, WO2016207216A1. c) Szlavik, Z.; Kotschy, A.; Chanrion, M.; Marles, D.; Geneste, O.; Davidson, J. E.P.; Murray, J. B.; Sipos, S.; Paczal, A.; Balint, B. *PCT Int. Appl.* **2016**, WO2016207225A1. d) Szlavik, Z.; Szabo, Z.; Csekel, M.; Paczul, A.; Kotschy, A.; Bruno, A.; Geneste, O.; Chen, I.; Davidson, J. E. P.; Murray, J. B.; Ondi, L.; Radics, G.; Sipos, S.; Proszenyak, A.; Perron-Sierra, F.; Balint, B. *PCT Int. Appl.* **2016**, WO2016207226A1.

¹⁰⁰a) Brown, S. P.; Li, Y.; Lizarzaburu, M. E.; Lucas, B. S.; Paras, N. A.; Taygerly, J.; Vimolratana, M.; Wang, X.; Yu, M.; Zancanella, M.; Zhu, L.; Gonzales Buenrostro, A.; Li, Z. *PCT Int. Appl.* **2016**, WO2016033486. b) Hughes, P. E. The Discovery and Preclinical Characterization of AMG 176: A First-in-Class Mcl-1 Inhibitor in Clinical Development for Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2017**, 77. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-DDT01-01.

¹⁰¹a) Johannes, J. W.; Bates, S.; Beigie, C.; Belmonte, M. A.; Breen, J.; Cao, S.; Centrella, P. A.; Clark, M. A.; Cuozzo, J. W.; Dumelin, C. E.; Ferguson, A. D.; Habeshian, S.; Hargreaves, D.; Joubran, C.; Kazmirski, S.; Keefe, A. D.; Lamb, M. L.; Lan, H.; Li, Y.; Ma, H.; Mlynarski, S.; Packer, M. J.; Rawlins, P. B.; Robbins, D. W.; Shen, H.; Sigel, E. A.; Soutter, H. H.; Su, N.; Troast, D. M.; Wang, H.; Wickson, K. F.; Wu, C.; Zhang, Y.; Zhao, Q.; Zheng, X.; Hird, A. W. Structure Based Design of Non-Natural Peptidic Macrocyclic Mcl-1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8, 239-244. b) Hird, A. W.; Secrist, J. P.; Adam, A.; Belmonte, M. A.; Gangl, E.; Gibbons, F.; Hargreaves, D.; Johannes, J. W.; Kazmirski, S. L.; Kettle, J. G.; Kurtz, S. E.; Lamb, M. L.; Packer, M. J.; Peng, B.; Stewart, C. R.; Tyner, J. W.; Yang, W.; Ye, Q.; Zheng, X.; Clark, E. A. A Potent and Selective Macrocyclic Inhibitor of Mcl-1 for Treatment of Hematologic Cancers. *Cancer Res.* **2017**, 77. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-DDT01-02.

¹⁰²Lessene, G.; Czabotar, P. E.; Sleebs, B. E.; Zobel, K.; Lowes, K. N.; Adams, J. M.; Baell, J. B.; Colman, P. M.; Deshayes, K.; Fairbrother, W. J.; Flygare, J. A.; Gibbons, P.; Kersten, W. J. A.; Kulasegaram, S.; Moss, R. M.; Parisot, J. P.; Smith, B. J.; Street, I. P.; Yang, H.; Huang, D. C. S.; Watson, K. G.; Structure-Guided Design of a Selective BCL-X_L Inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9 (6), 390–397.

Grâce aux données obtenues par RX, ils ont validé l'hypothèse que la molécule **XIX** occupait la poche P2 et l'acide carboxylique interagissait avec l'Arg139 de Bcl-x_L.

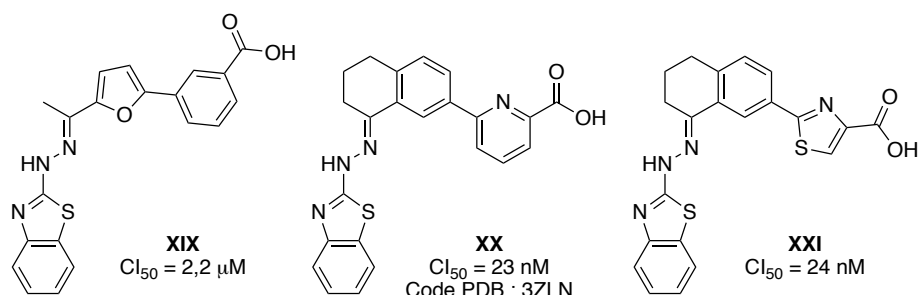


Figure 25 : La découverte d'inhibiteurs sélectifs de Bcl-x_L par approche SBDD.

Le remplacement du furane du composé **XIX** par un 1,2,3,4-tétrahydronaphthalène et le remplacement du benzène terminal de la molécule **XIX** par un acide picolinique (**XX**) ou un acide thiazolique (**XXI**) ont été réalisés et ont permis une étude de RSA. L'affinité pour Bcl-x_L a été améliorée d'un facteur 100 ainsi que les paramètres pharmacocinétiques, comparé à la molécule **XIX** tout en minimisant l'augmentation du poids moléculaire. Par ces changements, les molécules **XX** et **XXI** sont mieux positionnées dans la cible, ce qui induit une meilleure interaction entre l'acide carboxylique et l'Arg139. Cette interaction est renforcée par l'engagement de l'azote du cycle aromatique (pyridine pour **XX** et isothiazole pour **XXI**).

Les optimisations suivantes ont été effectuées dans le but d'initier une interaction avec la poche P4. En effet, comme l'a démontré l'ABT-737, l'affinité du composé est nettement améliorée lorsque celui-ci occupe les poches P2 et P4. Dans la poche P4, un groupement hydrophobe est préférable ainsi qu'une amine terminale pour interagir avec la Glu96. L'extension du composé **XXI**, par l'ajout d'une chaîne alkylée liant un phénoxy en *ortho* de l'acide carboxylique sur le thiazole permet d'améliorer l'affinité d'un facteur 2. Ensuite, une étude de RSA réalisée en présence de diverses substitutions de ce phénoxy a permis de concevoir l'inhibiteur WEHI-539, avec une Cl₅₀ de 1,1 nM (Figure 26).

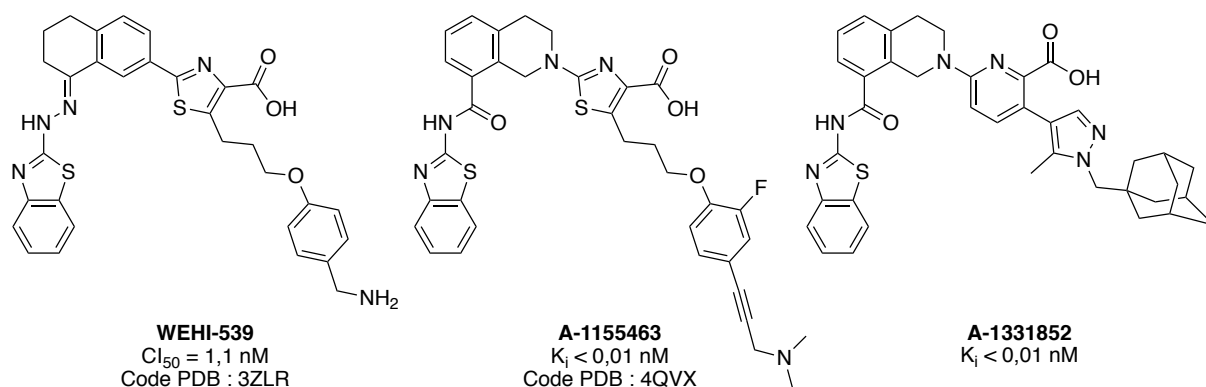


Figure 26 : Le *lead* WEHI-539 et la découverte d'inhibiteurs sélectifs de Bcl-x_L actifs *in vivo*.

Cet inhibiteur, dont l'affinité est comparable à celle de l'ABT-737, se positionne différemment dans Bcl-x_L. En effet, WEHI-539 déplace la Phe105 pour s'enfoncer plus profondément dans la poche P2 ; l'acide carboxylique de WEHI-539 est engagé dans une liaison hydrogène avec l'Arg139 et ce phénomène n'est pas observé avec l'acylsulfonamide de l'ABT-737. Le π -stacking entre les deux cycles de l'ABT-737 occupant la poche P4 est remplacé par la présence d'un groupement phénoxy.

WEHI-539 est actif sur les cellules MEF (*mouse embryo fibroblast*) dépendante de Bcl-x_L (*mcl-1^{-/-}*) avec une CE₅₀ de 48 nM. WEHI-539 a une CE₅₀ de 550 nM sur les cellules cancéreuses pulmonaires humaines H146 Bcl-x_L-dépendantes (*small cell lung cancer*, SCLC). Il a été prouvé que son mécanisme d'action est médié par Bak pour induire l'apoptose. Bien que WEHI-539 présente une activité cellulaire pro-apoptotique, les limitations, par la présence de l'hydrazone potentiellement toxique et ses faibles propriétés pharmacocinétiques (disponibilité), ne permettent pas l'exploitation de cette molécule *in vivo*.

Abbvie combine alors un criblage de fragments par RMN et une approche de *Structure-Based Design* pour optimiser WEHI-539 et conduire à la découverte de A-1155463 et son analogue oralement disponible A-1331852 (Figure 26).^{103,104} Ces deux molécules sont des inhibiteurs plus puissants de Bcl-x_L (K_i < 0,010 nM). A-1155463 a une activité sur les cellules H146 (CE₅₀ = 65 nM) *in vitro*. Il présente une activité *in vivo* modeste mais statistiquement significative sur les souris SCID-Beige qui ont été inoculées par des cellules tumorales H146 Bcl-x_L-dépendantes. Comparée à A-1155463, l'activité cellulaire de A-1331852 est améliorée d'un facteur 10 (CE₅₀ = 6 nM comparée à 70 nM sur la lignée cellulaire cancéreuse Molt-4 Bcl-x_L-dépendante). Il induit, en combinaison avec des taxanes, une régression de la tumeur dans des modèles murins xénotransplantés de tumeurs solides dont le cancer de l'ovaire et des poumons.

¹⁰³Tao, Z.-F.; Hasvold, L.; Wang, L.; Wang, X.; Petros, A. M.; Park, C. H.; Boghaert, E. R.; Catron, N. D.; Chen, J.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E.; Deshayes, K.; Fairbrother, W. J.; Flygare, J. A.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Judge, R. A.; Koehler, M. F. T.; Kovar, P. J.; Lessene, G.; Mitten, M. J.; Ndubaku, C. O.; Nimmer, P.; Purkey, H. E.; Oleksijew, A.; Phillips, D. C.; Sleebs, B. E.; Smith, B. J.; Smith, M. L.; Tahir, S. K.; Watson, K. G.; Xiao, Y.; Xue, J.; Zhang, H.; Zobel, K.; Rosenberg, S. H.; Tse, C.; Levenson, J. D.; Elmore, S. W.; Souers, A. J.; Discovery of a Potent and Selective BCL-X_L Inhibitor with *in Vivo* Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5 (10), 1088–1093.

¹⁰⁴Levenson, J. D.; Phillips, D. C.; Mitten, M. J.; Boghaert, E. R.; Diaz, D.; Tahir, S. K.; Belmont, L. D.; Nimmer, P.; Xiao, Y.; Ma, X. M.; Lowes, K. N.; Kovar, P.; Chen, J.; Jin, S.; Smith, M.; Xue, J.; Zhang, H.; Oleksijew, A.; Magoc, T. J.; Vaidya, K. S.; Albert, D. H.; Tarrant, J. M.; La, N.; Wang, L.; Tao, Z.-F.; Wendt, M. D.; Sampath, D.; Rosenberg, S. H.; Tse, C.; S. Huang, D. C.; Fairbrother, W. J.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. Exploiting Selective BCL-2 Family Inhibitors to Dissect Cell Survival Dependencies and Define Improved Strategies for Cancer Therapy. *Sci. Transl. Med.* **2015**, 7 (279), 279ra40.

3. Inhibiteurs à dualité d'action Mcl-1/Bcl-x_L

Nous avons vu précédemment que les protéines anti-apoptotiques coopèrent entre elles pour empêcher les cellules cancéreuses d'entrer en apoptose. Il est nécessaire d'inhiber simultanément les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Une des stratégies envisagées est de concevoir des inhibiteurs à dualité d'action ou *dual inhibitors*. En effet, une molécule aurait alors plusieurs cibles thérapeutiques, avec de bonnes affinités pour chacune des cibles. Cela permet notamment de limiter le nombre de molécules différentes à introduire dans un protocole de traitement et ainsi limiter les effets secondaires pour le patient. Dans la littérature, plusieurs molécules ont été rapportées comme agissant sur plus d'une protéine anti-apoptotique.^{52,84,105} Cependant, les molécules inhibitrices à la fois de Bcl-x_L et de Mcl-1 ayant des bonnes activités sur les deux cibles sont peu nombreuses.

3.1. Molécule hybride du groupe de Tanaka

Nous pouvons citer par exemple les travaux de Tanaka *et al.* qui ont mis en place une stratégie d'hybridation.¹⁰⁶ Ils ont analysé les données structurales des complexes molécule/protéine de la littérature avec pour objectif de fusionner un inhibiteur sélectif de Mcl-1 et un inhibiteur sélectif de Bcl-x_L. Le composé hybride **XXII** a été généré et possède une affinité duale pour les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 (Figure 27).

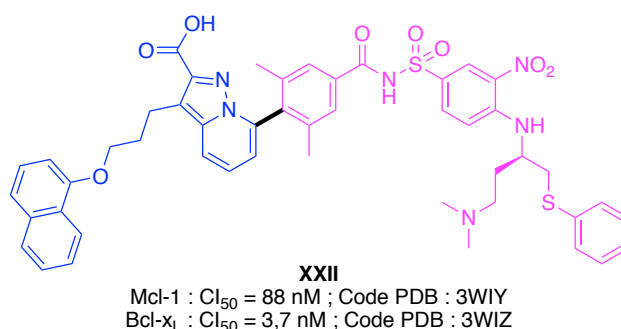


Figure 27 : Une stratégie d'hybridation pour la découverte d'un inhibiteur à dualité d'action Mcl-1/Bcl-x_L.

¹⁰⁵Beekman, A. M.; Howell, L. A. Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. *ChemMedChem* **2016**, *11* (8), 802–813.

¹⁰⁶Tanaka, Y.; Aikawa, K.; Nishida, G.; Homma, M.; Sogabe, S.; Igaki, S.; Hayano, Y.; Sameshima, T.; Miyahisa, I.; Kawamoto, T.; Tawada, M.; Imai, Y.; Inazuka, M.; Cho, N.; Imaeda, Y.; Ishikawa, T. Discovery of Potent Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors by Using a Hybridization Strategy Based on Structural Analysis of Target Proteins. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9635–9645.

État de l'Art – Inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L

Ils se sont inspirés d'un inhibiteur de Mcl-1 conçu par Fesik et Abbvie (partie bleue de la molécule **XXII**) et de l'ABT-737 (partie magenta de la molécule **XXII**). Les structures cocrystallisées du composé **XXII** dans Mcl-1 (code PDB : 3WIY) et dans Bcl-x_L (code PDB : 3WIZ) ont été résolues (Figure 28).

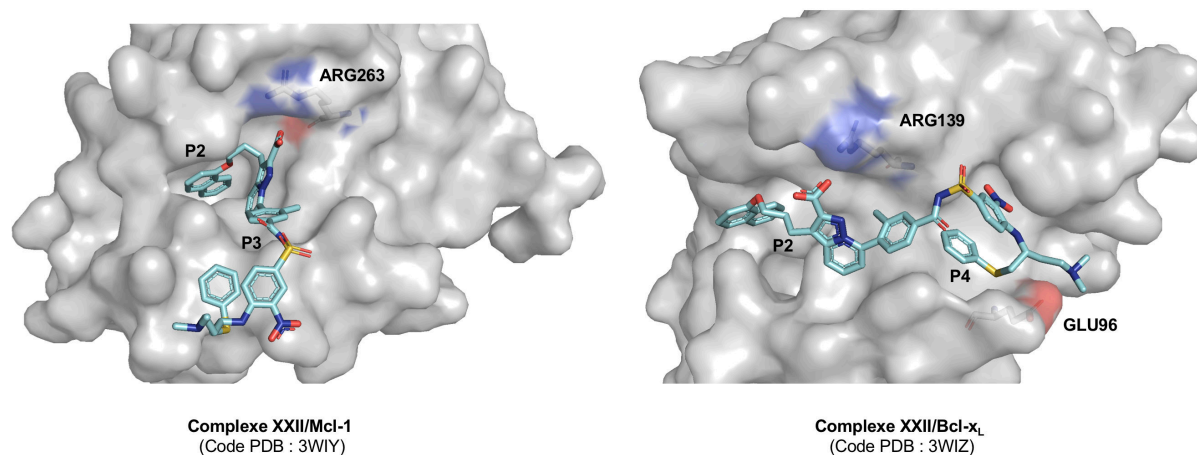


Figure 28 : Structures cristallisées de la molécule **XXII** avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Le noyau naphthalène de **XXII** est profondément ancré dans la poche P2 de Mcl-1 pendant que la partie arylsulfonamide de la molécule est exposée au solvant. Dans Bcl-x_L, le groupe naphthalène occupe la poche P2 tandis que la partie magenta inspirée de l'ABT-737 occupe la poche P4. Cela peut expliquer la meilleure affinité de **XXII** pour Bcl-x_L *versus* Mcl-1. Dans les deux protéines, le carboxylate forme un pont salin avec les arginines conservées Arg139 (Bcl-x_L) et Arg263 (Mcl-1).

3.2. Inhibiteur à dualité d'action découvert par le groupe de Pellecchia

Pellecchia *et al.* ont découvert par une approche de FBDD un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L (Schéma 5), le composé **XXV**.¹⁰⁷ Cet acylsulfonamide **XXV** a été optimisé à partir des fragments initiaux **XXIII** et **XXIV** ayant une affinité initiale pour Bcl-x_L (déterminée par RMN). L'acylsulfonamide **XXV** a une affinité de l'ordre du nM.

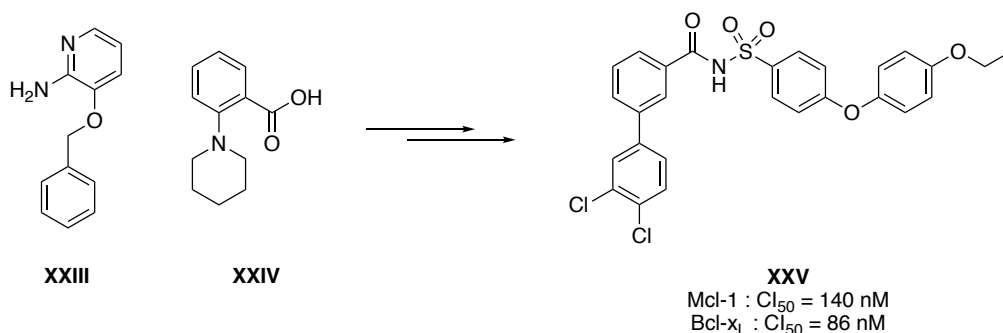


Schéma 5 : Découverte du composé **XXV**, inhibiteur à dualité d'action.

En conclusion, nous avons présenté les inhibiteurs de la littérature les plus pertinents pour le projet. Ces inhibiteurs ont une bonne affinité pour les cibles et les structures RX des complexes de ces molécules avec les protéines cibles sont disponibles. Ils ont été découverts par les méthodes de FBDD et de SBDD pour la plupart. Ils possèdent un acide carboxylique ou un acylsulfonamide dans le but d'interagir avec l'Arg139 de Bcl-x_L et l'Arg263 de Mcl-1. L'acylsulfonamide joue également un rôle de *linker*. Un groupement hydrophobe occupe la poche hydrophobe P2 de Bcl-x_L et de Mcl-1. Pour la protéine Bcl-x_L, un autre groupement hydrophobe occupe la poche P4 ainsi qu'une amine terminale pour interagir avec la Glu96, ce qui permet d'augmenter l'affinité du composé pour les cibles.

¹⁰⁷Rega, M. F.; Wu, B.; Wei, J.; Zhang, Z.; Cellitti, J. F.; Pellecchia, M. SAR by Interligand Nuclear Overhauser Effects (ILOEs) Based Discovery of Acylsulfonamide Compounds Active against Bcl-x_L and Mcl-1. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (17), 6000–6013.

Genèse du projet

Genèse du projet

L'étude des interactions protéine-protéine est un des axes de recherche du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie. Les travaux antérieurs du CERMN, menés en collaboration avec l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE ont montré qu'une famille de molécules et plus particulièrement l'une d'entre elles, le Pyridoclast, est capable d'interagir avec la protéine Mcl-1 et d'inhiber son action. Le Pyridoclast est sélectif de la protéine Mcl-1 et il ne se lie pas à la protéine Bcl-x_L. En outre, nous n'avons pas clairement établi le positionnement de cette molécule dans la protéine Mcl-1 et plusieurs hypothèses ont été posées pour comprendre la sélectivité du Pyridoclast pour Mcl-1. Une étude de co-cristallisation du Pyridoclast et de la protéine Mcl-1 est actuellement en cours.

Parce ce qu'elle induit la résistance dans les cellules cancéreuses ovariennes, cibler la protéine anti-apoptotique Mcl-1 est d'un intérêt majeur pour la découverte de nouveaux anticancéreux. Bien que l'inhibition de la protéine Mcl-1 soit d'un intérêt majeur pour la communauté scientifique, elle n'est pas suffisante : l'inhibition de la protéine Bcl-x_L doit se faire concomitamment.

L'objectif principal dans mes travaux est de concevoir des inhibiteurs à dualité d'action agissant sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Mon projet est ancré dans une démarche dynamique de *Drug Design*. Différentes disciplines sont sollicitées : la chémoinformatique pour la conception rationnelle de nouvelles molécules, la chimie organique pour la synthèse des molécules et les sciences biophysiques et biologiques pour l'évaluation de l'affinité (Mcl-1) et l'activité pro-apoptotique (Mcl-1 et Bcl-x_L) de ces composés.

Pour concevoir des inhibiteurs à dualité d'action agissant sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, la stratégie employée est une approche originale s'inspirant du *Fragment-Based Drug Design* (FBDD) et du *Structure-Based Drug Design* (SBDD).

Le plan du projet de recherche est divisé en trois chapitres (Figure 29).

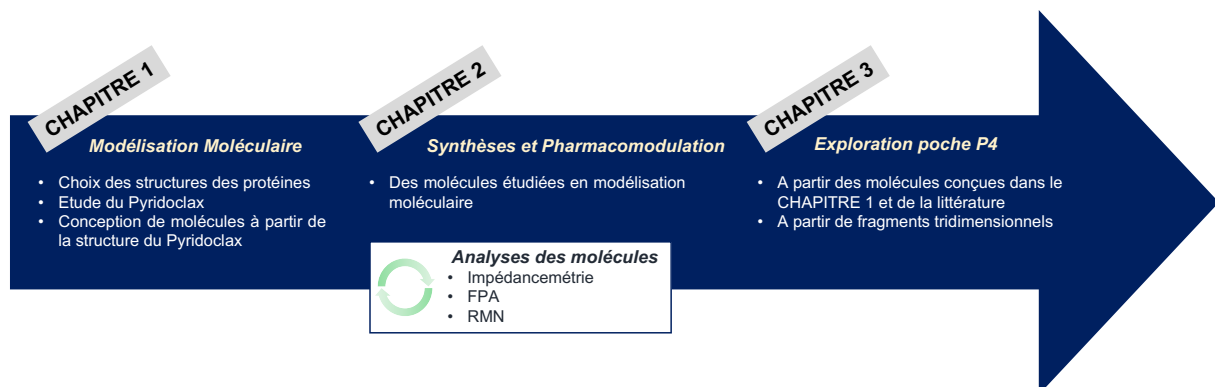


Figure 29 : Plan du projet de recherche.

Genèse du projet

Dans le **chapitre 1**, les travaux de modélisation moléculaire ont permis de sélectionner les structures tridimensionnelles des protéines pour initier nos travaux de recherche. L'étude du Pyridoclastax dans les protéines cibles a permis de choisir les hypothèses quant au positionnement de celui-ci dans la protéine Mcl-1 et ainsi être le point de départ de la conception de nouvelles molécules.

La solubilité du Pyridoclastax en milieu tamponné est faible. Pour concevoir des inhibiteurs à dualité d'action, nous ne pouvions donc pas utiliser la structure « entière » du Pyridoclastax à laquelle, par l'utilisation d'un *linker*, nous aurions introduit un fragment pour interagir avec la protéine Bcl-x_L. Par conséquent, nous avons « fragmenté » la structure du Pyridoclastax dans le but d'obtenir les plus petits fragments possibles, gagnant ainsi en solubilité, capables d'interagir avec Mcl-1. Ces molécules ont été conçues et étudiées en modélisation moléculaire dans les cibles d'intérêt, Mcl-1 et Bcl-x_L.

Dans le **chapitre 2**, la synthèse de ces composés et les pharmacomodulations sont présentées. Pour faire le lien avec leur activité pour les protéines cibles, les résultats de l'évaluation biologique (criblage par impédancemétrie) sont directement décrits après leur synthèse. L'intérêt de présenter les résultats du *screening* réside dans l'établissement de relations structure-activité qui viennent enrichir le travail de pharmacomodulation. En préambule de ce chapitre, le principe du test cellulaire par impédancemétrie est expliqué.

Dans le **chapitre 3**, nous nous intéressons à l'amélioration de l'affinité pour la protéine Bcl-x_L par l'exploration de sa poche hydrophobe P4. Pour cela, nous avons mis en place deux stratégies. La première est de s'inspirer des inhibiteurs de la protéine Bcl-x_L de la littérature pour « agrandir » les molécules conçues dans le chapitre 1. La seconde stratégie est de concevoir une librairie de nouveaux fragments tridimensionnels pour l'exploration de la poche P4 de Bcl-x_L.

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des interactions protéine-protéine, un projet en collaboration avec l'équipe du Docteur Carmen Garrido est actuellement en cours. Le criblage de la chimiothèque d'oligopyridines du CERMN a montré que trois composés avaient un intérêt pour l'inhibition de la protéine HSP110 impliquée dans les cancers colorectaux. Parmi ces trois composés, la synthèse de l'un deux est issu de mon travail et le *scale-up* de ces composés (synthèse de 500 mg) m'a été demandé pour les études *in vivo* (Annexe 1).

Travaux personnels

CHAPITRE 1

I. Choix des structures tridimensionnelles

Dans le cadre d'une démarche de conception rationnelle de molécules d'intérêt thérapeutique, la première étape est d'étudier les interactions entre nos cibles thérapeutiques Mcl-1 et Bcl-x_L et le Pyridoclax ou les fragments. A ce jour, tous les efforts portés sur la résolution d'une structure co-cristallisée Pyridoclax/Mcl-1 n'ont pas encore abouti. Ainsi, pour analyser les interactions entre nos molécules et les protéines, nous avons donc choisi d'utiliser une structure cristallographique issue de la PDB.

Pour le choix des structures cristallographiques les plus adéquates pour notre étude, une Analyse par Composantes Principales (ACP)¹⁰⁸ a été nécessaire. L'ACP est une méthode de calcul qui nous a permis d'évaluer la variation structurale des protéines des complexes recensés dans la PDB. Cette approche, largement décrite dans la littérature, est un outil pertinent pour comparer les conformations spatiales de différents complexes.¹⁰⁹ Ces analyses ont été réalisées sur les complexes co-cristallisés et les formes natives des protéines Bcl-x_L et Mcl-1.

1. Analyse par Composantes Principales des structures de la protéine Bcl-x_L

Pour Bcl-x_L, l'ACP a été réalisée par Kalenkiewicz *et al.*¹¹⁰ sur 56 structures issues de la PDB, comprenant Bcl-x_L *wild-type* et mutants (humain, souris et rat) en forme apo ou holo (compléxée à un peptide ou inhibiteur synthétique). L'ACP est réalisée sur les coordonnées cartésiennes C α des hélices α 2, α 3, α 4, α 5 ainsi que les boucles qui les relient, ce qui correspond à la cavité hydrophobe BH3. La première composante principale (PC1) représente 51,5 % de la variance totale. Elle correspond à un mouvement de translation dans la région composée des hélices α 3 et α 4 et de la boucle α 3- α 4. La seconde composante principale (PC2) contient 16,7 % de la variance, et correspond aux décalages longitudinaux de l'hélice α 3 (Figure 30).

¹⁰⁸Jolliffe, I. T.; Cadima, J. Principal Component Analysis: A Review and Recent Developments. *Philos. Trans. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, 374 (2065).

¹⁰⁹Grant, B. J.; McCammon, J. A.; Caves, L. S. D.; Cross, R. A. Multivariate Analysis of Conserved Sequence-Structure Relationships in Kinesins: Coupling of the Active Site and a Tubulin-Binding Sub-Domain. *J. Mol. Biol.* **2007**, 368 (5), 1231–1248.

¹¹⁰Kalenkiewicz, A.; Grant, B. J.; Yang, C.-Y. Enrichment of Druggable Conformations from Apo Protein Structures Using Cosolvent-Accelerated Molecular Dynamics. *Biology (Basel)*. **2015**, 4 (2), 344–366.

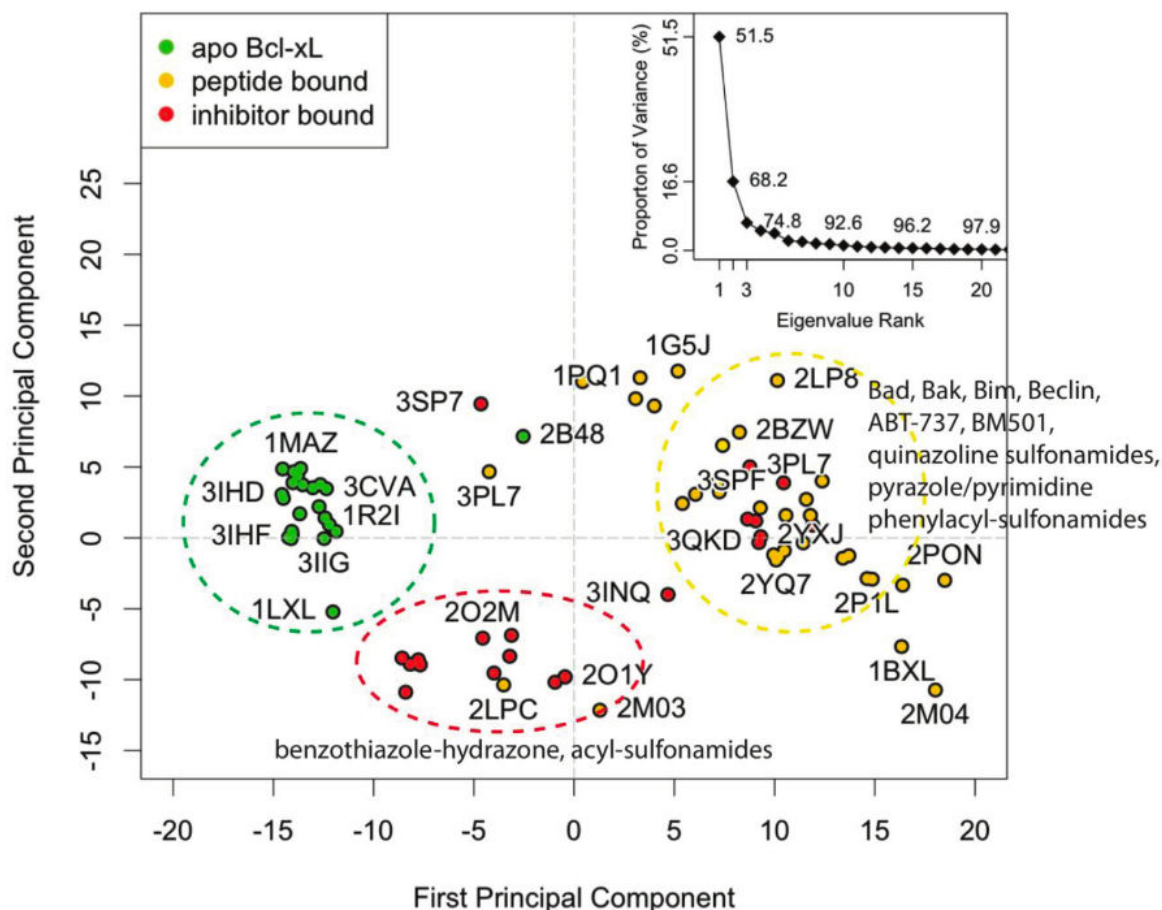


Figure 30 : Analyse par composantes principales sur les structures de Bcl-x_L
 (En vert : structure apo ; en jaune complexes peptide/Bcl-x_L ; en rouge : complexes molécule/Bcl-x_L. Sur chaque point est indiqué le code PDB).¹¹⁰

L'ACP a mis en évidence trois groupes conformationnels principaux : les structures apo, les complexes peptide/Bcl-x_L et les complexes molécule/Bcl-x_L.

Les structures apo (pointillé vert) forment un groupe distinct des complexes peptide/Bcl-x_L et molécule/Bcl-x_L. La PC1 et la PC2 divisent les structures holo en deux groupes. Le plus grand groupe, les complexes peptide/Bcl-x_L (pointillé jaune), contient la plupart des structures liées aux peptides et quelques inhibiteurs synthétiques de Bcl-x_L, incluant l'ABT-737. L'autre groupe molécule/Bcl-x_L (pointillé rouge) regroupe une classe d'inhibiteurs comportant un benzothiazole ou un acylsulfonamide. Les benzothiazoles, comme l'inhibiteur WEHI-539, se lient profondément à la poche P2.

Les structures holo sont réparties à travers une large gamme d'espaces conformationnels qui se chevauchent. Cela reflète la diversité des peptides et des ligands capables de s'ancrer dans la cavité hydrophobe BH3. Pour la majorité des structures holo, les hélices α_3 et α_4 sont décalées vers le bas par rapport aux structures apo, donnant ainsi l'accès aux poches hydrophobes. Cet accès permet l'interaction entre le ligand et la protéine.

Nos travaux concernent l'analyse de molécules synthétiques dans des cibles thérapeutiques. Il est donc pertinent de sélectionner des structures de la protéine Bcl-x_L liée à une molécule de la littérature. Pour les travaux de modélisation moléculaire, les structures cristallographiques choisies sont :

- La structure code PDB 2YXJ, correspondant au complexe ABT-737/Bcl-x_L (molécule étendue de la poche P2 à P4), appartenant au groupe peptide/Bcl-x_L ;
- Les structures codes PDB 3ZLN correspondant au complexe de la molécule **XX**/Bcl-x_L et 3ZLR, correspondant au complexe WEHI-539/Bcl-x_L, appartenant au groupe molécule/Bcl-x_L.

Le choix de ces structures a été conforté par les travaux de Tzakos *et al.*¹¹¹ A partir d'analogues de quercétine, potentiels inhibiteurs de Bcl-x_L, ils ont montré que les meilleurs scores de *docking* sont obtenus avec les structures codes PDB 2YXJ et 3ZLN comparés à ceux obtenus avec les autres structures molécule/Bcl-x_L. Les poses obtenues par *docking* dans ces structures sont corrélables à leurs données expérimentales obtenues par RMN.

1.1. Complexe ABT-737 avec Bcl-x_L

La structure cristallographique du complexe entre l'inhibiteur ABT-737 et la protéine Bcl-x_L correspond au code PDB 2YXJ (Figure 31). Sa résolution est de 2,2 Å.

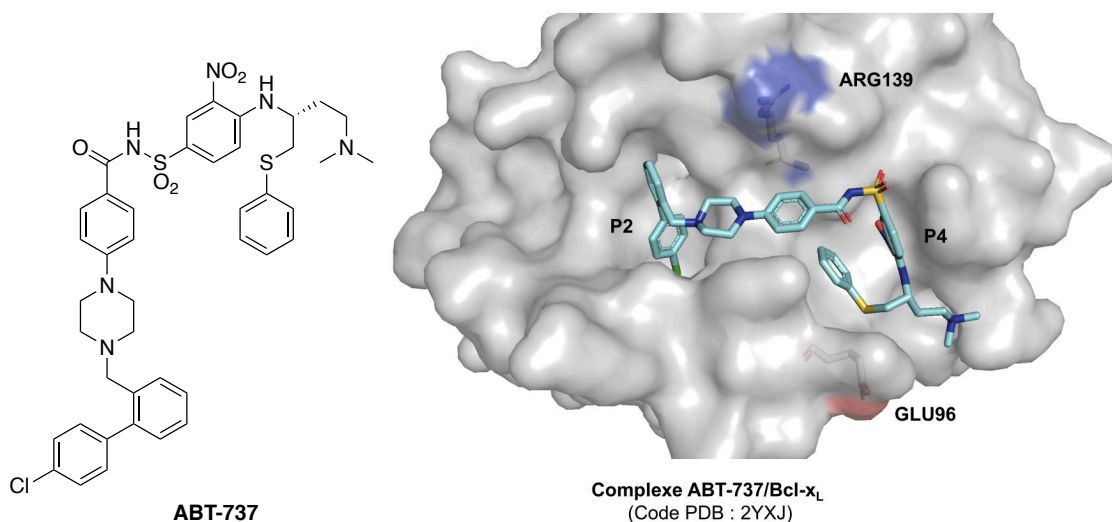


Figure 31 : Structure de l'ABT-737 et le complexe ABT-737/Bcl-x_L.

¹¹¹Kellici, T. F.; Chatziathanasiadou, M. V.; Lee, M.-S.; Sayyad, N.; Geromichalou, E. G.; Vrettos, E. I.; Tsailianis, A. D.; Chi, S.-W.; Geromichalos, G. D.; Mavromoustakos, T.; Tzakos, A. G. Rational Design and Structure-Activity Relationship Studies of Quercetin-Amino Acid Hybrids Targeting the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x_L. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (37), 7956–7976.

CHAPITRE 1 – Choix des structures tridimensionnelles

Le site d'interaction est large. L'ABT-737 occupe la poche P2 par son groupement chlorobiphényle, s'étend sur la poche P3 jusqu'à interagir dans la poche P4 où un π -stacking entre le nitrophényle et le thiophényle se forme. Dans cette structure, les poches P2 et P4 sont donc ouvertes. Le groupement acylsulfonamide n'est pas en interaction avec l'Arg139. L'amine terminale interagit avec le Glu96, ce qui améliore l'affinité de l'ABT-737 pour Bcl-x_L.

Outre le fait que l'ABT-737 est l'inhibiteur de Bcl-x_L de référence, il est pertinent d'utiliser ce complexe pour nos études car les poches P2 et P4 sont ouvertes et prêtes à accueillir un ligand.

1.2. Complexes molécule **XX**/Bcl-x_L et WEHI-539/Bcl-x_L

La structure cristallographique du complexe entre la molécule **XX** et la protéine Bcl-x_L correspond au code PDB 3ZLN et celle du complexe entre l'inhibiteur WEHI-539 et la protéine Bcl-x_L correspond au code PDB 3ZLR (Figure 32). Respectivement, leurs résolutions sont de 2,29 et 2,03 Å.

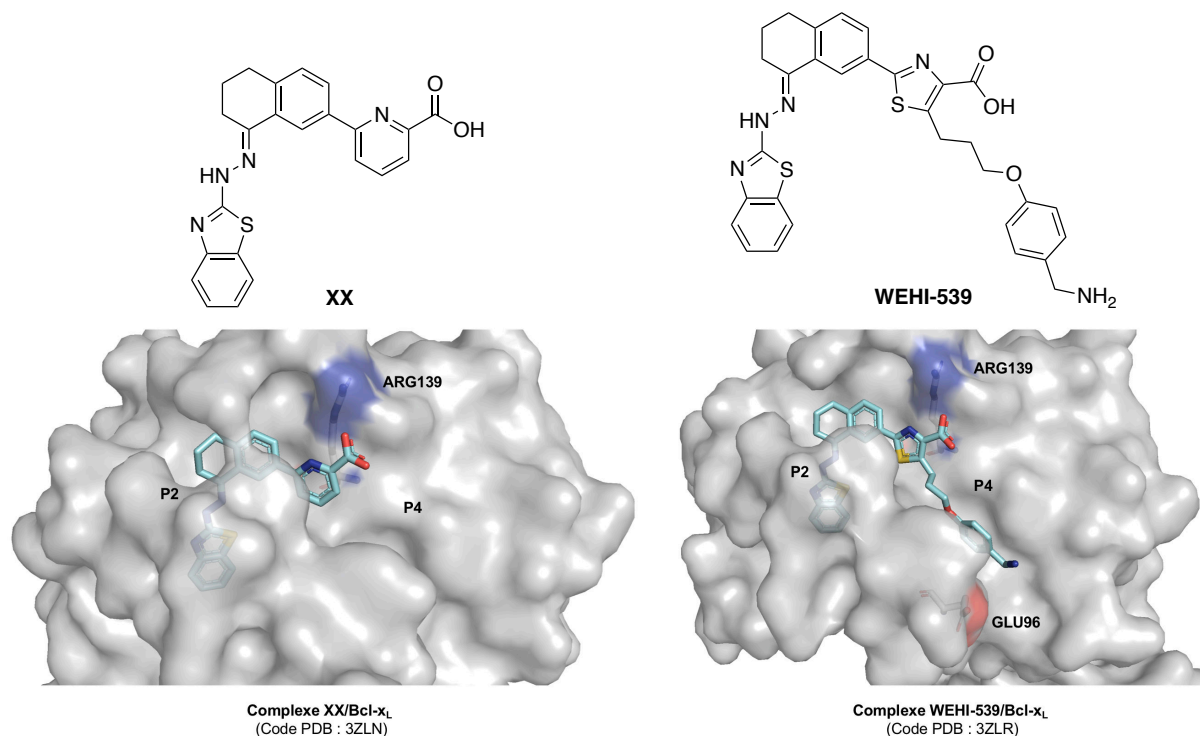


Figure 32 : Structure des molécules **XX** et WEHI-539 ; Complexes molécule **XX**/Bcl-x_L et WEHI-539/Bcl-x_L.

La molécule **XX** et le composé WEHI-539 occupent plus profondément la poche P2 de Bcl-x_L que l'ABT-737. De plus, leur carboxylate forme une liaison hydrogène avec l'Arg139. La molécule **XX** occupe uniquement la poche hydrophobe P2, ce qui nous a permis dans nos études de se focaliser sur cette poche. Le composé WEHI-539, en plus d'être ancré profondément dans la poche P2 et d'interagir avec l'Arg139, occupe également la poche P4 de Bcl-x_L. Une chaîne alkylée projette un phénol dans la poche P4. Une amine terminale sur ce phénol interagit avec le Glu96. Sur cette structure, la poche P2 est profonde et ouverte ; et le site d'interaction s'étend jusqu'à la poche P4.

Ces structures semblent pertinentes pour nos études car la poche P2 est profonde. Pour la structure 3ZLN, le site d'interaction sera centré sur la poche P2 et pour la structure 3ZLR, celui-ci s'étendra de la poche P2 à P4.

Trois familles de complexes se différencient. De gauche à droite sur la Figure 33A, le premier groupe est composé des complexes entre Bim et Mcl-1 ainsi que les mutants de Bim et Mcl-1 ; le second groupe comprend les autres complexes peptide/Mcl-1 ; et le troisième groupe est composé des complexes molécule/Mcl-1. La première composante principale (PC1) représente 59,0 % de la variance totale et correspond à une perturbation de l'hélice $\alpha 4$ et de la boucle $\alpha 5-\alpha 6$. La seconde composante principale (PC2) contient 12,7 % de la variance, et est dirigée par une variation moindre des mêmes résidus que pour la PC1.

Contrairement à l'ACP de Bcl-x_L où les structures apo formaient un groupe bien distinct, la structure apo de Mcl-1 est très proche des structures de Mcl-1 complexées avec des inhibiteurs synthétiques. La structure apo de Mcl-1 serait donc plus ouverte au niveau de son site d'interaction BH3 comparée à celle de Bcl-x_L. On remarque une structure isolée (5FC4), structure intermédiaire entre les complexes avec les peptides et les non-peptides.

Pour réaliser nos travaux de modélisation moléculaire, la structure code PDB 4WMU, correspondant au groupe associé aux petites molécules cristallisées en présence de MBP (*Maltose Binding Protein*) (série 4WM comprenant notamment la forme apo 4WMS), a été choisie. Il semble pertinent de choisir cette structure de protéine parce que la structure de l'inhibiteur et son interaction dans la poche P2 permet à celle-ci d'être ouverte, et également parce qu'elle appartient au groupe molécule/Mcl-1.

La structure code PDB 5FC4 a également été sélectionnée car la protéine Mcl-1 se situe entre sa forme liée à une petite molécule synthétique et sa forme liée à un peptide. De plus, les inhibiteurs de 5FC4 sont des fragments interagissant dans la poche P2 et P4 de Mcl-1.

2.1. Complexe molécule XII/Mcl-1

La structure cristallographique du complexe entre la molécule XII et la protéine Mcl-1 correspond au code PDB 4WMU (Figure 34). Sa résolution est de 1,55 Å.

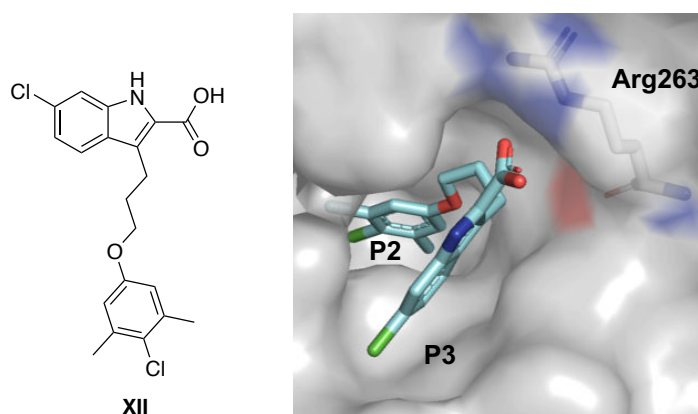


Figure 34 : Complexe molécule XII/Mcl-1 (Code PDB : 4WMU).

Dans cette structure, la molécule **XII** occupe les poches hydrophobes P2 et P3 de Mcl-1. Son groupement 2-chloro-5-méthoxy-1,3-diméthylbenzène se positionne au fond de la poche P2, le carboxylate interagit avec l'Arg263 et l'indole se situe à la frontière des poches P2 et P3.

2.2. Complexe molécules **XIII** et **XIV**/Mcl-1

La structure cristallographique des composés **XIII** et **XIV** dans Mcl-1 correspond au code PDB 5FC4 (Figure 35). Sa résolution est de 1,50 Å.

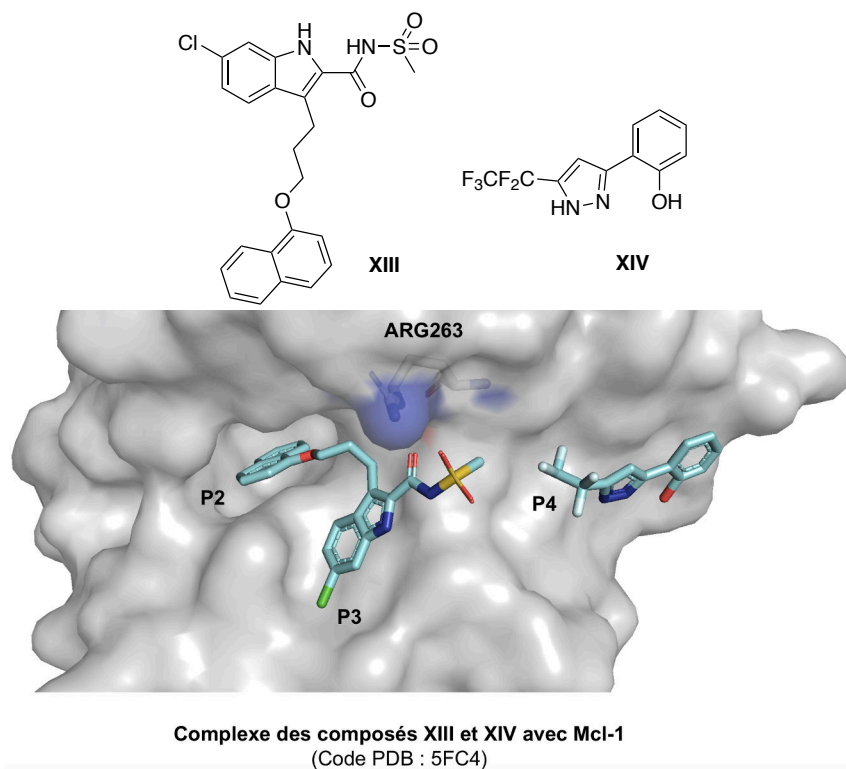


Figure 35 : Structures des composés **XIII** et **XIV** ; Complexe des composés **XIII** et **XIV**/Mcl-1.

Le naphthalène du composé **XIII** se positionne dans la poche P2, l'indole occupe la poche P3 de Mcl-1 et l'acylesulfonamide interagit avec l'Arg263. Le fragment **XIV** occupe la poche P4. Dans cette structure, les poches hydrophobes sont ouvertes.

Pour conclure, les structures cristallographiques retenues sont :

- Les structures ayant pour codes PDB 2YXJ et 3ZLN/3ZLR pour la protéine Bcl-x_L ;
- Les structures ayant pour codes PDB 4WMU et 5FC4 pour la protéine Mcl-1.

II. Le Pyridoclastax : Étude de modélisation moléculaire

Au sein de notre laboratoire, les travaux de modélisation moléculaire pour comprendre le positionnement du Pyridoclastax dans Mcl-1 ont été initiés en 2014 dans le cadre des travaux de thèse de Jade Fogha.¹¹³ Les données ont ensuite été complétées dans le cadre des travaux post-doctoraux (2016) du Docteur Bogdan Marekha et mes travaux de thèse. Ils sont actuellement enrichies dans le cadre des travaux de thèse de Mohammed Benabderrahmane (2017).

Les travaux précédant ma thèse ont été réalisés à partir de la structure en solution du complexe Bid/Mcl-1 (code PDB : 2KBW).⁹⁵ Cette structure, obtenue par RMN, est moins précise qu'une structure résolue par cristallographie des RX. De plus, la structure correspond au complexe entre un peptide et Mcl-1. Or dans nos études, les résultats sont dépendants de la structure de la protéine utilisée. En effet, les poses de *docking* (combinaison d'une conformation du ligand avec sa position et son orientation dans la protéine) du Pyridoclastax dans la protéine Mcl-1 sont influencées par la structure de la protéine utilisée. Nous avons donc poursuivi ces analyses en utilisant les structures cristallographiques choisies précédemment (codes PDB 4WMU et 5FC4).

1. Comment le Pyridoclastax inhibe-t-il la protéine Mcl-1 ?

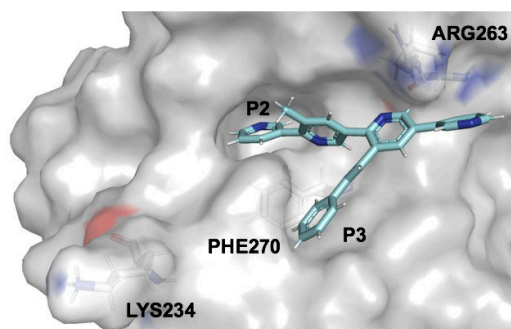
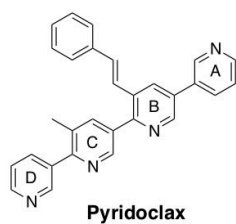
Le Pyridoclastax a un squelette rigide et de ce fait, sa structure s'adapte difficilement à la protéine. Les différentes structures PDB utilisées ont donné des résultats de *docking* très variables. C'est pourquoi le choix de la structure de la protéine Mcl-1 est un point important dans nos études.

Puisque le Pyridoclastax est à la fois une molécule synthétique et un BH3-mimétique, nous l'avons étudié dans la structure code PDB 5FC4. Pour rappel, dans l'ACP, cette structure est à la jonction des groupes peptide/Mcl-1 et molécule/Mcl-1.

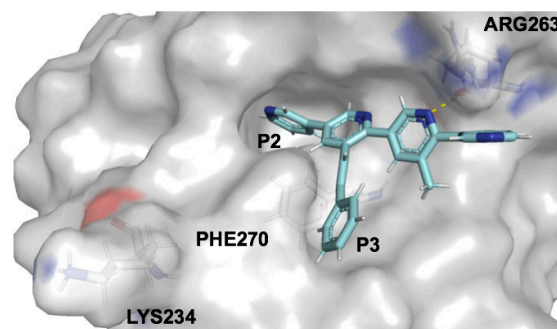
Ces travaux ont été initiés par le Docteur Bogdan Marekha. Premièrement, un *docking* a été effectué. Six poses de *docking* ont été retenues pour des simulations par dynamique moléculaire et sont représentées sur la Figure 36.

¹¹³Fogha Ngewmeta, J. *Les interactions protéine-protéine comme sources de conception de nouveaux médicaments anti-cancéreux*. Thèse de doctorat en pharmacochimie et modélisation moléculaire. 2014, Caen.

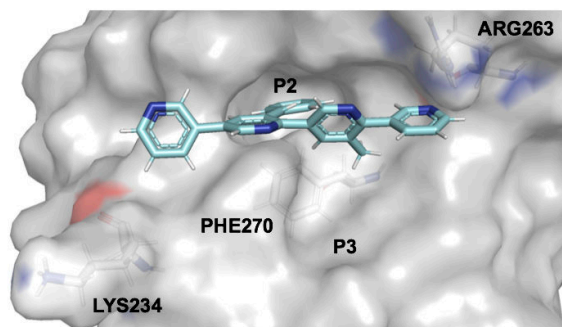
CHAPITRE 1 – Le Pyridoclastax : Étude de modélisation moléculaire



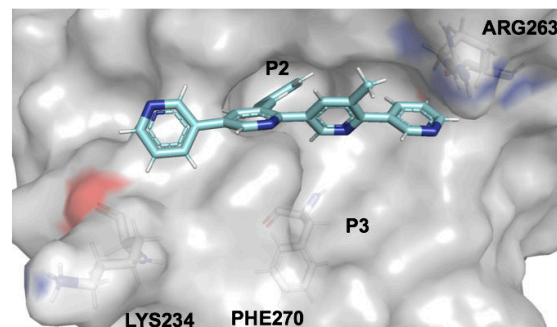
Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 1
(Code PDB : 5FC4)



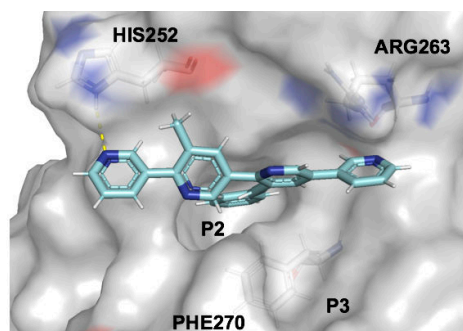
Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 2
(Code PDB : 5FC4)



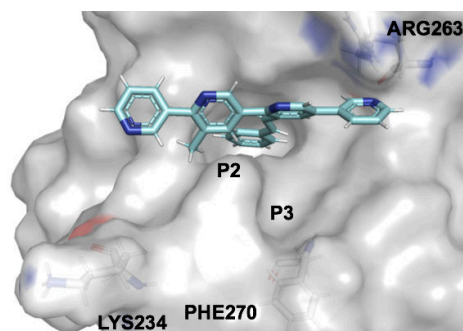
Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 3
(Code PDB : 5FC4)



Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 3A
(Code PDB : 5FC4)



Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 4
(Code PDB : 5FC4)



Complexe Pyridoclastax/Mcl-1 : Pose 4A
(Code PDB : 5FC4)

Figure 36 : Différentes poses de *docking* du Pyridoclastax dans Mcl-1.

Sur la représentation, le manque de perspective laisse percevoir que la Phe270 est à la surface de la protéine et qu'elle définit la poche P3. Or, la Phe270 est bien au fond de la poche P2.

Dans la pose 1, la pyridine terminale D occupe la poche P2, le styryle est dans la poche P3. La pyridine centrale B est à proximité de l'Arg263 et la pyridine terminale A se projette vers la poche P4.

Dans la pose 2, la pyridine terminale A se positionne dans P2 et le styryle occupe la poche hydrophobe P3. L'azote de la pyridine C forme une interaction avec l'Arg263 et la pyridine terminale D est à la surface de Mcl-1.

Dans la pose 3, le styryle occupe la poche hydrophobe P2 et la quaterpyridine est alignée dans la cavité hydrophobe BH3 de Mcl-1 selon un axe imaginaire Arg263–Lys234. Le méthyle sur la pyridine C se projette dans la poche P3. La pyridine terminale D est dans la poche P1. La pyridine terminale D est à proximité de l'Arg263, et son azote est dans la direction de cette arginine.

Dans la pose 3A, le styryle occupe la poche hydrophobe P2 et la quaterpyridine est alignée dans la cavité hydrophobe BH3 de Mcl-1 selon un axe imaginaire Arg263–Lys234. Le méthyle sur la pyridine C se projette à l'opposé de la poche P3. La pyridine terminale D est dans la poche P1. La pyridine terminale D est à proximité de l'Arg263, et son azote est dans la direction de cette arginine. La pose 3A est donc similaire à la pose 3, à l'exception que le méthyle ne s'oriente plus vers la poche P3 mais à l'opposé de celle-ci.

La pose 4 est à l'opposé de la pose 3A. Le styryle est dans la poche P2 et la quaterpyridine est alignée dans la cavité hydrophobe BH3 de Mcl-1 selon un axe imaginaire Arg263–Lys234. Dans cette pose, la pyridine terminale A est à proximité de l'Arg263 tandis que la pyridine terminale D est vers la poche P1, et son azote établit une interaction avec l'His252.

La pose 4A est similaire à la pose 4. Cependant, le méthyle est orienté différemment.

Les premières simulations par dynamique moléculaire ont été réalisées sur 6 ns à partir de ces poses de *docking* (Figure 37). Sur le graphique, l'énergie du complexe Pyridoclastax/Mcl-1 (en kcal.mol⁻¹) est en fonction du temps de la simulation (en ns).

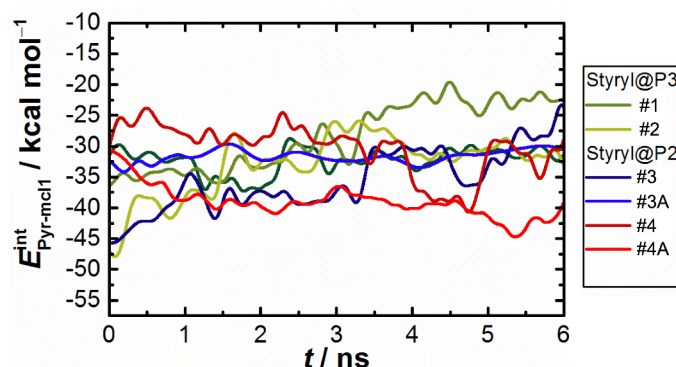


Figure 37 : Stabilité des complexes Pyridoclastax/Mcl-1 au cours de la simulation par DM.

Les poses 3 et 4A donnent les simulations les plus stables. Le styryle occupant la poche P2 de Mcl-1 semble l'hypothèse la plus probable. Les différentes orientations du groupement méthyle, vers la poche P3 dans la pose 3 et vers la poche P1 pour 4A, restent deux orientations à envisager également. De plus, ces résultats sont trop prématurés pour exclure les positions où le styryle occupe la poche P3, notamment dans la pose 2. D'après ces analyses, le groupement styryle est indispensable à l'interaction.

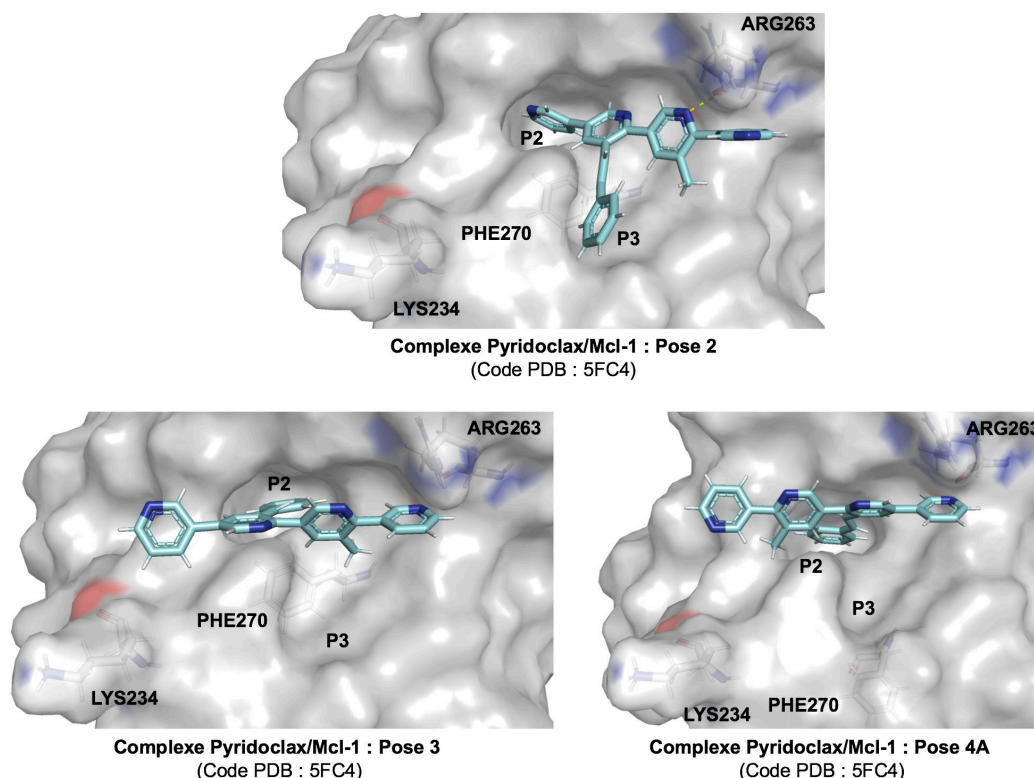


Figure 38 : Trois poses du Pyridoclastax dans Mcl-1 à envisager.

Nous avons donc trois positions à envisager (Figure 38) : la pose 2 où le styryle est dans la poche P3 ; la pose 3 où le styryle est dans P2, le méthyle dans P3 et la pyridine terminale D vers l'Arg263 ; et la pose 4A où le styryle est également dans P2 mais où la pyridine terminale A s'oriente vers l'Arg263.

2. Pourquoi le Pyridoclastax est-il sélectif de la protéine Mcl-1 ?

Notre objectif est de concevoir des *dual* inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Pour atteindre cet objectif, nous devons comprendre pourquoi le Pyridoclastax n'a pas d'affinité pour la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. Pour cela, nous avons aligné les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, ce qui permet de visualiser le Pyridoclastax, initialement *docké* dans Mcl-1, dans la protéine Bcl-x_L.

2.1. Matériels et Méthodes

- Préparation de la protéine

Les structures issues de la PDB sont préparées à partir de l'application *Protein Preparation Wizard*¹¹⁴ du logiciel Schrödinger, Maestro 2015-4 version 10-4-018.

Préalablement, les molécules d'eau et les molécules autres que le ligand, ayant cristallisées avec la protéine, sont supprimées. Si le fichier PDB contient plus d'une unité ligand/protéine, celles-ci sont supprimées pour n'en conserver qu'une seule.

Avec *Protein Preparation Wizard*, la première étape est un prétraitement de la structure. Celle-ci consiste à corriger les principaux problèmes structuraux (correction des ordres de liaison, addition des hydrogènes, création de ponts disulfures, modélisation des chaînes latérales et des boucles manquantes).

La deuxième étape est l'optimisation du réseau de liaisons hydrogène. Les fonctions amides des résidus asparagines et des résidus glutamines, ainsi que les cycles imidazoles des histidines sont réorientés.

La troisième étape est une minimisation sous contrainte de la structure. Le champ de force utilisé est OPLS2005 et les atomes lourds se déplacent pour optimiser la structure avec comme critère d'arrêt une valeur de RMSD de 0,30 Å.

- Alignement des protéines

Les protéines sont alignées à partir de *Superimpose* du logiciel *Discovery Studio*.¹¹⁵

Les alignements sont réalisés à partir de la séquence d'acide aminé du peptide ou de la protéine étudiée.

¹¹⁴Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, 27 (3), 221–234.

¹¹⁵Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio, version 4.5

2.2. Alignement des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Il n'est pas aisé de superposer la structure de ces deux protéines : leur séquence n'est pas assez similaire pour réussir un alignement correct. Pour accéder à la superposition des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, nous avons utilisé les complexes Bim/Mcl-1 (code PDB : 2PQK) et Bim/Bcl-x_L (code PDB : 3FDL). En effet, en superposant le peptide Bim présent dans les deux complexes, nous alignons indirectement les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L (Figure 39). Le RMSD est de 1,23 Å.

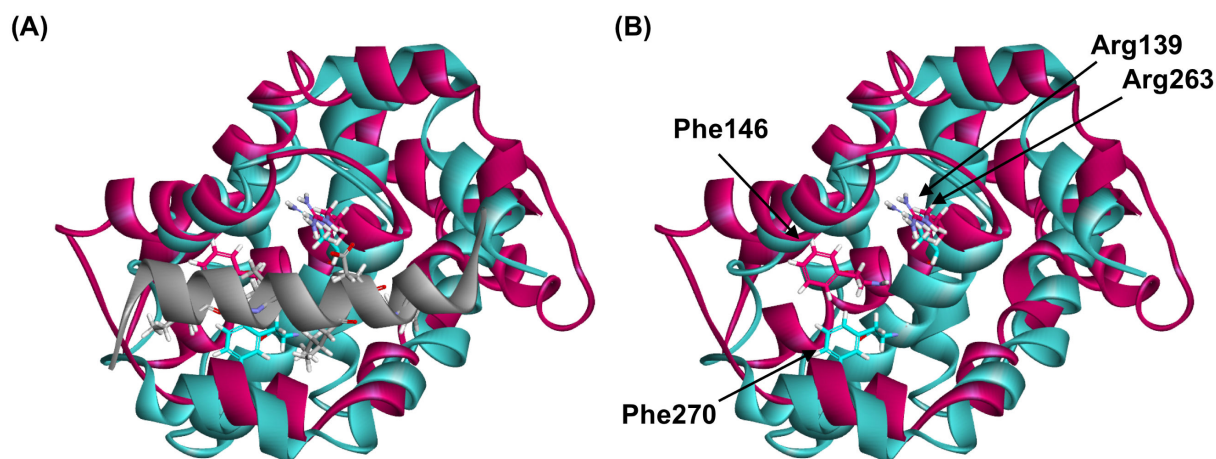


Figure 39 : Alignement des protéines Mcl-1 (en cyan) et Bcl-x_L (en fuchsia) à partir du BH3-*only* Bim (en gris).

Sur la Figure 39 (A), le BH3-*only* Bim (en gris) est représenté et celui-ci n'est pas représenté sur la Figure 39 (B), pour mieux apercevoir la Phe270 de Mcl-1 et la Phe146 de Bcl-x_L qui définissent la poche hydrophobe P2. Leur position diffère mais elles participent toutes les deux à l'interaction hydrophobe avec la Leu_c à la position *i*+3 sur Bim.

Les structures cristallographiques de la protéine Mcl-1 issues des complexes molécule/Mcl-1 ont été alignées à la structure Mcl-1 issue du complexe Bim/Mcl-1. Il en est de même pour les structures cristallographiques de la protéine Bcl-x_L avec la structure Bcl-x_L issue du complexe Bim/Bcl-x_L. Par conséquent, tous les complexes molécule/Mcl-1 et molécule/Bcl-x_L sont alignés.

Par exemple, l'alignement du complexe molécule **XII**/Mcl-1 (code PDB : 4TUH) avec le complexe ABT-737/Bcl-x_L (code PDB : 2YXJ) est illustré par la Figure 40.

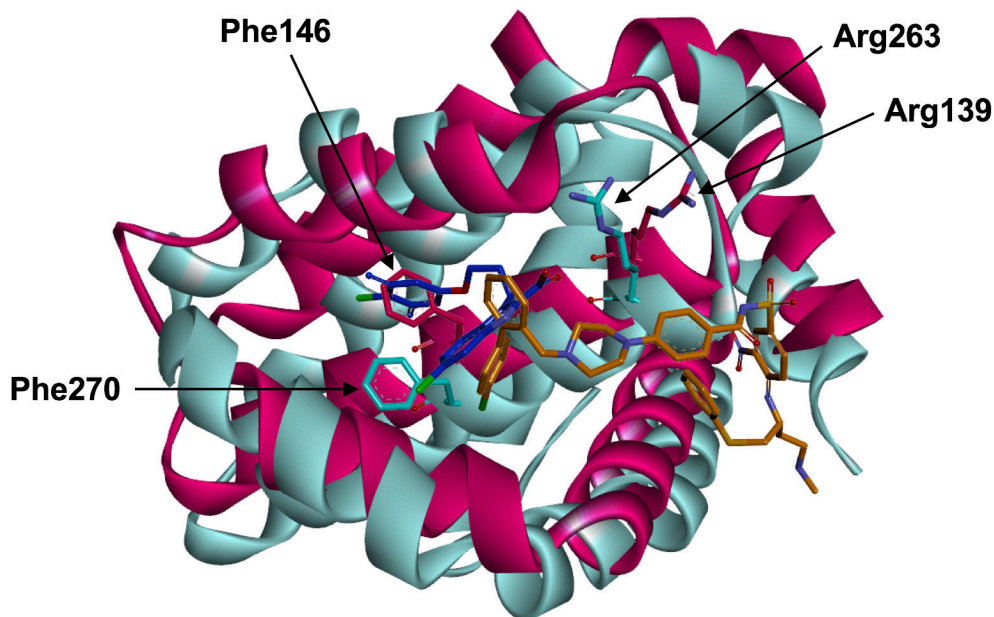


Figure 40 : Aligment des complexes molécule **XII**/Mcl-1 et ABT-737/Bcl-x_L.

La protéine Mcl-1 est en cyan, la Phe270 et l'Arg263 sont représentées en *stick*. La protéine Bcl-x_L est en fuchsia, la Phe146 et l'Arg139 sont représentées en *stick*. La molécule **XII**, inhibiteur de Mcl-1 est en bleu foncé et l'ABT-737, inhibiteur de Bcl-x_L, est en orange.

Par la superposition de ces complexes, nous observons que les poches hydrophobes P2 de Mcl-1 et Bcl-x_L sont différentes. En effet, le composé **XII** (en bleu), qui établit un π -*stacking* avec la Phe270 de Mcl-1, est bloqué par la Phe146 de Bcl-x_L. L'ABT-737, quant à lui, ne semble pas perturbé par la Phe270. L'Arg263 est mieux superposée à l'Arg139. La position du carboxylate de la molécule **XII**, qui interagit avec l'Arg263, pourrait interagir avec l'Arg139 de Bcl-x_L.

2.3. Observation du Pyridoclax dans la protéine Bcl-x_L

La protéine Mcl-1 du complexe Pyridoclax/Mcl-1 pose 3 (issue du *docking* à partir de la structure de Mcl-1 (code PDB : 5FC4)), est alignée à la protéine Mcl-1 du complexe Bim/Mcl-1. Par conséquent, la protéine Mcl-1 du complexe Pyridoclax/Mcl-1 peut être superposée à la protéine Bcl-x_L du complexe Bim/Bcl-x_L (code PDB : 3FDL). Nous pouvons visualiser le Pyridoclax dans la protéine Bcl-x_L.

Le Pyridoclax dans la protéine Bcl-x_L est illustré en Figure 41. La protéine Bcl-x_L est en fuchsia, la Phe146 et l'Arg139 sont en représentation *stick*, et le Pyridoclax est en cyan.

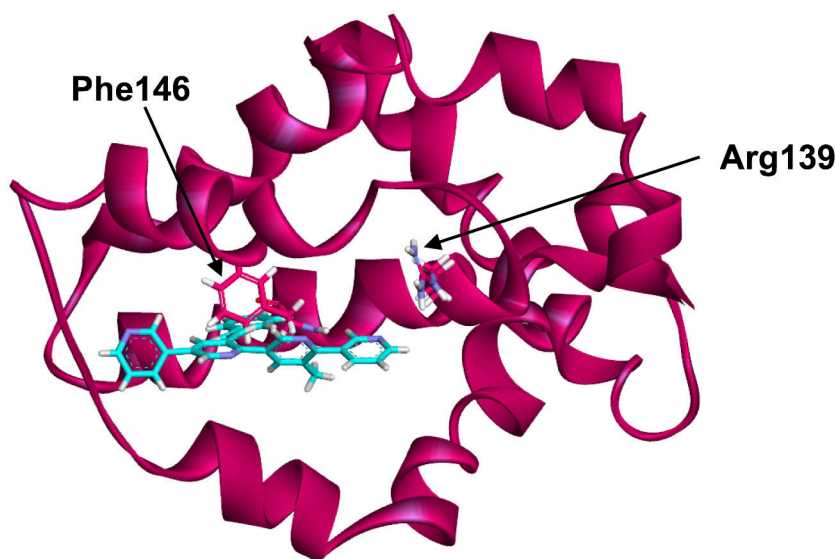


Figure 41 : Visualisation du Pyridoclax dans la protéine Bcl-x_L.

Nous pouvons observer que la Phe146, au fond de la poche P2 de Bcl-x_L, heurte le groupement styryle du Pyridoclax. Le squelette du Pyridoclax étant très rigide, il ne peut pas s'adapter à la morphologie de la poche P2 et de ce fait, ne peut éviter la Phe146.

La gêne occasionnée par la Phe146 dans l'interaction du ligand avec Bcl-x_L, pourrait expliquer la sélectivité du Pyridoclax pour Mcl-1.

Pour la conception de *dual* inhibiteurs, il faut prendre en compte la différence de positionnement de la Phe146 par rapport à la Phe270 de Mcl-1. La poche P2 est fondamentale pour l'interaction d'un ligand avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Le groupement choisi pour occuper cette poche doit être capable de s'adapter aux poches P2 de Mcl-1 et de Bcl-x_L. Si celui-ci ne s'adapte pas, nous aurons probablement une sélectivité pour l'une ou l'autre protéine. **A partir du Pyridoclax, nous pouvons envisager de moduler le groupement styryle tout en le conservant ou alors de modifier la quaterpyridine pour un squelette moins rigide.**

III. Conception rationnelle de molécules à partir de la structure du Pyridoclax

Nous avons fait le choix de construire notre propre librairie de fragments à partir de la fragmentation du Pyridoclax au lieu d'utiliser des librairies commerciales par exemple. La qualité de la librairie de fragments est essentielle pour mener à bien la découverte d'une molécule active. Il nous semblait pertinent de concevoir des fragments à partir d'un *lead* qui a fait ses preuves concernant son activité sur Mcl-1.

Nous entendons par le terme *fragmentation* du Pyridoclax le « découpage » de la structure de celui-ci afin de conserver la partie essentielle et de la moduler.

Les fragments sont composés des pyridines A et B du Pyridoclax ainsi que du groupement styryle comme substituant (en gras sur la Figure 42).

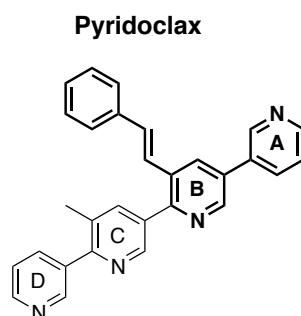


Figure 42 : Pyridoclax.

D'après les études de modélisation moléculaire du Pyridoclax, le groupement styryle est fondamental pour l'interaction et nous avons fait le choix de le conserver pour nos fragments.

Les études de relations structure-activité ont permis de mettre en évidence les parties essentielles du Pyridoclax pour son activité pro-apoptotique, telle que la nécessité de conserver au moins une des deux pyridines terminales (A ou D). Par conséquent, ayant fait le choix de conserver le styryle, les fragments sont composés de la pyridine B qui supporte ce groupement et, entre les pyridines A ou D, nous conservons la pyridine A, adjacente à la pyridine B (Figure 43).

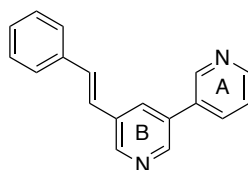


Figure 43 : Fragment issu du Pyridoclax, conservé dans toutes les molécules conçues par la suite.

Le groupement méthyle du Pyridoclax est indispensable pour l'activité pro-apoptotique parce qu'il permet d'orienter la pyridine D. Sans ce groupement méthyle, les pyridines C et D seraient coplanaires. Or, nous nous intéressons à la conception de fragments qui ne contiendront pas la pyridine D, c'est pourquoi nous nous affranchissons de la présence du méthyle.

En considérant que le styryle peut occuper la poche P2 (hypothèse 1) ou la poche P3 (hypothèse 2) de Mcl-1, différents fragments sont proposés. L'hypothèse 1 est basée sur la pose 3 et l'hypothèse 2 est basée sur la pose 2 du *docking* du complexe Pyridoclax/Mcl-1.

1.1. Conception de molécules selon l'hypothèse 1

Les fragments obtenus en suivant l'hypothèse 1, où le styryle du Pyridoclax occupe la poche P2 de Mcl-1, sont présentés de façon générale sur le Schéma 6.

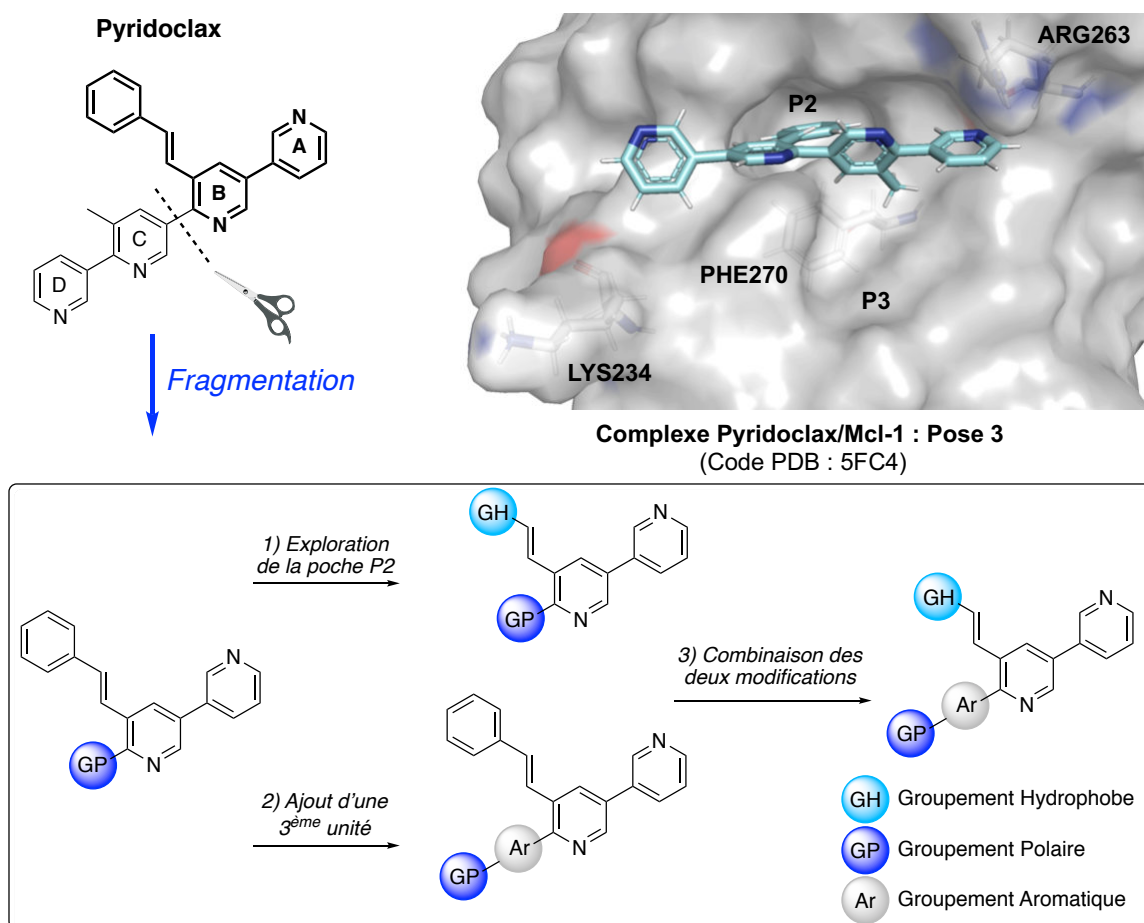


Schéma 6 : Conception de molécules selon l'hypothèse 1.

Un premier fragment a été envisagé. Dans ce fragment, les pyridines A et B du Pyridoclax sont conservées, et un groupement polaire est ajouté. Ce groupement polaire pourrait interagir avec les arginines conservées des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Deux modifications sont envisagées pour améliorer l'interaction à partir du premier fragment :

- La première modification est l'exploration de la poche P2 : le styryle peut être remplacé par un groupement hydrophobe plus volumineux.
- La deuxième modification est l'ajout d'une troisième unité aromatique portant un groupement polaire.

Enfin, la combinaison des deux modifications, *i.e.* l'exploration de la poche P2 et l'ajout d'une troisième unité aromatique a été envisagée.

Plus précisément, cinq composés ont retenu notre attention et leur étude en modélisation moléculaire est présentée dans ce manuscrit (Figure 44).

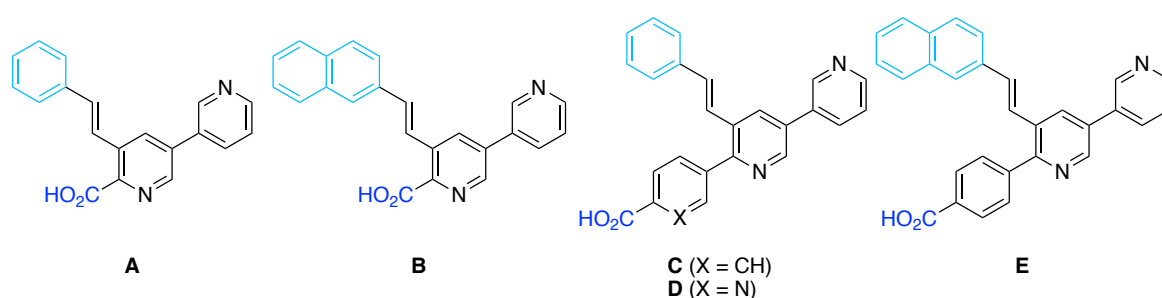


Figure 44 : Structure des cinq composés conçus.

Le composé **A** est le fragment initial. Il possède un acide carboxylique comme groupement polaire. Cet acide pourrait interagir avec les arginines mais également être utilisé comme *linker* en vue de lier un autre fragment par la suite.

Pour l'exploration de la poche hydrophobe (première modification), la molécule **B** est composée d'un 2-vinylnaphtalène comme groupement hydrophobe.

Pour la deuxième modification, le composé **C** possède une pyridine et le composé **D** un benzène comme troisième unité aromatique, avec un acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction en tant que groupement polaire.

Enfin, la combinaison des deux modifications a conduit à la conception du composé **E**.

1.2. Conception de molécules selon l'hypothèse 2

De la même façon, à partir de l'hypothèse 2 où le styryle du Pyridoclast occupe la poche P3, nous avons envisagé trois modifications du fragment : l'ajout d'un *linker*, d'un groupement polaire et d'une troisième unité aromatique. Les fragments conçus sont présentés dans le Schéma 7.

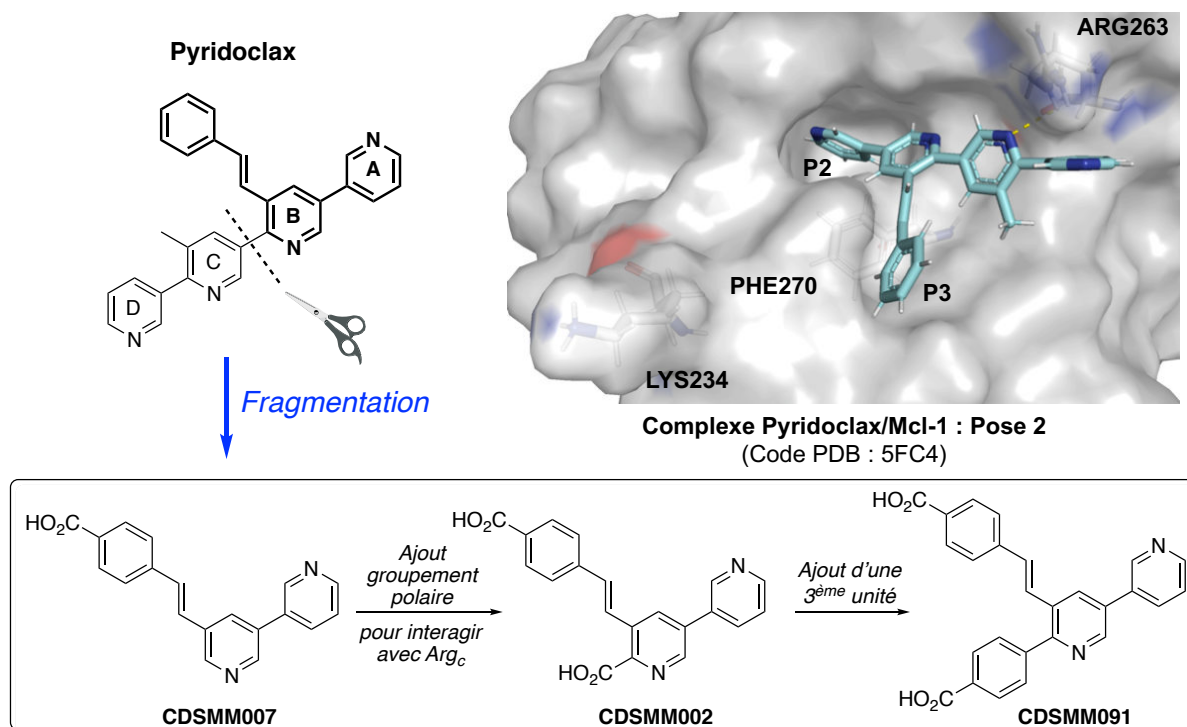


Schéma 7 : Conception de molécules selon l'hypothèse 2.

La pyridine A est dans la poche P2. Le styryle, occupant la poche P3, est accessible pour ajouter un acide carboxylique en *para* de la double liaison, qui pourra être utilisé par la suite comme *linker* (**CDSMM007**). De même, il est possible d'ajouter un groupement polaire sur la pyridine B pour interagir avec les arginines de Mcl-1 et Bcl-x_L (**CDSMM002**). Enfin, une molécule comportant une troisième unité aromatique, avec un acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction a été envisagée (**CDSMM091**).

IV. Modélisation Moléculaire : Méthodes utilisées

1. Numérotation des composés

Dans ce manuscrit, le composé est numéroté **MRxxxxx** lorsque la molécule a été synthétisée chimiquement et répertoriée dans la chimiothèque de notre laboratoire. Les trois premiers chiffres suivant l'indication MR permettent d'identifier le chimiste l'ayant synthétisé pour la première fois. Les séries de molécules que j'ai synthétisées sont numérotées **MR349xx** et **MR361xx**. Les intermédiaires de synthèses qui ne sont pas enregistrés systématiquement dans la chimiothèque sont numérotés en chiffres arabes.

Cependant, tous les composés envisagés n'ont pas été synthétisés chimiquement. Pour ceux-là, l'appellation **CDSMMxxx** sera adoptée dans ce manuscrit (CDS pour Camille DeniS et MM pour Modélisation Moléculaire).

2. Matériels et Méthodes

Les travaux réalisés sur les molécules conçues peuvent se diviser en trois grandes étapes : 1) le *docking* ; 2) la simulation par Dynamique Moléculaire (DM) ; et 3) le calcul de l'énergie libre de liaison par la méthode MM-GBSA.

Pour réaliser un *docking*, deux requis sont nécessaires : la conception de la molécule et son analyse conformationnelle ; et la préparation de la protéine.

La suite Schrödinger est utilisée avec le logiciel Maestro 2015-4 version 10-4-018.

2.1. Construction de la molécule et analyse conformationnelle

Après avoir dessiné la molécule, nous prédisons son état de protonation à pH $7,0 \pm 2,0$ avec la fonction *Epik*.^{116,117}

Ensuite, avec *MacroModel*, nous réalisons une minimisation de l'énergie suivie d'une analyse conformationnelle.

¹¹⁶Greenwood, J. R.; Calkins, D.; Sullivan, A. P.; Shelley, J. C. Towards the Comprehensive, Rapid, and Accurate Prediction of the Favorable Tautomeric States of Drug-like Molecules in Aqueous Solution. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (6–7), 591–604.

¹¹⁷Shelley, J. C.; Cholleti, A.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Timlin, M. R.; Uchimaya, M. Epik: A Software Program for PK a Prediction and Protonation State Generation for Drug-like Molecules. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2007**, *21* (12), 681–691.

Pour la minimisation, le champ de force est OPLS2005¹¹⁸ et l'eau est choisie comme solvant (modèle *continuum*). L'algorithme de gradient conjugué utilisé est PRCG (*Polak-Ribiere Conjugate Gradient*). Le critère de convergence se base sur la valeur moyenne quadratique du gradient d'énergie avec une valeur de 0,05 kJ.mol⁻¹.Å⁻¹ pour la convergence.

L'analyse conformationnelle est réalisée avec *Conformational Search*. Cette analyse permet de proposer les géométries de la molécule étudiée de plus basse énergie, en faisant varier les angles dièdres. La méthode utilisée est *Systematic Torsional Sampling* (SPMC).¹¹⁹ C'est une méthode Monte Carlo qui requiert un nombre de variables à définir. Ces variables sont configurées automatiquement pendant le calcul. La variable de fin est de 100 rotations par liaisons rotatives ce qui permet d'explorer l'espace conformationnel. *Torsional Sampling* permet de contrôler la configuration automatique de l'échantillonnage de torsion des liaisons qui ont généralement de hautes barrières énergétiques. Ces liaisons sont les liaisons simples C–O et C–N des fonctions amides et esters par exemple, et les doubles liaisons C=O et C=N. Nous choisissons le niveau d'échantillonnage intermédiaire, qui analyse les liaisons simples C–O et C–N autres que celles des amides et esters. Pour éliminer les conformères redondants, un RMSD est calculé pour tous les atomes entre deux structures, si celui-ci est inférieur à 0,5 Å, alors les structures sont considérées comme équivalentes.

2.2. Préparation de la protéine

La protéine, issue de la PDB est préparée en trois étapes avec *Protein Preparation Wizard*.¹¹⁴ Le protocole est identique à celui décrit dans Matériels et Méthodes de la partie II.2 du chapitre 1 des Travaux Personnels. A la suite de ces trois étapes (prétraitement, optimisation et minimisation), la structure de la protéine est prête à être utilisée.

2.3. Docking

Pour le composé étudié, un *docking* est réalisé sur l'ensemble des structures cristallographiques des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L retenues. A la suite de ce *docking*, les différentes poses proposées sont classées selon un score de *docking* et sont étudiées. Les meilleures poses sont retenues pour la simulation par dynamique moléculaire.

¹¹⁸Banks, J. L.; Beard, H. S.; Cao, Y.; Cho, A. E.; Damm, W.; Farid, R.; Felts, A. K.; Halgren, T. A.; Mainz, D. T.; Maple, J. R.; et al. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1752–1780.

¹¹⁹Kolossváry, I.; Guida, W. C. Torsional Flexing: Conformational Searching of Cyclic Molecules in Biased Internal Coordinate Space. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14* (6), 691–698.

Le *docking* est effectué avec *Glide* (*Grid-based Ligand Docking with Energetics*).^{120,121,122} *Glide* recherche les interactions favorables entre un ligand et un récepteur, souvent une protéine, et peut être utilisé pour un *docking* rigide ou flexible. Dans un *docking* rigide, la structure du ligand reste fixe alors que dans un *docking* flexible, différentes conformations du ligand sont générées (la structure du ligand peut s'adapter à la protéine).

La combinaison d'une conformation du ligand avec sa position et son orientation est appelée une « pose de *docking* ». *Glide* génère des poses triées par une série de filtres hiérarchiques qui évaluent les interactions du ligand avec le récepteur. Les premiers filtres testent l'ajustement spatial du ligand dans un site actif défini et examinent la complémentarité des interactions ligand-récepteur. Les poses issues des premiers filtres entrent dans la phase finale de l'algorithme : le ligand est minimisé dans le récepteur à l'aide d'une fonction d'énergie de mécanique moléculaire OPLS-AA (*All Atom Optimized Potentials for Liquid Simulations*). Un score de *docking*, appelé XP *GlideScore*, est généré pour prédire l'affinité de liaison et permettre de classer les poses minimisées.

Pour réaliser le *docking*, nous devons préalablement définir le site actif de la protéine, en utilisant *Receptor Grid Generation*.

Une grille définissant le site actif va être construite par une méthode classique très proche de celle d'Autodock.^{123,124} Le centre de la grille correspond au centroïde du ligand d'origine inclus dans le site d'interaction. La taille de cette grille est équivalente à la taille du site d'interaction du ligand d'origine.

Une fois le site actif généré, la fonction *ligand docking* permet d'initier le *docking*. Le *docking* est réalisé en précision XP (extra précision) et la structure de la molécule est flexible.¹²⁵ Un score de *docking*, appelé le XP *GlideScore*, est obtenu.

¹²⁰Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1750–1759.

¹²¹Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; et al. *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.

¹²²Zhou, Z.; Felts, A. K.; Friesner, R. A.; Levy, R. M. Comparative Performance of Several Flexible Docking Programs and Scoring Functions: Enrichment Studies for a Diverse Set of Pharmaceutically Relevant Targets. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (4), 1599–1608.

¹²³Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

¹²⁴Bureau, R. Modélisation Moléculaire et Conception de Nouveaux Ligands d'intérêts Biologiques. *Technique de l'Ingénieur* **2014**.

¹²⁵Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision *Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6177–6196.

Le score de *docking* prend en considération, en plus des paramètres standards, l'identification de motifs structuraux spécifiques qui contribuent largement à l'affinité d'interaction et la pénalité liée à la désolvatation des groupements polaires et chargés du ligand et de la protéine.

Il est calculé en additionnant différentes composantes énergétiques correspondant 1) aux interactions stériques et électrostatiques entre le ligand et le récepteur (calcul par les méthodes classiques) ; 2) à des critères de liaison associés (liaisons hydrophobes et liaisons hydrogènes) ; 3) à des phénomènes entropiques comme la désolvatation ou les contraintes sur le ligand.

Plus le score est négatif, plus le positionnement de la molécule dans la protéine est correct.

Pour avoir une estimation de la pertinence du *docking* effectué sur les molécules étudiées, le *docking* de la molécule d'origine a été réalisé. Le Tableau 5 récapitule les différents scores de *docking* obtenus. La position du ligand d'origine obtenue par *docking* se superpose à chaque fois à la position du ligand d'origine obtenue lors de la cristallisation.

Figure (n° page)	Protéine (Code PDB)	Ligand d'origine	Score de <i>docking</i>
Figure 34 (105)	Mcl-1 (4WMU)	Composé XII	-12,3
Figure 35 (106)	Mcl-1 (5FC4)	Composé XIII	-10,3
Figure 31 (101)	Bcl-x _L (2YXJ)	ABT-737	-10,3
Figure 32 (103)	Bcl-x _L (3ZLN)	Composé XX	-13,4
Figure 32 (103)	Bcl-x _L (3ZLR)	WEHI-539	-14,8

Tableau 5 : Scores de *docking* des ligands d'origine.

Les meilleures poses de *docking* sont retenues pour réaliser des simulations par dynamique moléculaire.

2.4. Simulation par Dynamique Moléculaire (DM)

Une simulation par dynamique moléculaire est effectuée sur un temps de 50 ns. Des travaux préliminaires au laboratoire ont montré que 50 ns sont nécessaires et suffisantes pour identifier les principales interactions et avoir une estimation de la stabilité du complexe suite au *docking* (comparaison entre les structures envisagées). Avec cette simulation, nous étudierons la stabilité de l'interaction entre la molécule étudiée et la protéine et une estimation des contacts entre le ligand et la protéine sera présentée sous forme d'histogramme.

Les simulations par DM sont réalisées en trois étapes avec *Desmond*.¹²⁶ Les paramètres par défaut sont conservés.

La première étape est la construction du système. Réaliser des simulations sur des systèmes biologiques aqueux nécessite la préparation de la protéine et du ligand, l'addition de contre-ions pour neutraliser le système, la sélection de la taille de la boîte de simulation, l'ajout des molécules d'eau comme solvant. Cette procédure est souvent fastidieuse. *System Builder* automatise ce processus et réduit considérablement l'effort requis. Une boîte de molécules d'eau de dimension $10 \times 10 \times 10 \text{ \AA}$ est créée en utilisant le modèle prédéfini SPC (*Simple Point-Charge*). Des ions chlorures ou sodiques sont ajoutés pour conduire à une concentration molaire de 0,30 M.

La deuxième étape est la minimisation du système. Elle est indispensable pour faciliter la configuration de la simulation. Elle consiste à déterminer les coordonnées du système représentant une conformation pour laquelle l'énergie est minimale. Les paramètres par défaut représentent un bon équilibre entre la précision et la performance. Le critère de convergence correspond à un gradient de $0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$.

La troisième étape est la dynamique moléculaire. Elle simule la dynamique du système, en produisant une trajectoire des coordonnées, des vitesses et des énergies des particules en fonction du temps. La simulation par DM se décompose en une phase d'équilibration qui précède la phase de production.

Une phase d'équilibration est nécessaire pour stabiliser la température et le système. Pour cela, une série de minimisations et de courtes simulations par DM sont effectuées pour relaxer le système avant de lancer la production de la DM. Plus précisément, une première relaxation du système est réalisée à basse température ($T = 10 \text{ K}$), à volume constant, en infligeant des contraintes sur les atomes lourds pendant un temps de 150 ps. Puis, en augmentant la température à la valeur désirée, $T = 300 \text{ K}$, une simulation est effectuée en conservant les contraintes sur les atomes lourds pendant 12 ps. Le système est maintenant dans un ensemble isobarique-isothermique NPT, correspondant à une température constante (300 K) et une pression constante (1,01325 bar) lors de la simulation. Enfin, le système, sans aucune contrainte appliquée, est relaxé pendant 24 ps à 300 K.

¹²⁶Bowers, K. J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossvary, I.; Moraes, M. A.; Sacerdoti, F. D.; Salmon, J. K.; Shan, Y.; Shaw, D. E. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, 2006, November 11-17.

Finalement, lors de la phase de production, le système évolue pendant un temps donné : ici il est de 50 ns. Cette dernière étape correspond à la création de trajectoires lesquelles, comme mentionné ci-dessus, précisent la variation de la position et de la vitesse des particules en fonction du temps. Ces données sont enregistrées à des intervalles réguliers pour des analyses ultérieures. Ici, l'intervalle d'enregistrement est de 200 ps, ce qui correspond à la production de 252 conformations.

La stabilité du complexe molécule/protéine est étudiée lors de cette simulation.

Nous avons choisi de présenter sous la forme d'un histogramme, les interactions établies entre la molécule étudiée et la protéine cible. Ces interactions peuvent être de différentes natures :

- **Interaction par liaison hydrogène**

Les liaisons hydrogène (H) jouent un rôle significatif dans la liaison du ligand à la protéine. Les liaisons hydrogène entre une protéine et un ligand peuvent être formées par des accepteurs (A) ou donneurs (D) de liaison hydrogène situés sur la protéine. Ces A et D se situent sur le *backbone* ou sur les chaînes latérales des acides aminés qui constituent la protéine. Les critères géométriques utilisés sont :

- Une distance de 2,5 Å entre les atomes donneur et accepteur de liaison hydrogène (D-H...A).
- L'angle « donneur » définit par les atomes Donneur-Hydrogène-Accepteur (D-H...A) $\geq 120^\circ$.
- L'angle « accepteur » définit par les atomes Hydrogène-Accepteur-atome X (H...A-X) $\geq 90^\circ$.

- **Interaction hydrophobe**

Les contacts hydrophobes peuvent être des interactions π -cation, π - π (appelés également π -*stacking*) ou d'autres interactions non spécifiques. Généralement, ces types d'interactions impliquent un acide aminé hydrophobe et un groupe aromatique ou aliphatique sur le ligand. Les critères géométriques utilisés sont :

- Les interactions π -cation sont définies entre un groupe aromatique et un groupe chargé distants de moins de 4,5 Å.
- Les interactions π - π sont définies entre deux groupes aromatiques, qui peuvent être parallèles ou perpendiculaires.
- Les interactions non spécifiques sont définies entre une chaîne latérale hydrophobe non spécifique distante de moins de 3,6 Å des carbones aromatiques ou aliphatiques du ligand.

- **Interaction ionique ou polaire**

Ces interactions s'établissent entre deux atomes chargés, à moins de 3,7 Å l'un de l'autre, et n'impliquant pas de liaison hydrogène. Ces interactions peuvent être médiées par les atomes du *backbone* ou des chaînes latérales de la protéine.

- **Interaction par l'intermédiaire de molécules d'eau**

Ce sont des interactions formées par liaison hydrogène, médiées par une molécule d'eau qui forme un pont entre le ligand et la protéine. La définition de la géométrie de la liaison hydrogène est légèrement relâchée par rapport à la définition standard. Les critères géométriques utilisés sont :

- Une distance de 2,7 Å entre les atomes donneur et accepteur de liaison hydrogène (D–H···A).
- L'angle « donneur » définit par les atomes Donneur–Hydrogène–Accepteur (D–H···A) $\geq 110^\circ$.
- L'angle « accepteur » définit par les atomes Hydrogène–Accepteur–atome X (H···A–X) $\geq 80^\circ$.

2.5. Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind} par la méthode de MM-GBSA

A partir de la simulation par dynamique moléculaire, l'énergie libre de liaison ΔG_{bind} est calculée par la méthode MM-GBSA (*Molecular Mechanics energies combined with Generalized Born and Surface Area continuum solvation*).¹²⁷ C'est une approche pertinente pour estimer l'énergie libre de liaison de petites molécules dans des macromolécules. Une valeur de ΔG_{bind} est associée à chaque conformation obtenue lors de la simulation par DM. Celle-ci rend compte de l'affinité d'interaction du ligand dans la protéine.

La méthode *Prime* MM-GBSA génère de nombreuses propriétés énergétiques. Ces propriétés rendent compte des énergies liées aux structures du ligand, de la protéine et du complexe ligand/protéine ainsi que des différences d'énergie relatives à l'interaction. Nous allons nous intéresser à l'énergie de liaison ΔG_{bind} , qui correspond à l'énergie du complexe à laquelle sont soustraites l'énergie du ligand et l'énergie de la protéine. **Plus l'énergie de liaison ΔG_{bind} est négative, plus l'affinité de la molécule étudiée pour la protéine est forte.**

¹²⁷Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (5), 449–461.

L'énergie libre de liaison ΔG_{bind} est calculée pour les 252 conformations (conf.) de la simulation par DM. Elles sont classées par ordre croissant de la valeur du ΔG_{bind} et la meilleure conformation est sélectionnée. Les images des molécules étudiées dans les protéines cibles sont établies à partir de cette meilleure conformation. Elles sont réalisées à partir du logiciel PyMOL.¹²⁸

Pour avoir une estimation de la pertinence du ΔG_{bind} obtenu pour les molécules étudiées, le ΔG_{bind} de la molécule d'origine a été calculé (Tableau 6).

Figure (n° page)	Protéine (Code PDB)	Ligand d'origine	K _i ^a ou CI ₅₀ ^b (nM)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
Figure 34 (105)	Mcl-1 (4WMU)	Composé XII	55 ^a	31	-123,25
Figure 35 (106)	Mcl-1 (5FC4)	Composé XIII	231 ^a	163	-122,94
Figure 31 (101)	Bcl-x _L (2YXJ)	ABT-737	<1 ^a	106	-161,85
Figure 32 (103)	Bcl-x _L (3ZLN)	Composé XX	23 ^b	10	-122,40
Figure 32 (103)	Bcl-x _L (3ZLR)	WEHI-539	1,1 ^b	2	-166,93

Tableau 6 : Energies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues pour les ligands d'origine.

Les structures des molécules **XII** et **XIII** sont très proches : elles sont composées respectivement d'un groupement 3,5-diméthyl-4-chloro-phényle et d'un groupement naphthyle qui occupent la poche P2 de Mcl-1 ; et respectivement d'un carboxylate et d'un acylsulfonamide pour interagir avec l'Arg263. Les valeurs de ΔG_{bind} sont autour de -123 kcal.mol⁻¹. Il faut noter que la valeur de ΔG_{bind} pour le composé **XIII** est haute comparée au K_i mesuré. Pour Bcl-x_L, une amélioration du ΔG_{bind} est observée entre le composé **XX** qui occupe principalement la poche P2 ($\Delta G_{\text{bind}} = -122,40$) et les composés ABT-737 ($\Delta G_{\text{bind}} = -161,85$) et WEHI-539 ($\Delta G_{\text{bind}} = -166,93$) qui occupent les P2, P3 et P4.

La méthode MM-GBSA est utilisée pour estimer une valeur d'affinité de liaison relative pour une liste de ligands. Les valeurs absolues calculées ne sont pas nécessairement en accord avec les valeurs d'affinité de liaison expérimentales. Cependant, on peut s'attendre à ce que le classement des ligands basé sur les énergies de liaison ΔG_{bind} calculées, soit raisonnablement en accord avec le classement basé sur l'affinité de liaison expérimentale. Comme les énergies de liaison calculées par la méthode MM-GBSA sont des énergies de liaison libres approximatives, une valeur plus négative indique une liaison plus forte.

¹²⁸PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

V. Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclax

Nous présentons tout d'abord les résultats de modélisation moléculaire des molécules provenant de l'hypothèse 1 du positionnement du Pyridoclax dans la protéine Mcl-1 (voir Schéma 6 page 116) suivi par les résultats des molécules conçues à partir de l'hypothèse 2 (voir Schéma 7 page 118). Nous avons étudié chacun des composés dans nos deux cibles d'intérêt, Mcl-1 et Bcl-x_L. Pour chacun des composés, nous présenterons une image de la molécule dans la protéine correspondant à la conformation ayant le ΔG_{bind} le plus bas lors de la simulation par DM. La DM a été réalisée à partir de différentes poses sélectionnées à l'étape du *docking*.

1. Selon l'hypothèse 1

Pour rappel, dans l'hypothèse 1, le styryle occupe la poche hydrophobe P2 de Mcl-1. La quaterpyridine est alignée dans la cavité hydrophobe BH3 selon un axe imaginaire Arg263–Lys234. Le méthyle sur la pyridine C se projette dans la poche P3. La pyridine terminale A est dans la poche P1. La pyridine terminale D est à proximité de l'Arg263, et son azote est dans la direction de cette arginine (Figure 45).

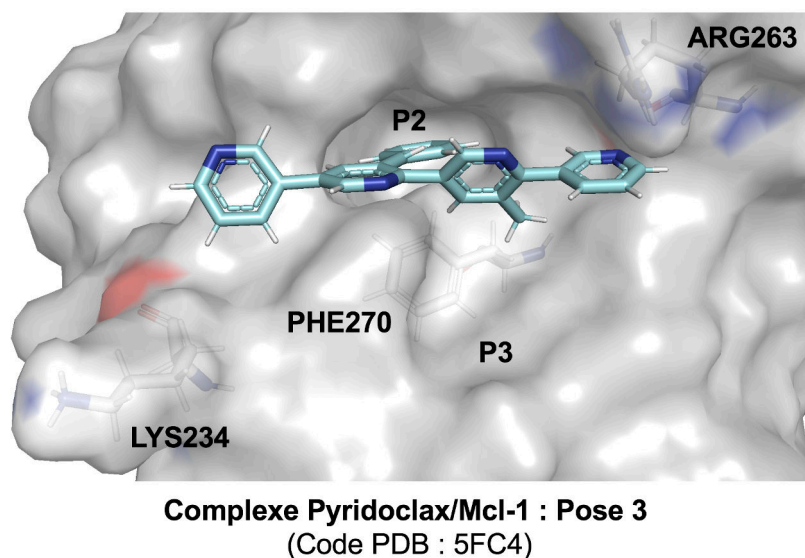


Figure 45 : Définition de la pose du Pyridoclax dans Mcl-1 selon l'hypothèse 1.

1.1. Résultats et discussion sur le composé **MR34911**

Le composé **MR34911** est le premier fragment conçu à partir de la fragmentation du Pyridoclastax (Figure 46).

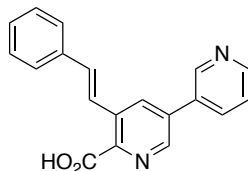


Figure 46 : Structure du **MR34911**.

Sur la Figure 47 sont assemblés les différents résultats obtenus en modélisation moléculaire.

- **Complexes avec la protéine Mcl-1**

Deux poses sont ressorties du *docking* à partir de la structure code PDB 5FC4. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. Dans ces deux poses, le styryle occupe la poche hydrophobe P2. Dans la pose 1 (Figure 47A), le carboxylate est orienté vers l'Arg263 et la pyridine terminale vers la Lys234. Dans la pose 2 (Figure 47C), c'est l'inverse, *i.e.* le carboxylate est orienté vers la Lys234.

Suite à la simulation par DM, nous obtenons un histogramme représentant les résidus participant le plus à l'interaction avec la molécule **MR34911**. Les interactions par liaison hydrogène sont en vert, celles établies par contacts hydrophobes en violet, par contacts ioniques en rose et par l'intermédiaire de molécules d'eau en bleu. En ordonnée la fraction d'interaction est indiquée. Par exemple, 0,7 indique que l'interaction est maintenue pendant 70 % du temps de la simulation. Les valeurs supérieures à 1,0 sont possibles puisque certains résidus peuvent établir de multiples contacts avec le ligand.

A partir de la pose 1 (Figure 47B), les résidus Val253, Met231, Ala227 et Phe270 sont impliqués dans des interactions hydrophobes. L'His224 *via* un pont établi par une molécule d'eau interagit pendant 60 % de la simulation avec le carboxylate. Cependant, le carboxylate est trop éloigné de l'Arg263 pour créer une liaison. A partir de la pose 2 (Figure 47D), la majorité des interactions sont hydrophobes. Un π -stacking est observé entre le picolinate et la Phe270 appartenant à la poche P2. Une interaction, principalement établie par liaison hydrogène, est observée entre la Lys234 et le carboxylate.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast

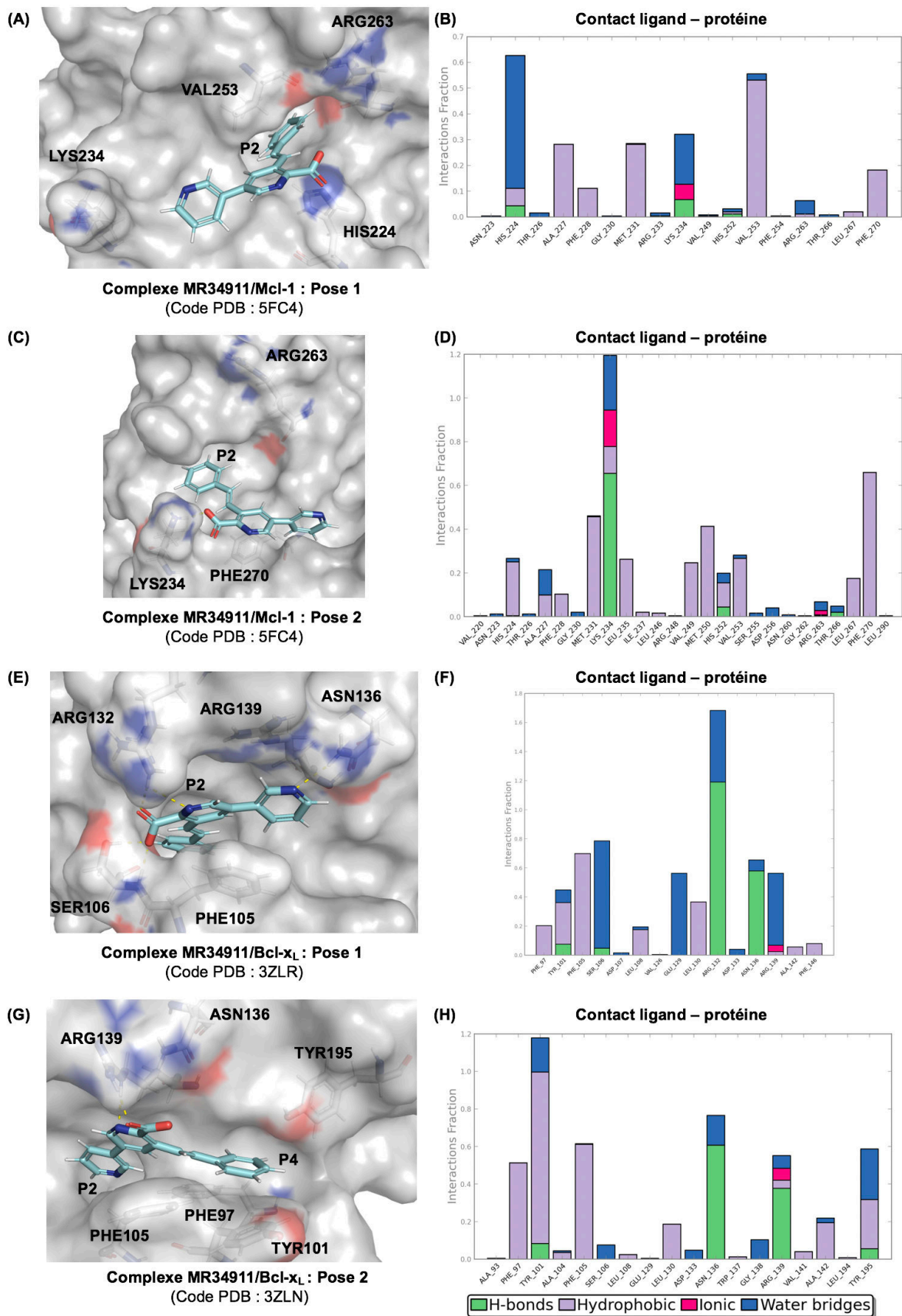


Figure 47 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34911**. Complexes **MR34911/Mcl-1** (A et C) et complexes **MR34911/Bcl-xL** (E et G) ; Histogrammes des contacts **MR34911/Mcl-1** (B et D) et **MR34911/Bcl-xL** (F et H) lors des simulations par DM.

- **Complexes avec la protéine Bcl-x_L**

Deux poses sont ressorties du *docking* à partir des structures codes PDB 3ZLN et 3ZLR. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. Dans la pose 1 (Figure 47E), le groupement styryle occupe la poche hydrophobe P2. Le carboxylate est orienté vers l'Arg132 et la pyridine terminale vers l'Arg139. Dans la pose 2 (Figure 47G), la molécule est étendue dans la cavité hydrophobe BH3. La pyridine terminale est à l'entrée de la poche P2 et le groupement styryle occupe la poche P4. Dans cette pose, le carboxylate est à proximité de l'Arg139.

Lors de la simulation par DM, le complexe était stable. A partir de la pose 1 (Figure 47F), un π -stacking entre la Phe105 et le picolinate stabilise l'interaction. Le carboxylate forme une interaction avec plusieurs résidus de la protéine : d'un côté avec l'Arg132 par liaison H et de l'autre avec la Ser106 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'atome d'azote de la pyridine terminale forme également une liaison H avec l'Asn136. A partir de la pose 2 (Figure 47H), la molécule est stabilisée par des contacts hydrophobes dans les poches P2 (avec la Phe105) et P4 (avec la Phe97 et la Tyr101 notamment).

- **Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind}**

Dans le but de privilégier une des poses par rapport à l'autre pour les différents complexes, nous avons calculé l'énergie libre de liaison ΔG_{bind} par la méthode MM-GBSA. Les valeurs sont résumées dans le Tableau 7.

Molécule	Mcl-1 – Pose 1 (5FC4)		Mcl-1 – Pose 2 (5FC4)		Bcl-x _L – Pose 1 (3ZLR)		Bcl-x _L – Pose 2 (3ZLN)	
	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
MR34911	221	-67,75	160	-71,52	5	-87,99	15	-86,13

Tableau 7 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.

Les valeurs de ΔG_{bind} sont très proches pour les poses 1 et 2 du complexe **MR34911**/Mcl-1 et également du complexe **MR34911**/Bcl-x_L. A partir de ces données, nous ne pouvons pas privilégier une pose, les deux poses sont à envisager.

Pour Bcl-x_L, les calculs n'ont pas été réalisés à partir de la même structure. Pour la pose 1, c'est avec la protéine Bcl-x_L (3ZLR) que l'on a obtenu le meilleur score de *docking* et que les analyses (simulations par DM et calcul de l'énergie libre de liaison) ont été poursuivies. Alors que pour la pose 2, le meilleur score de *docking* a été obtenu avec la protéine Bcl-x_L (3ZLN). Par conséquent, il est difficile de comparer rigoureusement les deux poses. Néanmoins, les poses 1 et 2 ont des valeurs similaires et les deux poses peuvent être envisagées.

1.2. Résultats et discussion sur le composé **MR34917**

La première modification de la structure du **MR34911**, le remplacement du styryle par un 2-vinylnaphtalène, conduisant à la molécule **MR34917** (Figure 48), permet l'exploration de la poche hydrophobe P2.

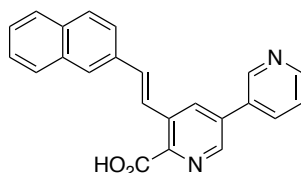


Figure 48 : Structure du **MR34917**.

Les résultats de modélisation moléculaire sont illustrés sur la Figure 49.

- **Complexes avec la protéine Mcl-1**

Deux poses sont majoritairement ressorties du *docking* à partir de la structure code PDB 5FC4. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. Dans la pose 1 (Figure 49A), le 2-vinylnaphtalène occupe la poche P2, le carboxylate est orienté vers l'Arg263 et la pyridine terminale vers la poche P4. Dans la pose 2 (Figure 49C), le 2-vinylnaphtalène occupe la poche P2, le carboxylate est orienté vers la Lys234 et la pyridine terminale vers P1.

Lors de la simulation par DM, que ce soit à partir de la pose 1 ou 2 (Figure 49B et 49D respectivement), le ligand se déplace considérablement. En effet, le ligand était initialement plus ancré dans la poche P2 ; il s'est déplacé pour se rapprocher de l'Arg263 dans la pose 1 et de la Lys234 dans la pose 2. A partir de la pose 1, les interactions hydrophobes entre le **MR34917** et la protéine sont faibles pendant la simulation. La seule interaction remarquable est une interaction forte par liaison H entre le carboxylate et les résidus Arg263 et Asn260. A partir de la pose 2, les interactions hydrophobes sont légèrement plus présentes, notamment un π -stacking entre le 2-vinylnaphtalène et la Phe270 au cœur de la poche P2. Durant toute la simulation, la liaison H entre la Lys234 et le carboxylate est conservée.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast

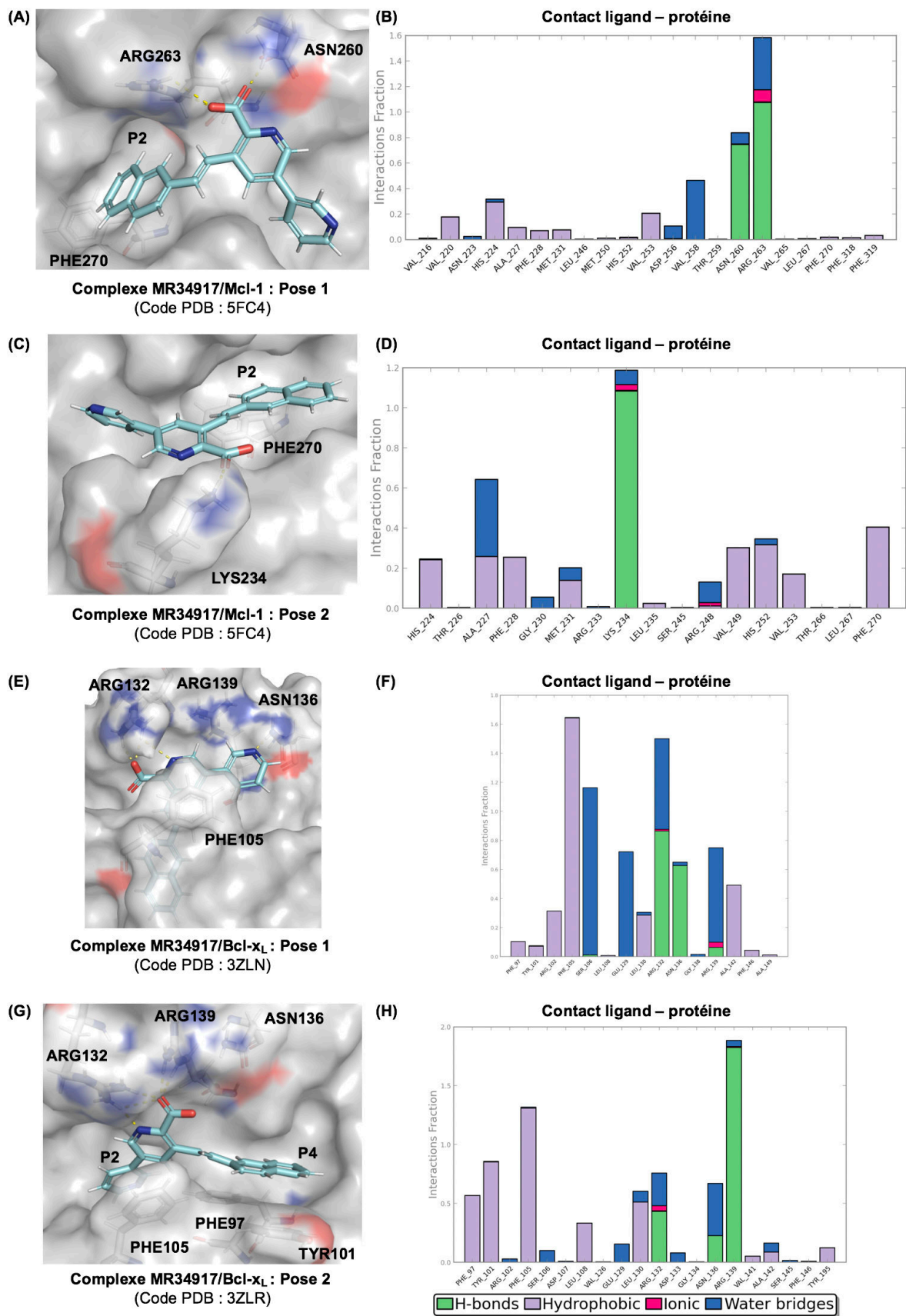


Figure 49 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34917**. Complexes **MR34917/Mcl-1** (A et C) et complexes **MR34917/Bcl-x_L** (E et G) ; Histogrammes des contacts **MR34917/Mcl-1** (B et D) et **MR34917/Bcl-x_L** (F et H) lors des simulations par DM.

- **Complexes avec la protéine Bcl-x_L**

Deux poses sont identifiées par le *docking* à partir des structures codes PDB 3ZLN et 3ZLR. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. La pose 1 (Figure 49E) et la pose 2 (Figure 49G), définies comme précédemment. Dans la pose 1, le 2-vinylnaphtalène s'enfouit plus profondément dans la poche P2 comparé au styryle du **MR34911**. Dans la pose 2, celui-ci occupe plus largement dans la poche P4 comparé au **MR34911**.

Lors de la simulation par DM à partir de la pose 1 (Figure 49F), un π -*stacking* entre le picolinate et la Phe105 stabilise l'interaction. Des contacts sont établis par des ponts de molécules d'eau entre le **MR34917** et les résidus Ser106 et Glu129. Le picolinate, par son atome d'azote et sa fonction carboxylate, crée des liaisons H avec l'Arg132. L'atome d'azote de la pyridine terminale interagit également avec l'Arg139 par liaison H. Concernant la pose 2 (Figure 49H), des interactions hydrophobes de type π -*stacking* sont établies entre le 2-vinylnaphtalène et les résidus hydrophobes qui composent la poche P4 de Bcl-x_L (Phe97, Tyr101), et entre le picolinate et la Phe105.

- **Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind}**

Les valeurs de ΔG_{bind} associées au composé **MR34917** sont comparées à celles du **MR34911** et résumées dans le Tableau 8.

Molécule	Mcl-1 – Pose 1 (5FC4)		Mcl-1 – Pose 2 (5FC4)		Bcl-x _L – Pose 1		Bcl-x _L – Pose 2	
	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
MR34911	221	-67,75	160	-71,52	5	-87,99 ¹	15	-86,13 ²
MR34917	169	-75	61	-82,25	58	-99,01 ²	89	-108,92 ¹

Tableau 8 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.

¹Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLR. ²Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLN.

Pour les protéines cibles Mcl-1 et Bcl-x_L, les valeurs de ΔG_{bind} du **MR34917** sont plus basses que celles du **MR34911**, ce qui traduit une interaction plus forte avec les cibles. Nous pouvons en conclure que **le remplacement du groupement styryle par un groupement hydrophobe plus volumineux, le 2-vinylnaphtalène, améliore l'affinité du composé pour les protéines cibles**. Pour Mcl-1, la valeur de ΔG_{bind} obtenue à partir de la pose 2 est plus basse que celle obtenue pour la pose 1 : la pose 2 serait donc plus plausible. Il en est de même pour la pose 2 du complexe **MR34917/Bcl-x_L**. Ainsi, on peut supposer que pour les deux complexes, les poses 2 sont les plus stables et donc les plus probables.

1.3. Résultats et discussion sur le composé **MR34913**

La seconde modification de la structure de la molécule **MR34911** est l'ajout d'une troisième unité aromatique, conduisant à la conception du composé **MR34913** (Figure 50). L'ajout d'une unité aromatique influencera-t-il l'affinité pour nos cibles thérapeutiques ?

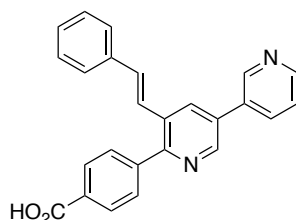


Figure 50 : Structure du **MR34913**.

Les résultats de modélisation moléculaire sont illustrés sur la Figure 51.

- **Complexes avec la protéine Mcl-1**

Deux poses de *docking* sont retenues à partir de la structure cristallographique code PDB 5FC4. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. Dans ces deux poses, le groupement styryle est dans la poche P2. Dans la pose 1 (Figure 51A), le carboxylate est orienté vers l'Arg263. Dans la pose 2 (Figure 51C), la molécule s'aligne le long d'un axe imaginaire défini par Lys234–Arg263. Le carboxylate interagit avec la Lys234 et la pyridine terminale est à proximité de l'Arg263. Cette pose est particulièrement intéressante : le styryle est enfoui dans la poche P2 et le squelette de la molécule épouse parfaitement une partie de la cavité hydrophobe BH3 de Mcl-1.

La simulation par DM montre que l'interaction entre la molécule et la Phe270 a lieu pendant 40 % du temps de la simulation à partir de la pose 1 (Figure 51B) et pendant plus de 60 % à partir de la pose 2 (Figure 51D). A partir de la pose 1, le carboxylate forme une liaison H avec l'Arg263 et à partir de la pose 2, il forme une liaison H avec la Lys234.

- **Complexe avec la protéine Bcl-x_L**

Nous avons sélectionné uniquement une pose (Figure 51E), la pose 1 obtenue à partir de la structure code PDB 3ZLR. La simulation par DM a été réalisée à partir de celle-ci. Le groupement styryle occupe la poche P2, le carboxylate est orienté vers l'Arg132 et la pyridine terminale vers l'Arg139.

Lors de la simulation par DM, les interactions les plus fortes sont de type hydrophobe, notamment avec la Phe105. Une liaison H se forme entre le carboxylate et l'Arg132.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclax

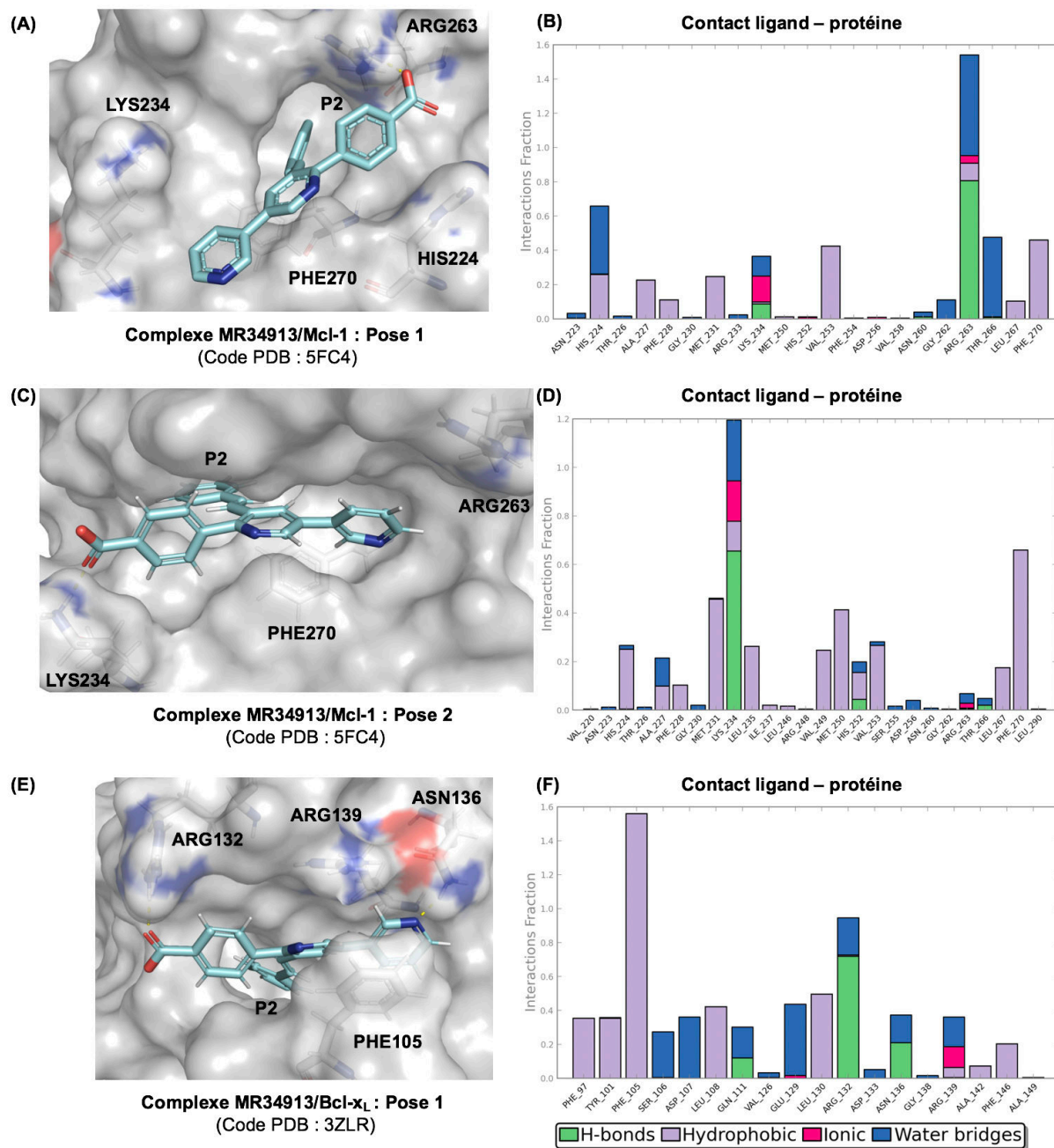


Figure 51 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34913**. Complexes **MR34913/Mcl-1** (A et C) et complexe **MR34913/Bcl-x_L** (E) ; Histogrammes des contacts **MR34913/Mcl-1** (B et D) et **MR34913/Bcl-x_L** (F) lors des simulations par DM.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclastax

• **Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind}**

Les valeurs de ΔG_{bind} associées au composé **MR34913** sont comparées à celles des molécules présentées précédemment et résumées dans le Tableau 9.

Molécule	Mcl-1 – Pose 1 (5FC4)		Mcl-1 – Pose 2 (5FC4)		Bcl-x _L – Pose 1		Bcl-x _L – Pose 2	
	Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
MR34911	221	-67,75	160	-71,52	5	-87,99 ¹	15	-86,13 ²
MR34917	169	-75	61	-82,25	58	-99,01 ²	89	-108,92 ¹
MR34913	50	-82,27	25	-99,13	24	-105,72 ¹	/	/

Tableau 9 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.

¹Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLR. ²Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLN.

Comparé à la première molécule conçue **MR34911**, nous obtenons des valeurs plus basses de ΔG_{bind} pour le composé **MR34913** dans les deux cibles d'intérêt. **Un gain d'affinité est donc obtenu en ajoutant une troisième unité aromatique.** Les valeurs de ΔG_{bind} du composé **MR34913** sont très proches de celles du composé **MR34917**.

Les deux premières modifications envisagées (exploration de la poche P2 et ajout d'une troisième unité aromatique) présentent un bénéfice similaire pour améliorer l'affinité pour nos cibles thérapeutiques.

1.4. Résultats et discussion sur le composé **MR34916**

L'étude de la terpyridine **MR34916** (Figure 52) a été entreprise différemment comparée à celle des autres molécules qui ont suivi le protocole que nous avons défini précédemment.

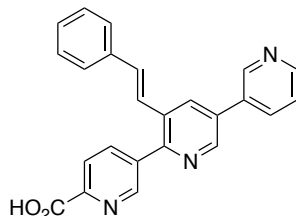


Figure 52 : Structure du **MR34916**.

Au lieu de construire la molécule **MR34916** et réaliser le *docking* dans les différentes structures des protéines, nous sommes partis des meilleures poses du **MR34913** dans les protéines cibles. Sur le composé **MR34913**, nous avons ajouté un atome d'azote en α du carboxylate. Nous avons positionné cet atome des deux façons possibles : l'azote est positionné vers la surface de la protéine Mcl-1 et vers le solvant ; il est positionné vers l'Arg132 de la protéine Bcl-x_L et à l'opposé de l'Arg132.

Pour résumer, six poses différentes sont étudiées et nous avons effectué une simulation par DM à partir de chacune d'entre elles. Les quatre premières sont des poses du **MR34916** dans Mcl-1 :

- 1) Pose 1a : le carboxylate est vers l'Arg263, l'azote est ajouté vers la protéine.
- 2) Pose 1b : le carboxylate est vers l'Arg263, l'azote est ajouté vers le solvant.
- 3) Pose 2a : le carboxylate est vers la Lys234, l'azote est ajouté vers la Lys234.
- 4) Pose 2b : le carboxylate est vers la Lys234, l'azote est ajouté à l'opposé de la Lys234.

Les deux dernières poses concernent la protéine Bcl-x_L :

- 5) Pose 1a : l'azote est ajouté vers l'Arg132.
- 6) Pose 1b : l'azote est ajouté à l'opposé de l'Arg132.

- **Complexes avec la protéine Mcl-1**

Si nous comparons les poses 1a et 1b (Figure 53 (A et C)), des interactions hydrophobes se renforcent pour la pose 1b au cours de la simulation notamment avec la Val253 et la Phe270 (avec même des interactions moins marquées avec l'Arg263). Par contre pour la pose 1a, l'interaction principale reste centrée sur l'Arg263 sans observer le même phénomène que pour la pose 1b (augmentation des interactions hydrophobes). Le positionnement de l'azote au départ de la simulation est donc un point important.

Pour les poses 2a et 2b (Figure 53 (E et G)), nous observons principalement des mouvements plus importants du ligand au cours de la dynamique avec des différences non marquées en fonction de la position de l'azote. Les interactions électrostatiques avec un élément flexible comme la Lys234 (RMSF autour de 2,41 Å pour la chaîne latérale) sont une explication logique pour ce phénomène (valeur de RMSF autour de 0,70 Å pour la chaîne latérale de l'Arg263 avec des mouvements de la chaîne alpha moins importants que pour la Lys234 autour d'un facteur 2 pour la valeur de RMSF).

- **Complexe avec la protéine Bcl-x_L**

Le complexe est stable à partir des deux poses 1a et 1b (Figure 54 (A et C)). Nous n'observons pas de différence marquée quant à l'ajout de l'atome d'azote orienté vers l'Arg132 ou à l'opposé de celle-ci. Au cours des deux simulations, une interaction sous la forme de π -stacking s'établit entre la pyridine centrale et la Phe105. Des contacts polaires sont également observés lors des simulations avec différents résidus (Arg132, Ser106, Gln111).

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclax

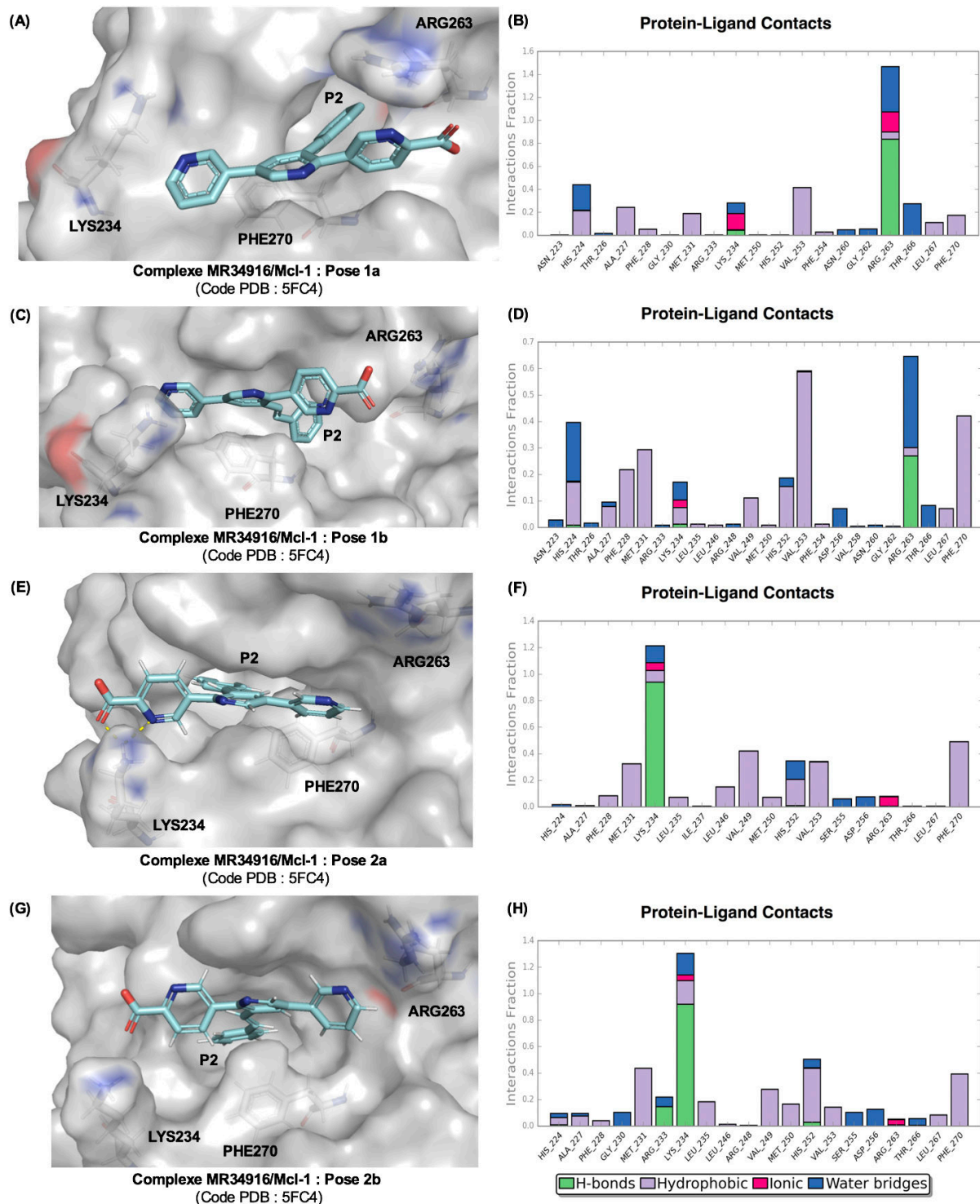


Figure 53 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34916**, application à la protéine Mcl-1. Complexes **MR34916/Mcl-1** (A, C, E, et G) ; Histogrammes des contacts **MR34916/Mcl-1** (B, D, F et H) lors des simulations par DM.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast

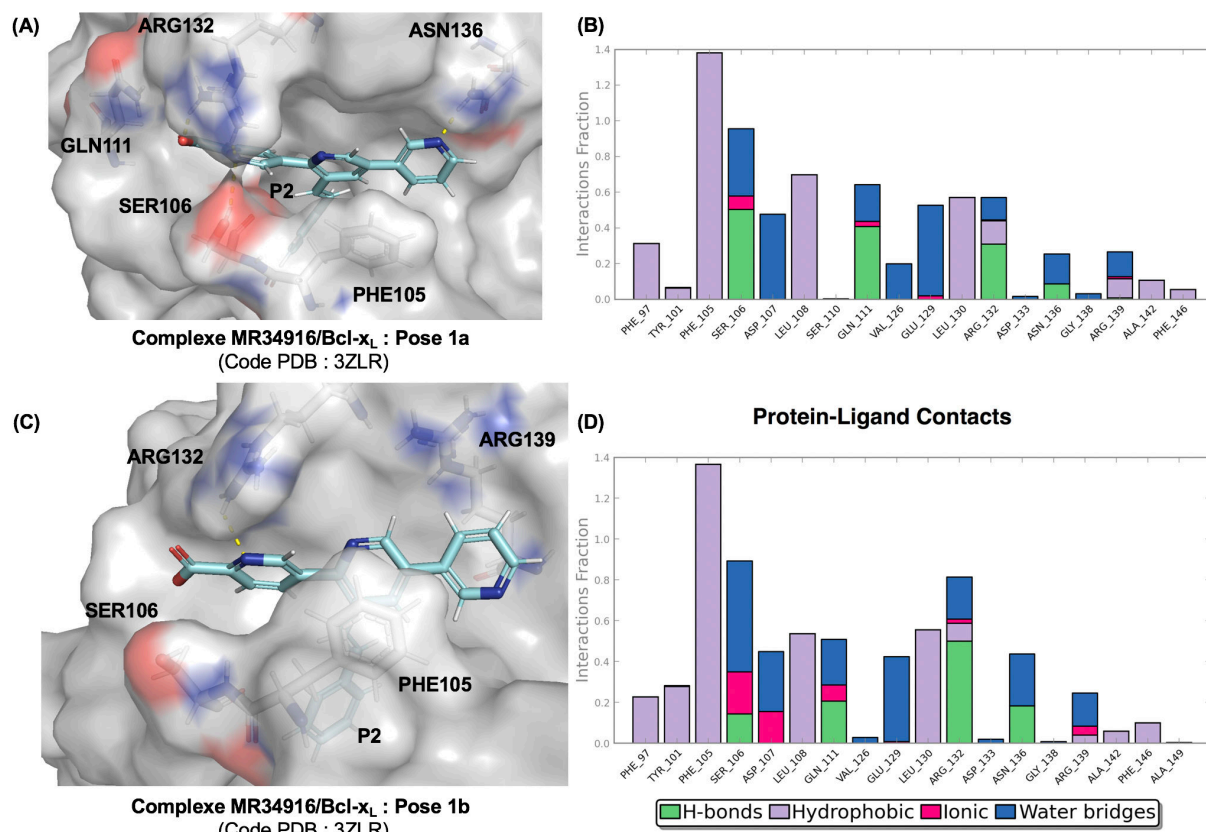


Figure 54 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34916**, application à la protéine Bcl-x_L. Complexes **MR34916**/Bcl-x_L (A et C) ; Histogrammes des contacts **MR34916**/Bcl-x_L (B et D) lors des simulations par DM.

• **Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind}**

Les valeurs de ΔG_{bind} associées au composé **MR34916** sont comparées à celles du composé **MR34913** (Tableau 10).

Molécule	Mcl-1 (5FC4)			Bcl-x _L (3ZLR)		
	Pose	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	Pose	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
MR34913	1	50	-82,27	1	24	-105,72
	2	25	-99,13			
MR34916	1a	214	-79,06	1a	186	-103,20
	1b	203	-82,94	1b	88	-107,42
	2a	3	-93,45			
	2b	103	-95,02			

Tableau 10 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast

En complexe avec Mcl-1, dans la pose 1 pour **MR34913** et les poses 1a et 1b pour **MR34916** (correspondant à l'orientation du carboxylate du composé vers l'Arg263), les molécules **MR34913** et **MR34916** ont des valeurs d'énergie libre de liaison similaires. Dans la pose 2 pour **MR34913** et les poses 2a et 2b pour **MR34916** (correspondant à l'orientation du carboxylate des composés vers la Lys234), les molécules **MR34913** et **MR34916** ont également des valeurs d'énergie libre de liaison similaires. Celle-ci possèderaient donc une affinité identique pour la protéine Mcl-1.

En complexe avec Bcl-x_L, les molécules **MR34913** et **MR34916** ont des valeurs d'énergie libre de liaison similaires. Celle-ci possèderaient donc une affinité identique pour la protéine Bcl-x_L.

Nous n'observons donc pas de différences entre les composés **MR34913** et **MR34916** (dont les structures diffèrent uniquement par un atome d'azote) quant à leur affinité pour les protéines cibles.

1.5. Résultats et discussion sur le composé **MR34937**

Après avoir étudié les deux premières modifications de la structure du **MR34911**, nous avons décidé de les combiner. Il en résulte le composé **MR34937** (Figure 55) : le 2-vinylnaphtalène remplace le styryle et un benzène portant un acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction a été ajouté à la bipyridine.

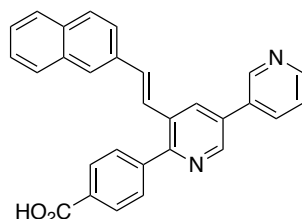


Figure 55 : Structure du **MR34937**.

Les résultats de modélisation moléculaire sont illustrés sur la Figure 56.

- **Complexes avec la protéine Mcl-1**

Nous avons retenu deux poses, la pose 1 (Figure 56A) et la pose 2 (Figure 56C), obtenues à partir de la structure cristallographique code PDB 5FC4. Les simulations par DM ont été réalisées à partir de celles-ci. Les poses 1 et 2 sont définies de la même façon que les poses 1 et 2 obtenues lors du *docking* du composé **MR34913** étudié précédemment.

Lors de la simulation par DM, à partir de la pose 1 (Figure 56B) comme de la pose 2 (Figure 56D), la Phe270 interagit avec la molécule pendant 80 % du temps, ce qui représente le meilleur pourcentage obtenu jusqu'alors. La formation d'une liaison H est observée lors des simulations, entre l'Arg263 et le carboxylate pour la pose 1 et entre la Lys234 et le carboxylate pour la pose 2.

- **Complexe avec la protéine Bcl-x_L**

Une seule pose a été sélectionnée lors du *docking*, équivalente à la pose 1 présentée précédemment pour le composé **MR34913**. La simulation par DM a été réalisée à partir de celle-ci. Le 2-vinylnaphtalène occupe profondément la poche P2 de Bcl-x_L, mais ne semble pas être gêné par la Phe146 au fond de la poche, contrairement au Pyridoclax.

Lors de la simulation par DM, une interaction (π -stacking) entre la pyridine centrale et la Phe105 est conservée pendant toute la durée de la simulation. Des liaisons H se forment entre le carboxylate et l'Arg132 et entre l'atome d'azote de la pyridine terminale et l'Asn136. Des interactions polaires sont observées entre l'atome d'azote de la pyridine terminale et l'Arg139.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclast

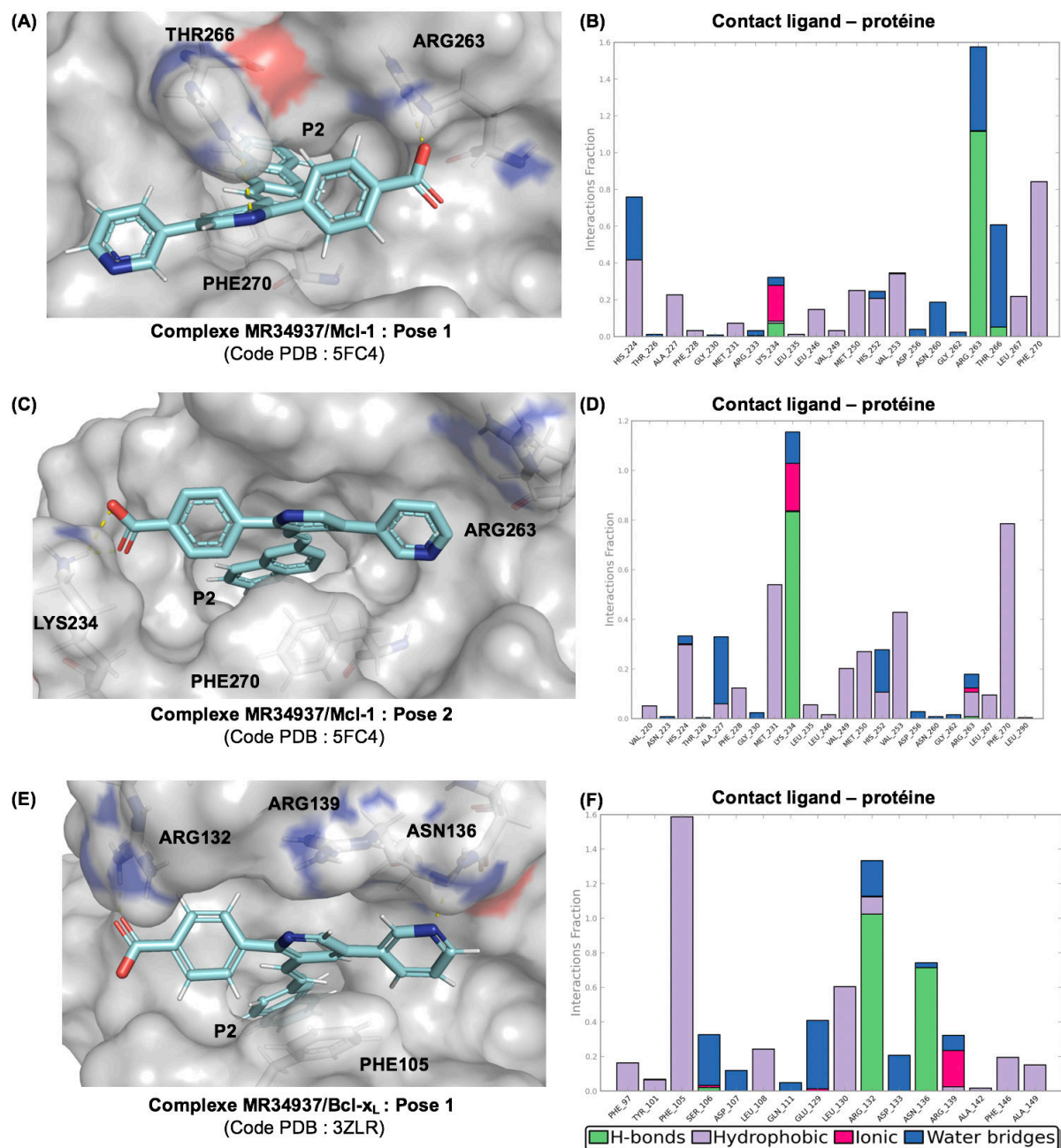


Figure 56 : Modélisation moléculaire sur le composé **MR34937**. Complexes **MR34937/Mcl-1** (A et C) et complexe **MR34937/Bcl-x_L** (E) ; Histogrammes des contacts **MR34937/Mcl-1** (B et D) et **MR34937/Bcl-x_L** (F) lors des simulations par DM.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclax

• **Calcul de l'énergie libre de liaison ΔG_{bind}**

Le Tableau 11 regroupe les valeurs de ΔG_{bind} obtenues par la méthode de MM-GBSA.

Molécule	Mcl-1 – Pose 1 (5FC4)		Mcl-1 – Pose 2 (5FC4)		Bcl-x _L – Pose 1		Bcl-x _L – Pose 2	
	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	n° Conf.	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)
MR34911	221	-67,75	160	-71,52	5	-87,99 ¹	15	-86,13 ²
MR34917	169	-75	61	-82,25	58	-99,01 ²	89	-108,92 ¹
MR34913	50	-82,27	25	-99,13	24	-105,72 ¹	/	/
MR34937	190	-110,65	6	-108,25	5	-121,71 ¹	/	/

Tableau 11 : Énergies libres de liaison ΔG_{bind} obtenues par la méthode MM-GBSA.

¹Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLR. ²Valeur calculée à partir de la structure de Bcl-x_L code PDB 3ZLN.

Pour le **MR34937** dans la protéine Mcl-1, d'après les valeurs de ΔG_{bind} , aucune distinction n'est possible entre les poses 1 et 2. Ces deux poses sont toutes les deux possibles. Comparées aux valeurs de ΔG_{bind} des composés **MR34917** et **MR34913**, celles du **MR34937** sont plus basses : la combinaison des deux modifications apporte un plus grand gain d'affinité pour les deux cibles par rapport à une des deux modifications seules. Enfin, si l'on compare les valeurs de ΔG_{bind} du composé **MR34937** au fragment initial, le **MR34911**, une différence de -43 kcal.mol⁻¹ est obtenue à partir de la pose 1 du complexe avec Mcl-1, une différence de -36 kcal.mol⁻¹ est obtenue à partir de la pose 2 de Mcl-1 et une différence de -33 kcal.mol⁻¹ est obtenue à partir de la pose 1 du complexe avec Bcl-x_L.

2. Selon l'hypothèse 2

Pour rappel, dans l'hypothèse 2, le groupement styryle occupe la poche hydrophobe P3 et la pyridine terminale A se positionne dans la poche P2. L'azote de la pyridine C forme une interaction avec l'Arg263 et la pyridine terminale D est à la surface de Mcl-1.

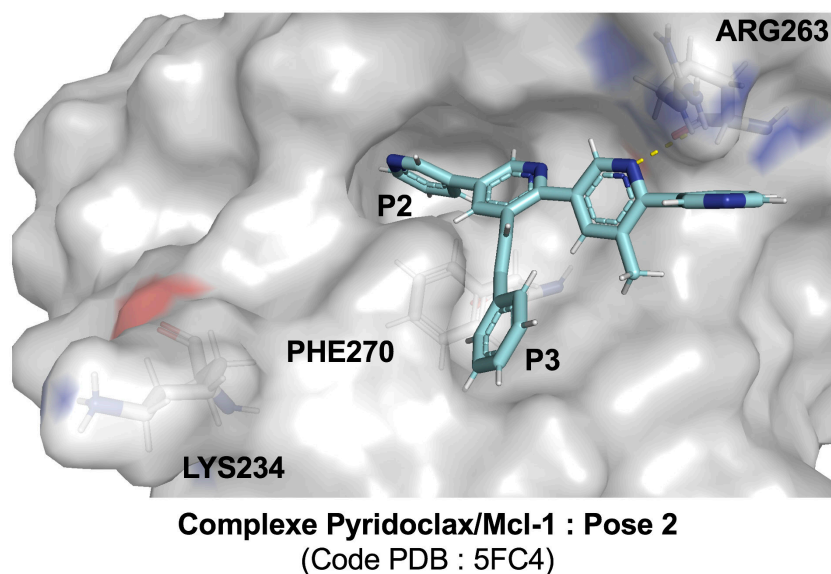


Figure 57 : Définition de la pose du Pyridoclastax dans Mcl-1 selon l'hypothèse 2.

2.1. Résultats et discussion sur les molécules CDSMM007, -002 et -091

Les molécules **CDSMM007**, **CDSMM002** et **CDSMM091** (Figure 58) ont été étudiées dans les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

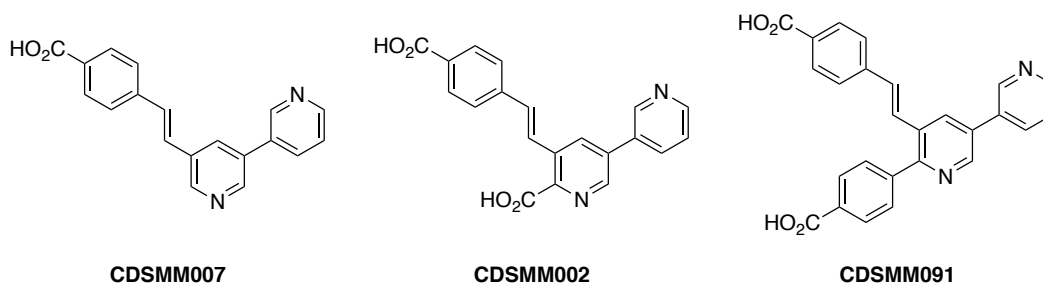


Figure 58 : Structure des composés conçus à partir de l'hypothèse 2.

Bien que les résultats de *docking* dans la protéine Mcl-1 aient fourni des poses correctes et envisageables, cela n'a pas été le cas pour le *docking* dans la protéine Bcl-x_L.

La surface de la protéine Mcl-1 est plus électropositive que celle de la protéine Bcl-x_L notamment. En particulier, des résidus chargés positivement sont présents dans la cavité d'interaction de Mcl-1 ce qui engendre un potentiel électrostatique positif à celle-ci.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclastax

En comparaison, Bcl-x_L a une cavité essentiellement non chargée. Ces caractéristiques de surface pourraient expliquer que le *docking* de ces molécules comportant un ou plusieurs carboxylates ait donné des résultats encourageants sur Mcl-1 mais pas sur Bcl-x_L.

Un de nos critères de sélection d'une molécule pour l'emmener vers l'étape suivante est qu'elle puisse à la fois interagir avec Mcl-1 et Bcl-x_L. Or, ce n'est pas le cas pour ces molécules conçues à partir de l'hypothèse 2, où le styryle du Pyridoclastax occupe la poche P3 de Mcl-1. Nous n'avons donc pas poursuivi les études de modélisation moléculaire pour ces composés.

3. Discussion

A partir de l'hypothèse 1, où le styryle du Pyridoclastax occupe la poche P2 de la protéine Mcl-1, nous avons conçu un premier fragment, le **MR34911** (Schéma 8).

A partir de celui-ci, nous avons envisagé deux modifications. La première est l'exploration de la poche P2 par un groupement hydrophobe plus encombrant que le styryle (composé **MR34917**). La deuxième modification est l'ajout d'une troisième unité aromatique dans le but d'augmenter l'affinité par l'amélioration de la position du carboxylate dans la protéine (composés **MR34916** et **MR34913**). Enfin, la combinaison de ces deux modifications a été étudiée (composé **MR34937**).

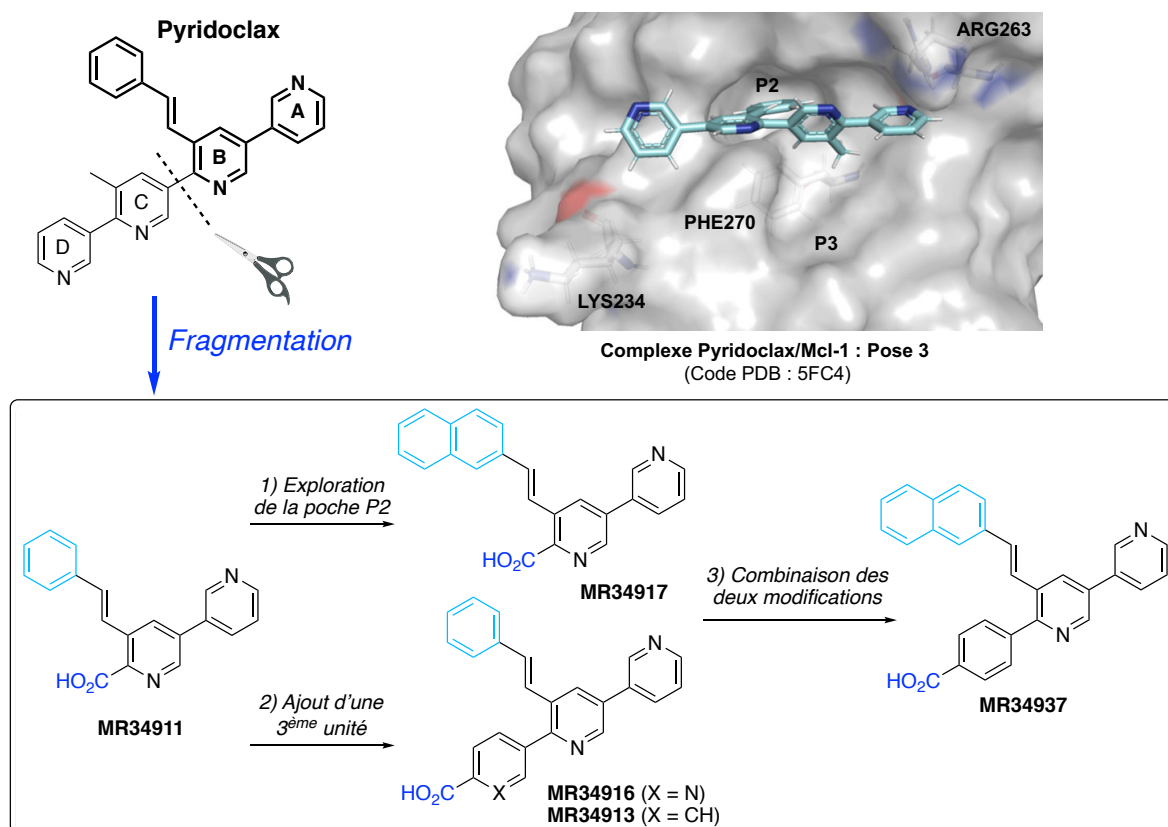


Schéma 8 : Synthèse des molécules conçues selon l'hypothèse 1.

CHAPITRE 1 – Modélisation moléculaire sur les molécules conçues à partir de la structure du Pyridoclastax

D'après les résultats de modélisation moléculaire, le fragment **MR34911** établit une interaction avec les protéines cibles. De plus, la première et la deuxième modification ont permis d'améliorer l'affinité initiale. La combinaison des deux modifications est prometteuse puisque la molécule **MR34937** présente la meilleure valeur de ΔG_{bind} , traduisant une meilleure affinité d'interaction.

Ces molécules ont donc été sélectionnées pour la synthèse. Différentes voies de synthèses ont été mises en place, selon la structure de la molécule. A partir des molécules étudiées dans cette partie, des pharmacomodulations ont été effectuées pour réaliser une étude de relations structure-activité.

A partir de l'hypothèse 2, où le styryle du Pyridoclastax occupe la poche P3 de la protéine Mcl-1, les molécules conçues n'ont pas montré de résultats satisfaisants, notamment après les études de *docking* dans la protéine Bcl-x_L. Pour appuyer et conforter les résultats de modélisation moléculaire sur cette hypothèse, nous avons choisi de synthétiser trois molécules. La voie synthétique va également être présentée.

CHAPITRE 2

I. Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

Afin de faciliter la compréhension des résultats de l'évaluation biologique menée à partir des composés d'intérêt, une partie explicative du test par impédancemétrie est présentée dans ce préambule.

L'évaluation biologique de nos molécules a été réalisée par l'équipe du Docteur Laurent Poulain de l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE au Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse de Caen.

Le test mis en place est un test de criblage qui utilise la technologie xCELLigence. Cette technologie est basée sur une mesure d'impédance, les cellules sont cultivées sur un support de microélectrodes d'or et modifient le flux électronique. Une mesure d'impédance peut être réalisée à des intervalles de temps définis permettant ainsi de caractériser avec une grande précision aussi bien les événements précoces que tardifs de la réponse cellulaire. **La technologie xCELLigence permet de suivre l'activité cellulaire en temps réel et en continu sans marquage préalable.**

Dans notre cas, nous utilisons des cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes de la lignée IGROV-1 R10, dont la survie est dépendante de l'activité des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L. Nous pouvons donc évaluer l'activité de nos molécules sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L de façon indirecte. Nos molécules sont toutes testées à une concentration de 25 µM. Cette concentration est choisie car le Pyridoclastax est actif à cette dose et perd son activité à dose plus faible. A 25 µM, si les molécules étudiées ont montré une trop forte activité, elles ont été testées aux concentrations plus faibles de 10 µM et 1 µM.

Dans le modèle de lignée cellulaire choisi, pour « tuer » les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes en addition aux protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L, il faut inhiber à la fois Mcl-1 et Bcl-x_L. Ainsi, les molécules ont été testées dans différentes conditions, à savoir :

Pour observer l'activité de la molécule étudiée uniquement sur Mcl-1, il faut auparavant inhiber la protéine Bcl-x_L. Pour cela il y a deux possibilités :

- Transfecter les cellules avec un petit ARN interférent (siRNA Bcl-x_L) se liant spécifiquement à une séquence d'ARNm et empêchant l'expression du gène codant pour la protéine Bcl-x_L.
- Utiliser un inhibiteur pharmacologique issu de la littérature : nous avons choisi l'ABT-737.

Inversement, pour observer l'activité de la molécule étudiée uniquement sur Bcl-x_L, il faut auparavant inhiber la protéine Mcl-1. Les deux possibilités sont :

- Transfecter les cellules avec un siRNA Mcl-1 (inhibition de l'expression des gènes codant pour Mcl-1).
- Utiliser un inhibiteur pharmacologique issu de la littérature, le S63845.

Lorsque les siRNA sont utilisés pour ce test, l'effet de la transfection est contrôlé par un ARN interférent témoin, le siRNA CTRL.

Enfin, pour observer l'activité de la molécule étudiée sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, celle-ci est mise en contact des cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes. Si dans ces conditions, les cellules cancéreuses meurent, alors soit la molécule a une action à la fois sur Mcl-1 et Bcl-x_L, soit elle est cytotoxique par un autre mécanisme d'action. Il convient alors de diminuer la dose utilisée pour vérifier la conservation de l'activité inhibitrice de Mcl-1 et Bcl-x_L à plus faible dose. Toutefois pour distinguer la dualité d'action de la molécule de son éventuelle toxicité « off-target », une analyse de l'interaction indirecte (BRET) ou indirecte (SPR) devra être menée en parallèle d'une caractérisation complémentaire de l'activité pro-apoptotique (étude des morphologies cellulaires et nucléaires, étude de la répartition des cellules dans le cycle (cytométrie en flux), recherche de caractéristiques de l'apoptose (notamment de la voie mitochondriale) telles que le clivage des caspases 9 et 3 et/ou de l'une de leurs cibles (la PARP), étude d'éventuelles variations d'expression des protéines de la famille Bcl-2).

Pour s'assurer que le DMSO (solvant de solubilisation des molécules étudiées) n'a pas d'effet délétère sur la lignée cellulaire, une condition témoin, dans laquelle les cellules cancéreuses sont mises en présence de DMSO, est réalisée.

Le test se déroule de la façon suivante quand les siRNA sont utilisés pour « éteindre » les protéines Mcl-1 ou Bcl-x_L :

- à t = 0, l'expérience débute en présence des cellules cancéreuses uniquement.
- à t = 24 h, la transfection avec le siRNA est réalisée.
- à t = 72 h, la molécule étudiée est ajoutée au milieu.
- à t = 96 h, l'activité de la molécule étudiée est considérée comme maximale.

Pour illustrer ce test, nous présentons l'exemple du Pyridoclax (Figure 59). Les résultats se présentent sous la forme de courbes représentant l'index cellulaire (I) en fonction du temps et sous la forme d'un histogramme représentant l'index cellulaire à 96 h. La Figure 59A regroupe les différents témoins et la Figure 59B regroupe les résultats obtenus pour le Pyridoclax. Celui-ci est testé à la concentration de 25 μ M.

Plus la valeur de l'index cellulaire est petite, plus le nombre de cellules cancéreuses est faible, ce qui signifie que l'activité de la molécule étudiée est importante.

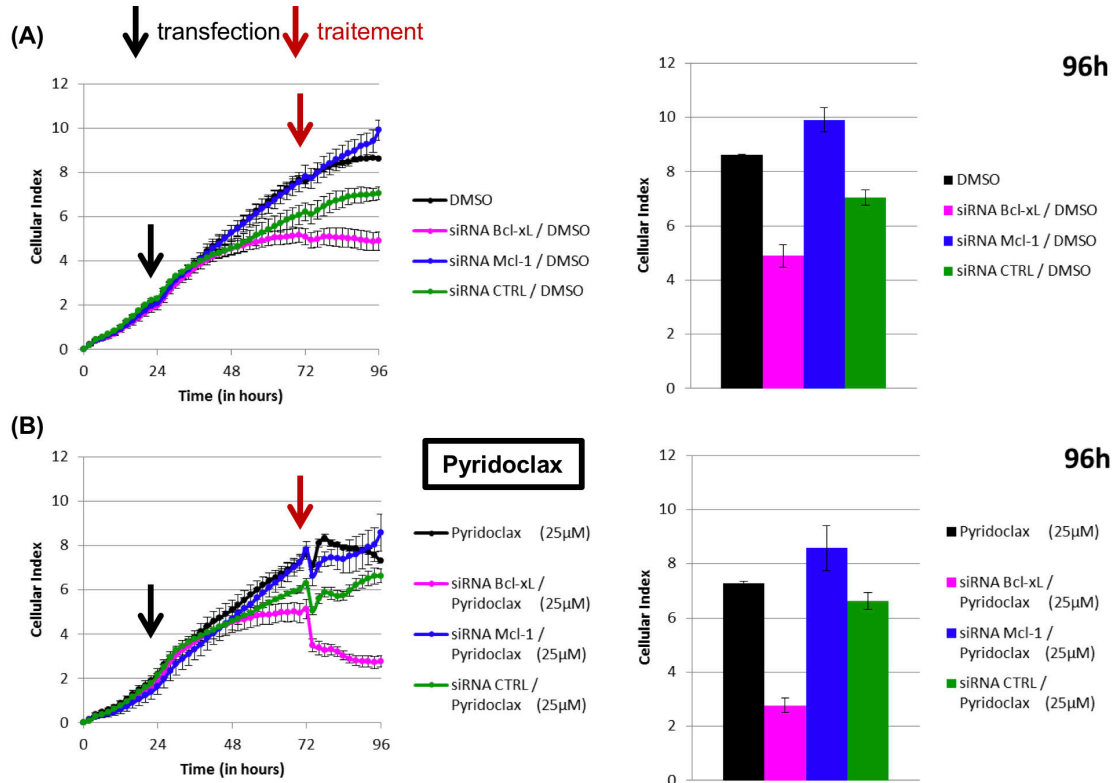


Figure 59 : Résultats de l'évaluation biologique du Pyridoclax par impédancemétrie.

Sur la Figure 59A, en noir, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO, ce qui correspond au témoin. En magenta, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA Bcl-xL : l'expression de la protéine Bcl-xL est inhibée. En bleu, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA Mcl-1 : l'expression de la protéine Mcl-1 est inhibée. En vert, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA contrôle, qui permet de s'assurer que la transfection n'a pas d'effet sur les cellules.

CHAPITRE 2 – Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

Sur la Figure 59B, le Pyridoclax est ajouté à 72 h (soit 48 h après la transfection, avec une inhibition optimale de l'expression de la protéine ciblée par le siRNA utilisé). La courbe de l'index cellulaire du Pyridoclax seul (en noir) est superposable à la courbe témoin : le Pyridoclax n'a pas une dualité d'action. En magenta, après l'ajout du Pyridoclax, l'index cellulaire chute : le Pyridoclax a potentiellement une activité sur la protéine Mcl-1. En bleu, après l'ajout du Pyridoclax, l'index cellulaire continue de croître : les cellules cancéreuses ne meurent pas suggérant que le Pyridoclax n'a pas d'activité sur la protéine Bcl-x_L.

En regardant l'histogramme où l'index cellulaire à 96 h (temps optimal de l'activité de la molécule) est représenté, seul l'index cellulaire siRNA Bcl-x_L/Pyridoclax (25 µM) en magenta chute comparé à celui du témoin siRNA Bcl-x_L.

Le Pyridoclax est un potentiel inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1 : une caractérisation complémentaire de l'effet pro-apoptotique a été menée et l'étude de l'interaction directe du Pyridoclax avec la protéine Mcl-1 a confirmé que le Pyridoclax est un inhibiteur de la protéine Mcl-1 à la dose de 25 µM.⁹⁵

Lorsque les inhibiteurs synthétiques sont utilisés pour inhiber les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, le test se déroule de la manière suivante :

- A t = 0, l'expérience débute en présence des cellules cancéreuses uniquement.
- A t = 24 h, les inhibiteurs synthétiques sont ajoutés au milieu à une concentration de 5 µM pour l'ABT-737 et 1 µM pour le S63845. La molécule étudiée est ajoutée au même moment.
- A t = 72 h, l'activité de la molécule étudiée est considérée comme maximale.

Nous présentons ici les courbes témoin et l'action de l'association des inhibiteurs de la littérature sur les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes (Figure 60).

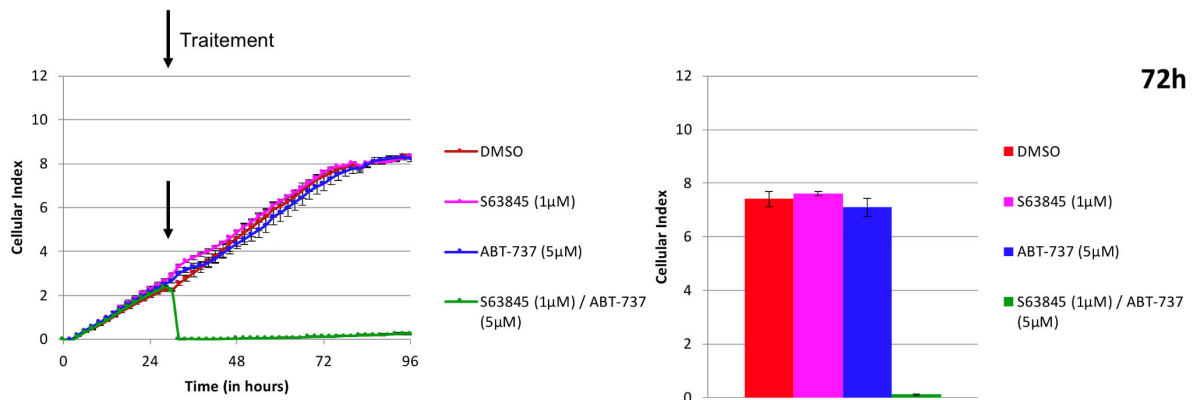


Figure 60 : Résultats de l'activité cellulaire au cours du temps (impédancemétrie) de l'exposition de la lignée cellulaire IGROV1-R10 à l'ABT-737 (5 µM), au S63845 (1 µM) et à la combinaison des deux.

La courbe rouge (DMSO) est la courbe témoin. En magenta, la molécule S63845 est ajoutée à 24 h : après inhibition de Mcl-1 uniquement, les cellules cancéreuses continuent leur croissance. De la même façon, l'inhibition de Bcl-x_L uniquement (ABT-737, courbe bleue), les cellules cancéreuses ne meurent pas. Par contre, la combinaison des molécules S63845 et ABT-737 (courbe verte) induit une chute immédiate de l'index cellulaire suggérant une mort cellulaire rapide.

CHAPITRE 2 – Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

Les molécules étudiées peuvent présenter cinq profils type lorsqu'elles sont administrées seules dans les lignées cellulaires IGROV1-R10 (Figure 61).

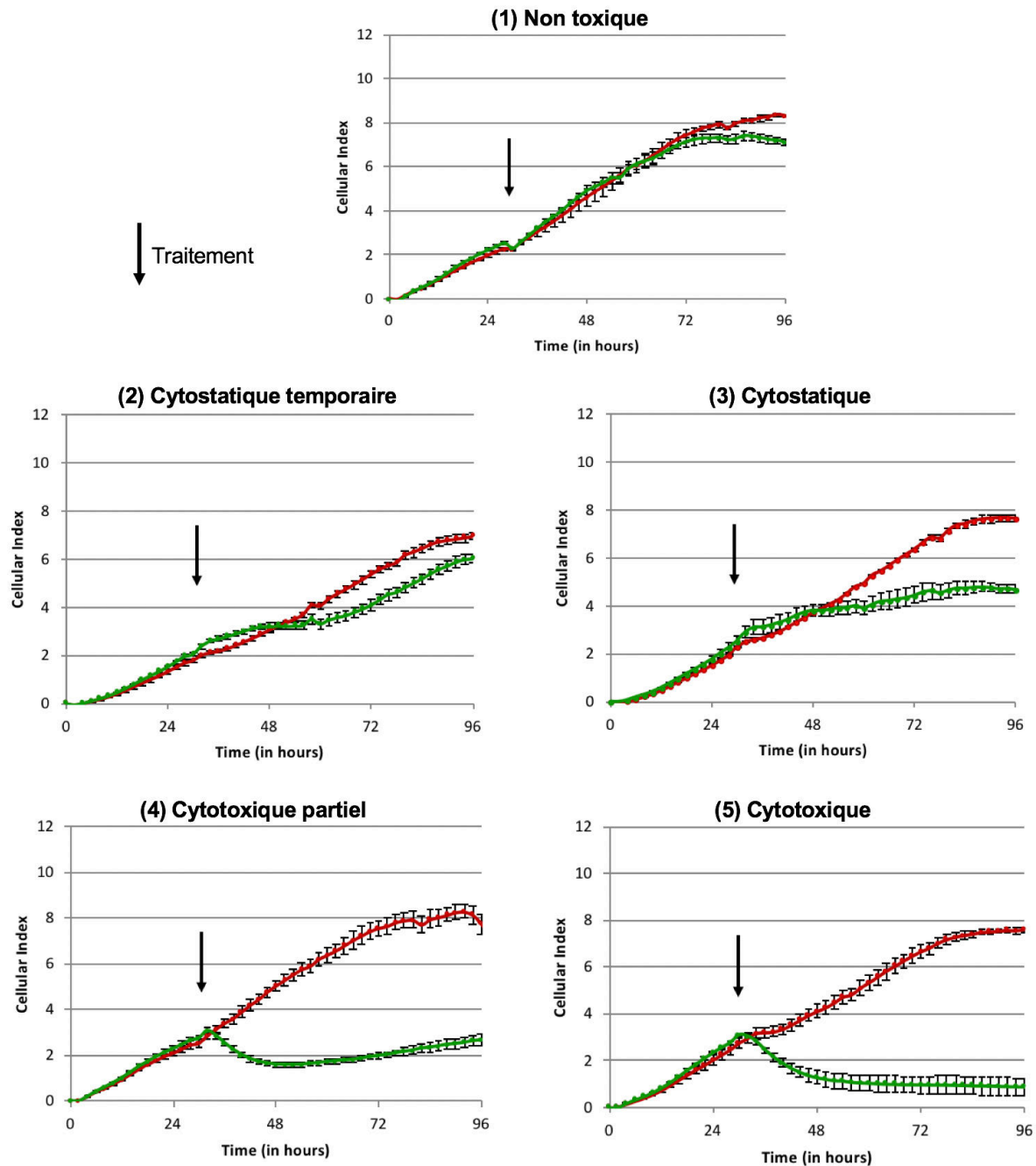


Figure 61 : Profils types de courbes obtenues par le test d'impédancemétrie.

Les courbes rouges sont les courbes témoins et les courbes vertes sont les courbes où les molécules étudiées ont été ajoutées dans les cellules cancéreuses. Dans le graphique (1), le profil d'une molécule non toxique est représenté. Dans les graphiques (2) et (3), l'action est cytotatique : à l'ajout de la molécule, la croissance cellulaire stagne et reprend ensuite dans le cas temporaire ou continue de stagner. Enfin, les profils d'une molécule partiellement cytotoxique (graphique (4)) ou cytotoxique (graphique (5)) sont illustrés.

CHAPITRE 2 – Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

Les molécules ont été classées selon ces cinq différents profils de courbe (Figure 61) quant à leur action sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Par ce classement, nous avons pu orienter les choix de synthèse et établir des RSA. Le tableau récapitulatif est fourni sous forme de fiche cartonnée en pièce détachée de la thèse.

Nous avons également fait le choix de représenter les résultats biologiques sous forme de graphiques (Figure 62). Par ces graphiques, nous voulons permettre au lecteur d'avoir une vision directe et résumée des profils d'activité de l'ensemble des molécules étudiées, afin de les comparer plus aisément.

Nous précisons qu'il s'agit d'une représentation simplifiée et que les résultats bruts fournis pour chaque molécule (dont quelques uns sont présentés en annexe 4) par nos partenaires biologistes ont été analysés en leur présence.

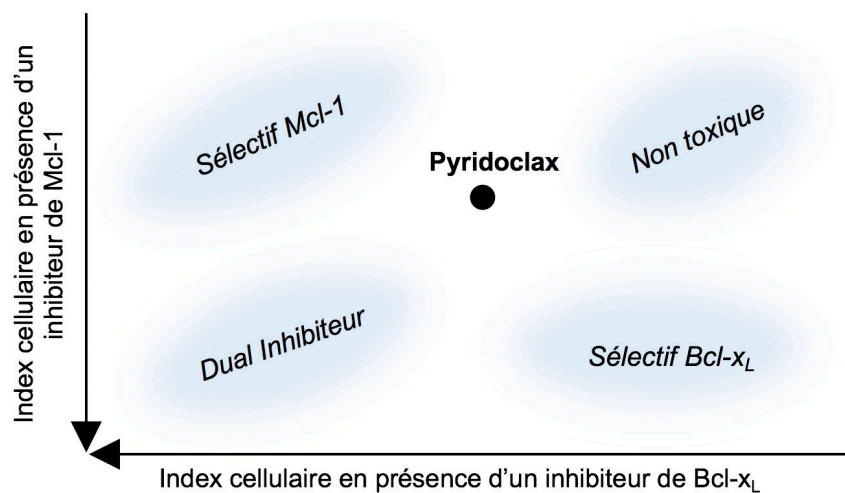


Figure 62 : Graphique de représentation simplifiée des résultats biologiques.

En abscisse est représenté l'index cellulaire en présence d'un inhibiteur de Bcl-x_L, ce qui traduit l'activité du composé étudié sur Mcl-1 et en ordonnée est représenté l'index cellulaire en présence d'un inhibiteur de Mcl-1, ce qui traduit l'activité du composé sur Bcl-x_L. **Plus l'index cellulaire est faible, plus la molécule est active.**

Chaque point correspond à une molécule. Le Pyridoclax est représenté et nous l'avons choisi pour référence. Les positions d'un *dual* inhibiteur, d'une molécule sélective de Mcl-1, d'une molécule sélective de Bcl-x_L et d'une molécule non active (non toxique) sont présentées dans le graphique (Figure 62).

CHAPITRE 2 – Description de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

A partir des données du test par impédancemétrie, les coordonnées de chaque point sont calculées de la façon suivante. Pour l'abscisse, l'index cellulaire (I) de la molécule en présence de siRNA Bcl-x_L est divisé par l'index cellulaire (I) de siRNA Bcl-x_L. Les valeurs de l'index cellulaire correspondent au temps de 96 h. Lorsque l'expérience est réalisée en présence d'inhibiteurs synthétiques, l'abscisse correspond à la valeur de l'index cellulaire de la molécule en présence de l'ABT-737 divisée par la valeur de l'index cellulaire de l'ABT-737. Ces valeurs sont prises à 72 h.

$$\frac{I_{\text{molécule/siRNA Bcl-xL}}}{I_{\text{siRNA Bcl-xL}}} \quad \text{OU} \quad \frac{I_{\text{molécule/ABT-737}}}{I_{\text{ABT-737}}}$$

Pour l'ordonnée, l'index cellulaire (I) de la molécule en présence de siRNA Mcl-1 est divisé par l'index cellulaire (I) de siRNA Mcl-1. Les valeurs de l'index cellulaire correspondent au temps de 96 h. Lorsque l'expérience est réalisée en présence d'inhibiteur synthétique, l'abscisse correspond à la valeur de l'index cellulaire de la molécule en présence du S63845 divisée par la valeur de l'index cellulaire du S63845. Ces valeurs sont prises à 72 h.

$$\frac{I_{\text{molécule/siRNA Mcl-1}}}{I_{\text{siRNA Mcl-1}}} \quad \text{OU} \quad \frac{I_{\text{molécule/S63845}}}{I_{\text{S63845}}}$$

Pour le premier test de criblage mis en place, les siRNA ont été utilisés dans l'expérience car la molécule S63845, inhibiteur sélectif de Mcl-1, n'était pas encore publiée et sur le marché. Cependant, nous avons eu dans certaines manipulations un effet de la transfection. Pour les molécules les plus intéressantes, le test a été de nouveau réalisé mais cette fois-ci en utilisant les inhibiteurs synthétiques.

Ce test de criblage, nous renseignant sur l'activité d'une molécule sur les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, possède certaines limites. L'une des principales limites est le risque de faux positifs. Il n'est pas possible de distinguer une molécule à action duale d'une molécule toxique. Dans ce cas, il est nécessaire de compléter ce test avec des analyses par BRET ou SPR par exemple, qui validera l'activité de la molécule sur ces deux cibles.

II. Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Le premier fragment conçu en modélisation moléculaire est le **MR34911**. La seconde molécule à deux unités étudiée est le **MR34917**. Elle a été conçue avec comme objectif l'exploration de la poche hydrophobe P2 par un groupement aromatique plus volumineux.

Notre objectif est de mettre en place une voie de synthèse rapide et robuste pour accéder à ces molécules. A partir de celles-ci, nous avons effectué des pharmacomodulations du groupement aromatique et de la fonction acide carboxylique (Figure 63).

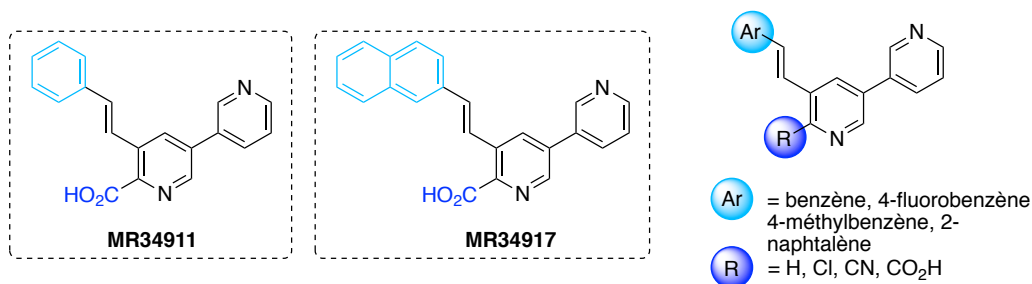


Figure 63 : Pharmacomodulation des composés **MR34911** et **MR34917**.

Le groupement hydrophobe (**Ar**) est initialement un benzène, et celui-ci peut être remplacé par un 4-fluorobenzène, un 4-méthylbenzène ou encore un 2-naphtalène plus volumineux. Les substituants **R** sont hydrophobes (hydrogène, chlore) ou polaires (nitrile, acide carboxylique). Selon la nature du substituant **R**, différentes voies de synthèses permettent d'accéder aux molécules.

1. Synthèse des molécules à deux unités, R = H

Ces molécules sont obtenues en deux étapes. La première étape est la synthèse de l'intermédiaire **MR27830** (Schéma 9).

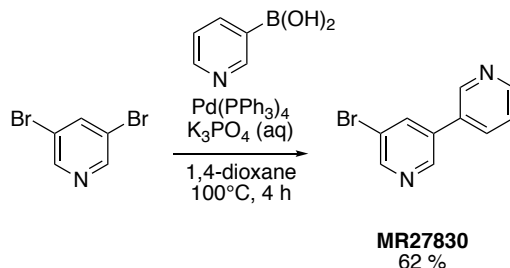


Schéma 9 : Synthèse de la molécule **MR27830**.

Un couplage de type Suzuki–Miyaura¹²⁹ entre la 3,5-dibromopyridine et l'acide pyridin-3-ylboronique permet l'obtention du composé **MR27830** avec un rendement de 62 %.

Un produit secondaire issu du bi-couplage est également observé mais il n'a pas été isolé. Les deux produits ont pu être séparés par colonne chromatographique. Le composé **MR27830** est obtenu majoritairement par rapport au produit issu du bi-couplage probablement car la 3,5-dibromopyridine est plus réactive que la bipyridine bromée **MR27830**.

La réaction de couplage de Suzuki–Miyaura est détaillée en annexe 7. Les conditions utilisées dans ce couplage, à savoir l'utilisation de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%) comme catalyseur et de K_3PO_4 (2,50 éq.) comme base et 1,25 équivalents de dérivé boronique, ont été optimisées antérieurement au sein de notre laboratoire.^{95,130}

¹²⁹a) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 36, 3437-3440. b) Miyaura, N.; Yanagi T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513. c) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457-2483.

¹³⁰Voisin-Chiret, A. S.; Bouillon, A.; Burzicki, G.; Célant, M.; Legay, R.; El-Kashef, H.; Rault, S. A General Synthesis of Halo-Oligopyridines. The Garlanding Concept. *Tetrahedron* **2009**, 65 (3), 607–612.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

La seconde étape est un couplage pallado-catalysé pour introduire le groupement aromatique (Schéma 10).

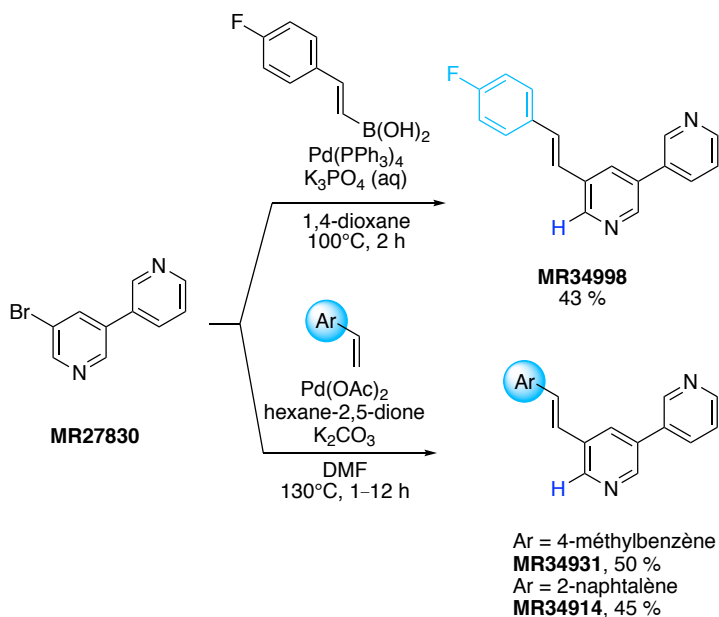


Schéma 10 : Synthèse des molécules à deux unités, R = H.

L'acide (*E*)-(4-fluorostyryl)boronique étant commercialement disponible, il est engagé dans un couplage de type Suzuki–Miyaura avec le **MR27830** pour synthétiser le composé **MR34998** avec un rendement de 43 %. Après une purification par flash chromatographie, un lavage au *n*-hexane est nécessaire pour supprimer l'oxyde de triphénylphosphine formé lors de la réaction de couplage. Les lavages successifs ont entraîné une perte de produit, ce qui explique le rendement obtenu.

Une réaction de couplage de type Heck,¹³¹ entre le **MR27830** et le 1-méthyl-4-vinylbenzène ou le 2-vinylnaphtalène (1,15 éq.), en présence d'un catalyseur (Pd(OAc)₂, 0,10 éq.), d'un ligand bidenté (hexane-2,5-dione, 0,20 éq.) et d'une base (K₂CO₃, 2,00 éq.), a été réalisée pour synthétiser les molécules **MR34931** et **MR34914** avec des rendements respectifs de 50 % et 45 %. Lors de la réaction, nous n'avons observé ni la dégradation du réactif **MR27830** ni la formation d'un produit secondaire. Cependant, la purification de ces produits a été délicate.

¹³¹Cui, X.; Li, J.; Liu, L.; Guo, Q. X. 1,3-Dicarbonyl Compounds as Phosphine-Free Ligands for Pd-Catalyzed Heck and Suzuki Reactions. *Chinese Chem. Lett.* **2007**, *18* (6), 625–628.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Le composé **MR34901** est obtenu à partir d'un autre intermédiaire de synthèse, le **MR29056**, par la mise en oeuvre d'une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura (Schéma 11).

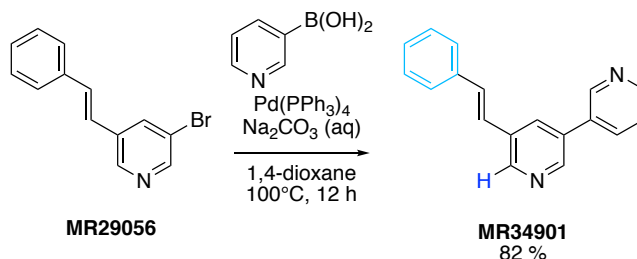


Schéma 11 : Synthèse de la molécule **MR34901**.

Le **MR29056**, déjà présent dans notre chimiothèque, réagit avec l'acide pyridin-3-ylboronique en présence d'un catalyseur ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) et d'une base (Na_2CO_3) pour accéder au composé **MR34901** avec un très bon rendement de 82 %.

2. Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl

2.1. Voie synthétique 1

Pour accéder aux molécules à deux unités où le substituant R est un atome de chlore, nous pouvons utiliser la voie rétrosynthétique mise en place pour la synthèse du Pyridoclox (Schéma 12).

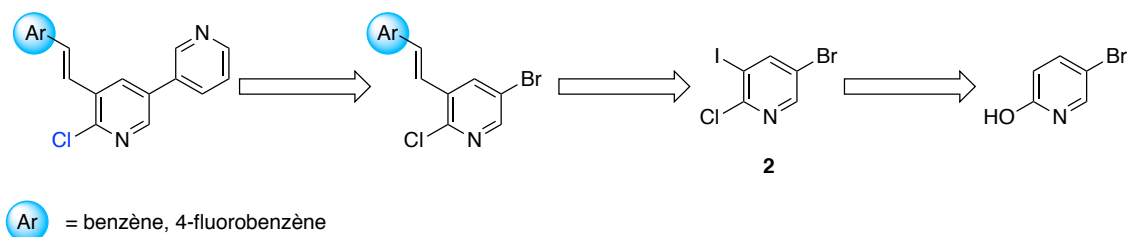


Schéma 12 : Voie rétrosynthétique 1.

Les molécules sont obtenues à partir de couplages pallado-catalysés successifs, permettant d'insérer le groupement hydrophobe aromatique (Ar) et la pyridine terminale à partir de l'intermédiaire clé **2**.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Celui-ci est obtenu par une iodation suivie d'une chlorodéshydroxylation de la 5-bromo-2-hydroxypyridine (Schéma 13).

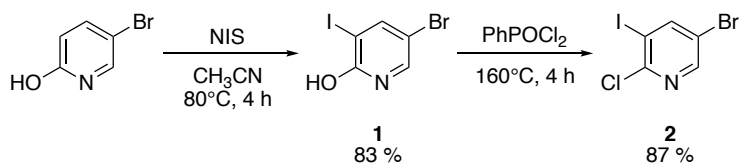


Schéma 13 : Synthèse de l'intermédiaire clé **2**.

La première étape est l'iodation de la position 3 de la 5-bromo-2-hydroxypyridine par le *N*-iodosuccinimide pour accéder à la molécule **1** avec un rendement de 83 %. La seconde étape est la chlorodéshydroxylation de la molécule **1** pour synthétiser l'intermédiaire clé trihalogéné **2**. Celui-ci comporte trois atomes d'halogène de différentes natures (I, Br et Cl) à différentes positions sur la pyridine.

A partir de la molécule **2**, les molécules d'intérêt sont synthétisées en deux étapes (Schéma 14).

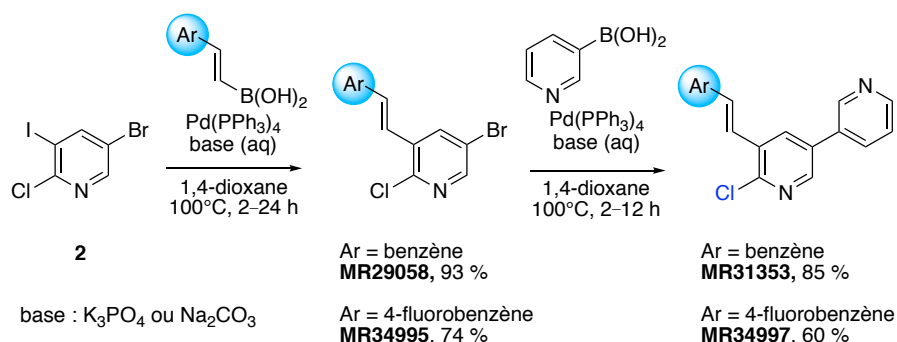


Schéma 14 : Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl, par la voie synthétique 1.

Une réaction pallado-catalysée entre la molécule **2** et l'espèce boronique choisie permet d'introduire le groupement hydrophobe aromatique désiré et de synthétiser les composés **MR29058** et **MR34995**. Un second couplage de type Suzuki–Miyaura introduit la pyridine terminale et permet d'obtenir les molécules cibles **MR31353** et **MR34997**.

En jouant sur la différence de réactivité des positions 2, 3 et 5 de la pyridine et sur la différence de nature des atomes d'halogène substituant la pyridine trihalogénée **2**, il est possible d'obtenir une sélectivité lors d'une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura.¹³⁰

L'atome d'azote de la pyridine induit une répartition de la densité électronique hétérogène. Les formes mésomères montrent que les positions 2, 4 et 6 de la pyridine sont particulièrement appauvries en électrons, puisque l'on peut faire apparaître des charges positives avec les formes de résonance. Les positions 3 et 5 sont par conséquent enrichies en électrons et sont moins favorisées dans les réactions de couplage pallado-catalysées notamment.

En fonction de la nature de l'atome d'halogène, on peut établir le classement de réactivité suivant : Ar-I>Ar-Br>>Ar-Cl lorsqu'on engage ces dérivés dans des réactions de couplage pallado-catalysées.¹³²

Par conséquent, lorsque l'intermédiaire **2** est engagé dans un couplage de type Suzuki–Miyaura, la position 3 enrichie en électrons avec l'iode comme atome d'halogène est la plus réactive. Ensuite, vient la position 5 de la pyridine avec l'atome de brome puis la position 2 avec l'atome de chlore.

Par cette voie de synthèse, nous avons également essayé d'introduire comme groupement aromatique (Ar) un 4-méthylbenzène ou un 2-naphtalène. Disposant des dérivés vinyliques correspondants, nous avons dans un premier temps tenter un couplage de type Heck à partir de l'intermédiaire clé **2**.

Malheureusement, nous perdons la sélectivité dans cette réaction : le dérivé vinylique couple sur l'iode mais également sur le brome. Nous avons donc mis en place une nouvelle voie de synthèse.

2.2. Voie synthétique 2

La seconde voie rétrosynthétique envisagée est décrite dans le Schéma 15.

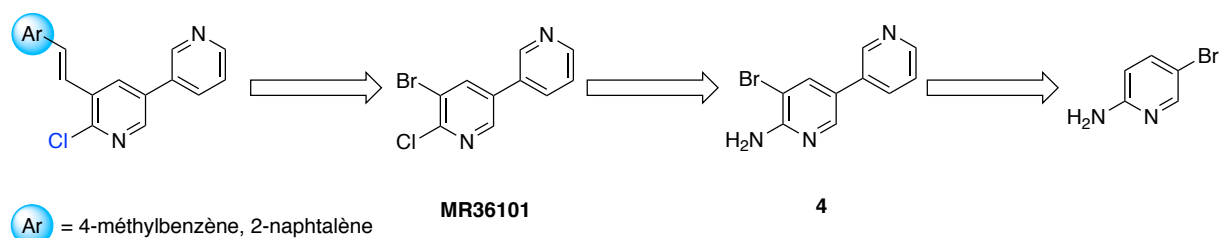


Schéma 15 : Voie rétrosynthétique 2.

Les molécules cibles sont synthétisées à partir de l'intermédiaire **MR36101** et du dérivé vinylique portant le groupement aromatique (Ar) par une réaction de type Heck.

¹³²Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C. Versatile Catalysts for the Suzuki Cross-Coupling of Arylboronic Acids with Aryl and Vinyl Halides and Triflates under Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4020-4028.

**CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique
des molécules à deux unités**

Le **MR36101** est synthétisé à partir du composé **4** par une réaction de type Sandmeyer. Celui-ci est obtenu en deux étapes à partir de la 2-amino-5-bromopyridine commerciale.

La synthèse de l'intermédiaire **MR36101** se fait en trois étapes (Schéma 16). Cette synthèse a été optimisée par Martina De Pascale, doctorante en chimie dans l'équipe du Professeur Voisin-Chiret.

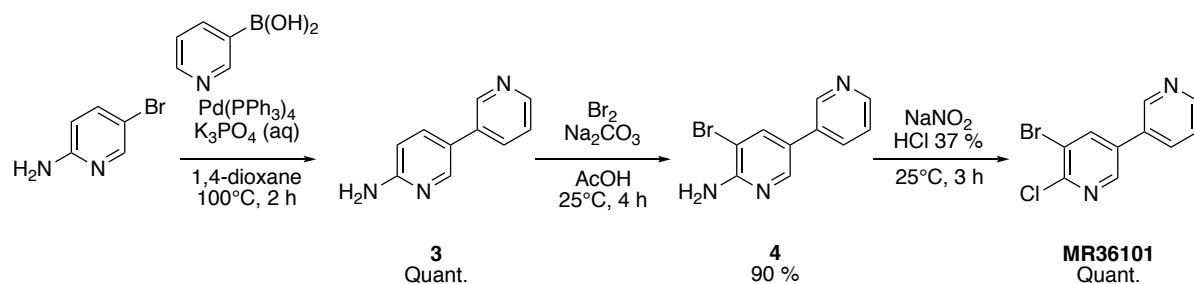


Schéma 16 : Synthèse de la molécule **MR36101**.

La première étape correspond à un couplage pallado-catalysé entre la 2-amino-5-bromopyridine et l'acide pyridin-3-ylboronique pour obtenir la molécule **3**.

Il est préférable d'utiliser comme réactif de départ la 2-amino-5-bromopyridine car la réaction de couplage est quantitative. En effet, avec le réactif de départ précédemment utilisé, la 5-bromo-2-hydroxypyridine, le rendement de la réaction de couplage était de 40 % uniquement. Cela peut s'expliquer par le fait que la 5-bromo-2-hydroxypyridine est moins réactive que la 2-amino-5-bromopyridine car ses deux formes tautomères sont stables contrairement à la 2-amino-5-bromopyridine.

La bipyridine **3** obtenue est ensuite engagée dans une réaction de bromation en position *ortho* de la fonction amine pour donner la molécule **4** avec 90 % de rendement. La fonction amine en position 2 de la pyridine renforce la nucléophilie de la position 3 de celle-ci. Cette position est donc plus réactive et permet de réaliser une réaction de bromation sélective.

Enfin, une réaction de type Sandmeyer à partir du composé aminé **4** en présence de nitrite de sodium dans de l'acide chlorhydrique concentré permet de synthétiser quantitativement le **MR36101**.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Une fois l'intermédiaire **MR36101** synthétisé, il est possible d'accéder aux molécules cibles par la mise en oeuvre d'un couplage de type Heck (Schéma 17).

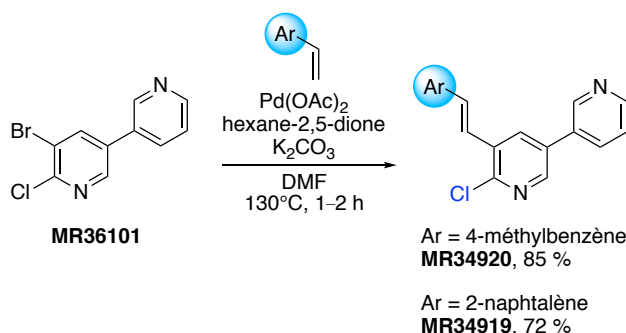


Schéma 17 : Synthèse des molécules à deux unités, R = Cl.

Cette dernière étape permet de synthétiser les molécules cibles **MR34920** et **MR34919** avec de bons rendements (respectivement 85 % et 72 %). Pour ce couplage, nous n'avons pas eu de problème de sélectivité, le couplage a lieu uniquement sur l'atome de brome en position 3 de la pyridine.

3. Synthèse des molécules à deux unités, R = CN ou CO₂H

3.1. A partir des travaux antérieurs du laboratoire

Pour commencer, guidé par les travaux antérieurs du laboratoire concernant la synthèse du Pyridoclox,⁹⁵ nous avons essayé d'adapter cette voie synthétique à la synthèse des molécules cibles à deux unités où R = CN ou CO₂H (Figure 64).

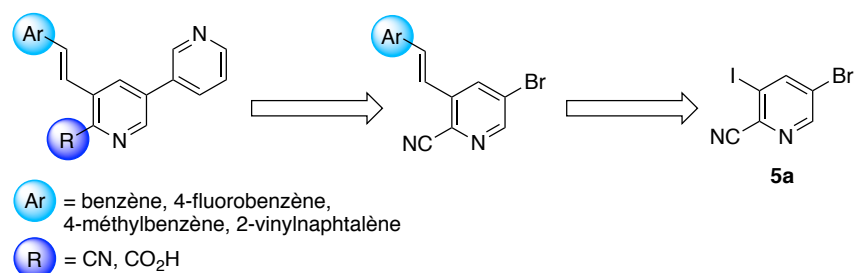


Figure 64 : Voie rétrosynthétique guidée par les travaux antérieurs du laboratoire pour accéder aux molécules à deux unités, R = CN ou CO₂H.

Les molécules cibles pourraient être obtenues par réactions de couplage pallado-catalysées successives à partir de la pyridine **5a**, pour introduire la pyridine terminale et le groupement aromatique. La pyridine **5a** pourrait être synthétisée à partir du 5-bromopicolinonitrile commercial.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Malheureusement, la première étape de la synthèse : l'iodation en position 3 du 5-bromopyridinonitrile par un iode électrophile n'a pas fonctionné. Nous avons uniquement retrouvé le réactif de départ (Schéma 18).

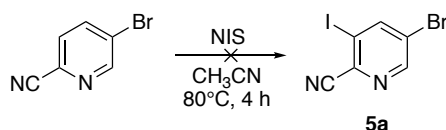


Schéma 18 : Essai d'iodation de la 5-bromopyridinonitrile.

Pour se faire, la réaction d'iodation aurait besoin d'un doublet non liant présent sur un groupement en position 2 de la pyridine. Le nitrile ne possède pas de doublet non liant contrairement aux fonctions hydroxyle et amine présentes en position 2 de la pyridine sur les réactifs de départ précédents. En effet, un groupement électrodonneur en position 2 renforce la nucléophilie de la position 3 de la pyridine, ce qui peut expliquer que la réaction n'ait pas fonctionné.

3.2. A partir d'une nouvelle voie rétrosynthétique

Une nouvelle rétrosynthèse pour accéder aux molécules désirées a donc été envisagée (Schéma 19).

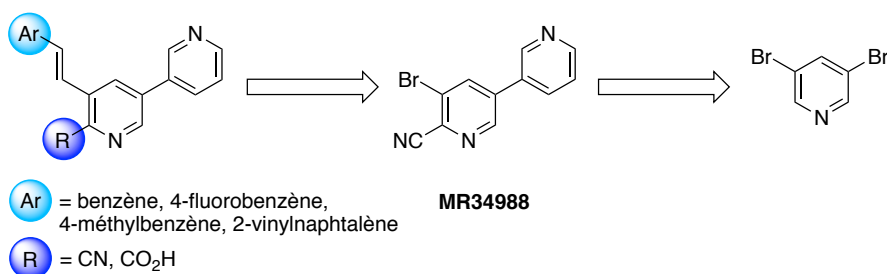


Schéma 19 : Voie rétrosynthétique pour accéder aux molécules à deux unités, R = CN ou CO₂H.

Les molécules cibles peuvent résulter d'un couplage pallado-catalysé à partir de l'intermédiaire clé **MR34988**, celui-ci pouvant être préparé à partir de la 3,5-dibromopyridine commerciale par une réaction de cyanation. Afin de réaliser la cyanation en position 2 de la pyridine, nous avons étudié les conditions présentes dans la littérature.

3.3. Réaction de cyanation en *ortho* de la pyridine

Dans la littérature, Sakamoto *et al.* décrivent que la cyanation de la *N*-oxyde 3-bromopyridine donne très majoritairement le produit 3-bromopicolinonitrile et minoritairement le 5-bromopicolinonitrile (respectivement 91 % et 9 %, rendements déterminés par RMN ¹H) (Schéma 20).¹³³

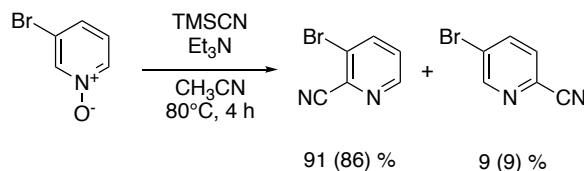


Schéma 20 : Réaction de cyanation du *N*-oxyde 3-bromopyridine selon Sakamoto.¹³³
Rendements isolés entre parenthèse.

Le mécanisme proposé est le suivant (Schéma 21).

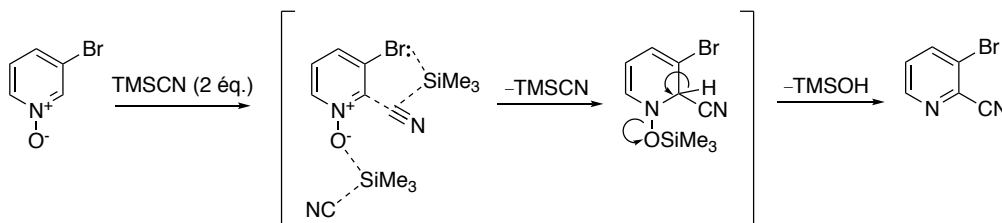
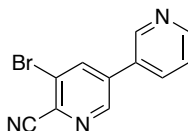


Schéma 21 : Mécanisme proposé pour la réaction de cyanation.¹³³

En plus de l'orientation de la réaction par le *N*-oxyde, il apparaît que la présence d'une paire d'électrons libres sur le substituant en position 3, ici l'atome de brome, participe à l'orientation en complexant l'atome de silicium, ce qui pourrait expliquer la sélectivité de la réaction.

En nous basant sur ces travaux, nous avons donc envisagé la synthèse de l'intermédiaire **MR34988** (Figure 65) par une oxydation suivie d'une cyanation.



MR34988

Figure 65 : Structure du **MR34988**.

¹³³Sakamoto, T.; Kaneda, S.; Nishimura, S.; Yamanaka, H. Site-Selectivity in the Cyanation of 3-Substituted Pyridine 1-Oxides with Trimethylsilylcarbonitrile. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1985**, 33 (2), 565–571.

3.4. Synthèse de l'intermédiaire clé MR34988

Pour synthétiser l'intermédiaire clé **MR34988**, nous voulons introduire le nitrile par une réaction de cyanation. Pour ce faire, nous avons besoin préalablement d'oxyder l'atome d'azote de la pyridine.

Synthétisé précédemment, l'intermédiaire **MR27830** est engagé dans une réaction d'oxydation en présence de *m*-CPBA (Schéma 22).¹³⁴

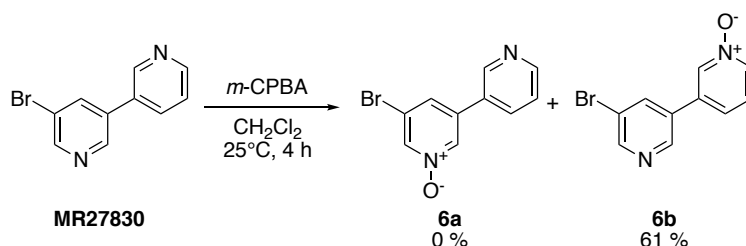


Schéma 22 : Réaction d'oxydation du **MR27830**.

Malheureusement, le produit **6a** désiré où l'oxydation a lieu sur l'atome d'azote de la pyridine bromée ne s'est pas formé. Nous obtenons uniquement le produit **6b** avec un rendement de 61 %.

Nous avons donc décidé de réaliser l'étape d'oxydation de la pyridine, non pas sur la bipyridine bromée **MR27830** mais sur le réactif de départ, la 3,5-dibromopyridine. Celle-ci a été oxydée dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 23).

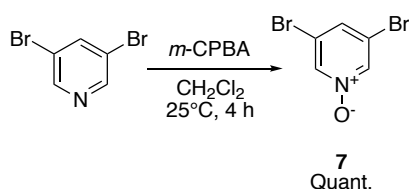


Schéma 23 : Réaction d'oxydation de la 3,5-dibromopyridine.

Ainsi, le *N*-oxyde 3,5-dibromopyridine **7** a pu être obtenu quantitativement.

¹³⁴Cava, M. P.; Weinstein, B. Pyridine Derivatives. III. The Rearrangement of Some Simple 3-Halopyridine-N-Oxides. *J. Org. Chem.* **1958**, 23 (11), 1616–1617.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Une fois la molécule **7** obtenue, elle est engagée dans une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura pour obtenir le produit **6a** (Schéma 24).

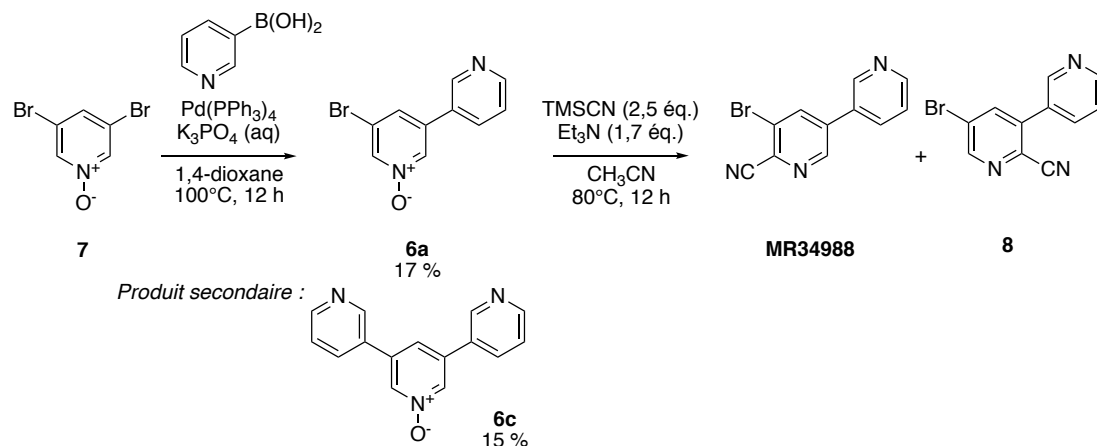


Schéma 24 : Synthèse du **MR34988** – essai 1.

La molécule **6a** est obtenue avec un rendement de 17 % et un produit secondaire **6c** provenant du double couplage a été isolé avec un rendement de 15 %.

La réaction de cyantation a ensuite été réalisée. La présence de deux produits, le **MR34988** et son isomère de position **8**, a été observée (¹H RMN, LC–MS). A cause du faible rendement lors de la réaction de couplage et du manque de sélectivité lors de la réaction de cyantation, cette voie synthétique a été abandonnée.

Nous avons repris la synthèse et, en s'appuyant sur l'expérience du laboratoire quant à la réactivité des dérivés halogénés, nous avons choisi de différencier la réactivité des deux sites halogénés pour engendrer une sélectivité lors de la réaction de type Suzuki–Miyaura.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

L'atome de brome est substitué par un atome d'iode par transhalogénéation (Schéma 25).¹³⁵

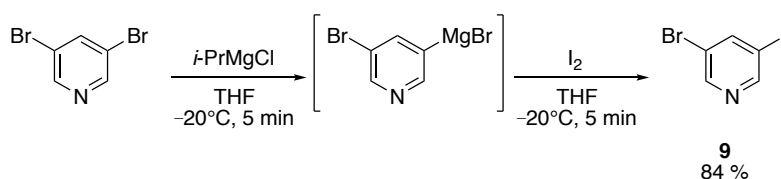


Schéma 25 : Transhalogénéation par échange halogène–métal sur la 3,5-dibromopyridine.

La 3,5-dibromopyridine est engagée à froid avec une source de magnésium pour obtenir l'organomagnésien mixte monobromé de la pyridine. Ensuite, par l'ajout d'iode électrophile, la 3-bromo-5-iodopyridine est synthétisée avec un rendement de 84 %.

La 3-bromo-5-iodopyridine **9** choisie comme réactif de départ, est engagée dans une étape d'oxydation (Schéma 26).

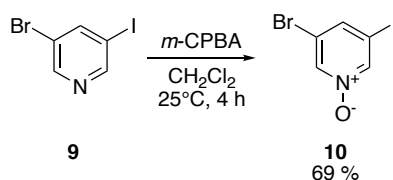


Schéma 26 : Réaction d'oxydation de la 3-bromo-5-iodopyridine.

Le N-oxyle **10** est synthétisé avec un rendement de 69 % et il est engagé dans une réaction de cyanation (Schéma 27).

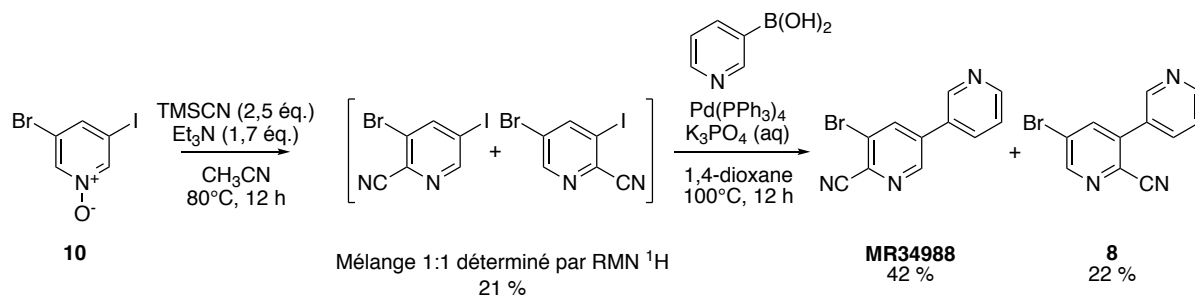


Schéma 27 : Synthèse du **MR34988** – essai 2.

La réaction de cyanation n'est pas sélective et nous obtenons un mélange 1:1 des deux isomères de positions non séparables avec un rendement faible de 21 %. Ce mélange a tout de même été engagé dans l'étape suivante, le couplage a été sélectif sur l'atome d'iode.

¹³⁵Cottet, F.; Schlosser, M. Trifluoromethyl-Substituted Pyridines Through Displacement of Iodine by *in Situ* Generated (Trifluoromethyl)Copper. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, (2), 327–330.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Nous pouvons conclure que les atomes de brome et d'iode imposent une sélectivité lors de la réaction de couplage mais pas lors de la réaction de cyanation. Par conséquent, nous avons effectué la réaction de cyanation sur une molécule symétrique, la *N*-oxyde 3,5-dibromopyridine **7** pour éviter l'obtention d'un mélange (Schéma 28).

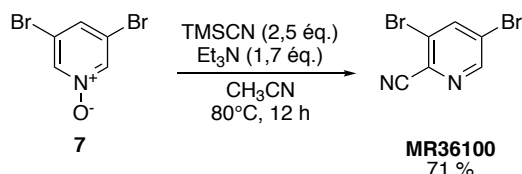


Schéma 28 : Réaction de cyanation de la molécule **7**.

La réaction de cyanation de **7** permet de synthétiser la molécule **MR36100** avec un rendement satisfaisant de 71 %.

Nous avons ensuite voulu différencier les positions 3 et 5 de la pyridine **MR36100** par transhalogénéation de l'atome de brome par un atome d'iode (Schéma 29).

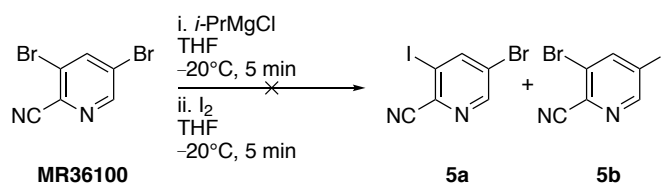


Schéma 29 : Essai de transhalogénéation par échange halogène–métal du composé **MR36100**.

Malheureusement, la réaction n'a pas fonctionné. Dans le brut réactionnel, nous n'avons pas observé de traces du réactif de départ **MR36100** mais nous n'avons pas non plus observé la formation des produits souhaités **5a** ou **5b**.

Nous avons donc décidé de réaliser un couplage de type Suzuki–Miyaura, directement à partir de la pyridine **MR36100**, sans différencier préalablement les positions 3 et 5 (Schéma 30).

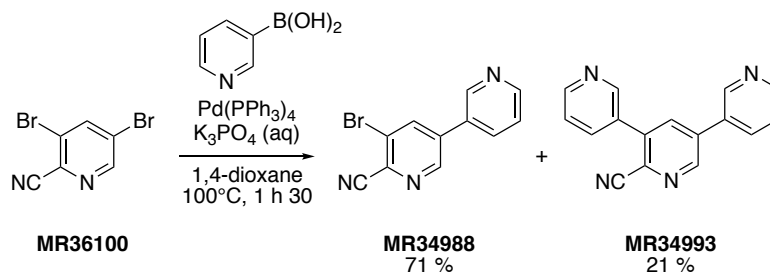


Schéma 30 : Synthèse de la molécule **MR34988**.

Le produit désiré **MR34988** est obtenu majoritairement avec un rendement de 71 %. Son isomère de position est observé en très faible quantité (< 5 % déterminé par ¹H RMN) et n'a pas été isolé. Le produit issu du bicouplage **MR34993** a été isolé avec un rendement de 21 %.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Pour résumer, trois étapes ont été optimisées pour obtenir l'intermédiaire clé **MR34988** dans la synthèse des molécules à deux unités où R = CN (Schéma 31).

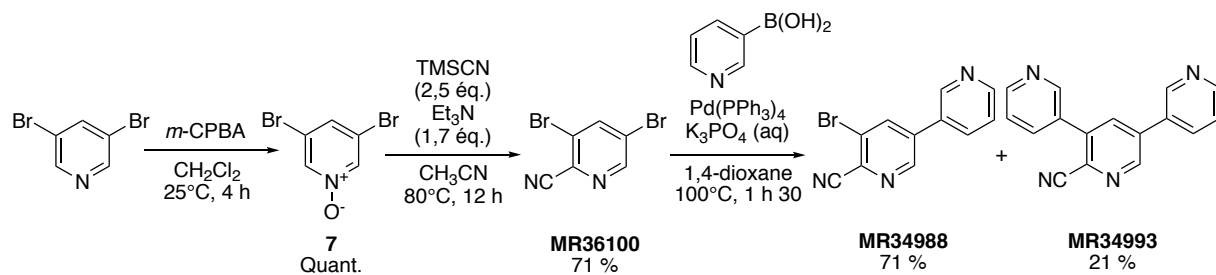


Schéma 31 : Synthèse de l'intermédiaire clé **MR34988**.

L'oxydation par le *m*-CPBA de la 3,5-dibromopyridine commerciale permet d'obtenir quantitativement le N-oxyle **7**. La cyanation de **7** permet de synthétiser le **MR36100**. Un couplage de type Suzuki-Miyaura permet d'obtenir majoritairement l'intermédiaire clé **MR34988**. Le rendement global de ces trois étapes pour la synthèse du **MR34988** est de 50 %.

3.5. Synthèse des molécules à deux unités, R = CN et R = CO₂H

L'intermédiaire clé **MR34988** a alors pu être engagé dans des réactions de couplage pallado-catalysées pour synthétiser les molécules cibles (Schéma 32).

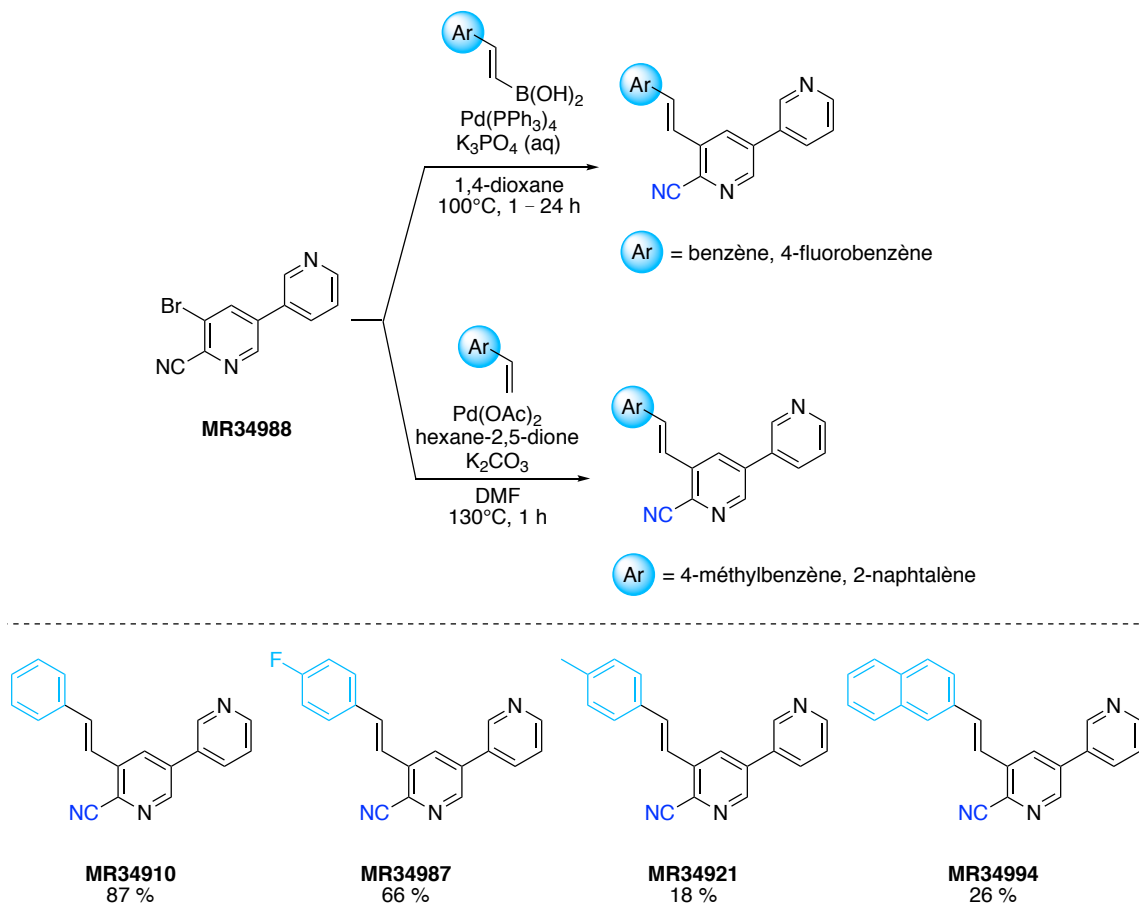


Schéma 32 : Synthèse des molécules à deux unités où R = CN.

Les molécules **MR34910** et **MR34987** sont synthétisées par la mise en oeuvre d'une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura avec des rendements respectifs de 87 % et 66 %.

Les molécules **MR34921** et **MR34994** sont obtenues par la mise en oeuvre d'une réaction de couplage de type Heck avec des rendements respectifs de 18 % et 28 %. Un seul essai de synthèse a été réalisé et a permis d'obtenir les molécules cibles en quantité suffisante pour réaliser les tests biologiques. Cependant, si les molécules devaient présenter un fort intérêt pour le projet, il conviendrait par la suite d'optimiser les conditions du couplage de type Heck (catalyseur, ligand, base) afin d'améliorer le rendement.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

L'hydrolyse des dérivés cyanés conduit à la synthèse des molécules cibles à deux unités où R = CO₂H (Schéma 33).

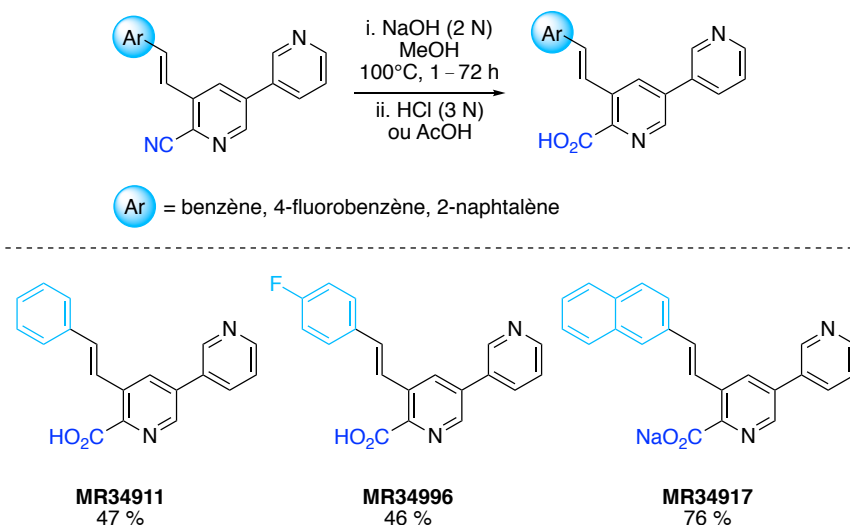


Schéma 33 : Synthèse des molécules à deux unités où R = CO₂H.

L'hydrolyse basique du nitrile forme le carboxylate en passant par un intermédiaire amide. L'acidification du milieu a permis la précipitation des composés **MR34911** et **MR34996**.

L'acide acétique permet d'éviter la protonation des pyridines et ainsi faciliter la précipitation des composés. Le pKa de l'acide acétique de 4,8 est trop faible pour protoner une pyridine dont le pKa de l'ion pyridinium est de 5,2.

Le dérivé **MR34917** sous forme de carboxylate de sodium est synthétisé avec un rendement de 76 %. Pour celui-ci, nous n'avons pas acidifié le milieu réactionnel car lors de l'hydrolyse basique, un précipité s'était formé.

4. Évaluation biologique des molécules à deux unités

Les structures des molécules à deux unités issues de pharmacomodulations des composés **MR34911** et **MR34917** étudiés en modélisation moléculaire sont regroupés sur la Figure 66.

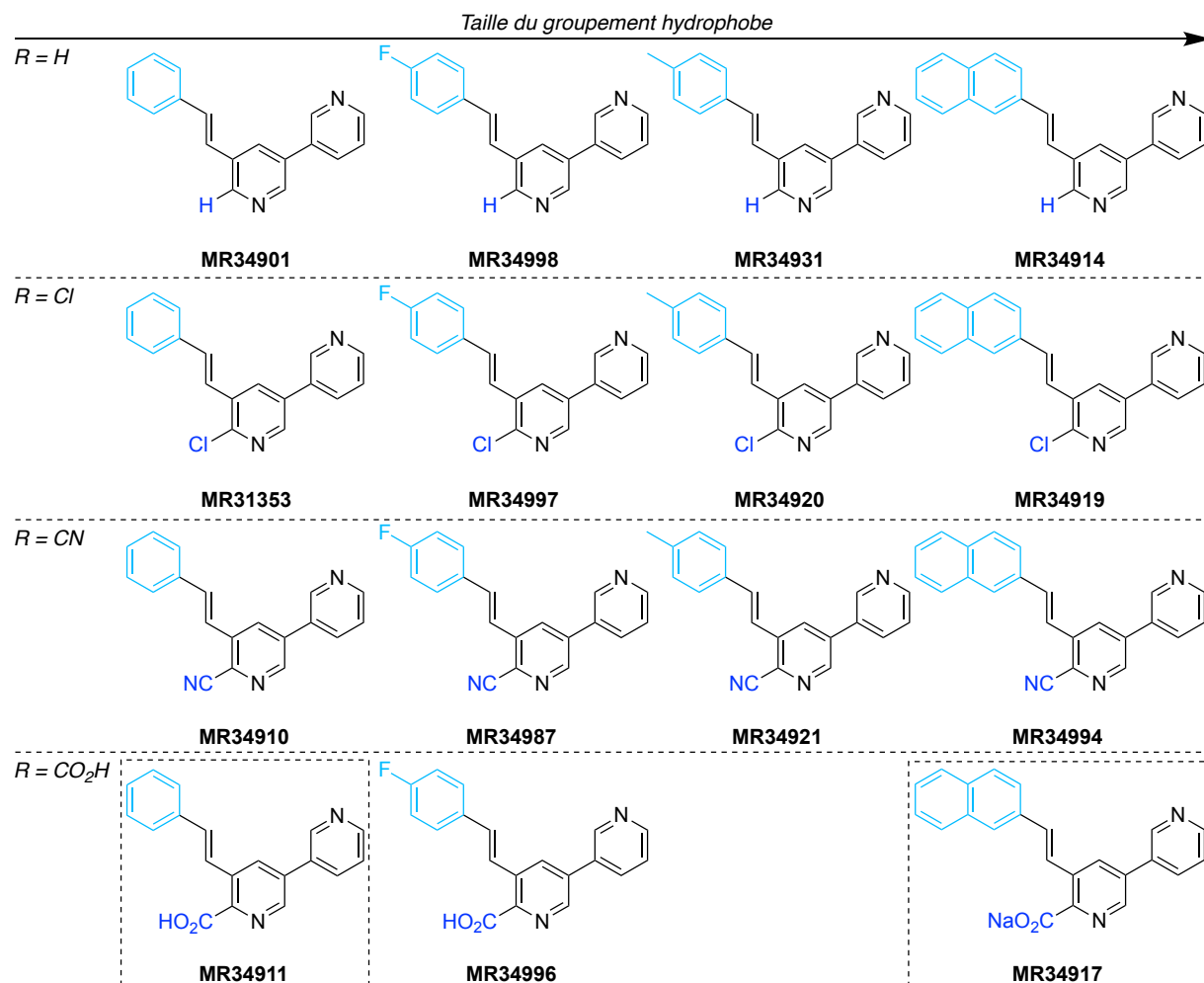


Figure 66 : Structures des composés à deux unités.

Les composés **MR34911**, **MR34917** issus des travaux de modélisation moléculaire sont encadrés en pointillé.

De gauche à droite, le groupement hydrophobe est de plus en plus volumineux et le substituant R ne varie pas pour une même ligne. Pour une même colonne, le groupement hydrophobe ne varie pas, seul le substituant R varie.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à deux unités

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci. Pour des soucis de clareté, nous présenterons les résultats sous forme de graphique. Les données brutes sont présentées en annexe 4 et le profil des activités pro-apoptotiques sont fournies dans la fiche détachée.

Les résultats de l'évaluation biologique de neuf molécules à deux unités sont regroupés dans ce graphique (Figure 67).

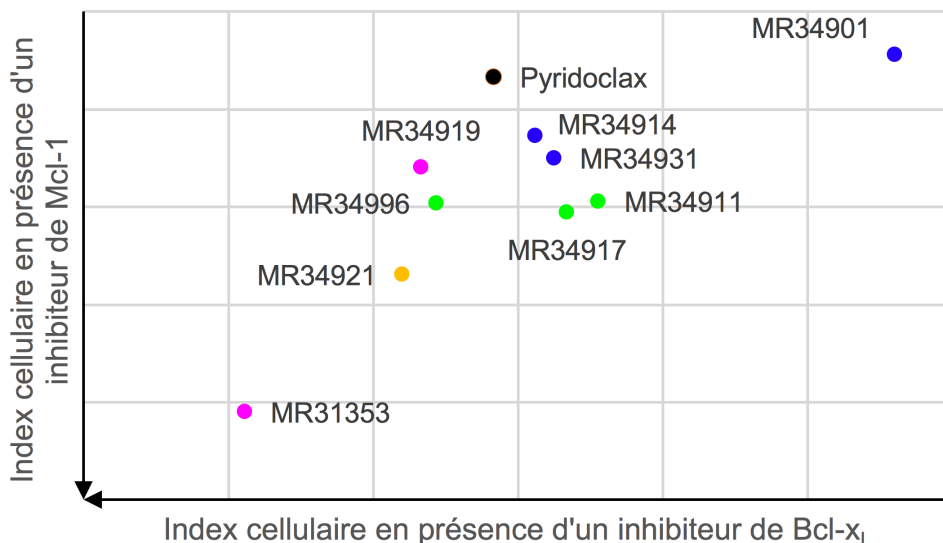


Figure 67 : Résultats de l'évaluation biologique des composés **MR34911**, **MR34917** et dérivés. Les molécules sont testées à 25 μ M. En bleu, molécules avec R = H ; En magenta, molécules avec R = Cl ; En orange, molécules avec R = CN ; En vert, molécule avec R = CO₂H.

D'un point de vue général, ces molécules présentent une activité proapoptotique par inhibition de Bcl-x_L comparée au Pyridoclax. La molécule **MR34901** n'est pas active. Le groupement 2-vinylnaphtalène comparé au styryle semblerait améliorer l'activité sur Mcl-1 (**MR34917** vs **MR34911** et **MR34914** vs **MR34901**). Avec uniquement ces résultats en main, il n'est pas possible de mener une étude de RSA quant à la nature du substituant. Toutes les molécules n'ont pas été testées. Une molécule se démarque cependant, le **MR31353**, portant un atome de chlore. Cette molécule a un profil de *dual* inhibiteur.

III. Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules à trois unités

Les modifications suivantes portent sur l'ajout d'une troisième unité aromatique, et sur la combinaison d'une troisième unité aromatique et d'un groupement hydrophobe plus volumineux. Nous avons étudié en modélisation moléculaire les molécules **MR34913**, **MR34916** et **MR34937**. A partir de ces structures, des pharmacomodulations ont été envisagées, tel que l'introduction de différents groupements R en différentes positions sur la troisième unité aromatique (Figure 68).

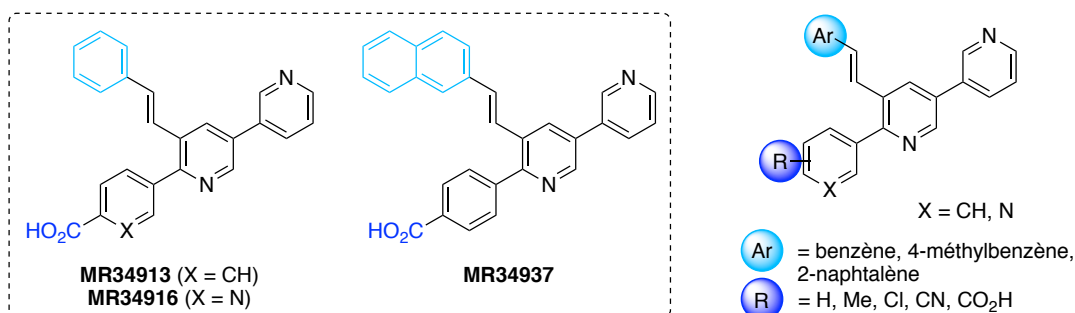


Figure 68 : Pharmacomodulations des molécules **MR34913**, **MR34916** et **MR34937**.

L'accès à ces molécules peut être envisagé à partir de la bipyridine chlorée correspondante préalablement synthétisée.

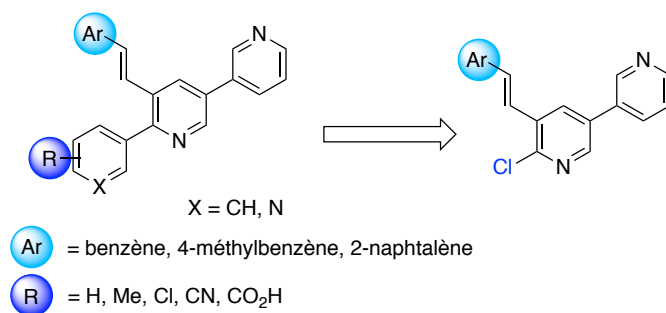


Schéma 34 : Rétrosynthèse envisagée pour les molécules à trois unités.

1. MR34916 et MR34913

1.1. Synthèse et pharmacomodulation

A partir de l'intermédiaire chloré **MR31353** obtenu précédemment, nous accédons aux molécules souhaitées en deux étapes (Schéma 35).

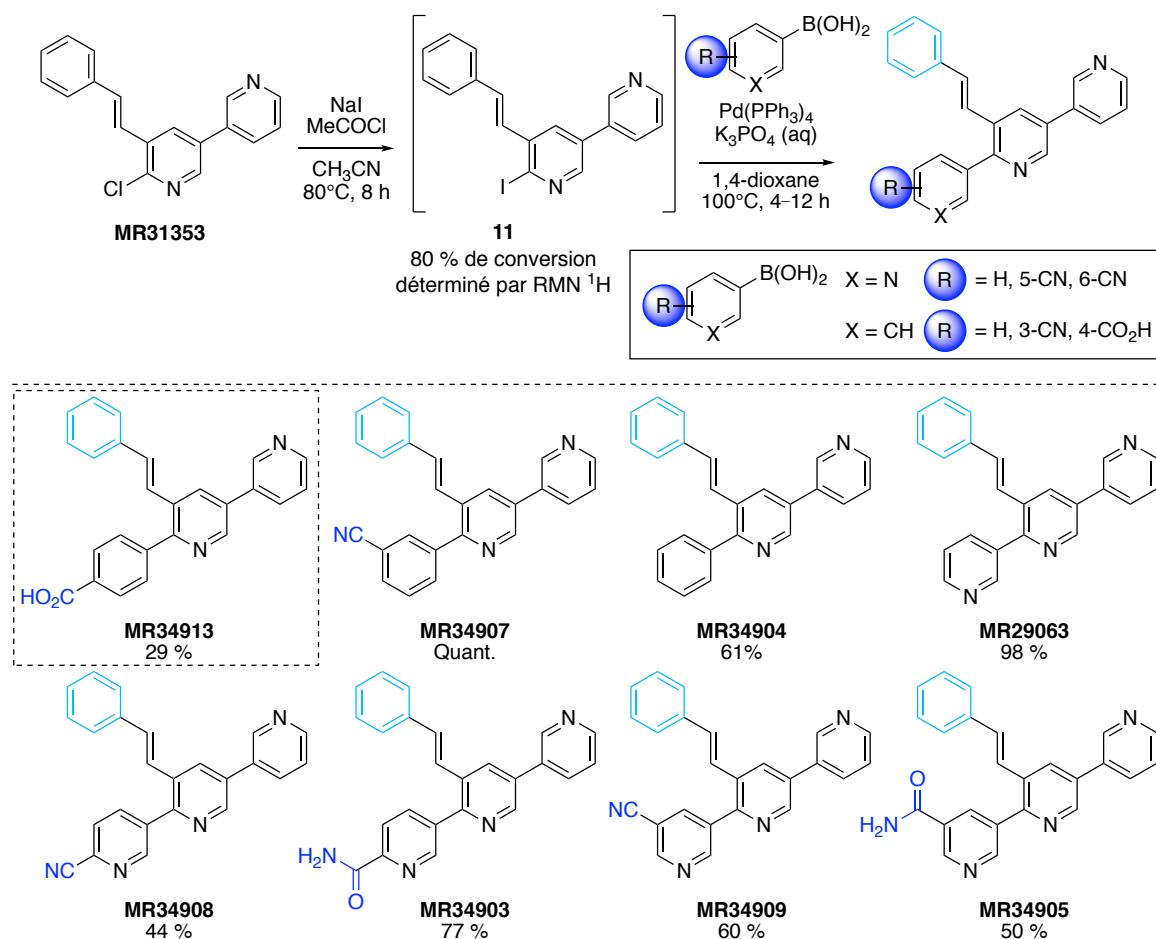


Schéma 35 : Voie de synthèse générale et pharmacomodulation des **MR34916** et **MR34913** (encadré en pointillé).

La première étape est un échange halogène-halogène. Cet échange est nécessaire pour assurer une réactivité suffisante lors de l'étape suivante qui consiste à réaliser une réaction de couplage pallado-catalysée. En effet, l'atome d'iode est plus réactif que l'atome de chlore dans les réactions de couplage pallado-catalysées. Cet échange halogène-halogène se fait en présence d'un large excès d'iode nucléophile et de chlorure d'acétyle. La conversion en produit iodé **11** n'est pas totale et celui-ci ne peut pas être séparé du précurseur chloré **MR31353**. Le mélange obtenu est engagé dans l'étape suivante, une réaction de couplage de type Suzuki-Miyaura, pour synthétiser les molécules désirées.

*CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique
des molécules issues de l'hypothèse 2*

Les molécules **MR34913**, **MR34907**, **MR34904** et **MR29063** sont synthétisées avec des rendements compris entre 29 et 100 %. Pour le **MR34913**, le milieu réactionnel étant basique, la molécule est passée en phase aqueuse. Le milieu a alors été acidifié pour obtenir le produit précipité. Cependant, la totalité du produit n'a pas été récupérée, cela peut expliquer le rendement obtenu.

Concernant les pharmacomodulations, les molécules **MR29063** et **MR34904** ne portent pas de substituant et sont obtenues respectivement avec des rendements de 98 % et 61 %. Nous avons également introduit différents substituants (nitrile, amide) en position *meta* ou *para* de la liaison de jonction.

Lorsque le dérivé iodé **11** est engagé dans une réaction de couplage pallado-catalysée avec l'acide 6-cyanopyridin-3-ylboronique et l'acide 5-cyanopyridin-3-ylboronique, nous obtenons les produits cyanés correspondant **MR34908** et **MR34909** avec des rendements respectifs de 44 % et 60 %. En réitérant ces couplages avec un temps de réaction plus long, nous avons synthétisé les composés **MR34903** et **MR34905** avec des rendements respectifs de 77 % et 50 %. En effet, la réaction de couplage se fait dans un milieu basique, ce qui facilite l'hydrolyse du nitrile en amide.

Pour introduire une fonction acide carboxylique, l'hydrolyse basique du nitrile est réalisée (Schéma 36).

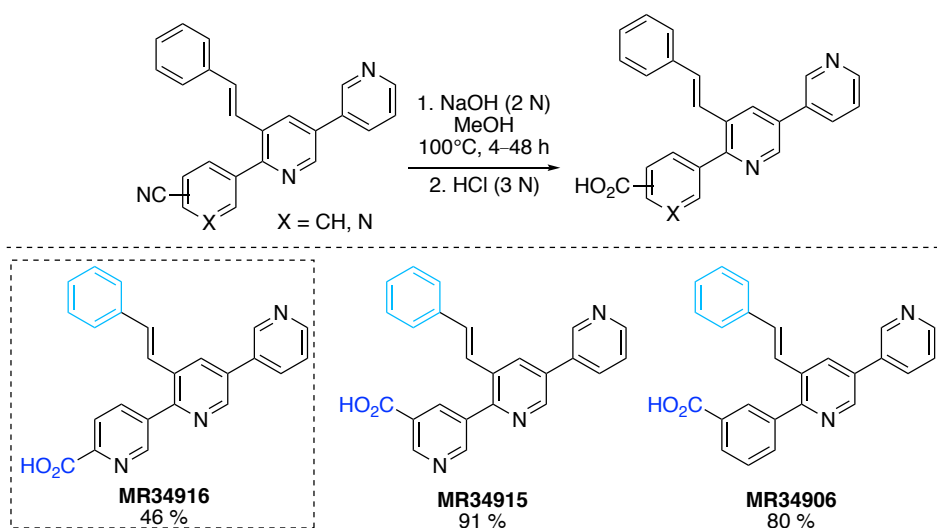


Schéma 36 : Hydrolyse basique des dérivés cyanés.

La base choisie est l'hydroxyde de sodium. Quand le carboxylate est formé, l'acidification du milieu permet d'obtenir l'acide carboxylique correspondant. Ainsi, les molécules **MR34916**, **MR34915** et **MR34906** sont obtenues avec comme rendements respectifs 46 %, 91 % et 80 %.

1.2. Évaluation biologique

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci.

Les résultats de l'évaluation biologique des composés **MR34916**, **MR34913** et leurs dérivés sont présentés dans la Figure 69.

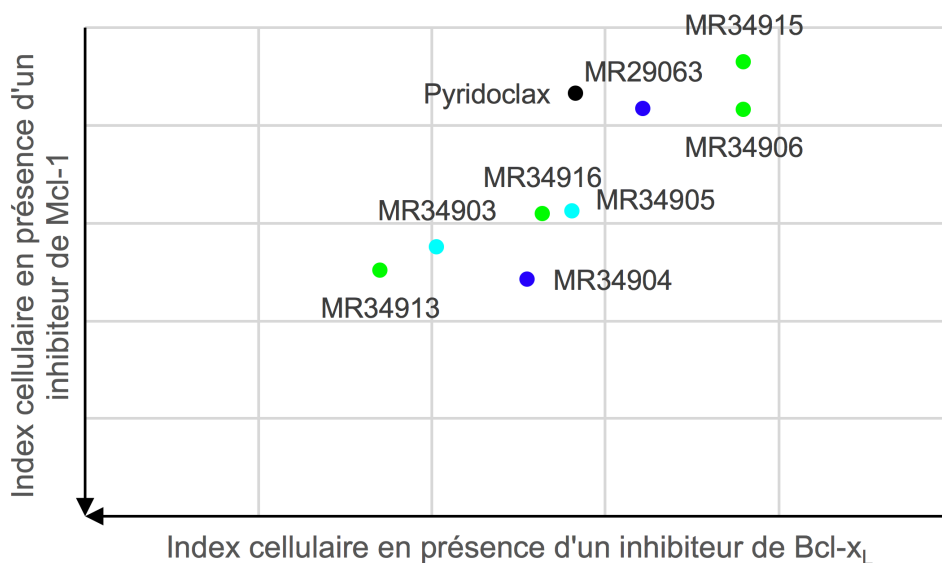


Figure 69 : Résultats de l'évaluation biologique des composés **MR34916**, **MR34913** et dérivés. Les molécules sont testées à 25 μ M. En bleu, molécules avec R = H ; En cyan, molécules avec R = CONH₂ ; En vert, molécules avec R = CO₂H.

A partir de ce graphique, nous pouvons tirer des tendances quant à l'influence de la nature de la troisième unité aromatique, la position et la nature du substituant sur l'activité et enfin comparer ces résultats avec l'étude de modélisation moléculaire.

Nature de la troisième unité aromatique : Une nette différence est remarquée entre les molécules où la troisième unité est une pyridine par rapport à un phényle : les molécules avec une troisième unité phényle sont plus actives sur les deux protéines cibles (**MR34904** vs **MR29063** et **MR34913** vs **MR34916**).

Position du substituant : Les molécules où le substituant est en position *meta* de la liaison de jonction ne sont pas actives (**MR34915**, **MR34906** et **MR34905**). Le substituant en position *para* de la liaison de jonction est à privilégier.

*CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique
des molécules issues de l'hypothèse 2*

Nature du substituant : La nature du substituant est comparée sur les molécules où le substituant est en position *para* de la liaison de jonction. La fonction acide carboxylique permet d'obtenir une bonne activité sur les protéines cibles (**MR34913**, **MR34916**) suivi de la fonction amide (**MR34903**, **MR34905**). En l'absence d'un substituant, nous n'observons aucune activité sur la protéine Mcl-1 (**MR34904**, **MR29063**) et une activité très faible sur Bcl-x_L pour la molécule **MR34904** qui comporte un benzène comme troisième unité aromatique.

Comparaison avec l'étude de modélisation moléculaire :

La molécule **MR34913**, étudiée en modélisation moléculaire, possédant une troisième unité benzène et une fonction acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction a la meilleure activité inhibitrice de Mcl-1 et de Bcl-x_L comparé aux dérivés issus des pharmacomodulations envisagées.

La molécule **MR34916**, étudiée en modélisation moléculaire, possédant une troisième unité pyridine et une fonction acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction, n'a pas l'effet escompté quant à son action inhibitrice des deux protéines cibles.

A partir de ces résultats, la troisième unité aromatique apporte un gain d'activité pour Mcl-1 et Bcl-x_L, quand celle-ci est un benzène. Le groupement polaire en position *para* de la liaison de jonction semble bénéfique lorsque celui-ci est un acide carboxylique.

2. MR34937

2.1. Synthèse et pharmacomodulation

A partir de la structure du composé **MR34937**, où le styryle est remplacé par un groupement plus volumineux, le 2-naphatylène, nous avons réalisé différentes pharmacomodulations. La synthèse générale de ces molécules est présentée dans le Schéma 37.

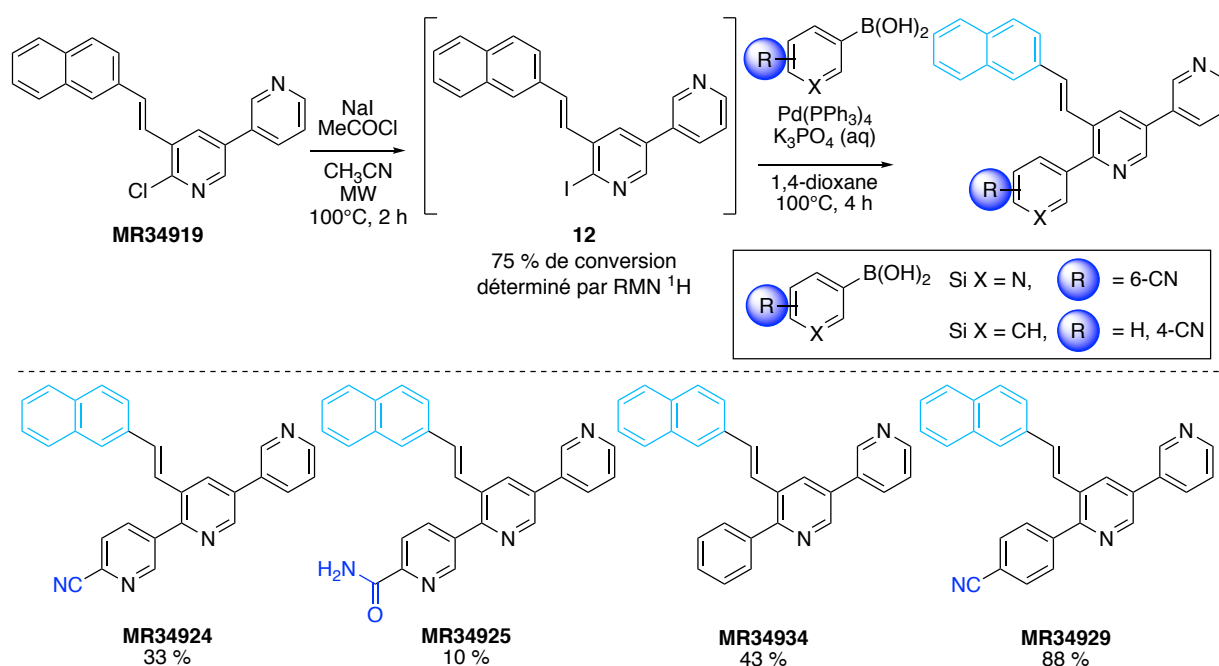


Schéma 37 : Voie de synthèse générale.

La première étape est un échange halogène–halogène pour augmenter la réactivité de la molécule lors de l'étape suivante. Pour cette réaction, le chauffage classique ne permettait pas de convertir le dérivé chloré **MR34919** en produit iodé **12**. Nous avons donc opté pour le chauffage sous application micro-onde¹³⁶ qui a permis d'obtenir une conversion de 75 % (déterminé par RMN ¹H). Le mélange inséparable du produit formé **12** et du précurseur chloré **MR34919** a ensuite été engagé dans une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura.

Les molécules **MR34924**, **MR34925**, **MR34934** et **MR34929** ont été obtenues par cette voie de synthèse. Lors de la réaction de couplage entre le dérivé iodé **12** et l'acide 6-cyanopyridin-3-ylboronique, deux produits se sont formés : le produit cyané attendu **MR34924** et un produit secondaire issu de l'hydrolyse du nitrile de **MR34924**, le **MR34925**. Ces produits ont été séparés par flash chromatographie (0–100% EtOAc/cyclohexane).

¹³⁶Perato, S.; Giorgi, M.; Burzicki, G.; Legalite, F.; Rault, S.; Voisin-Chiret, A. Focus on Microwaves Assisted Halogen-Halogen Exchange Reaction Conditions on 2-Halopyridines. *Curr. Microw. Chem.* **2014**, *1*, 75–80.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

La pharmacomodulation du composé **MR34937** par l'ajout d'une troisième unité pyridine (**MR34924** et **MR34925**) ou benzène (**MR34934** et **MR34929**) substituée ou non a donc été réalisée.

Les produits **MR34932** et **MR34937** sont obtenus par hydrolyse basique des produits cyanés correspondants **MR34924** et **MR34929** (Schéma 38).

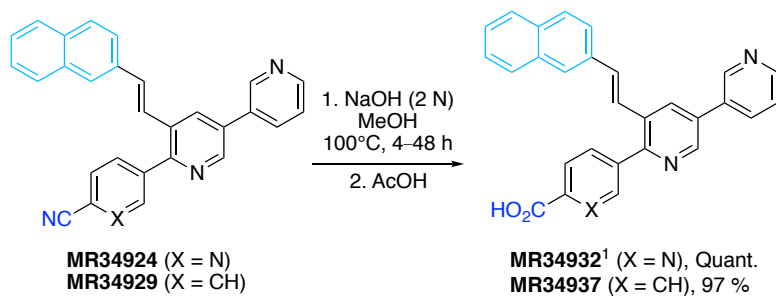


Schéma 38 : Hydrolyse basique des composés cyanés.
¹Le composé **MR34932** est sous forme de sel de fumarate.

Suite aux résultats biologiques précédents, nous avons fait le choix de ne pas continuer la synthèse de nouvelles molécules où le substituant est en position *meta* de la liaison de jonction. Néanmoins, pour confirmer l'influence positive sur l'activité d'un benzène plutôt qu'une pyridine en troisième unité aromatique, nous avons synthétisé de nouvelles terpyridines. Afin de pouvoir mesurer l'influence de l'ajout d'un groupement polaire, nous avons également synthétisé l'analogue non substitué (**MR34934**).

2.2. Évaluation biologique

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci.

Les résultats de l'évaluation biologiques sont présentés sur la Figure 70.

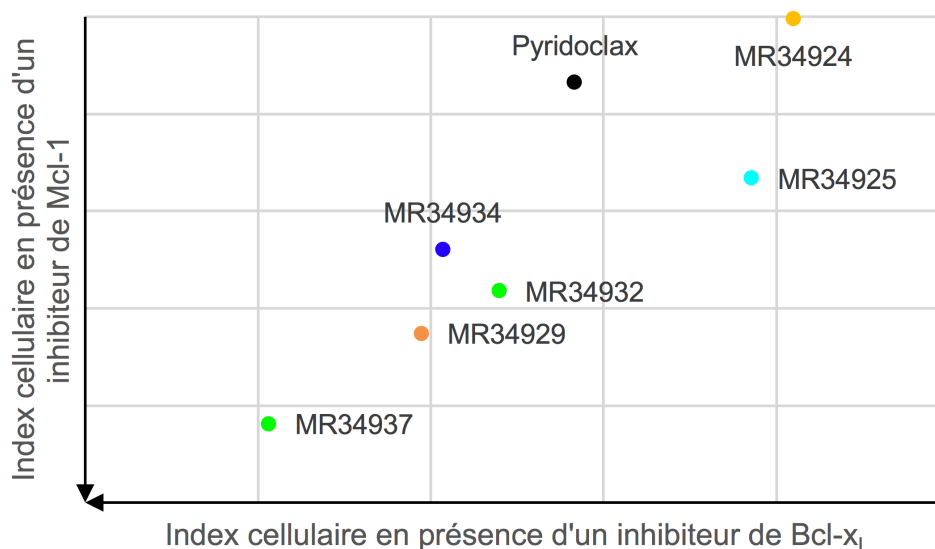


Figure 70 : Résultats de l'évaluation biologique du **MR34937** et dérivés. Les molécules sont testées à 25 μ M. En bleu, molécule avec R = H ; En orange, molécule avec R = CN ; En cyan, molécule avec R = CONH₂ ; En vert, molécules avec R = CO₂H.

A partir de ce graphique, nous pouvons tirer des tendances quant à l'influence de la nature de la troisième unité aromatique et de la nature du substituant sur l'activité, et enfin comparer ces résultats avec l'étude de modélisation moléculaire.

Nature de la troisième unité aromatique : Les terpyridines **MR34924** et **MR34925** ne montrent pas d'activité inhibitrice des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Les résultats confirment qu'un benzène en troisième unité aromatique semble plus favorable. Cependant, la terpyridine **MR34932**, parce qu'elle comporte un acide carboxylique, est active sur Mcl-1 et Bcl-x_L.

Nature du substituant : Sur la série de molécules avec un benzène en troisième unité, nous voyons une amélioration de l'activité de Mcl-1 et Bcl-x_L lorsque la polarité du substituant augmente (H (**MR34934**) < CONH₂ (**MR34929**) < CO₂H (**MR34937**)).

Comparaison avec l'étude de modélisation moléculaire :

Ces résultats confirment les hypothèses émises lors des études de modélisation moléculaire, à savoir qu'il est important pour inhiber Mcl-1 et Bcl-x_L d'occuper la poche P2 avec un groupement hydrophobe volumineux et d'ajouter un troisième cycle aromatique portant une fonction polaire afin de créer une interaction avec une arginine notamment.

La molécule **MR34937**, qui combine ces deux modifications étudiées en modélisation moléculaire est un potentiel *dual* inhibiteur.

3. Influence d'un second substituant sur la troisième unité

Toujours dans le but d'augmenter les activités sur Mcl-1 et Bcl-x_L, nous avons étudié l'influence d'un second substituant sur cette troisième unité aromatique. Tout d'abord, par l'ajout d'un groupement méthyle puis par l'ajout d'un atome de chlore.

3.1. Influence du groupement méthyle

Guidé par la structure du Pyridoclastax, nous avons synthétisé des molécules qui comportent le squelette terpyridine méthylé du Pyridoclastax sur lesquelles nous avons introduit un groupement polaire. Ces groupements ayant montré un intérêt quant à l'activité sur Mcl-1 et Bcl-x_L.

A partir de l'intermédiaire **11**, une réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura permet de synthétiser **MR34918**, suivi par une hydrolyse basique pour obtenir le composé **MR34928** (Schéma 39).

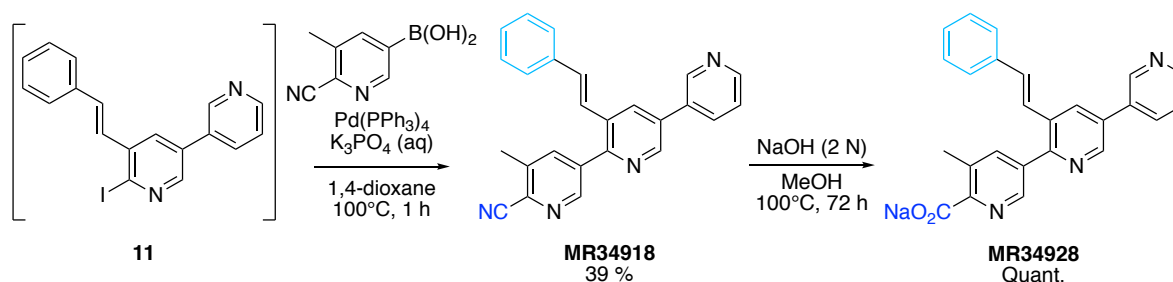


Schéma 39 : Synthèse des composés **MR34918** et **MR34928**.

Les deux composés **MR34918** et **MR34928** disubstitués sur la troisième unité par un groupement méthyle et respectivement un nitrile et un carboxylate de sodium en *para* de la liaison de jonction.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci.

Les résultats de l'évaluation biologique sont présentés dans la Figure 71.

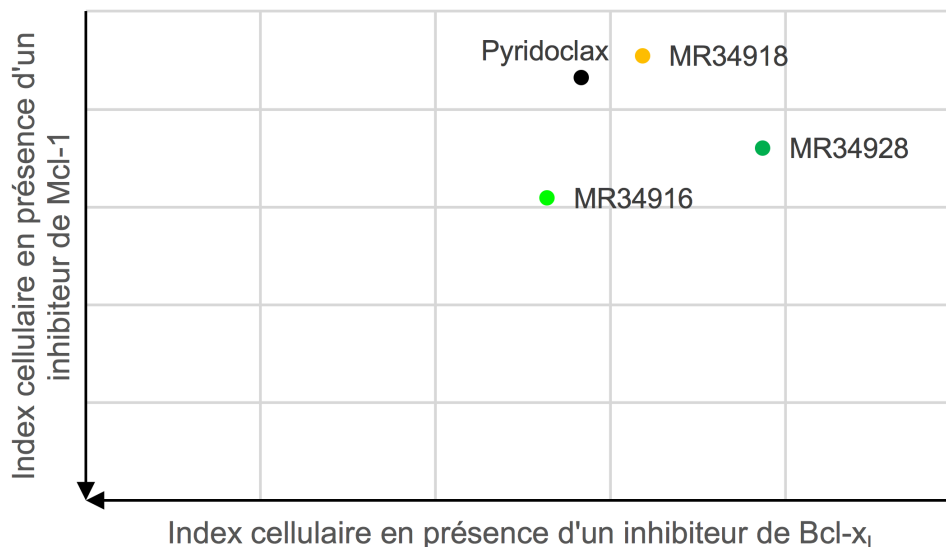


Figure 71 : Influence du groupement méthyle sur l'activité.
Les molécules sont testées à 25 μ M. En orange, molécule avec R = CH₃, CN ; En vert, molécule avec R = CO₂H ;
En vert foncé, molécule avec R = CO₂H, CH₃.

Sur la figure Figure 71, en plus des composés **MR34918** et **MR34928**, est également représentée la molécule **MR34916** comme élément de comparaison. Cette molécule est l'analogue non méthylé du composé **MR34928**.

Bien qu'ayant une analogie structurale plus prononcée que les molécules précédentes avec notre *lead* Pyridoclax, les molécules **MR34918** et **MR34928** n'ont pas montré d'activité inhibitrice sur les protéines cibles et sont moins actives que le **MR34916**.

3.2. Influence de l'atome de chlore

Pour poursuivre la piste de substituer une seconde fois la troisième unité aromatique, nous avons introduit un atome de chlore sur la troisième unité aromatique. L'atome de chlore est électronégatif et hydrophobe. Il peut permettre de former une « liaison hydrogène » avec les protéines cibles, ce qui aurait une influence positive sur l'activité.

Ainsi, des nouvelles molécules disubstituées ont été synthétisées par la mise en oeuvre d'une réaction pallado-catalysée à partir de l'intermédiaire iodé **11** (Schéma 40).

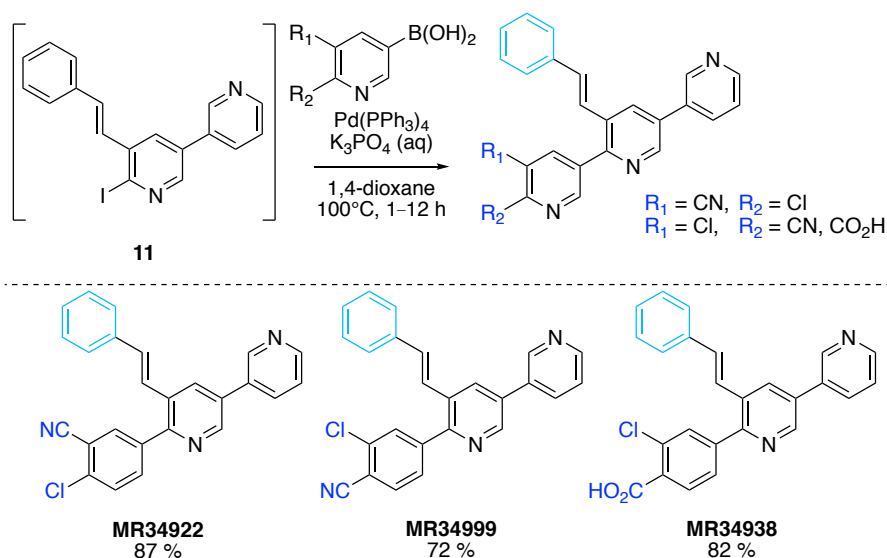


Schéma 40 : Synthèse de molécules disubstituées.

Les deux substituants sont de nature différente : l'un est un groupement polaire (nitrile ou acide carboxylique) et l'autre un atome de chlore, à caractère hydrophobe. Le groupement polaire peut être en position *meta* de la liaison de jonction et l'atome de chlore en position *para* (**MR34922**) ou inversement (**MR34999** et **MR34938**).

Le composé **MR34940** a été obtenu par hydrolyse basique de la molécule **MR34922** (Schéma 41).

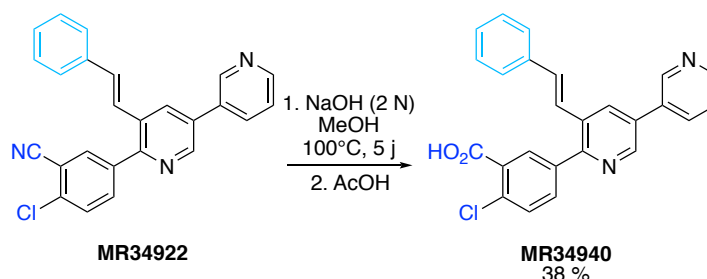


Schéma 41 : Hydrolyse basique du composé **MR34922**.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

Malgré que le milieu soit chauffé, la réaction est lente et elle a duré cinq jours. Le rendement faible de 38 % s'explique par le fait que la formation du précipité a été difficile et non totale.

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci.

Les résultats de l'évaluation biologique pour ces composés sont présentés dans la Figure 72.

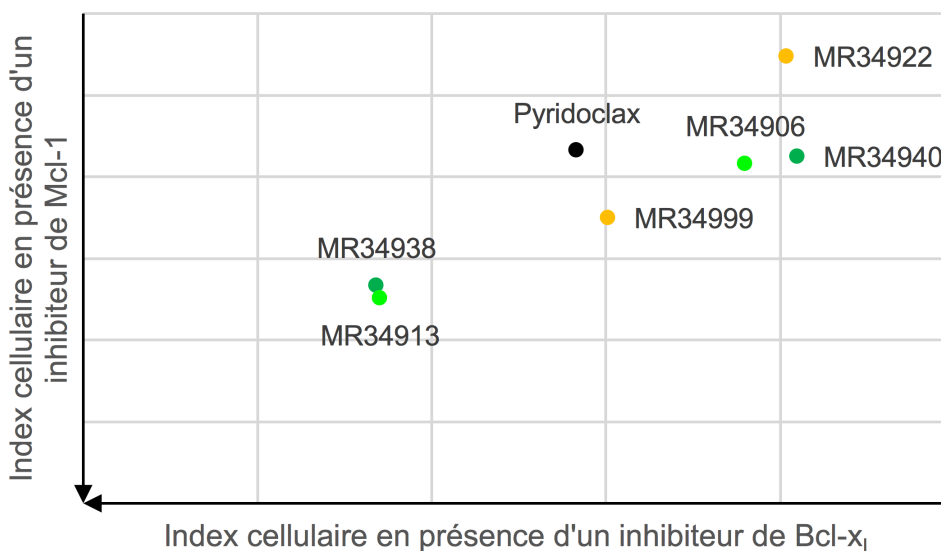


Figure 72 : Influence de l'atome de chlore sur l'activité biologique.

Les molécules sont testées à 25 μ M. En orange, molécules avec R = CN, Cl ; En vert, molécules avec R = CO₂H ; En vert foncé, molécules avec R = CO₂H, Cl.

A partir de ce graphique, nous pouvons tirer des tendances quant à l'influence de la position et de la nature du substituant sur l'activité, et comparer les molécules disubstituées à leurs analogues non chlorés (**MR34913** et **MR34940**).

Position des substituants : Les molécules où le groupement polaire est en position *meta* de la liaison de jonction (**MR34922** et **MR34940**) ne sont pas actives. Lorsque le groupement polaire est en *para* (**MR34938** et **MR34999**), l'activité sur Mcl-1 et sur Bcl-x_L est améliorée. Le composé **MR34938** est un *dual* inhibiteur avec une activité modérée.

Nature du substituant polaire : La fonction acide carboxylique engendre une activité sur les protéines cibles comparé à la fonction nitrile (**MR34913** vs **MR34999**).

Comparaison molécules disubstituées vs analogues non chlorés : A titre de comparaison, les activités des molécules **MR34913** (analogue non chloré du composé **MR34938**) et **MR34906** (analogue non chloré du composé **MR34940**) sont rappelées.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

L'introduction de l'atome de chlore n'influence pas l'activité biologique. Les molécules **MR34913** et **MR34906** et leurs analogues respectifs **MR34938** et **MR34940** conservent les mêmes activités inhibitrices pour les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

La molécule **MR34938** ayant montré des résultats biologiques encourageants, nous avons synthétisé la molécule **MR36102**, selon un schéma classique de réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura, où le groupement styryle est remplacé par un groupement 2-vinylnaphtalène pour occuper pleinement la poche hydrophobe P2 (Schéma 42).

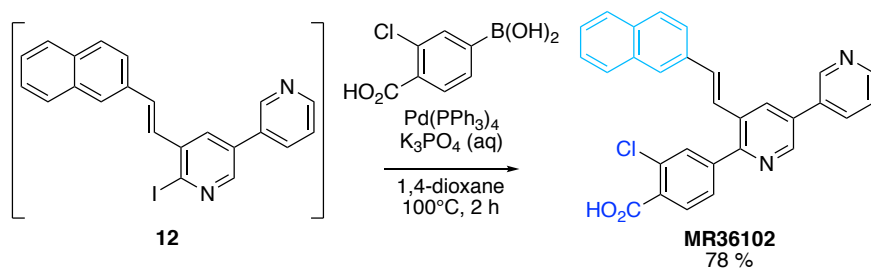


Schéma 42 : Synthèse du composé **MR36102**.

Le résultat de l'évaluation biologique du **MR36102** est présenté sur la Figure 73. Sur cette figure, nous avons également rappelé les résultats des analogues **MR34937** et **MR34938** afin de pouvoir comparer les résultats.

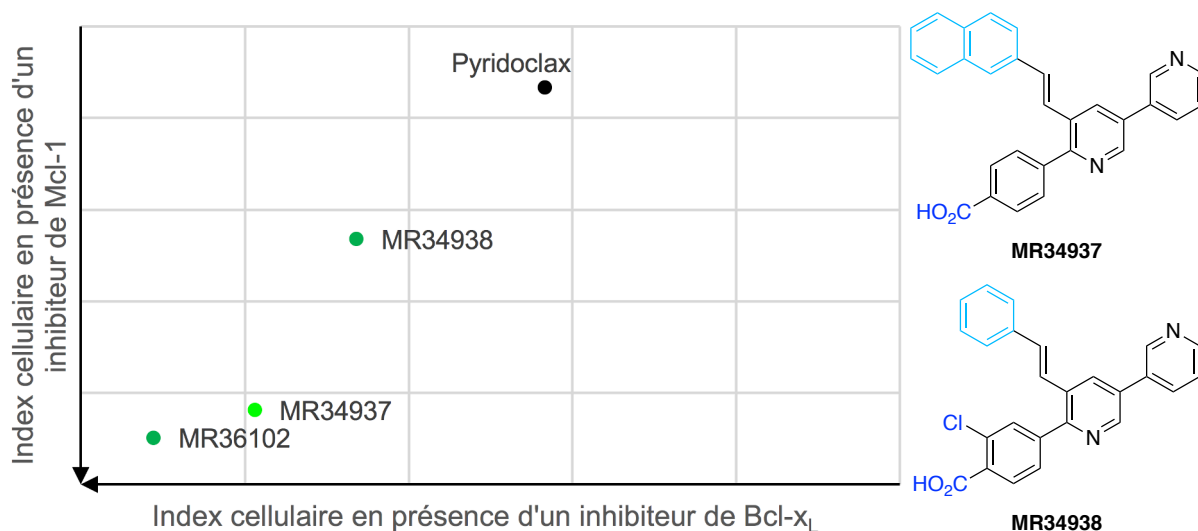


Figure 73 : A gauche – Résultats de l'évaluation biologique du composé **MR36102**. A droite – Structure des composés **MR34937** et **MR34938**.

Les molécules sont testées à 25 μ M. En vert, molécule avec R = CO₂H ; En vert foncé, molécules avec R = Cl, CO₂H.

A partir de ce graphique, nous pouvons tirer des tendances quant à l'influence de la nature du groupement aromatique hydrophobe et de la nature du substituant sur l'activité, et enfin comparer ces résultats avec l'étude de modélisation moléculaire.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

Nature du groupement aromatique hydrophobe : L'ajout d'un groupement hydrophobe plus volumineux pour explorer la poche P2 des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L augmente considérablement l'activité sur les deux protéines cibles (**MR36102** vs **MR34938**).

Ajout d'un atome de chlore : Si l'on compare les composés **MR36102** et **MR34937**, l'ajout d'un atome de chlore, substituant hydrophobe en position *meta* de la liaison de jonction, renforce l'activité sur Mcl-1 et Bcl-x_L.

4. Discussion

Pour les molécules à trois unités monosubstituées, la Figure 74 présente les différentes tendances concernant l'activité pro-apoptotique que nous avons pu dégager à travers les différentes pharmacomodulations.

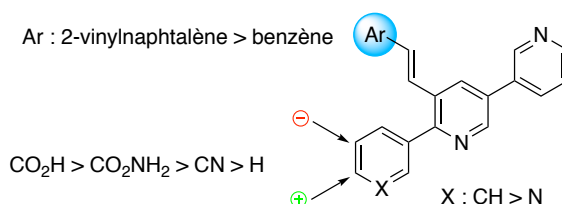


Figure 74 : Influence des pharmacomodulations sur l'activité pro-apoptotique.

- Un groupement aromatique hydrophobe plus volumineux est bénéfique pour l'activité sur les deux cibles.
- Le benzène en tant que troisième unité aromatique est préférable à la pyridine
- Le substituant doit être en position *para* de la liaison de jonction sur cette troisième unité. La substitution en position *meta* est délétère.
- La nature du substituant influence l'activité biologique : les molécules composées d'un acide carboxylique donnent les meilleures activités.

Les résultats de l'évaluation biologique des molécules étudiées en modélisation moléculaire et de leurs analogues chlorés sont présentés sur la Figure 75.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

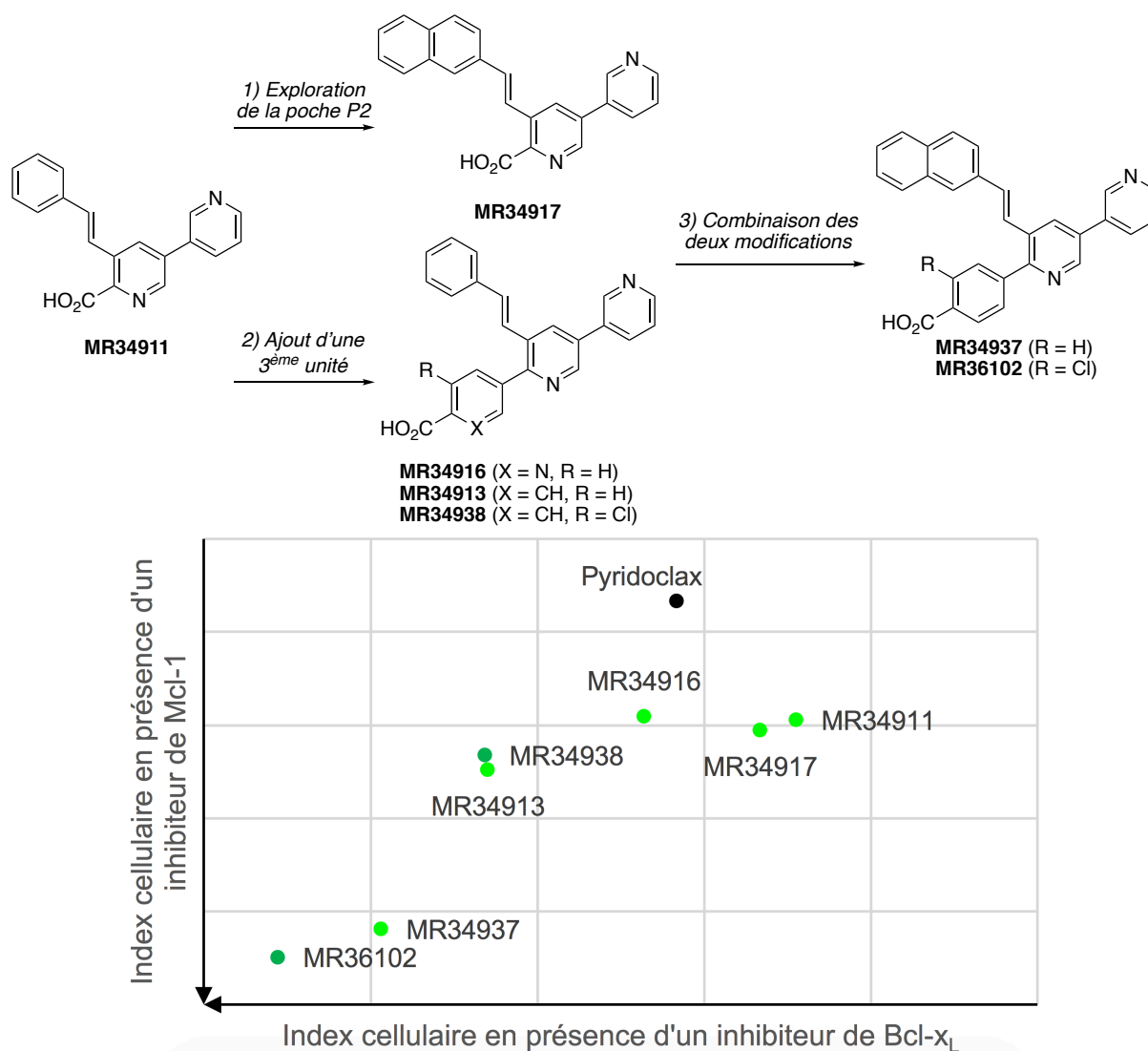


Figure 75 : Structures et évaluation biologique des molécules étudiées en modélisation moléculaire et molécules disubstituées.

Les molécules sont testées à 25 μ M. En vert, molécule avec R = CO₂H ; En vert foncé, molécules avec R = CO₂H, Cl.

Nous avons vu dans la partie de modélisation moléculaire qu'à partir du fragment initial **MR34911**, deux modifications pouvaient améliorer l'activité inhibitrice de Mcl-1 et Bcl-x_L.

Première modification : L'exploration de la poche P2, permet d'améliorer faiblement l'activité inhibitrice de Mcl-1 (**MR34917**).

Deuxième modification : L'ajout d'une troisième unité, permet également d'améliorer l'activité inhibitrice de Mcl-1 (**MR34916**, **MR34913** et **MR34938**).

Combinaison des deux modifications : comme nous l'avons prédit en modélisation moléculaire, **MR34937** donne les meilleurs résultats quant à l'activité inhibitrice de Mcl-1 et Bcl-x_L.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

Ajout d'un second substituant : Nous avons décidé d'ajouter un second substituant sur la troisième unité aromatique pour se rapprocher de la structure de notre *lead*, le Pyridoclast. L'atome de chlore a été introduit. Bien que l'atome de chlore n'influence pas l'activité du composé lorsque celui-ci porte un styryle comme groupement aromatique hydrophobe (**MR34938** vs **MR34913**), il renforce l'activité pour Mcl-1 et Bcl-x_L lorsque la molécule est composée d'un 2-vinylnaphtalène (**MR36102** vs **MR34937**). Ainsi, nous avons découvert notre meilleure molécule, le **MR36102**, qui est un potentiel *dual* inhibiteur (Figure 76).

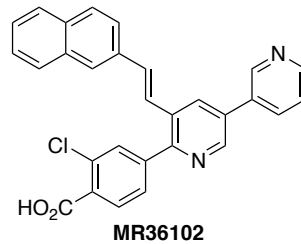


Figure 76 : Structure du **MR36102**.

La molécule **MR36102**, en raison de ces résultats très prometteurs, a fait l'objet de tests biologiques complémentaires et plus complets (Figure 77).

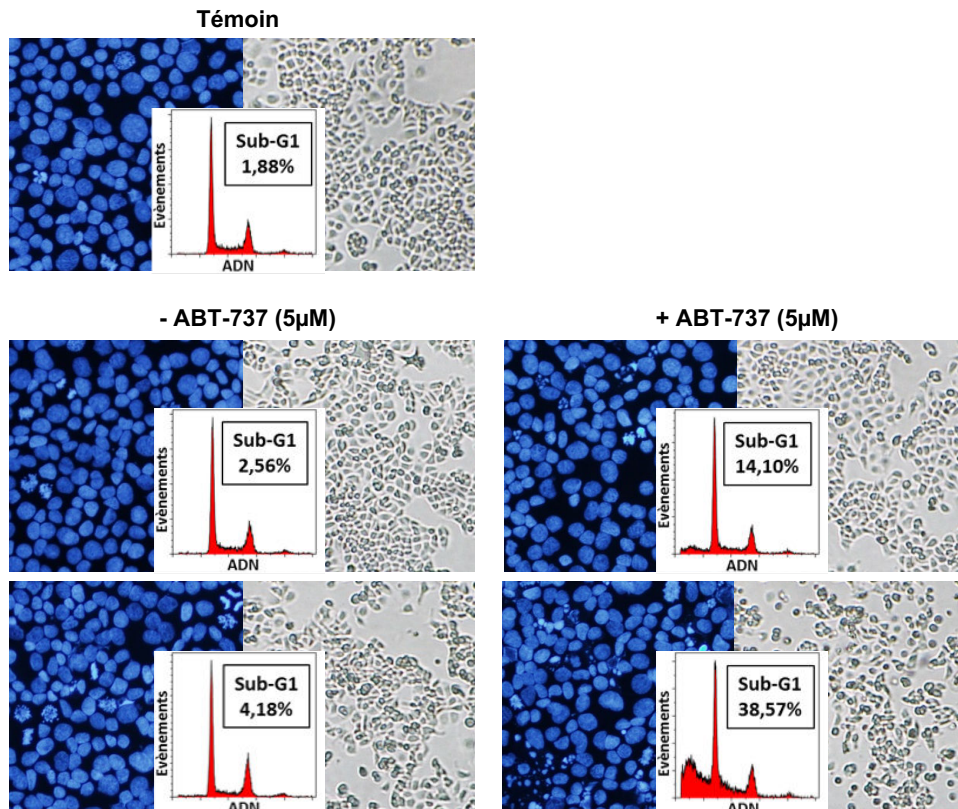


Figure 77 : Evaluation de l'activité de **MR36102** sur les cellules IGROV-R10 en association avec un inhibiteur de Bcl-x_L (ABT-737).

Tests d'évaluation de l'induction de la mort cellulaire (observation des morphologies cellulaires et nucléaires (marquage par le DAPI) ; et recherche d'une fraction Sub-G1 sur les histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium).

*CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique
des molécules issues de l'hypothèse 2*

Le test de criblage ayant identifié la molécule **MR36102** comme un potentiel inhibiteur de Mcl-1, nous avons procédé à l'évaluation de son activité sur les cellules IGROV1-R10 en association avec l'inhibiteur de Bcl-x_L ABT-737 par des tests conventionnels d'évaluation de l'induction de la mort cellulaire (observation des morphologies cellulaires et nucléaires (marquage des noyaux par le DAPI) et recherche d'une fraction Sub-G1 sur les histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium).

Alors que ni l'ABT-737 ni la **MR36102** ne provoquent de modification majeure des différents paramètres, comme attendu, l'association des deux molécules provoque l'apparition de caractéristiques de l'apoptose telles que des détachements et rétrécissements cellulaires, des condensations et fragmentations nucléaires ou encore l'apparition d'évènements dans la fraction sub-G1 suggérant que la molécule évaluée est bien un inhibiteur de Mcl-1.

Son activité reste cependant modeste comparée à celle du Pyridoclast dans les mêmes conditions. Il est par ailleurs nécessaire d'évaluer son activité en présence du S63845, inhibiteur de Mcl-1, pour évaluer son éventuelle activité sur la protéine Bcl-x_L, suggérée par les résultats du criblage.

IV. Synthèse et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

D'après les travaux de modélisation moléculaire, les molécules conçues à partir de l'hypothèse 2, où le styrile du Pyridoclastax occupe la poche P3, n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants quant à leur position dans les protéines cibles. En effet, selon cette hypothèse, l'étude s'est arrêtée à l'étape de *docking*. Cependant, afin de conforter ce résultat nous avons tout de même entrepris la synthèse de trois dérivés. Ils possèdent un groupement polaire (ester, nitrile, acide carboxylique) en position 4 sur le groupement styrile. Le choix de la nature des trois composés a été guidé par la rapidité d'accès synthétique.

1. Synthèse

La première molécule synthétisée est l'ester **MR34912** (Schéma 43).

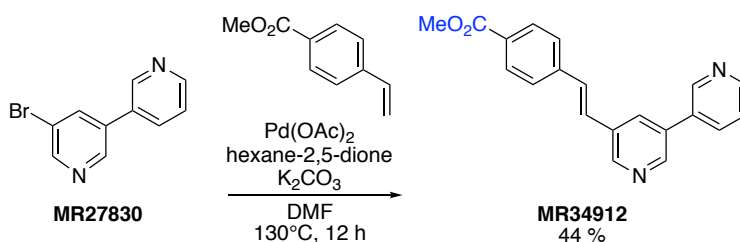


Schéma 43 : Synthèse du composé **MR34912**.

Celle-ci est obtenue par une réaction de couplage de type Heck à partir de l'intermédiaire **MR27830** et du 4-vinylbenzoate de méthyle.

La seconde molécule synthétisée est la terpyridine **MR34930** (Schéma 44).

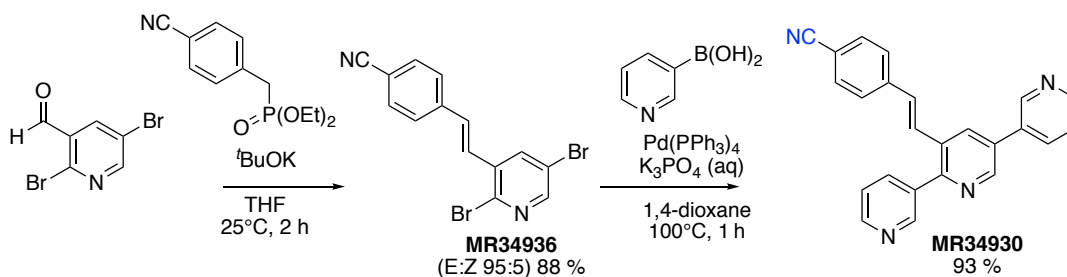


Schéma 44 : Synthèse du composé **MR34930**.

CHAPITRE 2 – Synthèse, pharmacomodulation et évaluation biologique des molécules issues de l'hypothèse 2

A partir du 2,5-dibromonicotinaldéhyde, une réaction de Horner–Wadsworth–Emmons¹³⁷ permet de synthétiser l'alcène **MR34936** avec un ratio E:Z de 95:5 déterminé par RMN ¹H. Un double couplage de type Suzuki–Miyaura permet d'accéder à la molécule **MR34930** avec un rendement global de 82 % à partir du 2,5-dibromonicotinaldéhyde.

Suite à l'hydrolyse basique de la molécule **MR34930**, le composé **MR34937** est obtenu (Schéma 45).

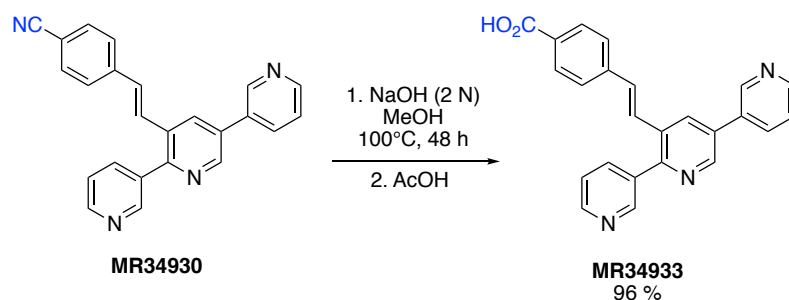


Schéma 45 : Synthèse du composé **MR34933**.

2. Évaluation biologique

Les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec les données brutes.

Ces trois composés ont été testés biologiquement (Figure 78). En concordance avec l'étude de modélisation moléculaire, ces composés n'ont pas montré d'activité inhibitrice pour les deux cibles. Cela a permis de confirmer de ne pas poursuivre la piste de l'hypothèse 2.

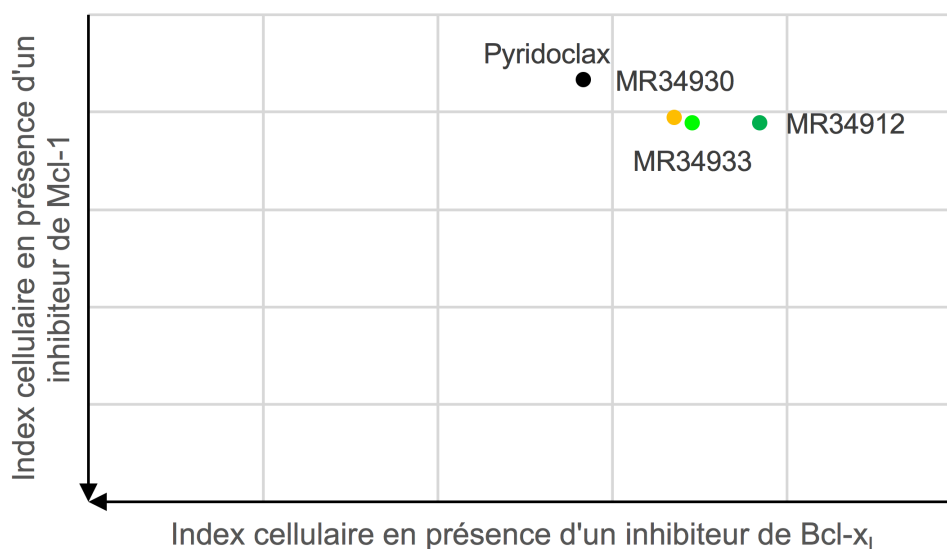


Figure 78 : Résultats de l'évaluation biologique des molécules **MR34912**, **MR34930** et **MR34933**. Les molécules sont testées à 25 μ M. En orange, molécule avec R = CN ; En vert foncé, molécule avec R = CO₂Me ; En vert, molécule avec R = CO₂H.

¹³⁷Büchert, M.; Steenbock, T.; Lukaschek, C.; Wolff, M. C.; Herrmann, C.; Heck, J. 2,2-Bipyridine-Based Dendritic Structured Compounds for Second Harmonic Generation. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (44), 14351–14361.

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3

A partir de la structure du Pyridoclax, nous avons conçu de nouvelles molécules avec pour objectif d'obtenir des premiers résultats quant à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L. Au vu des résultats biologiques, nous avons rempli ce critère. Les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L ayant des points en commun mais également de nombreuses différences, il n'était pas aisé de concevoir des *dual* inhibiteurs. Il en existe très peu dans la littérature.

D'après les études des différents groupes travaillant sur la recherche d'inhibiteurs de Bcl-x_L, l'affinité et l'activité d'une molécule sont améliorées lorsque la molécule se lie à la fois aux poches P2 et P4 de Bcl-x_L. De plus, nous avons calculé que l'énergie de liaison augmente d'une molécule occupant la poche P2 à une molécule qui occupe à la fois les poches P2 et P4 de Bcl-x_L.

Notre objectif est d'aller vers la conception d'une molécule qui occupe à la fois la poche P2 de Mcl-1 et Bcl-x_L et la poche P4 de Bcl-x_L. Il faut cependant garder à l'idée que ces nouvelles molécules devront conserver leur activité sur Mcl-1.

Les molécules que nous avons conçues ont un groupement hydrophobe qui occupe les poches P2 de Mcl-1 et de Bcl-x_L. Elles ont également un groupement polaire dans le but d'établir une interaction fondamentale avec l'Arg263 de Mcl-1 et l'Arg139 de Bcl-x_L.

Pour occuper la poche P2 des protéines cibles, nous avons un solide point de départ : notre molécule *lead* Pyridoclax, sélectif de la protéine Mcl-1.

Pour occuper la poche P4 de Bcl-x_L, nous avons mis en place deux approches :

- Dans un premier temps, nous nous sommes inspirés de la littérature pour concevoir un « bras » qui occuperait la poche P4 et qui pourrait être ajouté à nos molécules.
- Dans un second temps, une librairie de nouveaux fragments tridimensionnels a été construite, avec comme intention que ces nouveaux motifs puissent occuper la poche P4 de Bcl-x_L.

I. Exploration de la poche P4 de Bcl-x_L à partir de la littérature

1. Conception de molécules à partir de la littérature

Nous avons présenté précédemment la découverte de la molécule WEHI-539, inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-x_L (Figure 79).¹⁰²

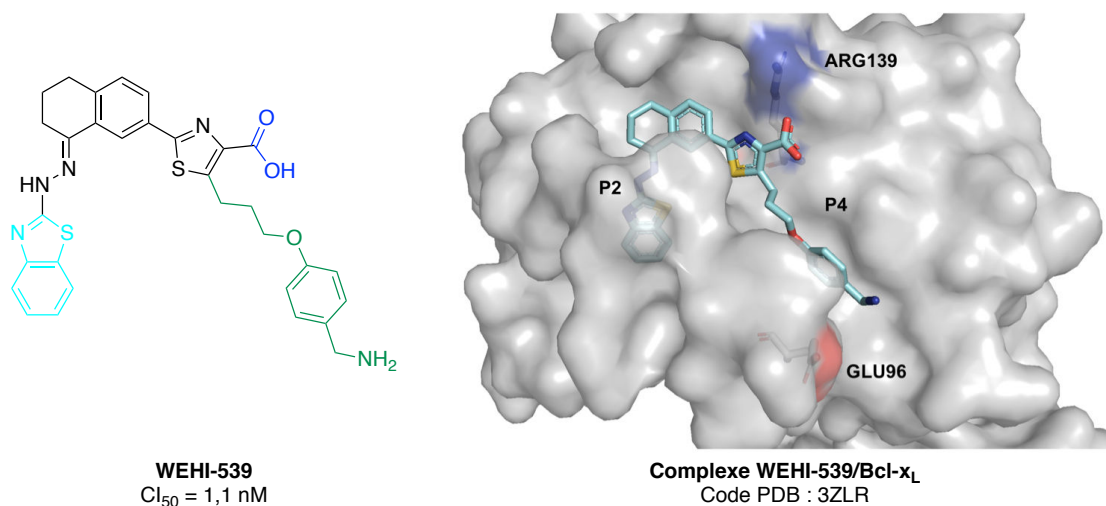


Figure 79 : Structure de WEHI-539 et le complexe WEHI-539/Bcl-x_L.

Cette molécule occupe les poches P2 et P4 de Bcl-x_L et établit une interaction avec l'Arg139 par son carboxylate. Un benzothiazole (en cyan) occupe la poche P2. A partir du thiazole, une chaîne alkyle constituée de trois atomes de carbone est utilisée comme linker pour introduire un benzène dans la poche P4 (en vert). Une amine terminale est ajoutée pour renforcer la sélectivité pour Bcl-x_L vs Bcl-2. En effet, l'amine interagit avec la Glu96 à l'extrémité de la poche P4.

Pour explorer la poche P4 de Bcl-x_L, notre idée est d'introduire sur nos molécules en α de l'acide carboxylique, à l'image de la structure du WEHI-539, le groupement alkyle-benzène-amine. Les molécules **CDSMM025** et **CDSMM024** sont imaginées (Figure 80).

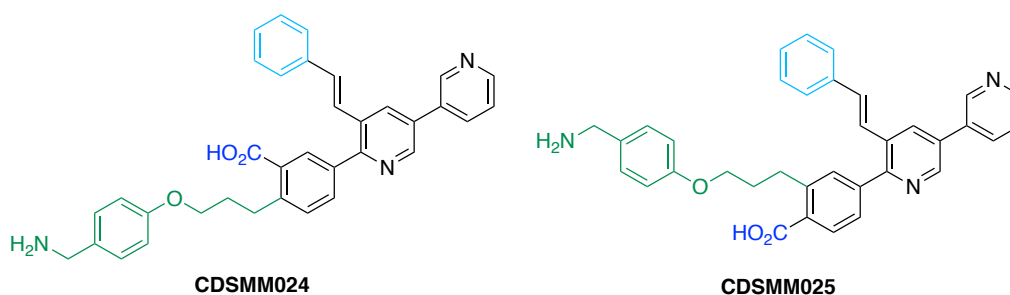


Figure 80 : Structure des composés CDSMM025 et CDSMM024.

La molécule **CDSMM024** contient la structure du composé **MR34906** sur laquelle est ajouté le groupement de WEHI-539 qui occupe la poche P4 de Bcl-x_L. Concernant la molécule **CDSMM025**, l'acide carboxylique est en position *para* de la liaison de jonction et le groupement de WEHI-539 en position *meta* et elle contient la structure du **MR34913**.

2. Études de modélisation moléculaire des composés **CDSMM024** et **CDSMM025**

La molécule **CDSMM024** est positionnée idéalement dans la protéine Bcl-x_L (Figure 81). A partir de cette pose de *docking*, une simulation par DM est réalisée. Lors de cette simulation, le complexe est très stable et la molécule se déplace peu.

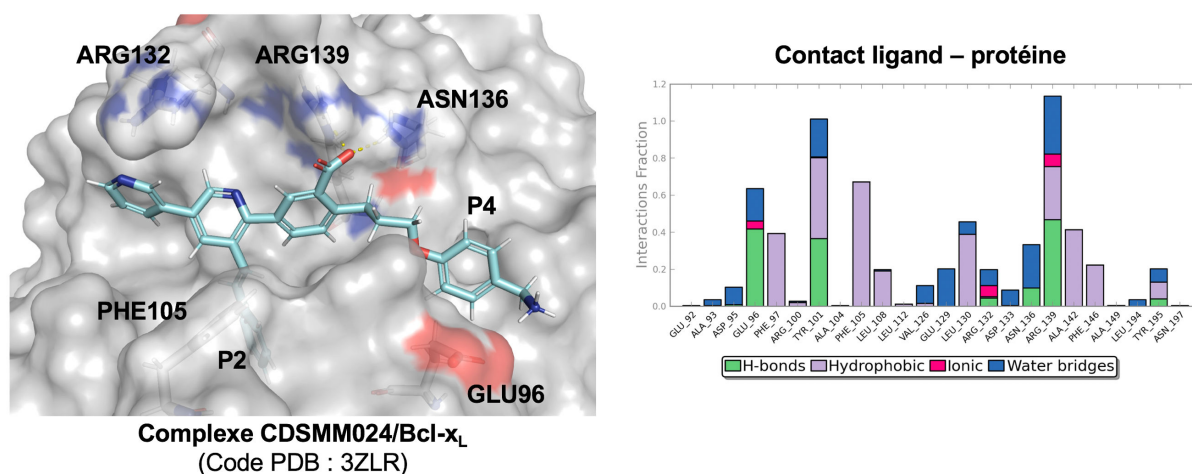


Figure 81 : Résultats de modélisation moléculaire du composé **CDSMM024**.

Le groupement styryle occupe la poche P2 et interagit par π -stacking avec la Phe105. L'azote de la pyridine terminale est à proximité de l'Arg132 mais l'interaction est établie seulement pendant 20 % du temps de la simulation. Le carboxylate est idéalement positionné pour former une interaction avec l'Arg139 et avec l'Asn136. Enfin, l'amine terminale forme une liaison H avec la Glu96 pendant plus de 60 % de la simulation.

L'énergie de liaison ΔG_{bind} est calculée par la méthode MM-GBSA. La meilleure conformation est la 120^{ème} et la valeur de ΔG_{bind} est de -127,28 kcal.mol⁻¹. Cette valeur est supérieure à toutes celles calculées précédemment : l'affinité de **CDSMM024** pour Bcl-x_L devrait être améliorée.

La molécule **CDSMM024** est également étudiée en parallèle dans la protéine Mcl-1. La première étape de *docking* a été réalisée avec succès et nous avons obtenu une pose envisageable dans Mcl-1. Une simulation par DM a été réalisée mais malheureusement, le complexe **CDSMM024**/Mcl-1 n'est pas stable : la molécule **CDSMM024** se libère de l'interaction pendant la simulation.

En revanche, concernant la molécule **CDSMM025**, les études de *docking* dans Bcl-x_L n'ont pas abouti à une pose de *docking* correcte. L'acide carboxylique en *para* de la liaison de jonction et le groupement de WEHI-539 en *meta* de la liaison de jonction ne sont pas bien positionnés pour interagir dans la protéine Bcl-x_L.

Nous avons tout de même envisagé la synthèse d'un analogue du composé **CDSMM024** pour vérifier les résultats de cette étude.

3. Étude de la voie de synthèse du composé **CDSMM024**

L'étude de la voie d'accès à la molécule **CDSMM024** est basée sur le brevet décrivant la synthèse des analogues du WEHI-539.¹³⁸ A partir de l'intermédiaire **MR34922** obtenu en six étapes avec un rendement global de 50 %, une suite réactionnelle est proposée pour accéder à la molécule **CDSMM024** en six étapes (Schéma 46).

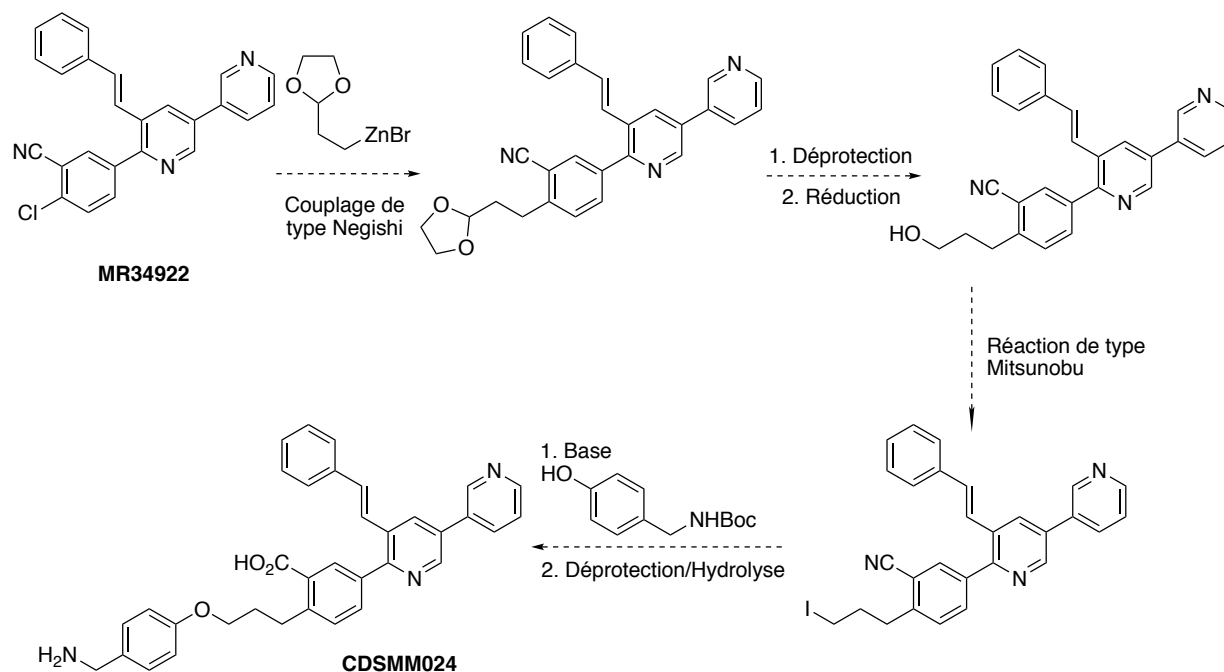
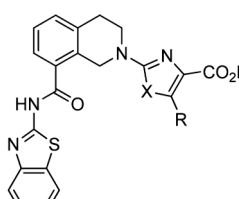


Schéma 46 : Voie de synthèse envisagée pour accéder au composé **CDSMM024**.

¹³⁸Baell, J. B.; Bui, C. T.; Colman, P.; Czabotar, P.; Dudley, D. A.; Fairbrother, W. J.; Lassene, G. L.; Ndubaku, C.; Nikolakopoulos, G.; Sleebs, B. E.; Smith, B. J.; Watson, K. G.; Elmore, S. W.; Hasvold, L. A.; Petros, A. M.; Souers, A. J.; Tao, Z.-F.; Wang, L. *PCT Int. Appl.* WO2010080503A1, 2010.

Notre objectif est d'apporter une preuve de concept quant au fait que l'ajout d'un « bras » sur nos molécules permettrait d'occuper la poche P4 de la protéine Bcl-x_L.

La voie de synthèse de **CDSMM024** faisant intervenir des réactions de couplages, protection et déprotection de groupements fonctionnels à partir du **MR34922** est longue et difficile. En conséquence, nous avons fait le choix d'introduire un autre « bras » sur nos molécules, en s'inspirant des résultats obtenus par l'équipe du Docteur Lessene sur un squelette analogue à celui du WEHI-539.¹³⁹



	X	R	Bcl-xL IC ₅₀ (μM)
13	CH=CH	H	0.27
14	S	H	0.091
15	CH=CH	(CH ₂) ₂ Ph	0.61
16	CH=CH	(CH ₂) ₃ Ph	0.032
17	CH=CH	(CH ₂) ₃ OPh	0.016
18	CH=CH	(CH ₂) ₄ OPh	0.043
19	CH=CH	CH=CHPh	0.090
20	CH=CH	CH=CHCH ₂ Ph	0.004
21	S	(CH ₂) ₂ OPh	0.086
22	S	(CH ₂) ₃ OPh	0.001
23	S	(CH ₂) ₄ OPh	0.007

Figure 4. Tetrahydroisoquinolines with and without extensions into the P4 pocket along with AlphaScreen measured IC₅₀ values for BCL-X_L. Compounds 19 and 20 were synthesized as the trans isomer.

Figure 82 : Étude de l'effet de l'ajout d'un "bras" sur les tétrahydroisoquinolines sur l'affinité pour Bcl-x_L.¹³⁹

Si l'on compare les composés **14** et **22** de la Figure 82, l'ajout du groupement phénol par l'intermédiaire d'une chaîne alkylée composée de trois carbones sur le squelette de la molécule permet d'améliorer de presque un log la valeur de la IC₅₀.

Nous avons donc choisi de commencer par introduire cet éther (-(CH₂)₃OPh) sur nos molécules. L'ajout de ce groupement permettrait d'apporter la preuve de concept, et l'accès à ces molécules semble plus aisé ; une seule étape de synthèse à partir du composé **MR34922** est nécessaire pour obtenir le composé **MR34935**.

¹³⁹Koehler, M. F. T.; Bergeron, P.; Choo, E. F.; Lau, K.; Ndubaku, C.; Dudley, D.; Gibbons, P.; Sleebs, B. E.; Rye, C. S.; Nikolakopoulos, G.; Bui, C.; Kulasegaram, S.; Kersten, W. J. A.; Smith, B. J.; Czabotar, P. E.; Colman, P.M.; Huang, D. C. S.; Baell, J. B.; Watson, K. G.; Hasvold, L.; Tao, Z.-F.; Wang, L.; Souers, A. J.; Elmore, S. W.; Flygare, J. A.; Fairbrother, W. J.; Lessene, G. Structure-Guided Rescaffolding of Selective Antagonists of BCL-X_L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5 (6), 662–667.

4. Synthèse du composé **MR34935**

Le composé **MR34935** a été synthétisé par la mise en œuvre d'une réaction de couplage de type Negishi (Schéma 47).¹⁴⁰

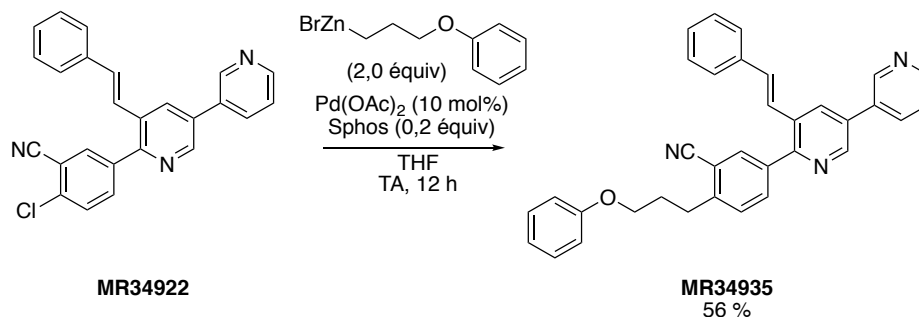


Schéma 47 : Synthèse du composé **MR34935**.

Le produit **MR34935** est obtenu à partir de la molécule **MR34922** et d'un organozincique, en présence d'un catalyseur au palladium et d'un ligand (SPhos), avec un rendement de 56 %.

Le **MR34935** est un analogue de la molécule **CDSMM024** étudiée en modélisation moléculaire. En effet, il possède un nitrile à la place de l'acide carboxylique comme groupement polaire. Le « bras » introduit est défini par une chaîne alkylée de trois carbones et d'un groupement phénoxy. Cette extension ne possède pas l'amine primaire, groupement terminal interagissant avec la Glu96 de Bcl-x_L. Cette amine apporte de la spécificité pour la protéine Bcl-x_L vis-à-vis de la protéine Bcl-2 notamment.

¹⁴⁰Baell, J., B.; Bui, C. T.; Colman, P.; Czabotar, P.; Dudley, D. A.; Fairbrother, W. J.; Flygare, J. A.; Lassene, G. L.; Ndubaku, C.; Nikolakopoulos, G.; Sleebs, B. E.; Smith, B. J.; Watson, K. G.; Elmore, S. W.; Hasvold, L. A.; Petros, A. M.; Souers, A. J.; Tao, Z. W.; Le, W.; Xilu, D. K. PCT Int. Appl. WO2010080503A1, Jul 15, 2010.

5. Évaluation biologique du composé **MR34935**

Les résultats biologiques pour cette molécule sont présentés sous la forme de courbes (Figure 83) car le **MR34935** ne peut être comparé à d'autres molécules.

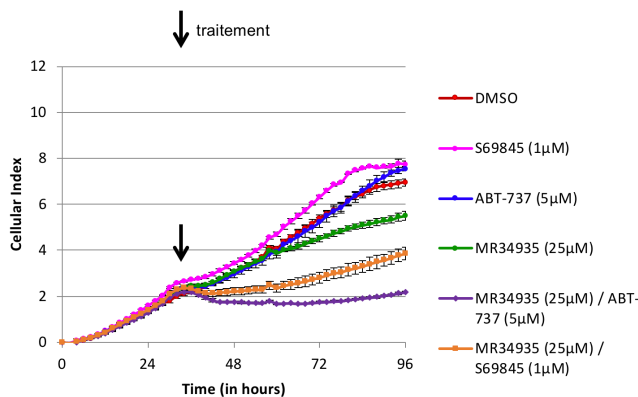


Figure 83 : Résultats de l'évaluation biologique du composé **MR34935**.
(25 µM, cellules IGOV1-R10).

En présence d'un inhibiteur de Bcl-x_L, l'activité inhibitrice du **MR34935** semble cytotatique. Cet effet est similaire en présence d'un inhibiteur de Mcl-1, bien qu'il soit bien marqué. D'après les études de modélisation moléculaire, ces résultats étaient attendus pour l'activité sur Mcl-1 mais quelque peu décevants pour l'activité sur Bcl-x_L. En effet, l'ajout du « bras » n'apporte pas de gain d'activité pour la protéine Bcl-x_L.

Ce travail a été réalisé à la fin de ma thèse. Il serait intéressant d'hydrolyser la fonction nitrile du **MR34935** pour obtenir l'acide carboxylique correspondant, et ainsi obtenir une molécule plus proche structurellement du composé **CDSMM024** conçu en modélisation moléculaire.

II. Exploration de la poche P4 de Bcl-x_L à partir de fragments tridimensionnels

L'exploration de la poche P4 reste un défi. En effet, accéder à cette poche permettrait d'augmenter l'affinité d'un ligand pour la protéine Bcl-x_L. Nous nous sommes inspirés de la littérature pour agrandir les composés déjà synthétisés mais nous voulions également être innovants. Ancré dans une démarche de *Fragment-Based Drug Design*, la conception d'une nouvelle librairie de fragments s'inscrit parfaitement dans mon projet.

Mes recherches bibliographiques m'ont amenée à identifier un laboratoire de recherche portant un intérêt particulier à ce domaine. Le groupe de recherche du Docteur James A. Bull, à l'*Imperial College London* à Londres (UK), s'intéresse au développement de nouvelles méthodologies de synthèse de fragments. Financée par le Cancérôpole Nord-Ouest suite à un appel à projet auquel j'ai répondu et par la Région Normandie, l'équipe du Dr. Bull m'a accueillie.

Après trois mois, j'ai acquis une partie du savoir-faire de l'équipe du Docteur Bull^{141,142} et j'ai développé une méthodologie de synthèse pour accéder à des fragments tridimensionnels, tels que des dérivés azétidines, pipéridines et cyclobutanes.

A ce jour, les molécules synthétisées sont enregistrées dans la chimiothèque du CERMN avec pour objectif de pouvoir les tester sur nos cibles thérapeutiques.

1. Fragments tridimensionnels

Les librairies de fragments commerciales existantes sont essentiellement composées de cycles (hétéro)aromatiques, possédant une forme plane, ce qui est une limite à la diversité structurale pour l'exploration de l'espace tridimensionnel.

¹⁴¹Bull, J. A.; Croft, R. A.; Davis, O. A.; Doran, R.; Morgan, K. F. Oxetanes: Recent Advances in Synthesis, Reactivity, and Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (19), 12150–12233.

¹⁴²Croft, R. A.; Mousseau, J. J.; Choi, C.; Bull, J. A. Structurally Divergent Lithium Catalyzed Friedel–Crafts Reactions on Oxetan-3-ols: Synthesis of 3,3-Diaryloxetanes and 2,3-Dihydrobenzofurans. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (45), 16271–16276.

Depuis quelques années, les fragments 3D, c'est-à-dire enrichis en carbone sp³, ont montré un intérêt croissant pour de nombreuses raisons.¹⁴³ La saturation d'un composé permet de disposer de vecteurs supplémentaires pour explorer les différentes directions de l'espace. Des études ont démontré que les molécules enrichies en carbone sp³ pourraient conduire à des candidats médicaments de meilleure qualité quant à la biodisponibilité notamment.¹⁴⁴ Une plus grande proportion de carbone sp³ dans une molécule est associée à une amélioration de la solubilité et une diminution de la lipophilie.

Le caractère 3D d'un fragment permet l'exploration de nouveaux espaces chimiques et biologiques. Les fragments 3D sont plus qualifiés pour l'exploration tridimensionnelle de la poche d'une protéine comparés aux fragments 2D.¹⁴⁵ Ils sont un atout pour la découverte de nouveaux candidats médicaments pour des cibles thérapeutiques difficiles à atteindre, telles que les interactions protéine-protéine.

Le challenge est de mettre en place des méthodologies de synthèse simples, rapides et robustes pour accéder aux fragments tridimensionnels.

2. Azétidines

Les hétérocycles azotés saturés sont très abondants dans les produits pharmaceutiques, notamment les cycles à 5 et à 6 chaînons.^{146,147} En revanche, les cycles azotés à 4 chaînons, appelés azétidines, sont beaucoup moins étudiés, même s'ils offrent des propriétés pharmaceutiques attrayantes pour la découverte de médicaments comme un faible poids moléculaire, une structure polaire avec des vecteurs définis dans trois directions de l'espace.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au développement d'une méthodologie pour la synthèse de 3,3-diarylazétidines.

¹⁴³Aldeghi, M.; Malhotra, S.; Selwood, D. L.; Chan, A. W. E. Two- and Three-Dimensional Rings in Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (4), 450–461.

¹⁴⁴Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752–6756.

¹⁴⁵Clemons, P. A.; Bodycombe, N. E.; Carrinski, H. A.; Wilson, J. A.; Shamji, A. F.; Wagner, B. K.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L. Small Molecules of Different Origins Have Distinct Distributions of Structural Complexity That Correlate with Protein-Binding Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (44), 18787–18792.

¹⁴⁶Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (24), 10257–10274.

¹⁴⁷Taylor, R. D.; MacCoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (14), 5845–5859.

En 2018, ces travaux seront soumis sous le titre *Synthesis of 3,3-Diarylazetidines by Calcium–Catalyzed Friedel–Crafts Reactions of Azetidins with Unexpected Cbz Enhanced Reactivity* dans le journal *Organic Letters*. Ils relatent la méthodologie de synthèse, l'exemplification et la dérivatisation réalisée.

Dans ce travail, j'ai réalisé l'intégralité de l'optimisation des conditions opératoires et j'ai synthétisé la moitié des 3,3-diarylazétidines présentés dans l'exemplification. Maryne Dubois, doctorante en chimie organique dans le groupe du Docteur Bull, a continué ces travaux que j'avais initiés pour finir l'exemplification et réaliser la dérivatisation.

2.1. Méthodologie, Exemplification et Dérivatisation

Les travaux de méthodologie, d'exemplification et de dérivatisation sont présentés dans la publication jointe à ce manuscrit. L'abstract est présenté dans la Figure 84.

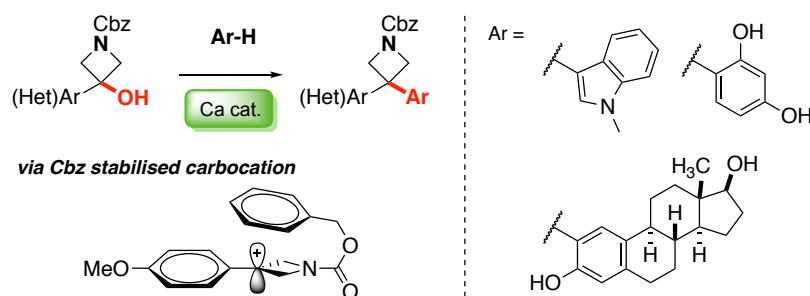


Figure 84 : Abstract de la publication intitulée *Synthesis of 3,3-Diarylazetidines by Calcium–Catalyzed Friedel–Crafts Reactions of Azetidins with Unexpected Cbz Enhanced Reactivity* en cours de soumission dans le journal *Organic Letters*.

Les 3,3-diarylazétidines sont préparées avec d'excellents rendements par une alkylation de Friedel–Crafts catalysée par le calcium triflimide entre des *N*-Cbz azétidinols et différents dérivés (hétéro)-aromatiques ou phénoliques.

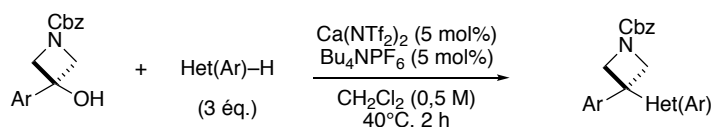


Schéma 48 : Réaction générale de Friedel–Crafts pour la préparation de 3,3-diarylazétidines.

Plus précisément, l'azétidinol est engagé avec le nucléophile (3 équ.) en présence de calcium triflimide (5 mol%) et de Bu₄NPF₆ (5 mol%) dans le dichlorométhane (0,5 M) à 40°C pendant 2 heures (Schéma 48).

2.2. 3,3-Diarylazétidines et nos cibles thérapeutiques

La structure des 3,3-diarylazétidines (Figure 85) présente de nombreux avantages.

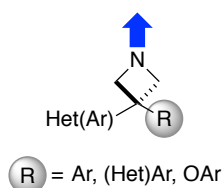


Figure 85 : Structure générale des dérivés azétidines.

La présence de cycles aromatiques ou hétéroaromatiques est en accord avec un caractère hydrophobe favorable pour occuper les poches hydrophobes des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Nous avons vu que les cycles aromatiques pouvaient être substitués par différents groupements à l'aide d'une variété de réactions chimiques usuelles : alkylation, réactions de couplage (Suzuki–Miyaura, Buchwald), etc. C'est un point de diversification des fragments, et d'agrandissement potentiel également (*fragment growing*).

L'atome d'azote de l'azétidine permet soit de créer une liaison hydrogène soit d'offrir un troisième vecteur afin d'explorer une autre direction de l'espace. Nous avons vu que les inhibiteurs de la littérature, établissent une liaison hydrogène avec le Glu96 de la poche hydrophobe P4 de Bcl-x_L. L'azote de l'azétidine pourrait former cette liaison hydrogène.

Ces 3,3-diarylazétidines sont des motifs tridimensionnels. Pour illustrer, nous avons pris l'exemple de la structure du composé **MR34973**, représentée en 2D et 3D sur la Figure 86.

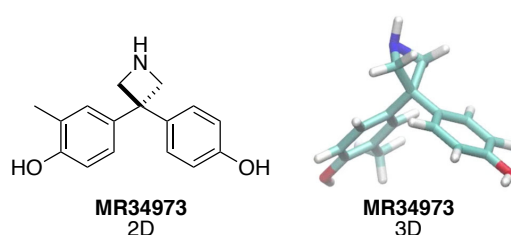


Figure 86 : Représentations 2D et 3D de la structure du composé **MR34973**.

La forme tridimensionnelle de ces composés est innovante et permet d'explorer de nouveaux espaces chimiques et biologiques.

Dans un premier temps, un criblage par impédancemétrie a été réalisé sur une sélection sans *a priori* d'un petit échantillon de ces nouvelles structures (Figure 87).

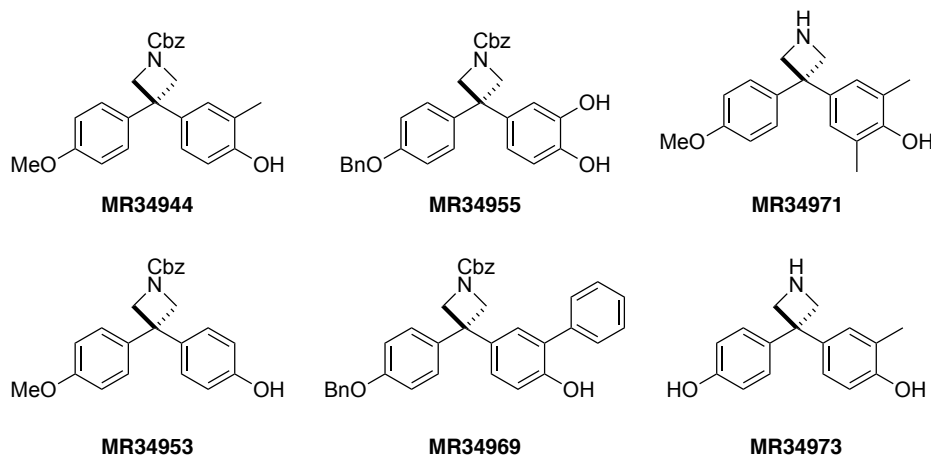


Figure 87 : Structure des 3,3-diarylazétidines testées biologiquement.

Dans cet échantillon, les composés **MR34944** et **MR34953** comportent un groupement éther et l'atome d'azote de l'azétidine est protégé par le groupement carboxybenzyle (Cbz). Les azétidines **MR34955** et **MR34969** possèdent les groupements Cbz et benzyle (Bn). Dans les molécules **MR34971** et **MR34973**, l'azétidine est secondaire.

Avant d'exploiter les résultats de l'évaluation sous la forme simplifiée, nous avons pris le soin d'étudier tous les résultats bruts et de vérifier que les résultats de notre analyse simplifiée sont en accord avec ceux-ci.

Les résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie sont exposés sur la Figure 88.

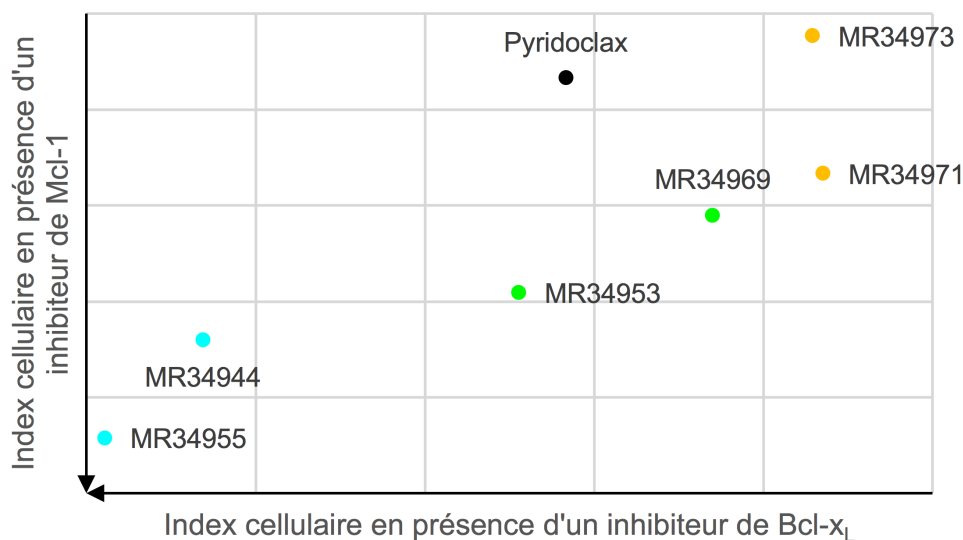


Figure 88 : Résultats de l'évaluation biologique des dérivés 3,3-diarylazétidines. Les molécules sont testées à 25 μ M.

Les composés **MR34971** et **MR34973** ne montrent pas d'activité inhibitrice des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. La taille de ces molécules, qui ne possèdent pas de groupement Cbz mais une amine libre, pourrait le justifier.

Ce test permettant de mesurer l'activité des molécules n'est probablement pas le plus adapté pour ces fragments de petites tailles. Il est alors envisagé de mesurer leur affinité pour les cibles par des techniques de criblage comme la FPA ou la RMN.

Les molécules **MR34953** et **MR34969** ne montrent pas d'activité inhibitrice de Mcl-1 mais une activité inhibitrice de Bcl-x_L modérée. Les azétidines **MR34944** et **MR34955** montrent une activité sur les deux cibles.

Sur six composés seulement, il est difficile d'établir des relations structure-activité. Les molécules **MR34944** et **MR34955** ont été testées à plus faible concentration (10 µM). A cette concentration, l'activité inhibitrice de Mcl-1 est conservée et le **MR34944** semble avoir un profil plus sélectif de la protéine Mcl-1 que le **MR34955**. A ce titre, nous avons sélectionné le **MR34944** pour poursuivre l'évaluation biologique avec des tests complémentaires (Figure 89).

Effet du MR34944 en combinaison avec l'ABT-737 et le S63845 sur les IGROV1-R10 à 24 h

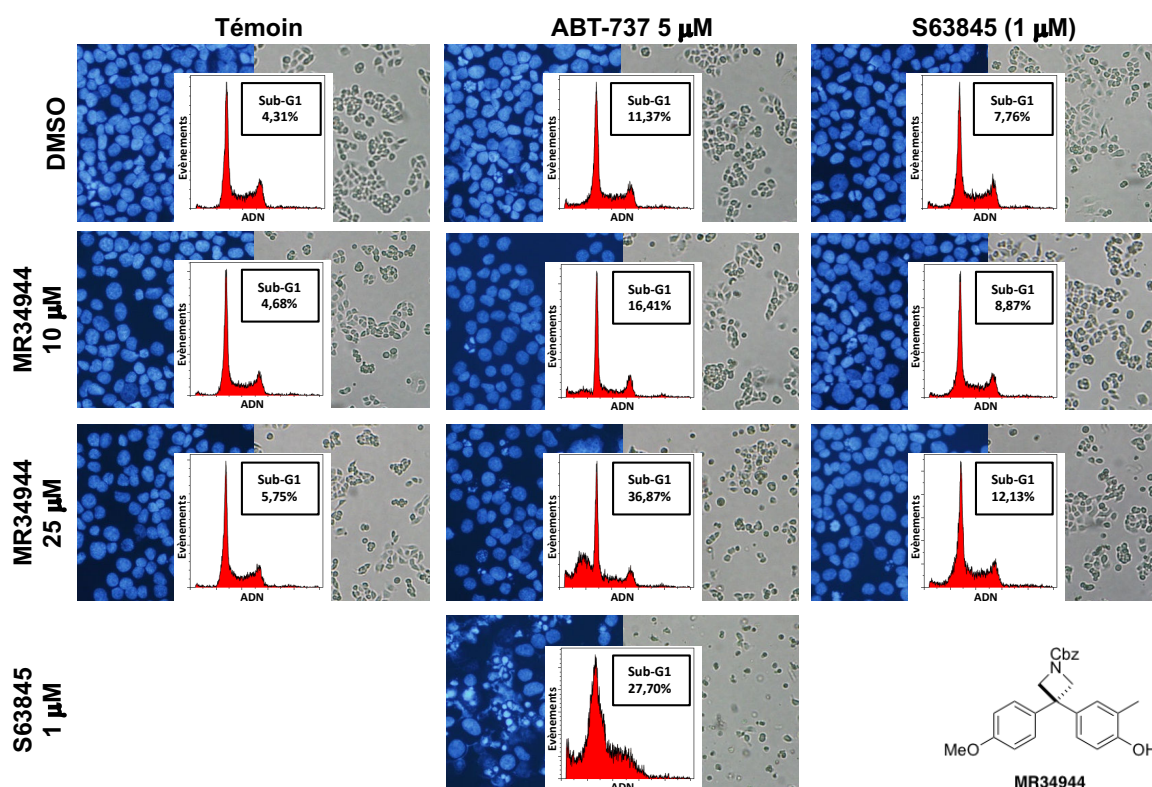


Figure 89 : Evaluation de l'activité de **MR34944** sur les cellules IGROV-R10 en association avec un inhibiteur de Bcl-x_L (ABT-737) et un inhibiteur de Mcl-1 (S63845).

Tests d'évaluation de l'induction de la mort cellulaire (observation des morphologies cellulaires et nucléaires (marquage par le DAPI) ; et recherche d'une fraction Sub-G1 sur les histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium).

Le test de criblage ayant identifié la molécule **MR34944** comme un potentiel inhibiteur des protéines cibles, nous avons procédé à l'évaluation de son activité. Elle a été testée sur les cellules IGROV1-R10 en association avec un inhibiteur de Bcl-x_L (ABT-737) et un inhibiteur de Mcl-1 (S63845) par des tests conventionnels d'évaluation de l'induction de la mort cellulaire (observation des morphologies cellulaires et nucléaires (marquage des noyaux par le DAPI) et recherche d'une fraction pré-G1 sur les histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium).

Ni l'ABT-737, ni le S63845, ni le **MR34944** ne provoquent de modification majeure des différents paramètres, comme attendu.

L'association de l'ABT-737 (5 µM) et de la **MR34944** (25 µM) provoque l'apparition de caractéristiques de l'apoptose telles que des détachements et rétrécissements cellulaires, des condensations et fragmentations nucléaires ou encore l'apparition d'évènements dans la fraction Sub-G1 (Sub-G1 à 36,87 %) suggérant que la molécule évaluée est bien un inhibiteur de Mcl-1. A une concentration de 10 µM de **MR34944** en association avec l'ABT-737 (5 µM), l'effet pro-apoptotique est quasiment perdu (Sub-G1 à 16,41 %).

L'association du S63845 (1 µM) et de la molécule **MR34944** (25 µM) provoque très légèrement l'apparition de caractéristiques de l'apoptose telle que l'apparition d'évènements dans la fraction Sub-G1 (Sub-G1 à 12,13 %) suggérant que la molécule évaluée inhibe faiblement la protéine Bcl-x_L à cette dose. A une concentration de 10 µM de **MR34944** en association avec le S63845 (1 µM), l'effet pro-apoptotique est perdu (Sub-G1 à 8,87 %).

A titre de comparaison, l'association de l'ABT-737 (5 µM) et du S63845 (1 µM) provoque des détachements et rétrécissements cellulaires, des condensations et fragmentations nucléaires très marquées et l'apparition d'évènements dans la fraction Sub-G1 (Sub-G1 à 27,70%).

3. 4,4-Diarylpipéridines et 3,3-diarylcyclobutanes

Nous nous sommes également intéressés à la mise en œuvre d'une voie synthétique pour accéder aux dérivés 4,4-diarylpipéridines et 3,3-cyclobutanes (Figure 90).

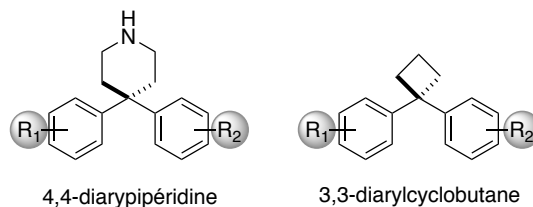


Figure 90 : Structure générale de 4,4-diarylpipéridines et 3,3-diarylcyclobutanes.

Basé sur les travaux décrits précédemment sur les 3,3-diaryloxétanes et les 3,3-diarylazétidines, nous avons optimisé une réaction de Friedel–Crafts entre un piperidinol (ou cyclobutanol) et un nucléophile, catalysée par un acide de Lewis pour synthétiser les dérivés 4,4-diarylpipéridines et 3,3-cyclobutanes.

3.1. Synthèse des 4-pipéridinols

Les 4-pipéridinols sont préparés à partir d'un intermédiaire organolithien sur lequel est additionné une 4-pipéridinone (Schéma 49).

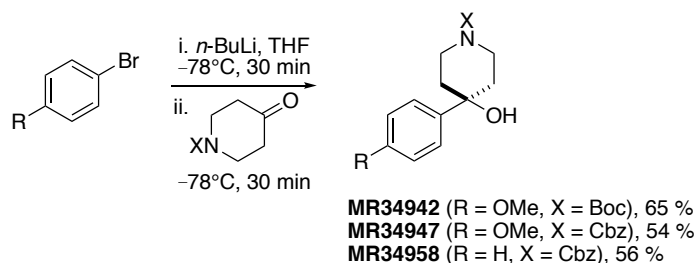


Schéma 49 : Synthèse des 4-pipéridinols.

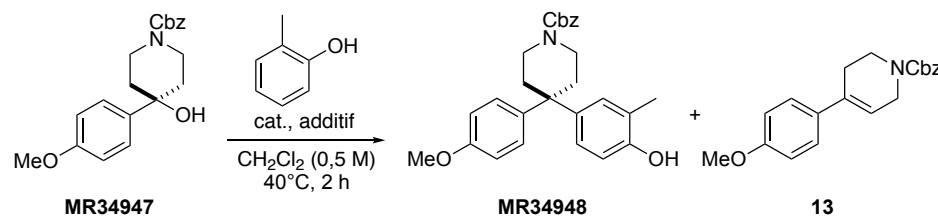
Avec le groupement protecteur *tert*-butoxycarbonyle comme groupement protecteur de l'azote de la 4-pipéridinone, le rendement est meilleur comparé à celui des 4-pipéridinones dont l'atome d'azote est protégé par un groupement carboxybenzyle.

3.2. Optimisation de la réaction de Friedel–Crafts à partir du MR34947

Initialement, nous avons débuté l'optimisation de la réaction de Friedel–Craft à partir du *N*-Boc-4-pipéridinol **MR34942** et du 2,6-xylinol comme nucléophile en utilisant différents acides de Lewis. Cependant, la réactivité est très faible et le pourcentage de conversion ne dépasse pas les 10 %, quel que soit le catalyseur utilisé.

Nous avons donc poursuivi notre optimisation à partir du *N*-Cbz-4-pipéridinol **MR34947**. La réaction de Friedel–Craft a été réalisée sur une échelle de 0,25 mmol de **MR34947** avec le *o*-crésol comme nucléophile dans le dichlorométhane (0,5 M) à 40°C pendant 2 heures. Lors de la réaction de Friedel–Craft, les positions *para* puis *ortho* du nucléophile sont favorisées par la présence du groupement alcool sur celui-ci.

Différents acides de Lewis ont été testés avec des quantités préalablement optimisées pour chacun (Tableau 12).



Entrée	Catalyseur/Additif (mol%)	éq. <i>o</i> -crésol	Rendement ^a
			MR34948/13/MR34947 (%)
1	Li(NTf ₂)/Bu ₄ NPF ₆ (11/5,5)	5,0	0/0/51
2	Ca(NTf ₂) ₂ /Bu ₄ NPF ₆ (5/5)	3,0	47/38/0
3	FeCl ₃ (5/-)	3,0	16/46/0

Tableau 12 : Optimisation de la synthèse du **MR34948**.

^aRendement calculé par RMN ¹H en utilisant le 1,3,5-triméthoxybenzène comme étalon interne.

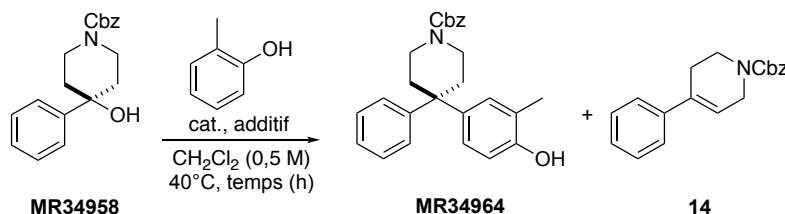
Trois catalyseurs ont été criblés : le lithium triflimide, le calcium triflimide et le chlorure de fer (III). L'additif Bu₄NPF₆ est ajouté pour faciliter la solubilisation des deux premiers catalyseurs.

Le produit désiré ne s'est pas formé en utilisant le lithium triflimide (Tableau 12, Entrée 1). Les conditions opérationnelles utilisant le calcium triflimide ont donné un meilleur rendement de 47 % et sont choisies comme conditions optimales (Tableau 12, Entrée 2).

Cependant, lors de cette réaction, un produit secondaire est observé, le produit d'élimination **13**, avec un rendement de 38 %. Ce produit se forme selon un mécanisme d'élimination E1. Bien que les conditions opérationnelles utilisant le chlorure de fer (III) aient permis d'obtenir le produit désiré **MR34948** (Tableau 12, Entrée 3), le produit majoritaire est le produit d'élimination **13** avec un rendement de 46 %.

3.3. Optimisation de la réaction de Friedel–Crafts à partir du MR34958

L'optimisation de la réaction de Friedel–Crafts à partir du *N*-Cbz-4-pipéridinol **MR34958** a été réalisée sur une échelle de 0,25 mmol, avec le *o*-crésol comme nucléophile dans le dichlorométhane (0,5 M) à 40°C. Les conditions optimisées avec les trois différents catalyseurs ont été testées (Tableau 13).



Entrée	Catalyseur/Additif (mol%)	éq. <i>o</i> -crésol	Temps (h)	Rendement ^a MR34964/14/MR34958 (%)
1	Li(NTf ₂)/Bu ₄ NPF ₆ (11/5,5)	5,0	2	0/0/100
2	Ca(NTf ₂) ₂ /Bu ₄ NPF ₆ (5/5)	3,0	2	14/24/56
3	FeCl ₃ (5/-)	3,0	2	43/21/24
4	FeCl ₃ (5/-)	3,0	24	65/35/0

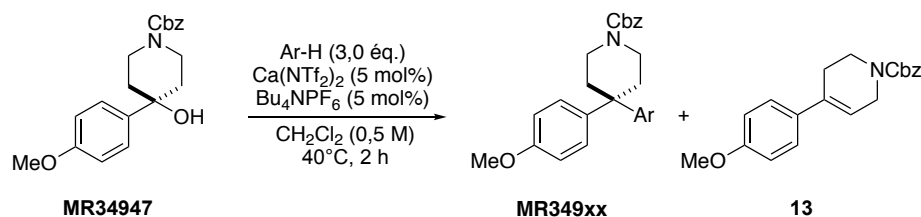
Tableau 13 : Optimisation de la synthèse de **MR34964**.

^aRendement calculé par RMN ¹H en utilisant le 1,3,5-triméthoxybenzène comme étalon interne.

Avec le lithium triflimide comme catalyseur, seul le précurseur **MR34958** a été récupéré (Tableau 13, Entrée 1). Le meilleur catalyseur est FeCl₃ qui a donné 43 % de produit **MR34964** issu de la réaction de Friedel–Crafts et 21 % de produit de l'élimination **15** (Tableau 13, Entrée 3). La réaction n'est pas complète en deux heures, il reste 24 % de pipéridinol **MR34958**. Comparé au *p*-méthoxyphénylpipéridinol **MR34947**, le phénylpipéridinol **MR34958** est moins riche en électrons et par conséquent l'intermédiaire cationique est moins réactif lors de la réaction de Friedel–Crafts. En augmentant le temps de la réaction à 24 heures, la réaction est complète (Tableau 13, Entrée 4). La pipéridine **MR34964** a été obtenue avec un rendement de 65 % et le produit d'élimination **15** a été obtenu avec un rendement de 35 %. Nous avons choisi ces conditions pour réaliser l'exemplification à partir du pipéridinol **MR34958**.

3.4. Exemplification

Réalisée à partir de différents nucléophiles, l'exemplification de la synthèse de 4,4-diarylpipéridines a été réalisée sur une échelle de 0,50 mmol de pipéridinol **MR34947** avec 3,0 équivalents de nucléophile, en présence de Ca(NTf₂)₂ (5 mol%) en combinaison avec Bu₄NPF₆ (5 mol%) dans le dichlorométhane à 40°C pendant deux heures. Les différents nucléophiles utilisés dans la réaction de Friedel–Craft sont présentés dans le Tableau 14.



Entrée	Nucléophile	Rendement MR349xx ^a (%)	Rendement 13 ^a (%)	Récupération de MR34947 ^a (%)
1	<i>o</i> -Crésol	MR34948 , 47 (40)	38	0
2	Catéchol	MR34963 , (9)	(79)	0
3	4-Chlorophénol	0	87 (87)	0
4	2-Chlorophénol	0	0	100
5	1,3-Diméthoxybenzène	0	0	100
6	<i>p</i> -Crésol	0	0	100
7	4-Fluorophénol	0	99	0
8	4-Trifluorométhylphénol	0	96	0

Tableau 14 : Nucléophiles testés dans la réaction de Friedel–Crafts pour la synthèse de 4,4-diarylpipéridines.
^aRendement calculé par RMN ¹H en utilisant le 1,3,5-triméthoxybenzène comme étalon interne. Rendement isolé entre parenthèses.

La réaction de Friedel–Crafts entre le pipéridinol **MR34947** et le *o*-crésol comme nucléophile a permis de synthétiser la pipéridine **MR34948** avec un rendement isolé de 40 % (Tableau 14, Entrée 1). Avec le catéchol, la pipéridine **MR34963** a été obtenue avec un rendement isolé de 9 % et le produit d'élimination **13** a été isolé avec un rendement de 79 % (Tableau 14, Entrée 2).

La réaction de Friedel–Crafts avec le 4-chlorophénol a donné uniquement le produit d'élimination **13** avec un rendement de 87 % (Tableau 14, Entrée 3). Avec le 2-chlorophénol comme nucléophile, qui a des effets électroniques similaires au 4-chlorophénol mais un encombrement stérique différent, nous avons retrouvé uniquement le réactif de départ, le pipéridinol **MR34947** (Tableau 14, Entrée 4).

De même, avec le 1,3-diméthoxybenzène et le *p*-crésol, nous avons retrouvé le pipéridinol **MR34947** (Tableau 14, Entrées 5 et 6) et le produit souhaité ne s'est pas formé.

Nous avons ensuite testé des nucléophiles plus ou moins riches en électrons. Le 4-fluorophénol, plus riche en électrons que les chlorophénols, et le trifluorométhylphénol, quant à lui plus pauvre en électrons que les chlorophénols, ont donné le produit d'élimination **13** avec des rendements respectifs de 99 % et 96 % sans aucune trace de la pipéridine souhaitée (Tableau 14, Entrées 7 et 8).

La réaction de Friedel–Crafts pour la synthèse de 4,4-diarylpipéridines à partir du pipéridinol **MR34947** est dépendante du nucléophile utilisé. Seulement deux produits (**MR34948** et **MR34963**) ont été synthétisés.

Dans certaines réactions, le produit d'élimination **13** a été obtenu. Nous avons alors entrepris d'étudier cette réaction d'élimination.

3.5. Produits secondaires obtenus

La synthèse des composés **13** et **15** est présentée dans le Schéma 50.

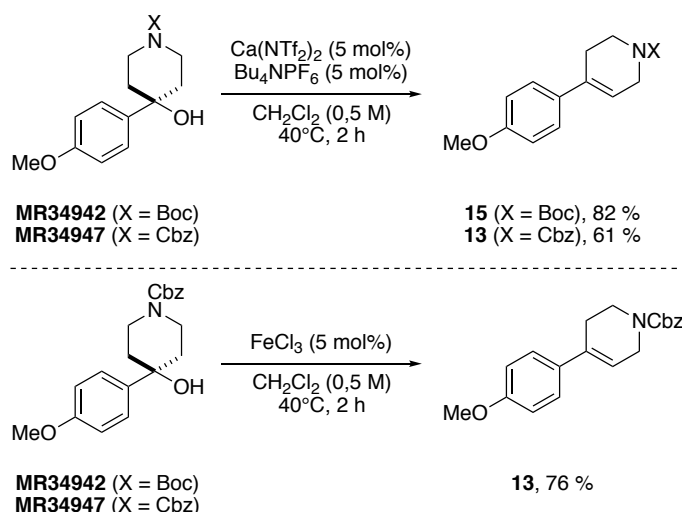


Schéma 50 : Synthèse des composés **13** et **15**.

La réaction entre le pipéridinol **MR34942** ou **MR34947** en présence de calcium triflimide en combinaison avec l'additif Bu₄NPF₆ a permis de synthétiser respectivement les produits **15** et **13** avec les rendements respectifs de 82 % et 61 %. La réaction a été réalisée sur une échelle de 0,50 mmol. Il est également possible d'accéder à la molécule **13** en utilisant le chlorure de fer (III) comme acide de Lewis. Celui-ci n'est pas stable à température ambiante. Le mécanisme de cette réaction est probablement une élimination E1.

Nous avons donc identifié de nouvelles conditions pour accéder à la synthèse de ces dérivés.

Niggemann *et al.*¹⁴⁸ ont publié une étude sur l'hydroarylation catalysée au calcium des alcènes (Figure 91).

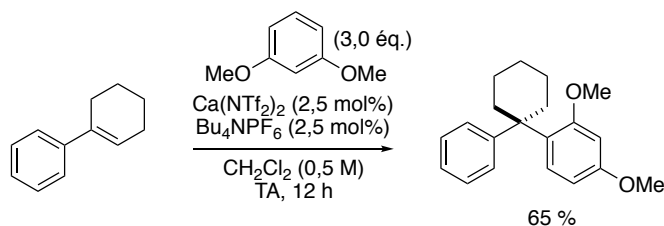


Figure 91 : Hydroarylation catalysée au calcium d'un alcène.¹⁴⁸

Nous avons donc essayé, à partir de du composé **15**, de réaliser cette réaction pour obtenir la pipéridine souhaitée **16** (Schéma 51).

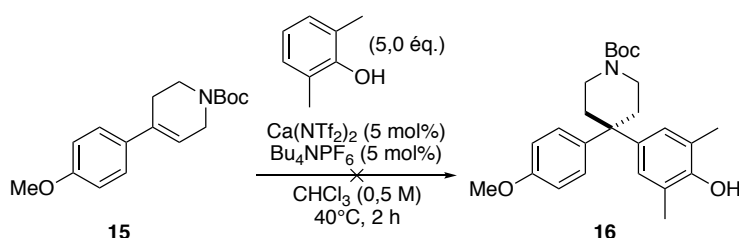


Schéma 51 : Etude de la synthèse de la pipéridine **16**.

Cependant, la réaction entre le composé **15** et le 2,6-diméthylphénol n'a montré aucune trace de la pipéridine attendue **16**, nous avons uniquement retrouvé les réactifs de départ. Cette étude n'a pas été investiguée davantage.

3.6. Synthèse de 3,3-diarylcyclobutanes

Des études antérieures réalisées dans le groupe du Docteur Bull ont déterminé les conditions optimales pour la synthèse de 3,3-diarylcyclobutanes (Schéma 52).

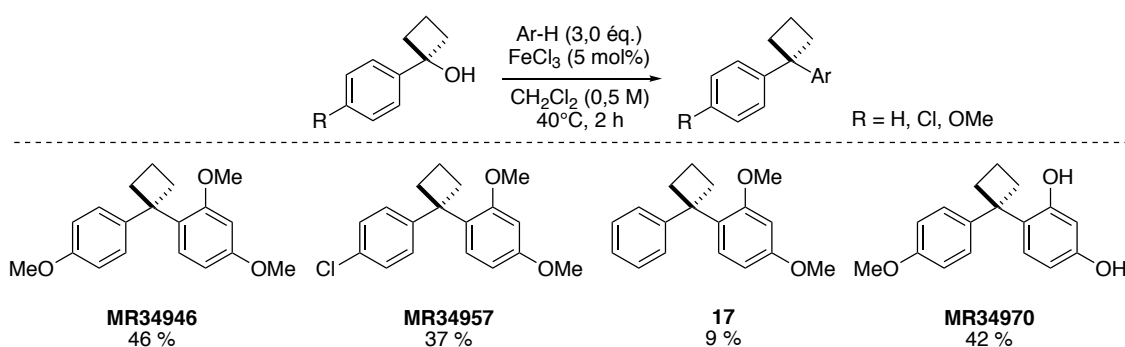


Schéma 52 : Synthèses des 3,3-diarylcyclobutanes.

¹⁴⁸Niggemann, M.; Bisek, N. Calcium-Catalyzed Hydroarylation of Alkenes at Room Temperature. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (37), 11246–11249.

La réaction de Friedel–Crafts à partir d'un cyclobutanol (0,50 mmol) et d'un nucléophile, en présence de chlorure de fer (III) comme catalyseur dans le dichlorométhane à 40°C pendant 2 heures permet d'accéder au cyclobutane disubstitué correspondant.

Quatre 3,3-diarylcyclobutanes ont été synthétisés avec des rendements de 9 à 46 %. Bien que les réactions soient complètes, les rendements de certains produits sont faibles à cause de la purification. Les purifications par flash chromatographie ont été difficiles car dans tous les systèmes d'éluants essayés, les rapports frontaux R_f du produit de Friedel–Crafts (**MR34946**, **MR34957** et **17**) et du réactif de départ 1,3-diméthoxybenzène sont identiques.

3.7. Perspectives

Le travail effectué lors de mon stage de trois mois sur les dérivés 4,4-diarylpipéridines et 3,3-diarylcyclobutanes s'inscrit dans un projet d'une plus grande ampleur. En effet, le projet consiste à mener une étude de la réaction de Friedel–Crafts appliquée à la synthèse de dérivés saturés diarylés. Les (hétéro)cycles saturés étudiés sont de différentes natures (cycles oxygénés, cycles azotés, cycles carbonés) et de différentes tailles (cycles à 4, 5 et 6 chaînons) (Figure 92).

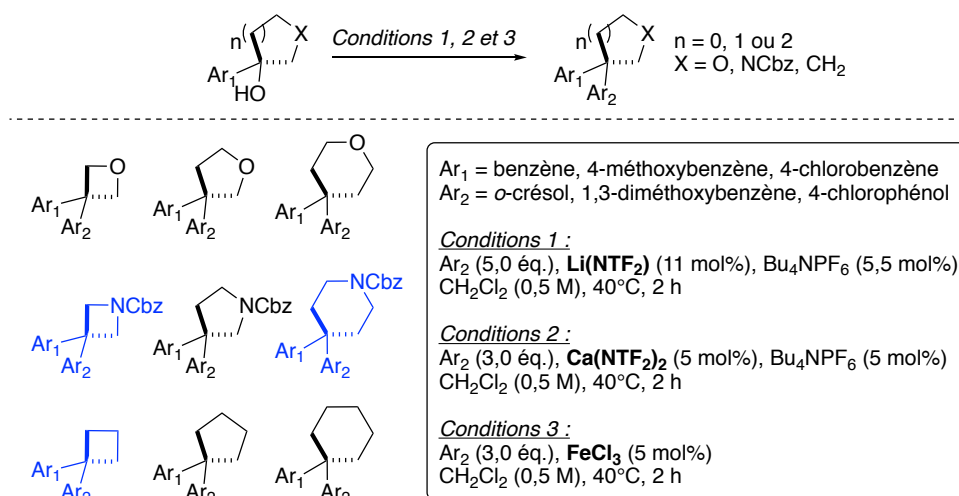


Figure 92 : Étude réalisée sur les dérivés diarylés.
 En bleu, les structures des composés sur lesquelles j'ai travaillé.

La réaction de Friedel–Crafts entre le précurseur portant le groupement Ar₁ et le nucléophile Ar₂ est réalisée en présence de trois catalyseurs différents (conditions 1, 2 et 3). Pour chaque couple précurseur/nucléophile, les meilleures conditions pour accéder au cycle saturé diarylé sont rapportées.

Cette étude fera l'objet d'une publication qui est actuellement en cours de rédaction.

4. Collaboration et enrichissement de notre chimiothèque

Suite à mon stage, une collaboration s'est initiée entre le laboratoire du Docteur Bull et notre laboratoire. En effet, la librairie de fragments du laboratoire anglais a été mise à notre disposition pour qu'une évaluation biologique puisse être menée.

Dans ce cadre, une dizaine de fragments est venue enrichir notre chimiothèque.

Depuis mon retour en France, le Docteur Bull nous a envoyé de nouveaux fragments tridimensionnels synthétisés dans son laboratoire. Ceux-ci ont été étudiés en modélisation moléculaire par des études de *docking* et plus d'une vingtaine de nouveaux composés tridimensionnels ont été sélectionnés et enregistrés dans notre chimiothèque. Les tests de criblage par FPA sont actuellement en cours pour définir l'intérêt de ces fragments dans la conception de perturbateurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les interactions protéine-protéine sont des cibles thérapeutiques difficiles à atteindre, du fait qu'une petite molécule doit être capable de perturber un complexe de macromolécules. Néanmoins, les travaux de recherche réalisés par la communauté scientifique ont été prometteurs, et plus particulièrement dans la découverte d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Au sein de notre laboratoire, nous avons découvert le Pyridoclax, inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1. Parce qu'une inhibition concomitante des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L est nécessaire pour rétablir l'apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes, mon objectif était de concevoir des *dual* inhibiteurs Mcl-1/Bcl-x_L.

Selon une approche pionnière dans notre laboratoire s'inspirant des méthodes de *Fragment-Based Drug Design* et *Structure-Based Drug Design*, le travail de recherche qui m'a été confié s'est intéressé à la combinaison d'études de modélisation moléculaire et de synthèse organique. L'analyse de l'affinité et de l'activité des molécules conçues vis-à-vis des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L a ensuite été menée.

Après avoir analysé la structure de ces protéines puis étudié le Pyridoclax en complexe avec la protéine Mcl-1, nous avons émis des hypothèses quant à son positionnement au sein des poches hydrophobes. A partir de cette étude et de la structure du Pyridoclax, nous avons conçu de nouvelles molécules. Cependant, la solubilité du Pyridoclax en milieu tamponné étant faible, pour concevoir des inhibiteur à dualité d'action, nous ne pouvions pas utiliser la structure « entière » du Pyridoclax à laquelle, par l'utilisation d'un *linker*, nous aurions introduit un fragment pour interagir avec la protéine Bcl-x_L. Par conséquent, nous avons « fragmenté » la structure du Pyridoclax dans le but d'obtenir les plus petits fragments possibles, gagnant ainsi en solubilité, tout en conservant leur capacité à interagir avec Mcl-1. Ces molécules ont été conçues et étudiées en modélisation moléculaire dans les cibles d'intérêt, Mcl-1 et Bcl-x_L.

Une soixantaine de molécules ont donc été conçues, synthétisées et évaluées. L'évaluation de la capacité des molécules préparées à perturber les interactions médiées par les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L a été réalisée selon une méthode de *screening* par mesure d'impédancemétrie. Les résultats obtenus ont permis d'orienter la conception de molécules plus actives et d'établir des relations structure-activité dans cette nouvelle série.

Conclusion et Perspectives

Nous avons montré que les modifications envisagées dans les études de modélisation moléculaire (exploration de la poche P2 par un groupement hydrophobe plus volumineux ; ajout d'une troisième unité aromatique ; combinaison de ces modifications) dans le but d'améliorer l'activité des molécules pour les deux protéines ont été fructueuses. Même si l'activité de cette série reste modeste comparée à celle du Pyridoclast, notre objectif de découvrir de nouveaux inhibiteurs à dualité d'action avec une activité pour les deux cibles est atteint. Ce projet de recherche exploratoire a été initié par mes travaux de thèse et devra donc se poursuivre. Parallèlement à mon travail, il a été mené une étude de l'évaluation de l'affinité de cette nouvelle série pour la protéine Mcl-1. La mise en place de nouvelles techniques au sein de notre unité (FPA, stage post-doctoral du Docteur Jouanne) et au sein du laboratoire COBRA à Rouen (RMN, thèse d'Asma Bourafai-Aziez) nous a permis d'acquérir les premiers résultats d'affinité de plusieurs molécules pour la protéine Mcl-1 (résultats en annexe 5 pour la FPA et annexe 6 pour la RMN).

Les travaux de pharmacomodulation dirigés par les études de modélisation moléculaire, les résultats du *screening* et l'étude de RSA font l'objet d'un article d'ores et déjà rédigé mais en attente de soumission en raison de la protection des données dans le cadre de la valorisation globale de mon travail. Les travaux de RMN réalisés en collaboration avec le laboratoire COBRA font actuellement l'objet de la rédaction d'un article pour soumission en fin d'année 2018.

Dans le but d'améliorer l'activité de nos composés pour la protéine Bcl-x_L, deux stratégies ont été envisagées : la première était de fusionner nos composés avec des inhibiteurs de Bcl-x_L de la littérature ; la seconde était de concevoir une librairie de nouveaux fragments tridimensionnels. Plus d'une trentaine de composés que j'ai synthétisés dans le laboratoire du Docteur Bull ont été enregistrés dans la chimiothèque du CERMN. L'accès à ces fragments tridimensionnels a fait l'objet de la rédaction d'un article en cours de soumission au journal *Organic Letters*.

Conclusion et Perspectives

Concernant les perspectives à court terme, nous pourrions envisager la synthèse de nouveaux composés dont la structure proviendrait de la fusion entre nos composés et une partie d'un inhibiteur de Bcl-x_L. En effet, il serait intéressant de synthétiser des molécules comportant un acide carboxylique (Figure 93).

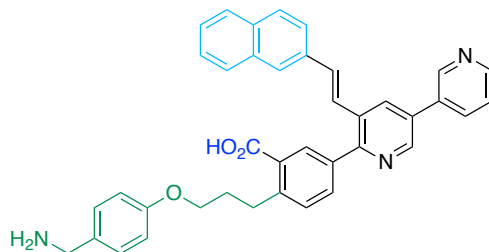


Figure 93 : Exemple d'une nouvelle structure de molécule pour la conception d'un inhibiteur des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Réaliser l'évaluation biologique de l'ensemble de la librairie de 3,3-diarylazétines nous permettrait d'identifier et de sélectionner les composés ayant la meilleure activité sur nos cibles thérapeutiques. Ensuite, nous pourrions envisager de les lier à nos structures pyridiniques (Schéma 53).

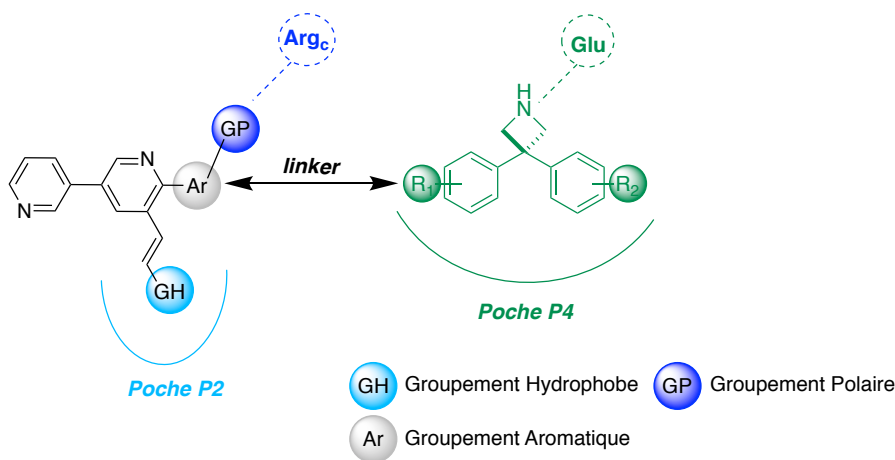


Schéma 53 : Perspective de la combinaison des molécules issues de la structure du Pyridoclast et des 3,3-diarylazétines.

Ces deux types de structure pourraient être liées de différentes façons, notamment par le groupement aromatique ou polaire des motifs pyridiniques et par les substituants R₁, R₂ ou par l'amine des motifs azétidiniques. Par exemple, le Schéma 53 montre une molécule liée par le groupement aromatique de la structure pyridinique et par le groupement R₁ de l'azétidine. Ces différentes pistes devront être étudiées en modélisation moléculaire avant de réaliser la synthèse des composés. De plus, le *fragment linking* n'est pas l'unique approche à pouvoir être envisagée, le *fragment merging* pourrait également convenir dans l'élaboration de cette perspective.

Conclusion et Perspectives

Pendant ma thèse, le Navitoclax développé par les laboratoires AbbVie, inhibiteur des protéines Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, était en essai clinique. Il s'est avéré que certaines patientes ont développé une thrombocytopénie causée par l'inhibition de la protéine Bcl-x_L. Les laboratoires AbbVie ont alors poursuivi leur recherche pour développer un inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-2 (très proche structurellement de Bcl-x_L), le Vénétoclax, approuvé par la FDA depuis avril 2016. De plus, en septembre 2018, un nouvel inhibiteur de la protéine Mcl-1, VU661013, actif *in vivo* a été découvert.⁹¹ L'association du VU661013 au Vénétoclax a permis d'obtenir une synergie d'action dans les modèles murins de leucémie AML. Ces nouvelles découvertes suggèrent l'intérêt majeur d'appliquer une stratégie thérapeutique rationnelle et ciblée en utilisant des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2.

Concernant les perspectives de ce projet, nous pourrions nous orienter vers la conception d'inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-2 (Schéma 54).

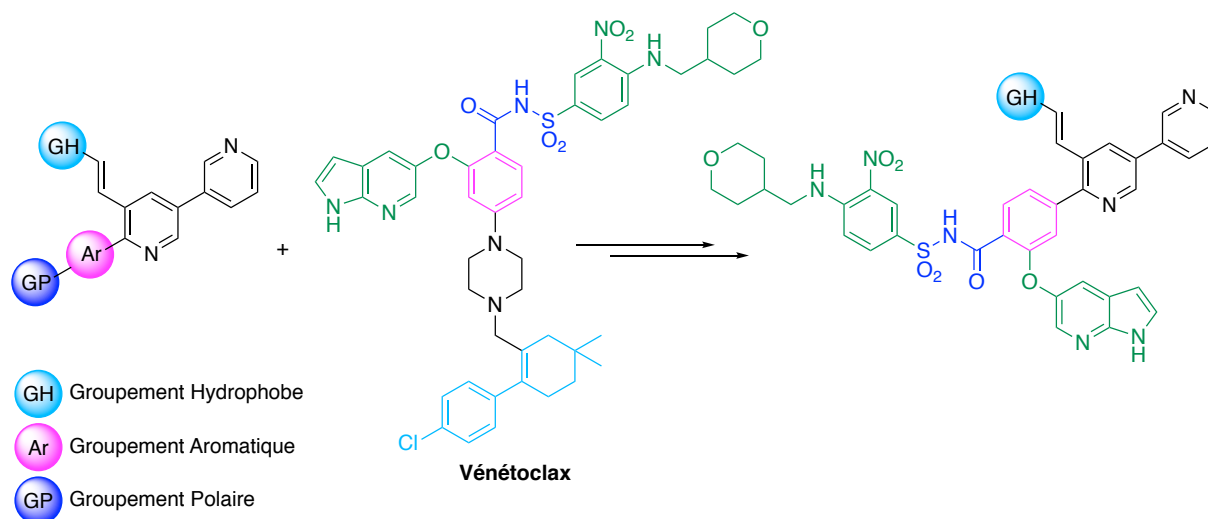


Schéma 54 : Perspective de conception de *dual* Mcl-1/Bcl-2 inhibiteurs.

Ces Mcl-1/Bcl-2 inhibiteurs pourraient s'inspirer de la structure de nos molécules dans le but d'inhiber Mcl-1 (groupement hydrophobe, groupement aromatique et polaire) et d'une partie de la structure du Vénétoclax (partie verte) pour établir une interaction avec la poche P4 de Bcl-2. Nous pourrions fusionner ces deux différentes structures à partie du cycle aromatique en rose et utiliser un acylsulfonamide comme groupement polaire. Ces nouveaux dérivés pourraient être étudiés dans un premier temps en modélisation moléculaire.

Les molécules synthétisées enregistrées dans notre chimiothèque pourront faire l'objet de campagnes de criblage pour différentes cibles thérapeutiques dont les interactions protéine-protéine. Cela a notamment été le cas dans le cadre de notre collaboration avec le Docteur Carmen Garrido : 130 molécules dont une vingtaine synthétisées lors de ma thèse ont fait l'objet d'un criblage pour identifier un inhibiteur de la protéine HSP110. Ce travail a donné lieu à une publication, actuellement soumise à *Cancer Research* et au dépôt d'un brevet européen.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

La partie expérimentale décrit les composés synthétisés dans le laboratoire du CERMN (Caen, France) et dans le laboratoire du Docteur Bull (London, UK). Les conditions expérimentales générales vont être décrites pour les travaux réalisés dans les deux laboratoires.

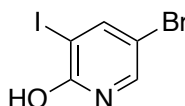
General Experimental Considerations (compounds made in CERMN lab)

All solvents and chemicals were used as purchased unless stated otherwise. All NMR spectra were recorded on Bruker Avance III 400 MHz, Avance III HD 500 MHz or NEO 600 MHz spectrometers. Proton and carbon-13 NMR spectra are reported as chemical shifts (δ) in parts per million (ppm). Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz) to the nearest one decimal point. The following abbreviations are used to describe multiplets: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad). Infrared spectra (ν_{\max} , FTIR ATR) were recorded in reciprocal centimeters (cm^{-1}), as neat compound using a Perkin Elmer FT-IR spectrometer. Melting points of solids were measured with a Griffin apparatus. Thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck 0.2 mm precoated plates of silica gel with Kieselgel 60 F264. The products were visualized using UV fluorescence (254 nm). Flash chromatography was performed with Merck silica gel C60 (40-60 μm) using eluent systems as described for each experiment. LC-MS was performed using a Waters SQ Detector as Mass Spectrometer and Waters Alliance 2695 as separating module (column XBridge C18 2.5 mM/4.6 50 mM) using the following gradients: A (H_2O with 0.1% of HCO_2H)/B (CH_3CN with 0.1% of HCO_2H) 95/5 to A/B 5/95 in 4.00 min. This ratio was held for 1.50 min before returning to the initial conditions for 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min. The retention times (t_{R}) of the molecules analysed are indicated in min. Unless otherwise specified, all reagents were obtained from commercial suppliers.

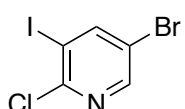
Partie expérimentale

General Experimental Considerations (compounds made in Bull lab)

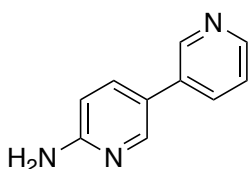
All nonaqueous reactions were run under an inert atmosphere (argon) with flame-dried or oven-dried glassware using standard techniques. Anhydrous solvents were obtained by filtration through drying columns (DMF, THF, CH₂Cl₂) or used directly from commercial sources (1,4-dioxane, EtOH, CHCl₃) purchased from commercial sources without drying. Lithium triflimide (99.95 % trace metal basis) was purchased from Sigma Aldrich, calcium bistriflimide was purchased from TCI (95%), stored in a desiccator, and used directly without further treatment. Flash column chromatography was performed using 230-400 mesh silica with the indicated solvent system according to standard techniques. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated, glassbacked silica gel plates. Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance (254 nm), aqueous potassium permanganate or *p*-anisaldehyde stains. Infrared spectra (ν_{\max} , FTIR ATR) were recorded in reciprocal centimeters (cm⁻¹). Nuclear magnetic resonance spectra were recorded on 400 MHz spectrometers. Chemical shifts for ¹H NMR spectra are recorded in parts per million from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard (chloroform: δ = 7.27 ppm, DMSO: δ = 2.50 ppm). Data is reported as follows: chemical shift [multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, quin = quintet, sep = septet, m = multiplet and br = broad), coupling constant in Hz, integration, assignment]. ¹³C NMR spectra were recorded with complete proton decoupling. Chemical shifts are reported in parts per million from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard (¹³CDCl₃: δ = 77.0 ppm, (¹³CD₃)₂SO: δ = 39.5 ppm). *J* values are reported in Hz. Assignments of ¹H/¹³C spectra were made by the analysis of δ /*J* values, and COSY, HSQC, and HMBC experiments as appropriate. Melting points were obtained using Optimelt MPA100 melting point apparatus and are uncorrected. Commercial reagents were used as supplied or purified by standard techniques where necessary.

5-Bromo-3-iodopyridin-2-ol – 1

N-iodosuccinimide (22.0 g, 94.8 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of 5-bromopyridin-2-ol (15.0 g, 86.2 mmol, 1.0 equiv) in 150 mL of CH₃CN. The mixture was stirred at 80 °C for 4 h. The reaction mixture was cooled to rt, filtered, washed with MeOH and concentrated to afford 5-bromo-3-iodopyridin-2-ol **1** (20.3 g, 79%) as a pink solid. mp = 63 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.57 min *m/z* [M+H]⁺: 300.20; IR/cm⁻¹ 3490, 1630, 1607, 1522, 1457, 1309, 863, 683, 628; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.59 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 4.20 (br, s, 1 H, OH); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.5 (C_q-OH), 146.8 (Pyr-CH), 145.9 (Pyr-CH), 100.7 (C_q-Br), 92.9 (C_q-I). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

5-Bromo-2-chloro-3-iodopyridine – 2

5-Bromo-3-iodopyridin-2-ol **1** (20.3 g, 67.7 mmol) was dissolved in 100 mL of phenylphosphonic dichloride 90%. The mixture was stirred at 160 °C for 4 h then cooled at rt. The mixture was introduced dropwise to water (100 mL) at 0 °C. The solution was basified by addition of NH₄OH solution (28%) until pH=12. The solution was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10% EtOAc/cyclohexane) afforded 5-bromo-2-chloro-3-iodopyridine **2** (19.3 g, 89%) as a white solid. mp = 67 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.46 min *m/z* [M+H]⁺: 318.17; IR/cm⁻¹ 3081, 3038, 1525, 1391, 1352, 1136, 1012, 890, 711, 515; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.29 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 153.2 (Pyr-CH), 150.2 (C_q-Cl), 149.6 (Pyr-CH), 118.4 (C_q-Br), 95.3 (C_q-I). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

[3,3'-Bipyridin]-6-amine – 3

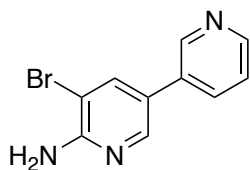
Pyridin-3-ylboronic acid (8.17 g, 66.5 mmol, 1.15 equiv), aq. sat. K₃PO₄ (30.7 g, 145 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (3.34 g, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromopyridin-2-amine (10.0 g, 57.8 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (200 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (100 mL) was added followed by EtOAc (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (1–10% MeOH/CH₂Cl₂) afforded [3,3'-bipyridin]-6-amine **3** (10.9 g, quant) as a white solid. mp = 82–84 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 0.75 min *m/z* [M+H]⁺: 172.38; IR/cm⁻¹ 3340, 3172, 1657, 1607, 1583, 1516, 1475, 1427, 1386, 851, 743; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.80 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.46 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.29 (dd, *J* = 2.5, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.97 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.76 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.41 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 6.54 (dd, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 6.18 (br, s, 2 H, NH₂); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.7, 147.3, 146.5, 146.1, 135.4, 133.7, 132.6, 123.8, 120.7, 108.1. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁰

¹⁴⁹Gloaguen, C.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Fogha, J.; Gautier, F.; De Giorgi, M.; Burzicki, G.; Perato, S.; Pétigny-Lechartier, C.; Simonin-Le Jeune, K.; Brotin, E.; Goux, D.; N'Diaye, M.; Lambert, B.; Louis, M.-H.; Ligat, L.; Lopez, F.; Juin, P.; Bureau, R.; Rault, S.; Poulain, L. First Evidence That Oligopyridines, α -Helix Foldamers, Inhibit Mcl-1 and Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to Bcl-x_L-Targeting Strategies. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1644–1668.

¹⁵⁰Tardia, P.; Stefanachi, A.; Niso, M.; Stolfa, D. A.; Mangiatordi, G. F.; Alberga, D.; Nicolotti, O.; Lattanzi, G.; Carotti, A.; Leonetti, F.; Perrone, R.; Berardi, F.; Azzariti, A.; Colabufo, N.A.; Cellamare, S. Trimethoxybenzanilide-Based P-Glycoprotein Modulators: An Interesting Case of Lipophilicity Tuning by Intramolecular Hydrogen Bonding. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (15), 6403–6418.

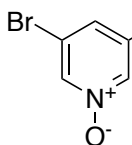
Partie expérimentale

5-Bromo-[3,3'-bipyridin]-6-amine – 4



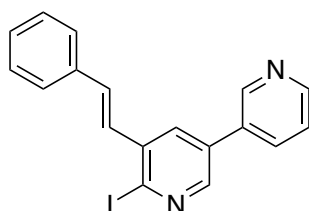
Bromine (3.23 mL, 63.1 mmol, 1.2 equiv) and Na_2CO_3 (5.60 g, 52.6 mmol, 1.0 equiv) were added to a solution of [3,3'-bipyridin]-6-amine **3** (9.00 g, 52.6 mmol, 1.0 equiv) in AcOH (150 mL). The reaction mixture was stirred for 4 h at 25 °C then basified with NaOH (4N) until pH=8. A aq. sat. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution (50 mL) was added followed by EtOAc (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (1% MeOH/ CH_2Cl_2) afforded 5-bromo-[3,3'-bipyridin]-6-amine **4** (11.8 g, 90%) as a white solid. mp = 170 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 2.51 min m/z [M+H]⁺: 250.34; IR/cm⁻¹ 3309, 3151, 1658, 1597, 1503, 1430, 1470, 1253, 1045, 711; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.85 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.50 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.36 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.15 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.03 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.42 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 6.48 (br, s, 2 H, NH₂); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.1, 147.9, 146.8, 145.2, 138.1, 133.0, 132.2, 123.8, 122.8, 103.5.

3,5-Dibromopyridine 1-oxide – 7



m-CPBA (16.7 g, 67.5 mmol, 1.6 equiv) was added to a solution of 3,5-dibromopyridine (10.6 g, 42.2 mmol, 1.0 equiv) in CH_2Cl_2 (200 mL). The reaction mixture was stirred for 12 h at 25 °C. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.28 g, 25.3 mmol, 0.6 equiv) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h at 25 °C then filtered and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (20–50% EtOAc/cyclohexane) afforded 3,5-dibromopyridine 1-oxide **7** (10.7 g, quant) as a white solid. LC-MS (ESI⁺) t_R = 2.83 min m/z [M+H]⁺: 252.26; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (d, J = 1.5 Hz, 2 H, 2 × Pyr-H), 7.58 (t, J = 1.5 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 131.9, 129.9, 127.1, 114.0. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵¹

(E)-6-Iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine – 11

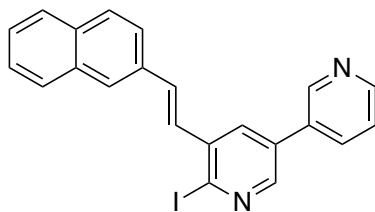


Sodium iodide (5.28 g, 45.0 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.90 mL, 27.0 mmol, 1.5 equiv) were added to a solution of (*E*)-6-chloro-5-styryl-3,3'-bipyridine **MR31353** (5.28 g, 18.0 mmol, 1.0 equiv) in CH_3CN (200 mL). The mixture was stirred at 80 °C for 2 h. Then sodium iodide (5.28 g, 45.0 mmol, 2.50 equiv) and acetyl chloride (1.90 mL, 27.0 mmol, 1.50 equiv) were added, the mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The mixture was cooled to rt, quenched with sat. NaHCO_3 solution (150 mL) and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, washed with sat. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 × 50 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (5.54 g, 80% conversion determined by ¹H NMR) as a yellow solid was used in the following reaction without further purification. LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.83 min m/z [M+H]⁺: 385.41; IR/cm⁻¹ 3079, 3045, 3023, 2924, 1634, 1574, 1544, 1495, 1453, 1420, 1381, 1163, 1087, 1060, 1023, 959, 914, 805, 729, 712, 680; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.89 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.46 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.95 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.61–7.59 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.48–7.41 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.38–7.34 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.29 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 149.1, 148.0, 144.8, 140.7, 135.4, 135.2, 134.1, 133.4, 133.2, 132.9, 128.7 (2 × Ar-CH), 128.0, 127.4 (2 × Ar-CH), 124.0, 115.9; The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

¹⁵¹Gardner, T.; Wenis, E.; Lee, J. Notes - Synthesis of Compounds for Chemotherapy of Tuberculosis. VII. Pyridine *N*-Oxides with Sulfur-Containing Groups. *J. Org. Chem.* **1957**, 22 (8), 984–986.

Partie expérimentale

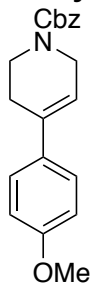
(*E*)-6-Iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine – 12



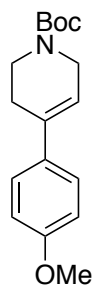
Sodium iodide (2.49 g, 17.0 mmol, 10.0 equiv) and acetyl chloride (0.30 mL, 4.25 mmol, 2.5 equiv) were added to a solution of (*E*)-6-chloro-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **MR34919** (570 mg, 1.70 mmol, 1.0 equiv) in CH₃CN (15 mL). The mixture was heated at 100 °C for 2 h in microwave reactor. Then sodium iodide (5.28 g, 45.0 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.90 mL, 27.0 mmol, 1.5 equiv)

were added, the mixture was stirred at 80 °C for 2 h. The mixture was cooled to rt, quenched with sat. NaHCO₃ solution (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The organic extracts were combined, washed with sat. Na₂S₂O₃ (2 × 20 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue (*E*)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **12** (661 mg, 75% conversion determined by ¹H NMR) as a yellow solid was used in the following reaction without further purification. LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.85 min *m/z* [M+H]⁺: 435.42; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.90 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (ddd, *J* = 7.7, 2.4, 1.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.90–7.78 (m, 4 H, 2 × Ar-H, 2 × Pyr-H), 7.53–7.49 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.48–7.45 (m, 1 H, Ar-H), 7.39 (d, *J* = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.26 (d, *J* = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.8, 148.1, 147.2, 138.4, 134.5, 134.3, 133.7, 133.6, 133.5, 133.4, 132.4, 131.2, 129.3, 128.7, 128.3, 127.9, 127.8, 126.7, 126.6, 123.9, 123.4, 123.4.

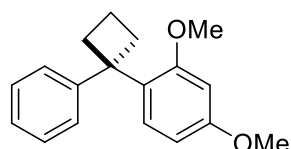
Benzyl 4-(4-methoxyphenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate – 13



FeCl₃ (2.0 mg, 12.5 μmol) was added to a solution of piperidinol **MR34947** (85 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) in CH₂Cl₂ (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO₃ (15 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (15 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic extracts were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded **13** (63 mg, 76%) as a white solid. R_f = 0.79 (30% EtOAc/hexane); mp = 70 °C; IR (film)/cm⁻¹ 2938, 1605 (C=O), 1513, 1456, 1420, 1367, 1350, 1183, 1116, 1025, 809, 803, 770, 733; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42–7.31 (m, 7 H, 7 × Ar-H), 6.91–6.87 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 5.98–5.93 (m, 1 H, C=CH), 5.20 (s, 2 H, CH₂-Ph), 4.16 (d, *J* = 2.8 Hz, 2 H, NCH₂C=), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H, NCH₂), 2.54 (m, 2 H, CH₂); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.9 (Ar-C_q-OCH₃), 155.4 (C=O), 136.8 (Ar-C_q), 134.9 and 134.6 (Ar-C_q), 133.1 (C=CH), 128.4 (2 × Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 127.9 (2 × Ar-CH), 125.9 (2 × Ar-CH), 119.0 and 118.4 (C=CH), 113.7 (2 × Ar-CH), 67.0 (CH₂-Ph), 55.2 (OCH₃), 43.8 and 43.6 (CH₂), 40.8 and 40.5 (CH₂), 27.4 and 27.1 (CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₀H₂₁NO₃ [M+H]⁺: 324.1600; Found: 324.1605.

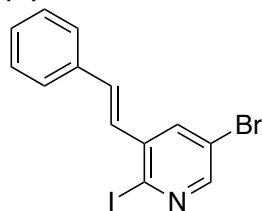
tert-Butyl 4-(4-methoxyphenyl)-3,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate – 15

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 25 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 25 μmol) were added to a solution of piperidinol **MR34942** (154 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv) in chloroform (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (15 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (15 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 15 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded **15** (118 mg, 82%) as a white solid. R_f = 0.89 (30% EtOAc/hexane); mp = 70 °C; IR (film)/ cm^{-1} 2935, 1686 (C=O), 1605, 1511, 1421, 1364, 1295, 1240, 1162, 1111, 1037, 986, 971, 860, 806, 769, 762; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.38–7.34 (m, 2 H, 2 \times Ar-CH), 6.92–6.88 (m, 2 H, 2 \times Ar-CH), 6.03 (s, 1 H, C=CH), 3.96 (s, 2 H, CHCH_2N), 3.74 (s, 3 H, OCH_3), 3.52 (t, J = 5.7 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.42 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.42 (s, 9 H, 3 \times CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 158.5 (Ar- C_q - OCH_3), 153.9 (C=O), 133.8 (Ar- C_q), 132.4 (C=CH), 125.8 (2 \times Ar-CH), 119.0 (C=CH), 113.8 (2 \times Ar-CH), 78.8 (C-(CH_3) $_3$), 55.1 (OCH_3), 43.2 (CH_2NCH_2), 28.1 (3 \times CH_3), 26.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 288.1596; Found: 288.1600. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵²

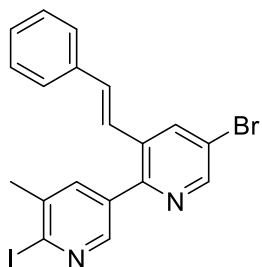
2,4-Dimethoxy-1-(1-phenylcyclobutyl)benzene – 17

FeCl_3 (4.0 mg, 0.05 mmol) was added to a solution of 1-phenylcyclobutan-1-ol (74 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) and 1,3-dimethoxybenzene (0.20 mL, 3.0 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (5-10% CH_2Cl_2 /pentane) afforded impure product. Second purification by flash chromatography (10% CH_2Cl_2 /pentane) cyclobutane **17** (12 mg, 9%) as a white solid. R_f = 0.60 (20% CH_2Cl_2 /pentane); mp = 73–74 °C; IR (film)/ cm^{-1} 2943, 1608, 1583, 1499, 1458, 1436, 1414, 1318, 1255, 1208, 1155, 1139, 1027, 838, 758; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43–7.40 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.28–7.24 (m, 3 H, 3 \times Ar-H), 7.14–7.10 (m, 1 H, Ar-H), 6.49 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.36 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 3.64 (s, 3 H, OCH_3), 2.77–2.62 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.04–1.96 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$), 1.90–1.81 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CHHCH}_2$); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.2 (Ar- C_q - OCH_3), 158.0 (Ar- C_q - OCH_3), 148.6 (Ar- C_q), 130.8 (Ar- C_q), 127.7 (2 \times Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.4 (2 \times Ar-CH), 125.0 (Ar-CH), 103.5 (Ar-CH), 99.3 (Ar-CH), 55.3 (OCH_3), 55.0 (OCH_3), 49.3 (C_q), 34.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 17.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 269.1536; Found: 269.1527.

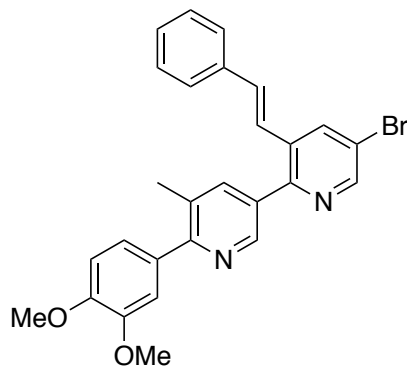
¹⁵²Wustrow, D. J.; Wise, L. D. Coupling of Arylboronic Acids with a Partially Reduced Pyridine Derivative. *Synthesis (Stuttg)*. **1991**, 1991 (11), 993–995.

(E)-5-Bromo-2-iodo-3-styrylpyridine – 18

Sodium iodide (5.34 g, 35.7 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.50 mL, 21.4 mmol, 1.5 equiv) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **MR29058** (4.20 g, 14.3 mmol, 1.0 equiv) in CH₃CN (200 mL). The mixture was stirred at 80 °C for 3 h. Then sodium iodide (5.34 g, 35.7 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.50 mL, 21.4 mmol, 1.5 equiv) were added, the mixture was stirred at 80 °C for 3 h. The mixture was cooled to rt, quenched with sat. NaHCO₃ solution (150 mL) and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, washed with sat. Na₂S₂O₃ (2 × 50 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue (*E*)-5-bromo-2-iodo-3-styrylpyridine **18** (5.35 g, 70% conversion determined by ¹H NMR) as a yellow solid was used in the following reaction without further purification. LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.44 min *m/z* [M+H]⁺: 386.31; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.09 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 6.94 (d, *J* = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.6 (Pyr-CH), 139.6 (C_q-Pyr), 135.9 (Pyr-CH), 135.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 134.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 129.0 (C_q-Ar), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 127.1 (2 × Ar-CH), 121.1 (C_q-I), 120.8 (C_q-Br). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

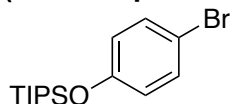
(E)-5-Bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine – 19

Sodium iodide (784 mg, 5.23 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (0.22 mL, 3.14 mmol, 1.5 equiv) were added to a solution of (*E*)-5,6'-dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **MR29061** (900 mg, 2.09 mmol, 1.0 equiv) in CH₃CN (150 mL). The mixture was stirred at 80 °C for 3 h. Then sodium iodide (784 mg, 5.23 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (0.22 mL, 3.14 mmol, 1.5 equiv) were added, the mixture was stirred at 80 °C for 3 h. The mixture was cooled to rt, quenched with sat. NaHCO₃ solution (50 mL) and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, washed with sat. Na₂S₂O₃ (2 × 50 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue (*E*)-5-bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **19** (926 mg, 70% conversion determined by ¹H NMR) as a yellow solid was used in the following reaction without further purification. LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.89 min *m/z* [M+H]⁺: 477.26; IR/cm⁻¹ 3029, 1576, 1449, 1428, 1389, 1112, 1089, 968, 900, 686, 498; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.73 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.34–7.30 (m, 1 H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.98 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151.4, 149.5, 148.1, 139.2, 137.5, 136.5, 135.9, 134.0, 133.9, 133.3, 128.9 (2 × Ar-CH), 128.8, 126.9 (2 × Ar-CH), 125.6, 123.4, 120.4, 26.2. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

(E)-5-Bromo-6'-(3,4-dimethoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine – 20

(3,4-Dimethoxyphenyl)boronic acid (105 mg, 0.58 mmol, 1.1 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (276 mg, 1.30 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (34.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **19** (250 mg, 0.52 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–40%

EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-bromo-6'-(3,4-dimethoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **20** (180 mg, 93%) as a yellow solid. mp = 158 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.80 min m/z [M+H]⁺: 487.47; IR/cm⁻¹ 3083, 2994, 2949, 2914, 2819, 1606, 1594, 1519, 1419, 1406, 1276, 1135, 1026, 968, 926, 759; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.74 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.70 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.91 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.46 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 2 × Ar-CH), 7.36 (t, J = 7.0 Hz, 2 H, 2 × Ar-CH), 7.34 (t, 1 H, J = 7.0 Hz, Ar-CH), 7.22 (d, 1 H, J = 2.3 Hz, Ar-CH), 7.19 (d, 1 H, J = 16.2 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 7.19 (dd, 1 H, J = 8.2, 2.3 Hz, Ar-H), 7.13 (d, 1 H, J = 16.2 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 6.98 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, Ar-H), 3.96 (s, 6 H, 2 × OCH_3), 2.49 (s, 3 H, CH_3); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.2, 152.5, 149.3, 149.0, 148.7, 147.5, 139.5, 136.6, 136.4, 133.3, 133.2, 132.6, 132.4, 130.7, 129.0, 128.7 (2 × Ar-CH), 127.1, 123.9 (2 × Ar-CH), 121.8, 112.3, 110.6, 74.2, 55.7 (2 × OCH_3), 20.3 (CH_3). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

(4-Bromophenoxy)triisopropylsilane – 21

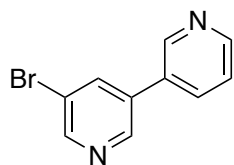
2,6-Lutidine (1.66 mL, 14.3 mmol, 1.3 equiv) was added to a solution of 4-bromophenol (1.90 g, 11.0 mmol, 1.0 equiv) and triisopropylsilyl trifluoromethanesulfonate (3.55 mL, 13.2 mmol, 1.2 equiv) in CH_2Cl_2 (22 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred at 0 °C during 30 min

and warmed to room temperature overnight. The reaction mixture was quenched with 100 mL of water. Followed the addition of 80 mL of CH_2Cl_2 , the layers were separated and the aqueous portion extracted with CH_2Cl_2 (3 × 80 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (100% pentane) afforded silane **21** (3.54 g, 98%) as a colourless oil. R_f = 0.75 (100% pentane); IR (film)/cm⁻¹ 2945, 2867, 1586, 1486, 1463, 1261, 1070, 1007, 996, 907, 882, 826, 731, 683; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35–7.29 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 6.80–6.73 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 1.33–1.18 (m, 3 H, 3 × CH), 1.11 (d, J = 7.4 Hz, 18 H, 6 × CH_3); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 155.3 (Ar-C_q-O), 132.2 (2 × Ar-CH), 121.7 (2 × Ar-CH), 113.2 (Ar-C_q-Br), 17.9 (6 × CH_3), 12.6 (3 × CH). The observed spectroscopic data for this compound was consistent with that previously reported.¹⁵³

¹⁵³Liptak, V. P.; Wulff, W. D. The Preparation and Evaluation of Electron Poor Benzylidene Fischer Carbene Complexes: Studies Toward the Total Synthesis of (+)-Olivin. *Tetrahedron* **2000**, 56 (52), 10229–10247.

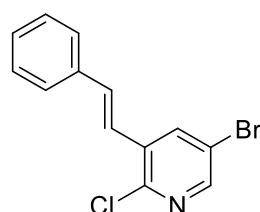
Partie expérimentale

5-Bromo-3,3'-bipyridine – MR27830



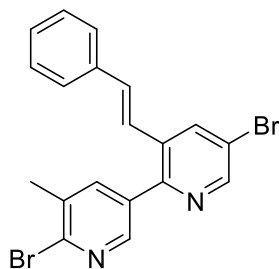
Pyridin-3-ylboronic acid (519 mg, 4.22 mmol, 1.0 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (2.24 g, 10.6 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (244 mg, 5 mol%) were added to a solution of 3,5-dibromopyridine (1.00 g, 4.22 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (50 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 4 h then cooled to rt. Water (50 mL) was added followed by EtOAc (50 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (EtOAc) afforded 5-bromo-3,3'-bipyridine **MR27830** (617 mg, 62%) as a white solid. mp = 105 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.25 min m/z [M+H]⁺: 235.42; IR/cm⁻¹ 3433, 3026, 2921, 2848, 1627, 1579, 1484, 1434, 1386, 1113, 1008, 888, 706; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.84 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.76 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.73 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.04 (t, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.88 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.44 (ddd, J = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁴

(E)-5-Bromo-2-chloro-3-styrylpyridine – MR29058



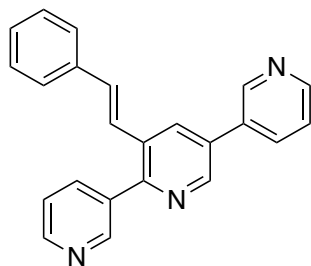
(*E*)-Styrylboronic acid (2.90 g, 19.6 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na_2CO_3 (4.16 g, 39.3 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine)palladium(0) (907 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-2-chloro-3-iodopyridine **2** (5.00 g, 15.7 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (100 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h then cooled to rt. Water (50 mL) was added followed by EtOAc (50 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (1% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **MR29058** (4.3 g, 93%) as a white solid. mp = 104 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.18 min m/z [M+H]⁺: 294.33; IR/cm⁻¹ 3036, 1627, 1530, 1494, 1447, 1389, 1152, 1116, 1063, 956, 897, 755, 719, 687, 491; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.11 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.57 (d, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38–7.34 (m, 1 H, Ar-H), 7.27 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.12 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148.6 (Pyr-CH), 148.5 (C_q-Cl), 136.7 (Pyr-CH), 135.9 (C_q-Ar), 134.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.7 (C_q-Pyr), 129.1 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 127.1 (2 × Ar-CH), 121.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 119.3 (C_q-Br). The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

¹⁵⁴Ishikura, M.; Ohta, T.; Terashima, M. A Novel Synthesis of 4-Aryl- and 4-Heteroarylpyridines via Diethyl(4-Pyridyl)Borane. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1985**, 33 (11), 4755–4763.

(E)-5,6'-Dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine – MR29061

6-Bromo-5-methylpyridin-3-ylboronic acid (765 mg, 3.54 mmol, 1.1 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (1.71 g, 8.05 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine)palladium(0) (186 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-2-iodo-3-styrylpyridine **18** (1.25 g, 3.22 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (50 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated

under reduced pressure. Purification by flash chromatography (5% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5,6'-dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **MR29061** (868 mg, 63%) as a white solid. mp = 143 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.72 min m/z [M+H]⁺: 431.29; IR/cm⁻¹ 3031, 1393, 1111, 1050, 968, 898, 740, 685, 499; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.41 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.17 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.83 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.42 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36 (t, J = 7.8 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.31 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.12 (d, J = 16.6 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.99 (d, J = 16.6 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.46 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151.4, 149.4, 147.8, 144.9, 139.6, 136.5, 136.0, 135.2, 134.0, 133.9, 133.3, 128.9 (2 × Ar-CH), 128.8, 126.9 (2 × Ar-CH), 123.4, 120.4, 22.0. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

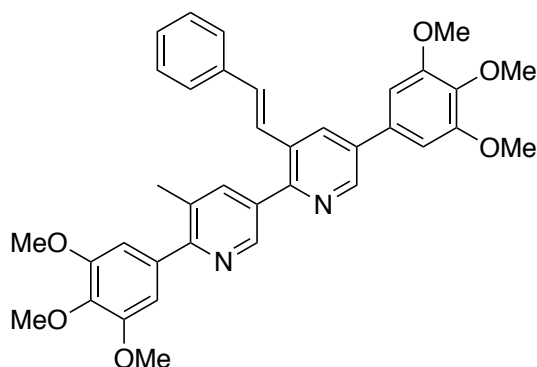
(E)-3'-Styryl-3,2':5',3''-terpyridine – MR29063

Pyridin-3-ylboronic acid (200 mg, 1.60 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.30 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 4 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and

concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–10% MeOH/CH₂Cl₂) afforded (*E*)-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **MR29063** (429 mg, 98%) as a white solid. mp = 117 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.52 min m/z [M+H]⁺: 336.49; IR/cm⁻¹ 3435, 2925, 1633, 1570, 1449, 1383, 1100, 1024, 802, 710; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.98 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.96 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.87 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.73 (t, J = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (t, J = 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (ddd, J = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.51–7.45 (m, 4 H, 2 × Pyr-H, 2 × Ar-H), 7.39–7.35 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33–7.29 (m, 1 H, Ar-H), 7.23 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 153.9 (C_q-Pyr), 150.6 (Pyr-CH), 149.7 (Pyr-CH), 149.6 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 146.9 (Pyr-CH), 138.0 (Pyr-CH), 136.4 (C_q-Ar), 135.0 (C_q-Pyr), 134.5 (Pyr-CH), 133.1 (C_q-Pyr), 133.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 (C_q-Pyr), 132.6 (Pyr-CH), 131.9 (C_q-Pyr), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9 (Pyr-CH), 123.3 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₃H₁₇N₃ [M+H]⁺: 336.1501; Found: 336.1503.

Partie expérimentale

(*E*)-5'-Methyl-3-styryl-5,6'-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3'-bipyridine – MR30847

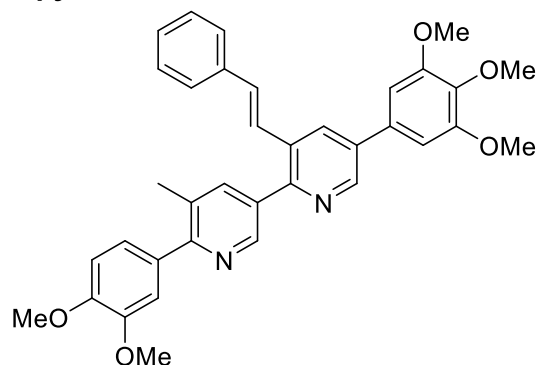


3,4,5-Trimethoxyphenylboronic acid (292 mg, 1.38 mmol, 3.0 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (246 mg, 1.16 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (23.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5,6'-dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **MR29061** (200 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined,

dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–40% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5'-methyl-3-styryl-5,6'-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3'-bipyridine **MR30847** (276 mg, 99%) as a white solid. mp = 100 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.58 min m/z [M+H]⁺: 605.70; IR/cm⁻¹ 2995, 2931, 2833, 1723, 1584, 1508, 1451, 1418, 1343, 1238, 1125, 747; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.84 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.81 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.17 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.00 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.37 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.32–7.30 (m, 1 H, Ar-H), 7.29 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.87 (s, 2 H, 2 × Ar-H), 6.85 (s, 2 H, 2 × Ar-H), 4.00 (s, 6 H, 2 × OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 3.94 (s, 6 H, 2 × OCH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 2.51 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.2 (C_q-Pyr), 153.9 (2 × C_q-OCH₃), 153.0 (2 × C_q-OCH₃), 152.9 (C_q-Pyr), 147.6 (Pyr-CH), 147.2 (Pyr-CH), 139.7 (Pyr-CH), 138.5 (C_q-OCH₃), 138.1 (C_q-OCH₃), 136.6 (Ar-C_q), 136.2 (C_q-Pyr), 135.8 (Ar-C_q), 133.7 (C_q-Pyr), 133.3 (Ar-C_q), 132.6 (Pyr-CH), 132.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.6 (C_q-Pyr), 130.6 (CH₃-C_q-Pyr), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 125.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 106.4 (2 × Ar-CH), 104.6 (2 × Ar-CH), 61.0 (OCH₃), 61.0 (OCH₃), 56.4 (2 × OCH₃), 56.2 (2 × OCH₃), 20.3 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₃₇H₃₆N₂O₆ [M+H]⁺: 605.2652; Found: 605.2662. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

Partie expérimentale

(*E*)-6'-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3'-bipyridine – MR30850

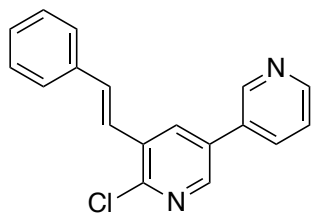


3,4,5-Trimethoxyphenylboronic acid (86.0 mg, 0.41 mmol, 1.1 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (196 mg, 0.93 mmol, 2.5 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (22.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-6'-(3,4-dimethoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **20** (180 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was

extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-6'-(3,4-dimethoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3'-bipyridine **MR30850** (137 mg, 66%) as a white solid. mp = 174 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.29 min m/z [M+H]⁺: 575.78; IR/cm⁻¹ 2999, 2967, 2932, 2838, 1582, 1514, 1450, 1419, 1242, 1146, 1124, 1024, 749; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.83 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.80 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.16 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.98 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.49 (d, J = 7.1 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36 (t, J = 7.1 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.32–7.28 (m, 1 H, Ar-H), 7.30 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.98 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (s, 2 H, 2 × Ar-H), 3.99 (s, 6 H, 2 × OCH₃), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 2.50 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.0 (C_q-Pyr), 153.9 (2 × C_q-OCH₃), 153.0 (C_q-OCH₃), 149.2 (C_q-OCH₃), 148.7 (Pyr-CH), 147.6 (Pyr-CH), 147.1 (Pyr-CH), 146.5 (C_q-OCH₃), 139.7 (C_q-OCH₃), 138.6 (C_q-Ar), 136.5 (C_q-Pyr), 136.2 (C_q-Ar), 133.8 (C_q-Pyr), 133.7 (C_q-Ar), 133.1 (Pyr-CH), 132.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.6 (C_q-Pyr), 130.5 (C_q-Pyr), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 126.9 (2 × Ar-CH), 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 112.5 (Ar-CH), 110.6 (2 × Ar-CH), 104.6 (2 × Ar-CH), 61.1 (OCH₃), 61.1 (OCH₃), 56.4 (2 × OCH₃), 56.0 (OCH₃), 20.5 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₃₆H₃₄N₂O₅ [M+H]⁺: 575.2546; Found: 575.2556. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

Partie expérimentale

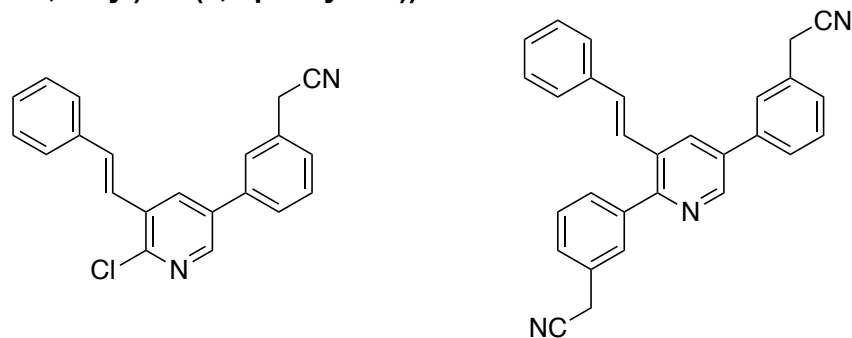
(*E*)-6-Chloro-5-styryl-3,3'-bipyridine – MR31353



Pyridin-3-ylboronic acid (938 mg, 7.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na_2CO_3 (1.35 g, 12.7 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (294 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **MR29058** (1.50 g, 5.08 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (100 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (100 mL) was added followed by EtOAc (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-6-chloro-5-styryl-3,3'-bipyridine **MR31353** (1.27 g, 85%) as a white solid. mp = 158–160 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.55 min m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 293.35; IR/ cm^{-1} 3435, 3019, 1632, 1421, 1384, 1165, 1061, 956, 805, 713, 732, 688; ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.51 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.16 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.95 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.61–7.59 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.49–7.41 (m, 4 H, Pyr-H, 2 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.38–7.34 (m, 1 H, Ar-H), 7.21 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 150.0 ($\text{C}_q\text{-Cl}$), 149.5 (Pyr-CH), 147.9 (Pyr-CH), 146.1 (Pyr-CH), 136.2 ($\text{C}_q\text{-Ar}$), 136.1 (Ar-CH), 134.7 (Pyr-CH), 134.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 ($\text{C}_q\text{-Pyr}$), 132.9 (Pyr-CH), 132.5 ($\text{C}_q\text{-Pyr}$), 132.3 ($\text{C}_q\text{-Pyr}$), 128.9 (2 × Ar-CH), 127.1 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 122.7 (Ar-CH=CH-Pyr); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 293.0846; Found: 293.0859. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁴⁹

Partie expérimentale

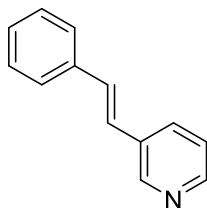
(*E*)-2-(3-(6-Chloro-5-styrylpyridin-3-yl)phenyl)acetonitrile – MR31378 and (*E*)-2,2'-((3-Styrylpyridine-2,5-diyl)bis(3,1-phenylene))diacetonitrile – MR34927



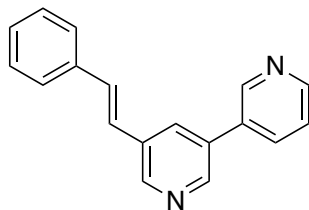
2-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetonitrile (258 mg, 1.06 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (451 mg, 2.13 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (49.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **MR29058** (250 mg, 0.85 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 45 min then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–20% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-2-(3-(6-chloro-5-styrylpyridin-3-yl)phenyl)acetonitrile **MR31378** (193 mg, 69%) as a white solid followed by (*E*)-2,2'-((3-styrylpyridine-2,5-diyl)bis(3,1-phenylene))diacetonitrile **MR34927** (60.0 mg, 17%) as a colourless oil.

MR31378: mp = 128 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.81 min m/z [M+H]⁺: 331.52; IR/cm⁻¹ 3433, 2248 (CN), 1630, 1446, 1418, 1383, 1162, 1089, 1052, 931, 899, 787, 720, 684; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.13 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.61–7.53 (m, 5 H, 5 × Ar-H), 7.46 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.44–7.40 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.37–7.33 (m, 1 H, Ar-H), 7.20 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 3.87 (s, 2 H, CH₂); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.4 (Cl-C_q-Ar), 146.2 (Pyr-CH), 137.7 (C_q-Pyr), 136.2 (C_q-Ar), 135.4 (C_q-Pyr), 133.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 (Pyr-CH), 132.0 (C_q-Pyr), 131.0 (C_q-Ar), 130.1 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.0 (2 × Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.7 (Ar-CH), 122.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 117.5 (CN), 23.7 (CH₂); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₁H₁₅ClN₂ [M+H]⁺: 331.1002; Found: 331.1016.

MR34927: LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.45 min m/z [M+H]⁺: 412.61; IR/cm⁻¹ 3432, 2921, 2250 (CN), 1605, 1587, 1450, 1413, 1386, 965, 749, 694; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.82 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.20 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.70 (br, s, 1 H, Ar-H), 7.67 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.64 (br, s, 1 H, Ar-H), 7.62 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.57 (t, J = 7.7 Hz, 1 H, Ar-H), 7.52 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.49–7.46 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.46–7.45 (m, 1 H, Ar-H), 7.45–7.43 (m, 1 H, Ar-H), 7.39–7.36 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33–7.28 (m, 1 H, Ar-H), 7.19 (d, J = 16.5 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.15 (d, J = 16.5 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 3.82 (s, 2 H, CH₂), 3.78 (s, 2 H, CH₂); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.6 (C_q-Pyr), 146.7 (Pyr-CH), 140.3 (C_q-Ar), 138.6 (C_q-Ar), 136.6 (C_q-Ar), 134.9 (C_q-Pyr), 132.5 (Pyr-CH), 132.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.4 (C_q-Pyr), 131.0 (CH₂-C_q-Ar), 130.3 (CH₂-C_q-Ar), 130.0 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 129.0 (Ar-CH), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 128.0 (Ar-H), 127.8 (Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.8 (3 × Ar-CH), 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 117.7 (CN), 117.6 (CN), 23.7 (CH₂), 23.7 (CH₂); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₉H₂₁N₃ [M+H]⁺: 412.1814; Found: 412.1816.

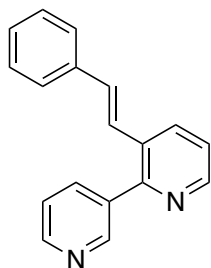
(E)-3-Styrylpyridine – MR34900

(*E*)-Styrylboronic acid (902 mg, 6.10 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (1.29 g, 12.2 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (282 mg, 5 mol%) were added to a solution of 3-iodopyridine (1.00 g, 4.88 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (1–20% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3-styrylpyridine **MR34900** (607 mg, 69%) as a pale yellow solid. mp = 80 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.27 min *m/z* [M+H]⁺: 182.40; IR/cm⁻¹ 3429, 2921, 1637, 1446, 1072, 961, 802, 705, 618, 529; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.46 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (dt, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.64–7.62 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.42–7.38 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.40 (d, *J* = 15.6, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.32–7.28 (m, 1 H, Ar-H), 7.29 (d, *J* = 15.6, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 148.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Ar), 132.8 (C_q-Pyr), 132.7 (Pyr-CH), 130.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 125.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₃H₁₁N [M+H]⁺: 182.0970; Found: 182.0974. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁵

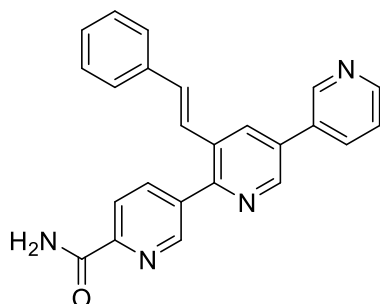
(E)-5-Styryl-3,3'-bipyridine – MR34901

Pyridin-3-ylboronic acid (333 mg, 2.71 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (575 mg, 5.43 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (125 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-3-bromo-5-styrylpyridine **MR29056** (564 mg, 2.17 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-styryl-3,3'-bipyridine **MR34901** (458 mg, 82%) as a brown solid. mp = 107 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.70 min *m/z* [M+H]⁺: 259.48; IR/cm⁻¹ 3435, 2921, 1494, 1449, 1395, 1345, 1199, 1018, 969, 805, 760, 711, 618; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.90 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (t, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.7, 1 H, Pyr-H), 7.56 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.45 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.32 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, Ar-H), 7.27 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.4 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 147.9 (Pyr-CH), 146.8 (Pyr-CH), 136.4 (C_q-Pyr), 134.5 (Pyr-CH), 133.5 (C_q-Pyr), 133.4 (C_q-Pyr), 133.2 (C_q-Ar), 131.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.1 (Pyr-CH), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₁₄N₂ [M+H]⁺: 259.1235; Found: 259.1241.

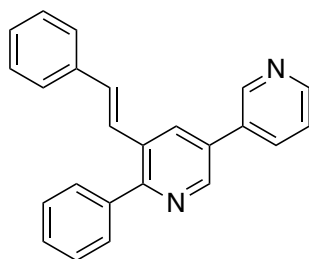
¹⁵⁵Rickborn, B.; Jensen, F. R. α-Carbon Isomerization in Amide Dehydrations. *J. Org. Chem.* **1962**, 27 (12), 4608–4610.

(E)-3-Styryl-2,3'-bipyridine – MR34902

Pyridin-3-ylboronic acid (143 mg, 1.16 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (246 mg, 2.33 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (54.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-2-chloro-3-styrylpyridine (200 mg, 0.93 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (10 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3-styryl-2,3'-bipyridine **MR34902** (458 mg, 82%) as an orange oil. LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.76 min *m/z* [M+H]⁺: 259.43; IR/cm⁻¹ 3434, 1630, 1383, 1253, 1126, 666; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.66 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.63 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.28 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.99 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.55 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.52–7.49 (m, 1 H, Pyr-H), 7.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, 2 × Ar-H) 7.39–7.27 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.09 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.8 (C_q-Pyr), 150.0 (Pyr-CH), 149.2 (Pyr-CH), 148.6 (Pyr-CH), 137.0 (Pyr-CH), 136.6 (C_q-Pyr), 135.2 (C_q-Pyr), 134.5 (Pyr-CH), 132.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2 (C_q-Ar), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4 (Pyr-CH), 123.3 (Pyr-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₁₄N₂ [M+H]⁺: 259.1235; Found: 259.1238.

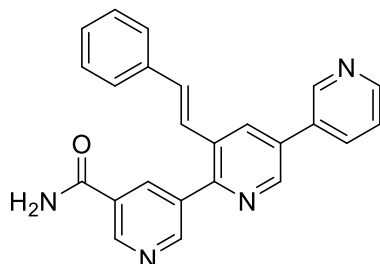
(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxamide – MR34903

(6-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (241 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (344 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10–100% EtOAc/cyclohexane then 20% MeOH/CH₂Cl₂) afforded (*E*)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxamide **MR34903** (360 mg, 77%) as a pale yellow solid. mp = 212 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.78 min *m/z* [M+H]⁺: 379.63; IR/cm⁻¹ 3444, 1710, 1587, 1564, 1382, 1361, 1012, 739, 685; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.99 (dd, *J* = 2.3, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.93 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.36 (dd, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (dd, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.92 (br, s, 1 H, NH), 7.50 (ddd, *J* = 8.1, 4.9, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.48–7.46 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.41–7.37 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36–7.31 (m, 1 H, Ar-H), 7.24 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.13 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 5.67 (br, s, 1 H, NH); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.3 (C=O), 152.9 (C_q-Pyr), 149.7 (Pyr-CH), 149.3 (Pyr-CH), 149.0 (Pyr-C_q-CO), 148.3 (Pyr-CH), 147.0 (Pyr-CH), 138.4 (Pyr-CH), 137.7 (C_q-Pyr), 136.2 (C_q-Ar), 134.5 (Pyr-CH), 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.3 (C_q-Pyr), 132.9 (C_q-Pyr), 132.8 (Pyr-CH), 132.2 (C_q-Pyr), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9 (Pyr-CH), 122.0 (Pyr-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₄H₁₈N₄O [M+H]⁺: 379.1559; Found: 379.1563.

(E)-6-Phenyl-5-styryl-3,3'-bipyridine – MR34904

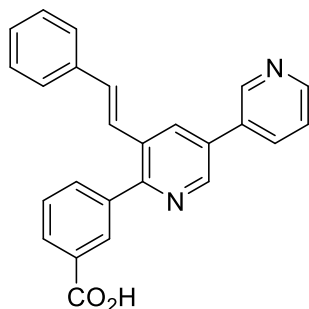
Phenylboronic acid (195 mg, 1.60 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.30 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under

reduced pressure. Purification by flash chromatography (10–100% EtOAc/cyclohexane then 20% MeOH/ CH_2Cl_2) afforded (*E*)-6-phenyl-5-styryl-3,3'-bipyridine **MR34904** (264 mg, 61%) as a brown solid. mp = 166 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.74 min m/z $[M+H]^+$: 335.53; IR/ cm^{-1} 3433, 1570, 1492, 1442, 1382, 1019, 966, 743, 694; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.98 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.84 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, J = 4.8, 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (dt, J = 7.8, 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.71–7.68 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.54–7.45 (m, 6 H, 5 × Ar-H, Pyr-H), 7.37 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.31–7.28 (m, 1 H, Ar-H), 7.24 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 157.1 (C_q -Pyr), 149.4 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 139.2 (C_q -Pyr), 136.7 (C_q -Ar), 134.4 (Pyr-CH), 133.4 (C_q -Pyr), 132.3 (Pyr-CH), 132.1 (C_q -Pyr), 131.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.4 (C_q -Pyr), 129.8 (2 × Ar-CH), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.6 (Ar-CH), 128.3 (2 × Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 125.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{24}H_{18}N_2$ $[M+H]^+$: 335.1548; Found: 335.1548.

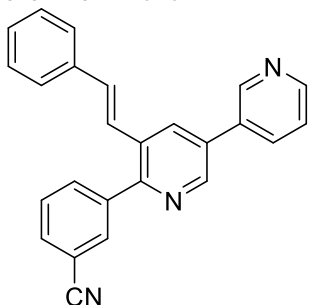
(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carboxamide – MR34905

(5-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (237 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts

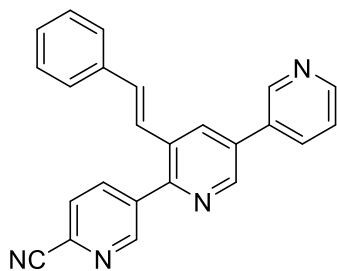
were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/cyclohexane then 10% MeOH/ CH_2Cl_2) afforded (*E*)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carboxamide **MR34905** (246 mg, 50%) as a pale yellow solid. mp = 240 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.30 min m/z $[M+H]^+$ 379.54; IR/ cm^{-1} 3375, 3049, 1688, 1631, 1428, 1376, 1293, 1027, 976, 909, 706, 692; ¹H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.16 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.14 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.04 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.93 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, J = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.66 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.50 (t, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.36 (dt, J = 7.9, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.30 (br, s, 1 H, NH_2), 7.69 (br, s, 1 H, NH_2), 7.63–7.58 (m, 1 H, Pyr-H), 7.61 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.53 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.16 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 166.1 (C=O), 152.5 (C_q -Pyr), 152.1 (Pyr-CH), 149.4 (Pyr-CH), 148.4 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.7 (Pyr-CH), 136.7 (C_q -Ar), 136.0 (Pyr-CH), 134.7 (Pyr-CH), 134.5 (C_q -Pyr), 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5 (Pyr-CH), 132.4 (C_q -Pyr), 132.1 (C_q -Pyr), 131.6 (C_q -Pyr), 129.3 (Pyr- C_q -CO), 128.8 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{24}H_{18}N_4O$ $[M+H]^+$: 379.1559; Found: 379.1569.

(E)-3-(5-Styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR34906

(E)-3-(5-Styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile **MR34907** (100 mg, 0.28 mmol, 1.0 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 4 mL) and MeOH (6 mL) at 100 °C during 48 h. The reaction mixture was acidified by HCl (3N) until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered and dried to afford (E)-3-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR34906** (85 mg, 80%) as a yellow solid. mp = 313 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.98 min m/z [M+H]⁺: 379.46; IR/cm⁻¹ 3416, 1698, 1637, 1453, 1384, 1308, 1088, 966, 736, 683; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.20 (br, s, 1 H, Pyr-H), 9.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (d, *J* = 4.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.65 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.25 (t, *J* = 1.6 Hz, 1 H, Ar-H), 8.07 (dt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H, Ar-H), 7.90 (dt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H, Ar-H), 7.70–7.66 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-H), 7.60 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, Ar-H), 7.16 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.1 (C=O), 155.0 (C_q-Pyr), 148.3 (Pyr-CH), 147.1 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 139.3 (C_q-CO), 136.8 (C_q-Ar), 135.8 (Pyr-CH), 133.9 (Ar-CH), 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.6 (C_q-Pyr), 132.4 (Pyr-CH), 131.6 (C_q-Ar), 130.9 (C_q-Pyr), 130.9 (C_q-Pyr), 130.5 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.4 (Pyr-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₅H₁₈N₂O₂ [M+H]⁺: 379.1447; Found: 379.1455.

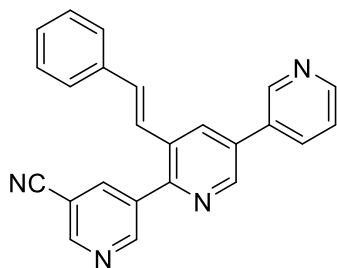
(E)-3-(5-Styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile – MR34907

(3-Cyanophenyl)boronic acid (239 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (344 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (E)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/cyclohexane then 10% MeOH/CH₂Cl₂) afforded (E)-3-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile **MR34907** (490 mg, quant) as a pale yellow solid. mp = 164 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.68 min m/z [M+H]⁺: 360.46; IR/cm⁻¹ 3446, 3002, 2230 (CN), 2001, 1631, 1383, 967, 804, 745, 688; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.97 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.73 (dd, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (br, s, 1 H, Ar-H), 8.02 (dt, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ar-H), 7.49 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.34–7.31 (m, 1 H, Ar-H), 7.22 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.4 (C_q-Pyr), 149.6 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.7 (Pyr-CH), 140.5 (C_q-Ar), 136.3 (C_q-Ar), 134.5 (Pyr-CH), 134.1 (Ar-CH), 133.3 (Ar-CH), 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.0 (C_q-Pyr), 132.9 (C_q-Pyr), 132.7 (Pyr-CH), 132.0 (C_q-Pyr), 131.7 (Ar-CH), 129.0 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.6 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH), 118.5 (CN), 112.8 (C_q-CN); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₅H₁₇N₃ [M+H]⁺: 360.1501; Found: 360.1504.

(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile – MR34908

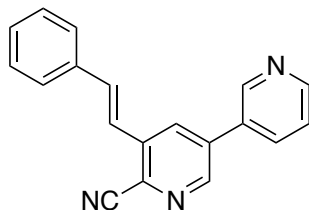
(6-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (241 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried

over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10-100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34908** (205 mg, 44%) as a yellow solid. mp = 168 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.41 min m/z [M+H]⁺: 361.58; IR/cm⁻¹ 3430, 3036, 2924, 2230 (CN), 1744, 1630, 1449, 1361, 1008, 961, 808, 684; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.09 (dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.98 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.89 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, J = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.24 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (dd, J = 8.0, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.85 (dd, J = 8.0, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (ddd, J = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.48–7.46 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.42–7.38 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.37–7.33 (m, 1 H, Ar-H), 7.25 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 151.9 (Pyr-H), 151.6 (C_q-Pyr), 149.9 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.2 (Pyr-CH), 138.2 (C_q-Pyr), 137.9 (Pyr-CH), 136.0 (C_q-Ar), 134.5 (Pyr-CH), 134.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.8 (C_q-Pyr), 133.2 (C_q-Pyr), 133.0 (Pyr-CH), 132.7 (C_q-CN), 132.5 (C_q-Pyr), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.9 (Ar-CH), 128.0 (Pyr-CH), 126.9 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 123.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 117.2 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{24}H_{16}N_4$ [M+H]⁺: 361.1453; Found: 361.1451.

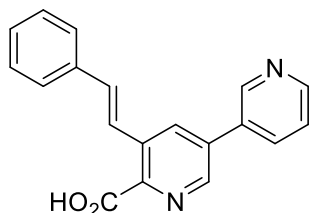
(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carbonitrile – MR34909

(5-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (237 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried

over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10-100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carbonitrile **MR34909** (282 mg, 60%) as a yellow solid. mp = 164 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.18 min m/z [M+H]⁺: 361.58; IR/cm⁻¹ 3429, 3058, 2233 (CN), 1560, 1493, 1459, 1415, 1380, 1215, 1024, 967, 906, 805, 750, 708; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.14 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.98 (dd, J = 2.3, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.97 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.88 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.75 (dd, J = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.39 (t, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.25 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, J = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (ddd, J = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.47–7.45 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.41–7.37 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36–7.32 (m, 1 H, Ar-H), 7.26 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.09 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 153.6 (Pyr-CH), 151.8 (Pyr-CH), 151.1 (C_q-Pyr), 149.9 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.2 (Pyr-CH), 140.1 (Pyr-CH), 135.9 (C_q-Ar), 135.4 (C_q-Pyr), 134.5 (Pyr-CH), 134.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.8 (C_q-Pyr), 133.0 (Pyr-CH), 132.6 (C_q-Pyr), 132.3 (C_q-Pyr), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.9 (Ar-CH), 126.9 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 123.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.3 (CN), 110.0 (C_q-CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{24}H_{16}N_4$ [M+H]⁺: 361.1453; Found: 361.1454.

(E)-5-Styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34910

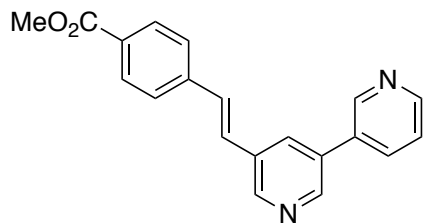
(*E*)-Styrylboronic acid (711 mg, 4.81 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. Na₂CO₃ (1.02 g, 9.60 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (220 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34988** (1.00 g, 3.84 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (100 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (100 mL) was added followed by EtOAc (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (40% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34910** (940 mg, 87%) as a white solid. mp = 186 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.50 min *m/z* [M+H]⁺: 284.48; IR/cm⁻¹ 3429, 3057, 3026, 2925, 2223 (CN), 1637, 1592, 1576, 1449, 1424, 1202, 1024, 962, 802, 734, 682, 529; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (dd, *J* = 2.4, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.77 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.98 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.64–7.61 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.51 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.47–7.42 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.41 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.41–7.37 (m, 1 H, Ar-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.7 (Pyr-CH), 137.4 (C_q-Pyr), 136.7 (C_q-Pyr), 136.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 135.3 (C_q-Ar), 134.7 (Pyr-CH), 132.0 (C_q-Pyr), 131.3 (C_q-CN), 130.6 (Pyr-CH), 129.6 (Ar-CH), 129.0 (2 × Ar-CH), 127.4 (2 × Ar-CH), 124.0 (Pyr-CH), 120.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.2 (CN); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₉H₁₃N₃ [M+H]⁺: 284.1188; Found: 284.1188.

(E)-5-Styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylic acid – MR34911

(*E*)-5-Styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34910** (300 mg, 1.06 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 12 mL) and MeOH (18 mL) at 100 °C during 24 h. The reaction mixture was acidified by HCl (3N) until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered and dried to afford (*E*)-5-styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylic acid **MR34911** (151 mg, 47%) as a white solid. mp = 110 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.47 min *m/z* [M+H]⁺: 303.47; IR/cm⁻¹ 3423, 3067, 2420, 1630, 1598, 1493, 1305, 1193, 1046, 959, 694; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (s, 1 H, Pyr-H), 8.91 (s, 1 H, Pyr-H), 8.69 (d, *J* = 3.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.65 (s, 1 H, Pyr-H), 8.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.72 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.61–7.57 (m, 4 H, 2 × Ar-H, Pyr-CH, Ar-CH=CH-Pyr), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.5 (C=O), 149.8 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.9 (C_q-CO), 145.8 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Ar), 134.9 (Pyr-CH), 134.8 (C_q-Pyr), 133.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.4 (C_q-Pyr), 132.4 (Pyr-CH), 131.8 (C_q-Pyr), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.0 (Pyr-CH), 123.3 (Ar-CH=CH-Pyr).

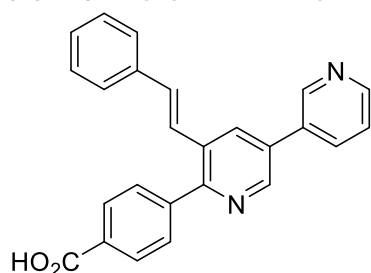
Partie expérimentale

Methyl (*E*)-4-(2-([3,3'-bipyridin]-5-yl)vinyl)benzoate – MR34912



Methyl 4-vinylbenzoate (70.0 mg, 0.43 mmol, 1.00 equiv), aq. sat. K_2CO_3 (119 mg, 0.86 mmol, 2.00 equiv), hexan-2,5-dione (9.0 μ L, 43 μ mol, 0.20 equiv) and palladium(II) acetate (10.0 mg, 10 mol%) were added to a solution of 5-bromo-3,3'-bipyridine **MR27830** (100 mg, 0.43 mmol, 1.00 equiv) in DMF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at 153 °C for 12 h then cooled to rt. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–20% MeOH/ CH_2Cl_2) afforded methyl (*E*)-4-(2-([3,3'-bipyridin]-5-yl)vinyl)benzoate **MR34912** (39.0 mg, 29%) as a yellow solid. mp = 150 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.77 min m/z [M+H]⁺: 317.49; IR/ cm^{-1} 3416, 3026, 2959, 1726, 1606, 1436, 1284, 1174, 1108, 1019, 956, 760, 708; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.88 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.77 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.68 (d, J = 4.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 8.00 (t, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.91 (ddd, J = 8.0, 3.6, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.43 (dd, J = 8.0, 4.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.27 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 3.92 (s, 3 H, CH_3); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.6 (C=O), 149.4 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 147.3 (Pyr-CH), 140.7 (C_q -Ar), 134.4 (Pyr-CH), 133.5 (C_q -Pyr), 133.2 (C_q -Pyr), 132.6 (C_q -Pyr), 131.3 (Pyr-CH), 130.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 130.1 (2 \times Ar-CH), 129.6 (C_q -CO), 126.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 126.5 (2 \times Ar-CH), 123.7 (Pyr-CH), 52.1 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{20}H_{16}N_2O_2$ [M+H]⁺: 317.1290; Found: 317.1301.

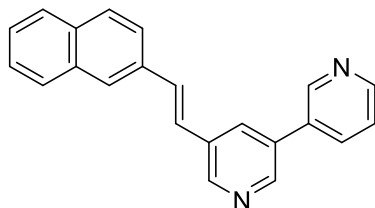
(*E*)-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR34913



4-Boronobenzoic acid (132 mg, 0.81 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (276 mg, 1.30 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (37.5 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (250 mg, 0.65 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was acidified with HCl (3N) until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered and dried to afford (*E*)-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR34913** (72.0 mg, 29%) as a pale yellow solid. mp = 273 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.98 min m/z [M+H]⁺: 379.54; IR/ cm^{-1} 3427, 2925, 2852, 1694, 1633, 1456, 1386, 1262, 1100, 805; ¹H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.15 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.99 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.62 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.34 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.09 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.75 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.61–7.57 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.49 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.29 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.15 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ 167.2 (C=O), 155.0 (C_q -Pyr), 149.4 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 143.2 (C_q -Ar), 136.7 (C_q -Ar), 134.6 (Pyr-CH), 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.4 (2C: Pyr-CH, C_q -Pyr), 132.1 (C_q -Pyr), 131.0 (C_q -CO), 130.8 (C_q -Pyr), 129.9 (2 \times Ar-CH), 129.3 (2 \times Ar-CH), 128.9 (2 \times Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 126.7 (2 \times Ar-CH), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.1 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{25}H_{18}N_2O_2$ [M+H]⁺: 379.1447; Found: 379.1452.

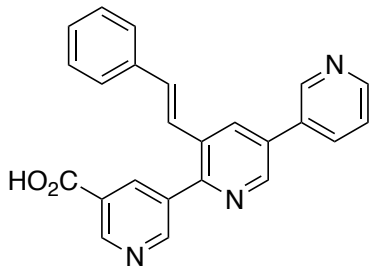
Partie expérimentale

(*E*)-5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine – MR34914

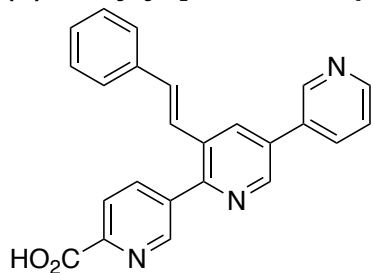


2-Vinylnaphthalene (173 mg, 1.12 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (20.0 μ L, 0.19 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (268 mg, 1.90 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (22.0 mg, 0.10 mmol, 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-3,3'-bipyridine **MR27830** (229 mg, 0.97 mmol, 1.00 equiv) in DMF (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at 130 °C for 12 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through celite, washed with CH_2Cl_2 (10 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **MR34914** (134 mg, 45%) as a pale yellow solid. mp = 137 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.27 min m/z [M+H]⁺: 309.52; IR/cm⁻¹ 3448, 3045, 3013, 1595, 1567, 1433, 1398, 1018, 958, 866, 817, 621, 477; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.92 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.82 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.73 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, J = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.06–8.04 (m, 1 H, Pyr-H), 7.95 (dt, J = 7.9, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.92 (br, s, 1 H, Ar-H), 7.88–7.83 (m, 3 H, 3 \times Ar-H), 7.78 (dd, J = 8.6, 1.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.54–7.49 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.47–7.42 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.28 (d, J = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 149.4 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 146.9 (Pyr-CH), 134.5 (Pyr-CH), 133.8 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Pyr), 133.5 (C_q-Pyr), 133.3 (C_q-Ar), 133.2 (C_q-Pyr), 131.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.1 (Pyr-CH), 128.5 (Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 126.5 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH), 123.2 (Ar-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₂H₁₆N₂ [M+H]⁺: 309.1392; Found: 309.1392.

(*E*)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carboxylic acid – MR34915

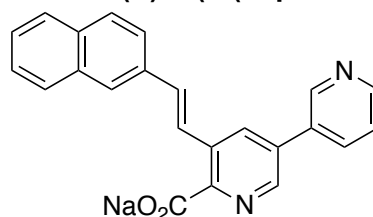


(*E*)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carbonitrile **MR34909** (255 mg, 0.71 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 12 mL) and MeOH (18 mL) at 100 °C during 4 h. The reaction mixture was acidified by HCl (3N) until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered. Purification by flash chromatography (0.1% NH₃, 0–20% MeOH/ CH_2Cl_2) afforded (*E*)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-5-carboxylic acid **MR34915** (246 mg, 91%) as a pale yellow solid. mp = 316 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.72 min m/z [M+H]⁺: 380.53; IR/cm⁻¹ 3435, 3055, 1710, 1575, 1434, 1380, 1262, 1116, 804, 735; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.09 (s, 1 H, Pyr-H), 9.00 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.82 (s, 1 H, Pyr-H), 8.68 (d, J = 3.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.60 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.44 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.36 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.62–7.57 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.53 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.38 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.30 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, Ar-H), 7.16 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5 (C=O), 153.1 (C_q-Pyr), 150.5 (Pyr-CH), 149.9 (Pyr-CH), 149.1 (Pyr-CH), 147.8 (Pyr-CH), 146.4 (Pyr-CH), 137.0 (Pyr-CH), 136.6 (C_q-Ar), 134.4 (Pyr-CH), 133.8 (2C: C_q-CO, C_q-Pyr), 132.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.2 (Pyr-CH), 132.1 (C_q-Pyr), 131.9 (C_q-Pyr), 131.1 (C_q-Pyr), 128.6 (2 \times Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 126.5 (2 \times Ar-CH), 124.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.7 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₄H₁₇N₃O₂ [M+H]⁺: 380.1399; Found: 380.1411.

(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylic acid – MR34916

(E)-3'-Styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34908** (127 mg, 0.35 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 6 mL) and MeOH (9 mL) at 100 °C during 12 h. The reaction mixture was acidified by HCl (3N) until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (E)-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylic acid **MR34916** (60 mg, 46%) as a pale yellow solid. mp = 264 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.70 min m/z [M+H]⁺: 380.40; IR/cm⁻¹ 3434, 1713, 1629, 1560, 1388, 1095, 964, 805; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ

9.15 (dd, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.04 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.91 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.65 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.36 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.20–8.16 (br, s, 2 H, 2 × Pyr-H), 7.63–7.58 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, Ar-H), 7.19 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3 (C=O), 152.5 (C_q-Pyr), 149.7 (Pyr-CH), 149.5 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.8 (Pyr-CH), 139.7 (C_q-CO), 138.1 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Ar), 134.7 (Pyr-CH), 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.6 (Pyr-CH), 132.5 (2 × C_q-Pyr), 132.2 (C_q-Pyr), 131.7 (C_q-Pyr), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 126.9 (2 × Ar-CH), 124.1 (Pyr-CH), 124.1 (2C: Pyr-CH, Ar-CH=CH-Pyr); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₄H₁₇N₃O₂ [M+H]⁺: 380.1399; Found: 380.1406.

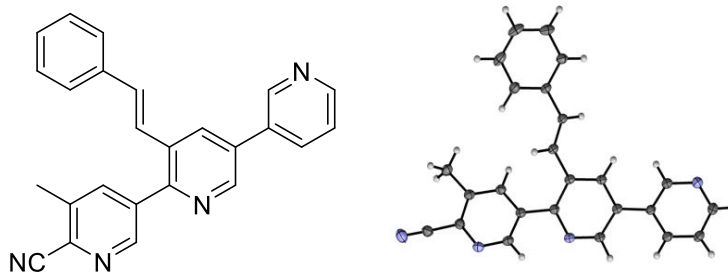
Sodium (E)-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylate – MR34917

(E)-5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34994** (100 mg, 0.30 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 4 mL) and MeOH (6 mL) at 100 °C during 12 h. The reaction mixture was cooled at rt and a precipitate was formed. The precipitate was filtered to afford sodium (E)-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylate **MR34917** (85 mg, 76%) as a pale yellow solid. mp = 365 °C;

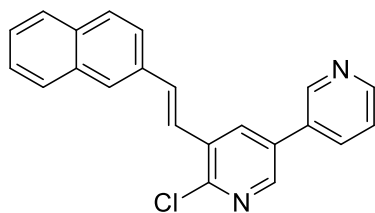
LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.38 min m/z [M+H]⁺: 353.51; IR/cm⁻¹ 3432, 1614, 1595, 1449, 1374, 1234, 970, 814; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.03 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.63 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.46 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.24 (dt, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.98–7.89 (m, 4 H, 4 × Ar-CH), 7.81–7.75 (m, 2 H, Ar-CH=CH-Pyr, Ar-H), 7.61 (d, *J* = 16.5 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.56–7.47 (m, 3 H, Pyr-H, 2 × Ar-H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.7 (C=O), 148.9 (Pyr-CH), 147.8 (Pyr-CH), 145.3 (Pyr-CH), 137.2 (C_q-Pyr), 135.0 (C_q-Ar), 134.4 (Pyr-CH), 133.3 (C_q-Pyr), 133.1 (C_q-Pyr), 132.7 (C_q-Ar), 130.1 (Pyr-CH), 130.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.8 (C_q-Pyr), 128.3 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 127.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 126.6 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 126.1 (Ar-CH), 124.0 (Pyr-CH), 123.7 (Ar-CH).

Partie expérimentale

(*E*)-5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile – MR34918

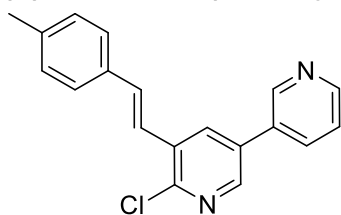


3-Methyl-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)picolinonitrile (159 mg, 0.65 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (276 mg, 1.30 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (30.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (200 mg, 0.52 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34918** (75 mg, 39%) as a pale yellow solid. mp = 181 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.24 min m/z [M+H]⁺: 375.51; IR/cm⁻¹ 3438, 3029, 2233 (CN), 1557, 1449, 1376, 1126, 1025, 974, 917, 808, 750, 709, 693; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.98 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.87 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.85 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, J = 4.9, 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.24 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.06 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (dt, J = 7.9, 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (dd, J = 7.9, 4.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.48–7.45 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.41–7.37 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36–7.32 (m, 1 H, Ar-H), 7.24 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.67 (s, 3 H, CH_3); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 151.8 (C_q -Pyr), 149.8 (Pyr-CH), 149.1 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.1 (Pyr-CH), 138.9 (Pyr-CH), 138.3 (C_q -Pyr), 137.9 (C_q - CH_3), 136.0 (C_q -Ar), 134.5 (C_q -Pyr), 134.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.7 (C_q -Pyr), 133.5 (C_q -CN), 132.9 (Pyr-CH), 132.7 (C_q -Pyr), 132.4 (C_q -Pyr), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.9 (Ar-CH), 126.9 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 123.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.4 (CN), 18.8 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{25}H_{18}N_4$ [M+H]⁺: 375.1610; Found: 375.1605; RX (ORTEP): Monoclinic, $P2_1/c$, a = 20.3375(9) Å, b = 7.3557(3) Å, c = 12.8732(5) Å, α = 90°, β = 100.505(2)°, γ = 90°, V = 1893.51(14) Å³, Z = 2, d = 1.057, μ = 0.06 mm⁻¹, R_{int} = 0.032, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.045, $wR(F^2)$ = 0.129.

(E)-6-Chloro-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine – MR34919

2-Vinylnaphthalene (658 mg, 4.27 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (76.0 μ L, 0.74 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (1.03 g, 7.42 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (83.0 mg, 0.37 mmol, 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **MR36101** (1.00 g, 3.71 mmol, 1.00 equiv) in DMF (15 mL). The reaction mixture was stirred at 130 °C for 1 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through

celite, washed with CH_2Cl_2 (50 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-6-chloro-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **MR34919** (920 mg, 72%) as a pale yellow solid. mp = 195–198 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.52 min m/z [M+H]⁺: 343.45; IR/cm⁻¹ 3433, 2915, 1627, 1421, 1383, 1361, 1085, 963, 819, 758, 697; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.91 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.52 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.20 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.96–7.93 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-H), 7.90–7.84 (m, 3 H, 3 \times Ar-H), 7.81 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.58 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.53–7.50 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.47 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.37 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 149.9 (C_q-Cl), 149.8 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.1 (Pyr-CH), 134.4 (Pyr-CH), 134.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.7 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Ar), 133.1 (C_q-Pyr), 132.8 (Pyr-CH), 132.4 (C_q-Pyr), 132.3 (C_q-Pyr), 128.7 (Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 126.6 (2 \times Ar-CH), 123.8 (Pyr-CH), 123.4 (Ar-CH), 122.9 (Ar-CH=CH-Pyr); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{22}H_{15}ClN_2$ [M+H]⁺: 343.1002; Found: 343.1004.

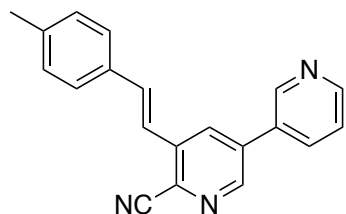
(E)-6-Chloro-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine – MR34920

1-Methyl-4-vinylbenzene (113 μ L, 0.85 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (15.0 μ L, 0.15 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (205 mg, 1.42 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (17.0 mg, 0.074 mmol, 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **MR36101** (200 mg, 0.74 mmol, 1.00 equiv) in DMF (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at 130 °C for 2 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through

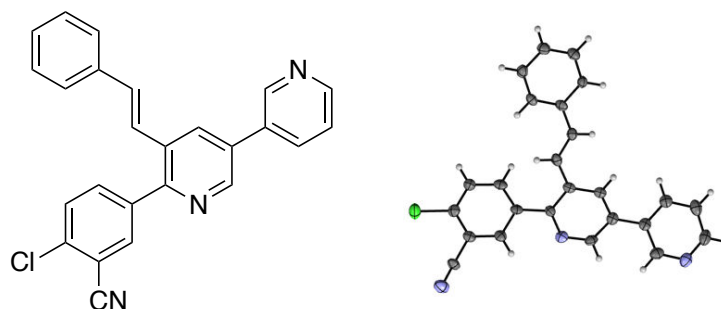
celite, washed with CH_2Cl_2 (20 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (0–40% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-6-chloro-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine **MR34920** (194 mg, 85%) as a pale yellow solid. mp = 165 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.96 min m/z [M+H]⁺: 307.41; IR/cm⁻¹ 3429, 3048, 2921, 1627, 1513, 1423, 1389, 1161, 1088, 1061, 971, 797, 712; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.89 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, J = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.49 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.14 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (ddd, J = 7.9, 2.3, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.49 (d, J = 7.9 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.46 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.41 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, J = 7.9 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.18 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.40 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 149.8 (C_q-Cl), 149.7 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 145.9 (Pyr-CH), 139.0 (C_q-CH₃), 134.4 (Pyr-CH), 133.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.4 (C_q-Ar), 133.0 (C_q-Pyr), 132.7 (C_q-Pyr), 132.5 (2C: Pyr-CH, C_q-Pyr), 129.6 (2 \times Ar-CH), 127.0 (2 \times Ar-CH), 123.8 (Pyr-CH), 121.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 21.4 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{19}H_{15}ClN_2$ [M+H]⁺: 307.1002; Found: 307.1012.

Partie expérimentale

(*E*)-5-(4-Methylstyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34921



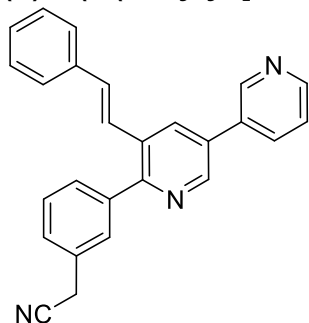
1-Methyl-4-vinylbenzene (117 μL , 0.89 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (16.0 μL , 0.15 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (213 mg, 1.54 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (18.0 mg, 7.7 μmol , 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34988** (200 mg, 0.77 mmol, 1.00 equiv) in DMF (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at 130 $^\circ\text{C}$ for 12 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through celite, washed with CH_2Cl_2 (20 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-(4-methylstyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34921** (42 mg, 18%) as a pale yellow solid. mp = 152 $^\circ\text{C}$; LC-MS (ESI⁺) t_{R} = 5.41 min m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 298.45; IR/ cm^{-1} 3434, 3042, 2918, 2230 (CN), 1635, 1611, 1386, 1180, 1027, 973, 801, 758, 710, 529; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.94 (dd, J = 2.4, 0.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.77 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.76 (m, 1 H, Pyr-H), 8.25 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.98 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.53 (d, J = 8.1 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.52–7.49 (m, 1 H, Pyr-H), 7.45 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.38 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.25 (d, J = 8.1 Hz, 2 H, 2 \times Ar-H), 2.41 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 150.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.5 (Pyr-CH), 140.0 (C_q - CH_3), 137.7 (C_q -Pyr), 136.7 (C_q -CN), 136.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 132.6 (C_q -Ar), 132.0 (C_q -Pyr), 131.2 (C_q -Pyr), 130.5 (Pyr-CH), 129.7 (2 \times Ar-CH), 127.3 (2 \times Ar-CH), 124.0 (Pyr-CH), 119.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.3 (CN), 21.4 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 298.1344; Found: 298.1347.

(E)-2-Chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile – MR34922

(4-Chloro-3-cyanophenyl)boronic acid (295 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 45 min then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-2-chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl) **MR34922** (444 mg, 87%) as a brown solid. mp = 192 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.68 min m/z $[M+H]^+$: 394.51; IR/ cm^{-1} 3427, 2922, 2231 (CN), 1629, 1452, 1428, 1261, 1084, 1063, 1021, 869, 809, 737, 710, 688; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.97 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.84 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Ar-H), 8.10 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.87 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1 H, Ar-H), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar-H), 7.51–7.49 (m, 1 H, Pyr-H), 7.47 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.42–7.38 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36–7.32 (m, 1 H, Ar-H), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.08 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 153.2 (C_q -Pyr), 149.8 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 146.9 (Pyr-CH), 138.8 (C_q -Ar), 137.0 (C_q -Cl), 136.2 (C_q -Ar), 135.2 (Ar-CH), 135.0 (Ar-CH), 134.5 (Pyr-CH), 133.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.4 (C_q -Pyr), 133.0 (Pyr-CH), 132.8 (C_q -Pyr), 131.8 (C_q -Pyr), 129.9 (Ar-CH), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9 (Pyr-CH), 115.7 (CN), 113.7 (C_q -CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{25}H_{16}ClN_3$ $[M+H]^+$: 394.1111; Found: 394.1114; RX (ORTEP): Orthorhombic, $Pca2_1$, a = 23.507(5) Å, b = 3.8826(7) Å, c = 20.822(5) Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°, V = 1900.4(7) Å³, Z = 4, d = 1.377, μ = 0.22 mm⁻¹, R_{int} = 0.094, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.070, $wR(F^2)$ = 0.175.

Partie expérimentale

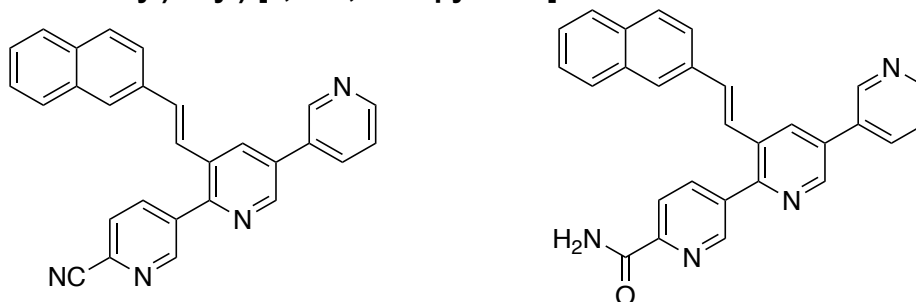
(*E*)-2-(3-(5-Styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)phenyl)acetonitrile – MR34923



2-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)phenyl)acetonitrile (397 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (75.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-2-(3-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)phenyl)acetonitrile **MR34923** (364 mg, 75%) as a yellow solid. mp = 70 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.93 min m/z $[M+H]^+$: 374.53; IR/ cm^{-1} 3412, 2923, 2850, 2242 (CN), 1631, 1584, 1485, 1451, 1417, 1381, 1017, 966, 802, 750, 692; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.98 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.84 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.72 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.22 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.71 (br, s, 1 H, Ar-H), 7.63 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.50–7.46 (m, 4 H, 3 × Ar-H, Pyr-H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33–7.29 (m, 1 H, Ar-H), 7.21 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 3.86 (s, 2 H, CH_2); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 156.0 (C_q -Pyr), 149.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 146.6 (Pyr-CH), 140.3 (C_q -Ar), 136.6 (C_q -Ar), 134.5 (Pyr-CH), 133.2 (C_q -Pyr), 132.6 (C_q -Pyr), 132.5 (Pyr-CH), 132.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.5 (C_q -Pyr), 130.4 (C_q - CH_2), 129.7 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 129.0 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 128.1 (2 × Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 125.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (Pyr-CH), 117.7 (CN), 23.7 (CH_2); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{26}H_{19}N_3$ $[M+H]^+$: 374.1657; Found: 374.1659.

Partie expérimentale

(*E*)-3'-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile – MR34924 and (*E*)-3'-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxamide – MR34925



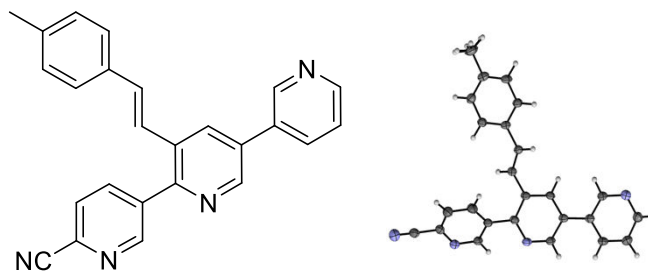
(6-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (136 mg, 0.92 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (393 mg, 1.85 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (43.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **12** (320 mg, 0.74 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 4 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3'-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34924** (100 mg, 33%) as a yellow solid then (*E*)-3'-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxamide **MR34925** (31 mg, 10%) as a brown solid.

MR34924: mp = 206 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.64 min m/z [M+H]⁺: 411.58; IR/cm⁻¹ 3433, 3054, 2920, 2235 (CN), 1627, 1593, 1560, 1422, 1386, 1363, 1010, 961, 813, 711, 477; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.13 (dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.00 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.90 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.76 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.30 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.24 (dd, J = 8.0, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.04 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.87–7.84 (m, 5 H, 4 × Ar-H, Pyr-H), 7.61 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.54–7.49 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.42 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.22 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151.9 (Pyr-CH), 151.6 (C_q-Pyr), 149.9 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.2 (Pyr-CH), 138.2 (C_q-Ar), 138.0 (Pyr-CH), 134.5 (Pyr-CH), 134.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.8 (C_q-Pyr), 133.5 (C_q-Pyr), 133.4 (C_q-Ar), 133.4 (C_q-Ar), 133.3 (C_q-CN), 133.0 (Pyr-CH), 132.7 (C_q-Pyr), 132.5 (C_q-Pyr), 128.8 (Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.8 (Pyr-CH), 126.7 (Ar-CH), 126.7 (Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 123.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.1 (Ar-CH), 117.2 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₈H₁₈N₄ [M+H]⁺: 411.1610; Found: 411.1608.

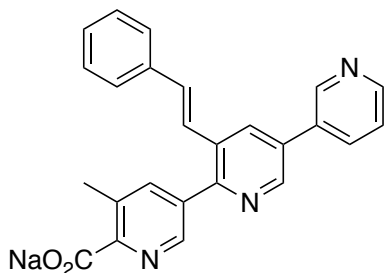
MR34925: mp = 205 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.76 min m/z [M+H]⁺: 429.54; IR/cm⁻¹ 3444, 3198, 3047, 1702, 1590, 1406, 1381, 1012, 801, 704; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.18 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.07 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.90 (dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.38 (ddd, J = 8.0, 2.5, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.28 (dd, J = 8.1, 2.2 Hz, 3 H, Pyr-H, NH₂), 8.21 (dd, J = 8.1, 0.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.03 (s, 1 H, Ar-H), 7.94–7.88 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.78 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.76–7.73 (m, 1 H, Ar-H), 7.61 (ddd, J = 8.0, 4.8, 0.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.55–7.48 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.34 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8 (C=O), 152.4 (C_q-Pyr), 149.8 (C_q-CO), 149.5 (Pyr-CH), 148.9 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.8 (Pyr-CH), 138.4 (Pyr-CH), 137.2 (C_q-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 134.3 (C_q-Ar), 133.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.1 (C_q-Ar), 132.8 (C_q-Ar), 132.7 (Pyr-CH), 132.5 (C_q-Pyr), 132.1 (C_q-Pyr), 131.8 (C_q-Pyr), 128.4 (Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 127.6 (Ar-CH), 127.2 (Ar-CH), 126.6 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0 (Pyr-CH), 123.6 (Ar-CH), 121.7 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₈H₂₀N₄O [M+H]⁺: 429.1715; Found: 429.1699.

Partie expérimentale

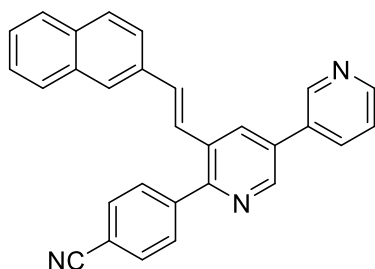
(*E*)-3'-(4-Methylstyryl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile – MR34926



(6-Cyanopyridin-3-yl)boronic acid (118 mg, 0.80 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (340 mg, 1.60 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (37.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine (254 mg, 0.64 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 6 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-3'-(4-methylstyryl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34926** (50 mg, 21%) as a yellow solid. mp = 186 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.30 min m/z [M+H]⁺: 375.56; IR/cm⁻¹ 3431, 3037, 2917, 2232 (CN), 1630, 1563, 1510, 1445, 1363, 1010, 971, 812, 768, 523; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.09 (dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.98 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.87 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.21 (dd, J = 8.0, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, J = 7.9, 2.2, 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.84 (dd, J = 8.0, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.20 (d, J = 8.1 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.04 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.39 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151.9 (Pyr-CH), 151.5 (C_q-Pyr), 149.8 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.0 (Pyr-CH), 139.1 (C_q-CH₃), 138.3 (C_q-Pyr), 137.9 (Pyr-CH), 134.6 (Pyr-CH), 134.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.8 (C_q-Pyr), 133.2 (C_q-Ar), 133.2 (C_q-CN), 132.9 (Pyr-CH), 132.7 (C_q-Pyr), 132.7 (C_q-Pyr), 129.7 (2 × Ar-CH), 128.0 (Pyr-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 122.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 117.2 (CN), 21.3 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₅H₁₈N₄ [M+H]⁺: 375.1610; Found: 375.1612; RX (ORTEP): Monoclinic, $P2_1/c$, a = 13.7248(4) Å, b = 5.4599(2) Å, c = 26.2423(8) Å, α = 90°, β = 91.210(2)°, γ = 90°, V = 1966.06(11) Å³, Z = 8, d = 1.265, μ = 0.08 mm⁻¹, R_{int} = 0.043, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.048, $wR(F^2)$ = 0.125.

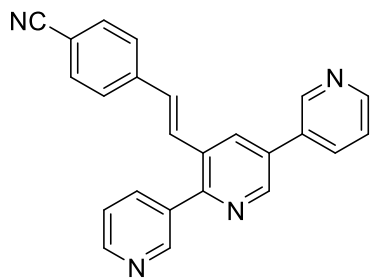
Sodium (*E*)-5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylate – MR34928

(*E*)-5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile **MR34918** (100 mg, 0.27 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 12 mL) and MeOH (18 mL) at 100 °C for 3 days. The reaction mixture was cooled at rt and a precipitate was formed. The precipitate was filtered to afford sodium (*E*)-5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylate **MR34928** (119 mg, quant.) as a grey solid. mp = 353 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.93 min m/z [M+H]⁺: 394.55; IR/cm⁻¹ 3426, 2924, 1615, 1383, 1027, 868, 734; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.12 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.97 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.67 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.57 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.42 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.31 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.74 (s, 1 H, Pyr-H), 7.59–7.51 (m, 4 H, Pyr-H, 2 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.39 (t, J = 7.9 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.30 (t, J = 7.9 Hz, 1 H, Ar-H), 7.19 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.40 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.3 (C=O), 160.8 (C_q-CO), 153.6 (C_q-Pyr), 149.1 (Pyr-CH), 147.8 (Pyr-CH), 146.3 (Pyr-CH), 145.6 (Pyr-CH), 137.9 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Ar), 134.3 (Pyr-CH), 132.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.2 (C_q-Pyr), 132.1 (Pyr-CH), 131.8 (C_q-Pyr), 131.5 (C_q-Pyr), 130.8 (C_q-Pyr), 128.7 (2 × Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.4 (C_q-CH₃), 126.4 (2 × Ar-CH), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.7 (Pyr-CH), 18.5 (CH₃).

(*E*)-4-(5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzotrile – MR34929

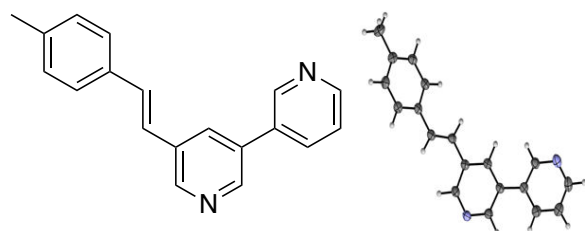
(4-Cyanophenyl)boronic acid (106 mg, 0.72 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K₃PO₄ (308 mg, 1.45 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (34.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **12** (250 mg, 0.58 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 4 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The

organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-4-(5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzotrile **MR34929** (208 mg, 88%) as a pale yellow solid. mp = 205 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.22 min m/z [M+H]⁺: 410.55; IR/cm⁻¹ 3429, 3041, 2914, 2228 (CN), 1623, 1446, 1423, 1381, 1266, 1018, 956, 843, 775, 707, 477; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.00 (dd, J = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.87 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.28 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.03 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.88–7.81 (m, 8 H, 8 × Ar-H), 7.59 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.53–7.48 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.38 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.7 (C_q-Pyr), 149.7 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 146.8 (Pyr-CH), 143.7 (C_q-Ar), 134.5 (Pyr-CH), 133.8 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Pyr), 133.3 (C_q-Ar), 133.2 (C_q-Ar), 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 (C_q-Pyr), 132.7 (Pyr-CH), 132.1 (2 × Ar-CH), 131.9 (C_q-Pyr), 130.5 (2 × Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 127.5 (Ar-CH), 126.7 (Ar-CH), 126.5 (Ar-CH), 124.9 (Ar-CH), 123.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.1 (Pyr-CH), 118.7 (CN), 112.3 (C_q-CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₉H₁₉N₃ [M+H]⁺: 410.1657; Found: 410.1661.

(E)-4-(2-([3,2':5',3''-Terpyridin]-3'-yl)vinyl)benzonitrile – MR34930

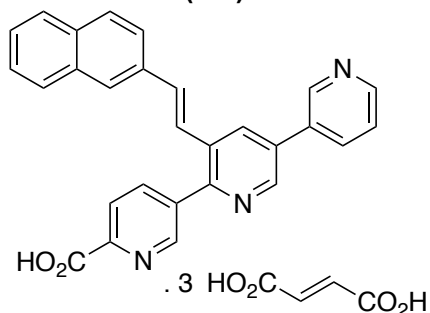
Pyridin-3-ylboronic acid (62.0 mg, 0.51 mmol, 2.30 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (117 mg, 0.55 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (13.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (E)-4-(2-(2,5-dibromopyridin-3-yl)vinyl)benzonitrile **MR34936** (70.0 mg, 0.51 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (20 mL) was added followed by EtOAc (20 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The

organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded (E)-4-(2-([3,2':5',3''-terpyridin]-3'-yl)vinyl)benzonitrile **MR34930** (44 mg, 55%) as a white solid. mp = 213 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.77 min m/z [M+H]⁺: 361.58; IR/cm⁻¹ 3433, 2924, 2850, 2218 (CN), 1640, 1603, 1442, 1388, 1008, 808, 707; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.97 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.91 (d, J = 2.1 Hz, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.74 (dt, J = 4.8, 1.7 Hz, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.23 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (dt, J = 7.9, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (ddd, J = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.51–7.47 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 7.29 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.21 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.2 (C_q-Pyr), 150.5 (Pyr-CH), 149.9 (Pyr-CH), 149.7 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 147.7 (Pyr-CH), 140.7 (C_q-Ar), 137.1 (Pyr-CH), 134.7 (C_q-Pyr), 134.5 (Pyr-CH), 133.0 (C_q-Pyr), 132.8 (C_q-Pyr), 132.8 (Pyr-CH), 132.8 (2 × Ar-CH), 131.0 (C_q-Pyr), 130.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 127.2 (2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 123.4 (Pyr-CH), 118.7 (CN), 111.6 (C_q-CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₄H₁₆N₄ [M+H]⁺: 361.1453; Found: 361.1454.

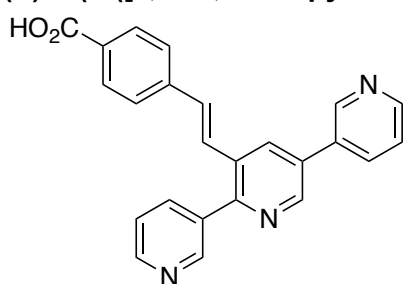
(E)-5-(4-Methylstyryl)-3,3'-bipyridine – MR34931

1-Methyl-4-vinylbenzene (130 μL, 0.98 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (17.0 μL, 0.17 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (235 mg, 1.70 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (20.0 mg, 0.085 mmol, 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-3,3'-bipyridine **MR27830** (200 mg, 0.85 mmol,

1.00 equiv) in DMF (2.5 mL). The reaction mixture was stirred at 130 °C for 1 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through celite, washed with CH_2Cl_2 (20 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (0–100% EtOAc/cyclohexane) afforded (E)-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine **MR34931** (116 mg, 50%) as a white solid. mp = 136 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.70 min m/z [M+H]⁺: 273.50; IR/cm⁻¹ 3425, 3027, 2919, 1637, 1587, 1513, 1443, 1399, 1336, 1015, 968, 808, 709; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.90 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.76 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.70–8.68 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 7.99 (br, s, 1 H, Pyr-H), 7.94 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.47–7.43 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.27–7.20 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (d, J = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.39 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.4 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.9 (Pyr-CH), 146.6 (Pyr-CH), 138.5 (C_q-CH₃), 134.5 (Pyr-CH), 133.6 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Pyr), 133.4 (C_q-Pyr), 133.4 (C_q-Pyr), 131.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 130.9 (Pyr-CH), 129.5 (2 × Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 123.7 (Pyr-CH), 123.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 21.3 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₉H₁₆N₂ [M+H]⁺: 273.1392; Found: 273.1393; RX (ORTEP): Orthorhombic, $Pbca$, a = 7.2839(5) Å, b = 12.0609(10) Å, c = 32.462(2) Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°, V = 2851.8(4) Å³, Z = 8, d = 1.269, μ = 0.08 mm⁻¹, R_{int} = 0.069, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.057, $wR(F^2)$ = 0.138.

(E)-3'-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylic acid compound with fumaric acid (1:3) – MR34932

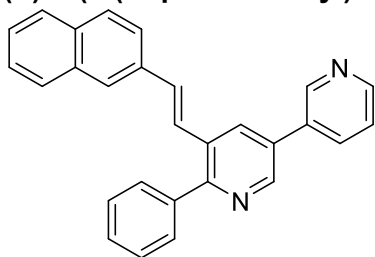
(E)-3'-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carbonitrile (100 mg, 0.27 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 12 mL) and MeOH (25 mL) at 100 °C for 5 days. The reaction mixture was cooled at rt and a precipitate was formed. The precipitate was filtered then fumaric acid (93.0 mg, 0.80 mmol, 3.30 equiv) and propan-2-ol were added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 12 h then cooled to rt. A precipitate was formed and filtered to afford (E)-3'-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,2':5',3''-terpyridine]-6-carboxylic acid compound with fumaric acid (1:3) **MR34932** (191 mg, quant) as a pale yellow solid. mp = 293 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.35 min m/z [M+H]⁺: 430.53; IR/cm⁻¹ 3434, 1706, 1584, 1407, 1190, 980, 811, 677; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 9.16 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.04 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.95 (s, 1 H, Pyr-H), 8.70–8.68 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.36 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.19–8.15 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.02 (s, 1 H, Ar-H), 7.92–7.88 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.76 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.59 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.53–7.49 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.51 (s, 6 H, 3 × CH-CO₂H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 166.8 (3 × (CH-CO₂H)₂), 166.5 (C=O), 152.6 (C_q-Pyr), 149.2 (Pyr-CH), 149.1 (Pyr-CH), 147.9 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 137.7 (Pyr-CH), 136.0 (C_q-CO), 135.9 (C_q-Pyr), 134.5 (3 × (CH-CO₂H)₂), 134.4 (Pyr-CH), 134.1 (C_q-Ar), 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.0 (C_q-Ar), 132.7 (C_q-Pyr), 132.4 (C_q-Pyr), 132.2 (Pyr-CH), 132.0 (C_q-Pyr), 131.5 (C_q-Pyr), 128.2 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 126.8 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 126.1 (Ar-CH), 124.5 (Pyr-CH), 123.7 (Pyr-CH), 123.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4 (Ar-CH);

(E)-4-(2-([3,2':5',3''-Terpyridin]-3'-yl)vinyl)benzoic acid – MR34933

(E)-4-(2-([3,2':5',3''-Terpyridin]-3'-yl)vinyl)benzonitrile **MR34930** (100 mg, 0.27 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 8 mL) and MeOH (12 mL) at 100 °C during 3 days. The reaction mixture was cooled at rt. The reaction mixture was acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (E)-4-(2-([3,2':5',3''-terpyridin]-3'-yl)vinyl)benzoic acid **MR34933** (97 mg, 96%) as a white solid. mp = 343 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.25 min m/z [M+H]⁺: 380.53; IR/cm⁻¹ 3431, 2920, 1697, 1633, 1607, 1446, 1386, 1279, 1082, 801, 758; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.15 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.04 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.83 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.70–8.68 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.66 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.35 (dt, J = 8.0, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (dt, J = 7.9, 2.2, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.92 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.65 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.61–7.57 (m, 4 H, 2 × Ar-H, 2 × Pyr-H), 7.27 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 167.2 (C=O), 153.5 (C_q-Pyr), 150.0 (Pyr-CH), 149.6 (Pyr-CH), 149.5 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 147.0 (Pyr-CH), 140.4 (C_q-Ar), 137.1 (Pyr-CH), 134.8 (C_q-Pyr), 134.7 (C_q-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 132.7 (Pyr-CH), 132.2 (C_q-Pyr), 132.2 (C_q-CO), 132.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2 (C_q-Pyr), 129.9 (2 × Ar-CH), 126.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 126.4 (2 × Ar-CH), 124.1 (Pyr-CH), 123.5 (Pyr-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₄H₁₇N₃O₂ [M+H]⁺: 380.1399; Found: 380.1381.

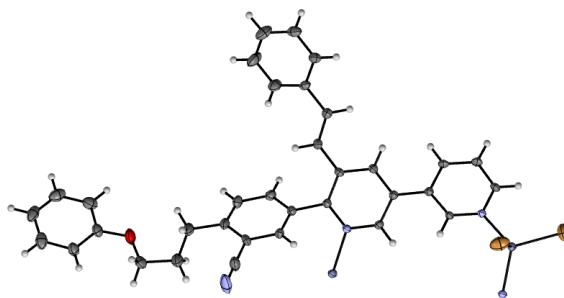
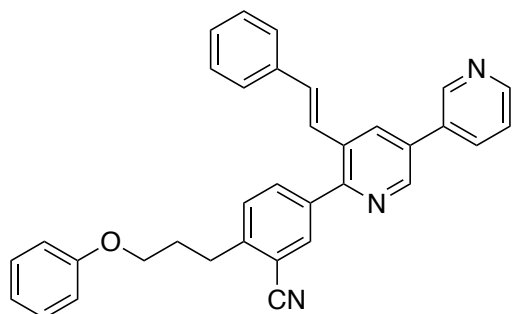
Partie expérimentale

(*E*)-5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-6-phenyl-3,3'-bipyridine – MR34934



Phenylboronic acid (88.0 mg, 0.72 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (308 mg, 1.45 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (34.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **12** (250 mg, 0.58 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion

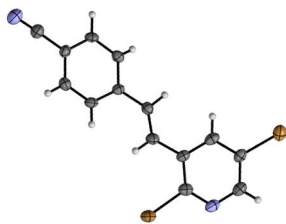
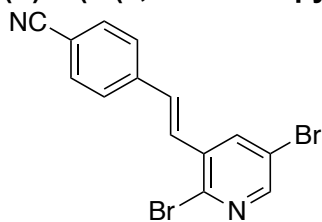
was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-6-phenyl-3,3'-bipyridine **MR34934** (97 mg, 43%) as a white solid. mp = 162 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.95 min m/z [M+H]⁺: 385.55; IR/cm⁻¹ 3431, 3051, 1627, 1583, 1445, 1383, 1279, 1018, 969, 913, 806, 738, 697, 430; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.86 (s, 1 H, Pyr-H), 8.74 (s, 1 H, Pyr-H), 8.25 (s, 1 H, Pyr-H), 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.85–7.79 (m, 4 H, 4 × Ar-H), 7.75–7.73 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, Ar-H), 7.56–7.45 (m, 6 H, 6 × Ar-H), 7.37 (d, J = 16.5 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.33 (d, J = 16.5 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 157.1 (C_q-Pyr), 149.3 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 139.2 (C_q-Ar), 134.4 (Pyr-CH), 134.2 (C_q-Ar), 133.5 (C_q-Ar), 133.2 (C_q-Ar), 132.2 (Pyr-CH), 132.1 (C_q-Pyr), 131.7 (2C: Ar-CH=CH-Pyr, C_q-Pyr), 131.4 (C_q-Pyr), 129.8 (2 × Ar-CH), 128.6 (Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 128.4 (2 × Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.7 (Ar-CH), 127.2 (Ar-CH), 126.5 (Ar-CH), 126.2 (Ar-CH), 126.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9 (Pyr-CH), 123.3 (Ar-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{28}H_{20}N_2$ [M+H]⁺: 385.1705; Found: 385.1707.

(E)-2-(3-Phenoxypropyl)-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile – MR34935

SPhos (52.0 mg, 0.13 mmol, 0.20 equiv) and palladium(II) acetate (14.0 mg, 10 mol%) were added to a solution of (*E*)-2-chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile **MR34922** (250 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv) in THF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 min then (3-phenoxypropyl)zinc(II) bromide (2.5 mL, 1.25 mmol, 2.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h then concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-2-(3-phenoxypropyl)-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile **MR34935** (174 mg, 56%) as a yellow solid. mp = 118 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.68 min m/z [M+H]⁺: 494.60; IR/cm⁻¹ 3432, 2927, 2225 (CN), 1630, 1600, 1426, 1259, 1110, 1028, 805, 687; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.98 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.68 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.60 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.35 (ddd, J = 8.0, 2.4, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Ar-H), 7.87 (dd, J = 8.0, 1.9 Hz, 1 H, Ar-H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ar-H), 7.60–7.58 (m, 1 H, Pyr-H), 7.57 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.51 (d, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.32–7.26 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.14 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.94–6.91 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 4.04 (t, J = 6.2 Hz, 2 H, OCH₂CH₂CH₂), 3.08–3.05 (m, 2 H, OCH₂CH₂CH₂), 2.18–2.14 (m, 2 H, OCH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.5 (C_q-O), 153.7 (C_q-Pyr), 149.4 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 145.3 (C_q-Ar), 137.9 (C_q-Ar), 136.7 (Pyr-CH), 134.8 (Pyr-CH), 134.3 (Ar-CH), 133.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 (C_q-Ar), 132.6 (C_q-Pyr), 132.2 (C_q-Pyr), 132.1 (C_q-Pyr), 131.1 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 129.5 (2 × Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 126.7 (2 × Ar-CH), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.1 (Pyr-CH), 120.6 (Ar-CH), 117.7 (CN), 114.4 (2 × Ar-CH), 111.7 (C_q-CN), 66.4 (OCH₂), 30.2 (OCH₂CH₂), 29.4 (OCH₂CH₂CH₂); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₃₄H₂₇N₃O [M+H]⁺: 494.223; Found: 494.2229; RX (ORTEP): Monoclinic, *P*2₁/*c*, a = 11.7174(10) Å, b = 12.8520(12) Å, c = 22.193(2) Å, α = 90°, β = 103.865(3)°, γ = 90°, V = 3244.7(5) Å³, Z = 4, d = 1.719, μ = 4.49 mm⁻¹, R_{int} = 0.041, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.078, $wR(F^2)$ = 0.255.

Partie expérimentale

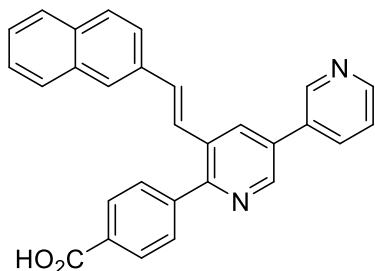
(E)-4-(2-(2,5-Dibromopyridin-3-yl)vinyl)benzonnitrile – MR34936



Diethyl (4-cyanobenzyl)phosphonate (574 mg, 2.27 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of 2,5-dibromonicotinaldehyde (500 mg, 1.89 mmol, 1.0 equiv) in THF (10 mL). A solution of potassium *tert*-butoxide (277 mg, 2.27 mmol, 1.2 equiv) in THF (10 mL). The reaction mixture was

stirred at 25°C for 2 h then concentrated under reduce pressure. Water (25 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (100% EtOAc) afforded (*E*)-4-(2-(2,5-dibromopyridin-3-yl)vinyl)benzonnitrile **MR34936** (603 mg, 88%) as a yellow solid with 5% of (*Z*)-4-(2-(2,5-dibromopyridin-3-yl)vinyl)benzonnitrile (determined by ¹H NMR). mp = 177 °C; LC-MS t_R = 5.77 min; IR/cm⁻¹ 3428, 2924, 2228 (CN), 1630, 1597, 1403, 1379, 1323, 1266, 1112, 1044 868, 818, 534; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.04 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.71–7.69 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.65–7.63 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.39 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.07 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.9 (Pyr-CH), 141.5 (C_q-Br), 140.2 (C_q-Ar), 136.8 (Pyr-CH), 135.1 (C_q-Pyr), 132.7 (2 × Ar-CH), 132.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 127.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 127.5 (2 × Ar-CH), 120.1 (C_q-Br), 118.6 (CN), 112.1 (C_q-CN); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₄H₈Br₂N₂ [M+H]⁺: 362.9132; Found: 362.9128; RX (ORTEP): Trigonal, *R*₃:*R*, *a* = 18.0640(17) Å, *c* = 18.0640(17) Å, α = 118.303(3)°, *V* = 1976.3(6) Å³, *Z* = 6, *d* = 1.835, μ = 6.13 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.093, *R*[*F*²>2σ(*F*²)] = 0.044, *wR*(*F*²) = 0.077.

(E)-4-(5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR34937

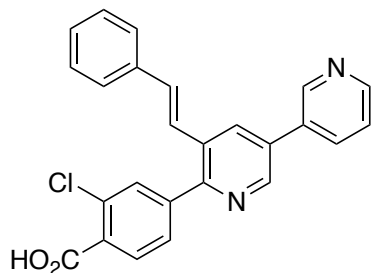


(*E*)-4-(5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonnitrile **MR34929** (126 mg, 0.31 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 4 mL) and MeOH (6 mL) at 100 °C during 2 days. The reaction mixture was cooled at rt. The reaction mixture was acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (*E*)-4-(5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR34937** (129 mg, 97%) as a pale yellow solid. mp = 380 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.18 min *m/z* [M+H]⁺: 429.54; IR/cm⁻¹ 3431,

2922, 2850, 1640, 1559, 1422, 1078, 1046, 808, 757; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.14 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.68 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.61 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.33 (dt, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.97 (s, 1 H, Ar-H), 7.91–7.87 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.70 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.64 (dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 1 H, Ar-H), 7.59–7.57 (m, 3 H, 2 × Ar-H, Pyr-H), 7.53–7.48 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.6 (C=O), 156.3 (C_q-Pyr), 149.0 (Pyr-CH), 147.8 (Pyr-CH), 146.1 (Pyr-CH), 140.8 (C_q-CO), 138.9 (C_q-Ar), 134.3 (C_q-Ar), 134.3 (Pyr-CH), 133.0 (C_q-Ar), 132.6 (C_q-Ar), 132.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.9 (C_q-Pyr), 131.7 (Pyr-CH), 131.2 (C_q-Pyr), 130.5 (C_q-Pyr), 128.6 (2 × Ar-CH), 128.4 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 126.6 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 126.0 (Ar-CH), 125.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.7 (Pyr-CH), 123.2 (Ar-CH); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₉H₂₀N₂O₂ [M+H]⁺: 429.1603; Found: 429.1585.

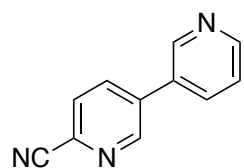
Partie expérimentale

(*E*)-2-Chloro-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR34938

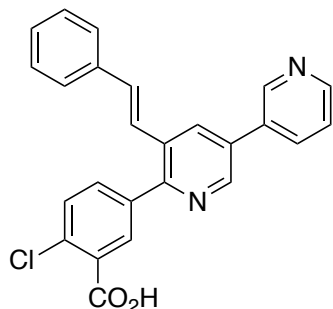


4-Borono-2-chlorobenzoic acid (163 mg, 0.81 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (345 mg, 1.63 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (38.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (250 mg, 0.65 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The aqueous layer was acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (*E*)-2-chloro-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR34938** (221 mg, 82%) as a white solid. mp = 214 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.68 min m/z [M+H]⁺: 413.50; IR/cm⁻¹ 3430, 1717, 1627, 1598, 1376, 1296, 1262, 1192, 1125, 1045, 928, 737, 686; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.14 (s, 1 H, Pyr-H), 9.00 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.67 (d, J = 4.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.61 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.34 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Ar-H), 7.75 (d, J = 1.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.63 (dd, J = 7.9, 1.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.60–7.57 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.53 (d, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, Ar-H), 7.17 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8 (C=O), 153.5 (C_q-Pyr), 149.4 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 142.4 (C_q-Ar), 136.7 (C_q-Ar), 134.7 (Pyr-CH), 134.0 (C_q-CO, determined by HMBC), 132.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.6 (Pyr-CH), 132.3 (C_q-Pyr), 132.1 (C_q-Pyr), 131.4 (C_q-Cl), 131.3 (C_q-Pyr), 131.2 (Ar-CH), 130.5 (Ar-CH), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0 (Pyr-CH); (ESI) m/z Calcd. for C₂₅H₁₇ClN₂O₂ [M+H]⁺: 413.1057; Found: 413.1069.

[3,3'-Bipyridine]-6-carbonitrile – MR34939



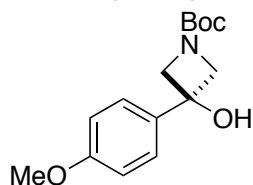
Side product from the synthesis of **MR34921**. Yellow solid. mp = 137 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 2.87 min m/z [M+H]⁺: 182.37; IR/cm⁻¹ 3427, 3031, 2920, 2232 (CN), 1637, 1553, 1470, 1373, 1343, 1002, 809, 711; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.89 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.75 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.05 (dd, J = 8.1, 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.84 (dd, J = 8.1, 0.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.49 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.5 (Pyr-CH), 149.4 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Pyr), 135.1 (Pyr-CH), 134.6 (Pyr-CH), 133.2 (C_q-CN), 131.7 (C_q-Pyr), 128.6 (Pyr-CH), 124.0 (Pyr-CH), 117.0 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₁H₇N₃ [M+H]⁺: 182.0718; Found: 182.0719.

(E)-2-Chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR34940

(E)-2-Chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzonitrile **MR34922**

(64 mg, 0.16 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 6 mL) and MeOH (18 mL) at 100 °C during 5 days. The reaction mixture was cooled at rt. The reaction mixture was acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (E)-2-chloro-5-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR34940** (25 mg, 38%) as a white solid. mp = 317 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.63 min m/z [M+H]⁺: 413.46; IR/cm⁻¹ 3432, 1710, 1640, 1567, 1412, 1021, 809, 644; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.01 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.82 (d, J =

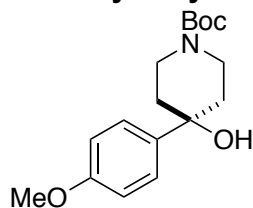
2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.64 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.53 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.31 (ddd, J = 8.0, 2.3, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.75 (t, J = 1.2 Hz, 1 H, Ar-H), 7.63 (ddd, J = 8.0, 4.9, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.54 (d, J = 1.2 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.52–7.50 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.42 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.34 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.28–7.24 (m, 1 H, Ar-H), 7.19 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 174.7 (C=O), 156.9 (C_q-Pyr), 149.8 (Pyr-CH), 148.6 (Pyr-CH), 147.0 (Pyr-CH), 142.3 (C_q-CO), 138.7 (C_q-Cl), 138.2 (C_q-Ar), 136.9 (Pyr-CH), 135.0 (C_q-Pyr), 134.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 134.1 (Pyr-CH), 133.9 (C_q-Pyr), 133.5 (C_q-Pyr), 131.1 (C_q-Ar), 130.6 (3 × Ar-CH), 129.8 (2 × Ar-CH), 129.3 (Ar-CH), 128.0 (2 × Ar-CH), 125.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 125.7 (Pyr-CH).

tert-Butyl 3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)azetidone – MR34941

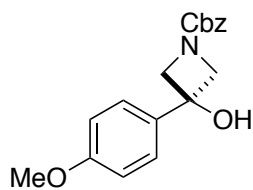
n-BuLi (2.19 M solution in THF, 2.97 mL, 6.50 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 4-bromoanisole (814 μL, 6.5 mmol, 1.3 equiv) in THF (20 mL) at –78 °C. The reaction mixture was stirred at –78 °C for a further 30 min. 1-Boc-3-azetidinone (856 mg, 5.00 mmol, 1.0 equiv) in THF (3 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at –78 °C the reaction mixture was

warmed to rt then quenched with water (20 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et₂O (3 × 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidinol **MR34941** (999 mg, 72%) as a white solid. R_f = 0.30 (30% EtOAc/hexane); mp = 86–88 °C; IR (film)/cm⁻¹ 3402 (br, OH), 2976, 1670 (C=O), 1513, 1460, 1398, 1367, 1153, 1166, 1119, 1101, 1048, 1031, 872, 854, 836, 807, 776; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43–7.36 (m, 2 H, 2 × Ar-CH), 6.95–6.88 (m, 2 H, 2 × Ar-CH), 4.23 (d, J = 9.2 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.14 (d, J = 9.2 Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 3.02 (br, s, 1 H, OH), 1.45 (s, 9 H, 3 × CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.3 (Ar-C_q-OCH₃), 156.6 (C=O), 135.5 (Ar-C_q), 126.1 (2 × Ar-CH), 114.1 (2 × Ar-CH), 80.0 (C-(CH₃)₃), 71.3 (C_q), 64.4 (2 × CH₂), 55.5 (OCH₃), 28.5 (3 × CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₅H₂₁NO₄ [M+H]⁺: 280.1556; Found: 280.1549. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁶

¹⁵⁶King, D.; Thompson, L. A.; Shi, J.; Thangathirupathy, S.; Islam, I.; Macor, J. E. Selective NR_{2B} antagonists. U.S. Patent 201501911452A1, Jul 9, 2015.

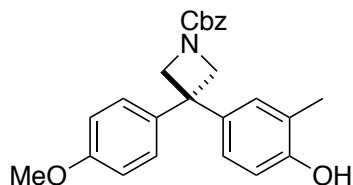
tert-Butyl 4-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)piperidine-1-carboxylate – MR34942

n-BuLi (2.38 M solution in THF, 2.73 mL, 6.5 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 4-bromoanisole (814 μ L, 6.5 mmol, 1.3 equiv) in THF (20 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for a further 30 min. 1-Boc-3-piperidinone (996 mg, 5.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (3 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (20 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et₂O (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10% EtOAc/hexane to 20% EtOAc/hexane) afforded piperidinol **MR34942** (993 mg, 65%) as a white solid. R_f = 0.32 (30% EtOAc/hexane); mp = 115 °C; IR (film)/cm⁻¹ 3438 (br, OH), 2955, 1655 (C=O), 1512, 1420, 1360, 1281, 1248, 1214, 1160, 1136, 1101, 1041, 1030, 967, 829; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, J = 8.8 Hz, 2 H, 2 \times Ar-CH), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 2 H, 2 \times Ar-CH), 3.99 (br, s, 2 H, CHHNCHH), 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 3.24 (br, s, 2 H, CHHNCHH), 1.96 (br, s, 2 H, CHHCCHH), 1.75–1.72 (m, 2 H, CHHCCHH), 1.66 (br, s, 1 H, OH), 1.48 (s, 9 H, 3 \times CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.8 (Ar-C_q-OCH₃), 155.0 (C=O), 140.3 (Ar-C_q), 125.8 (2 \times Ar-CH), 113.9 (2 \times Ar-CH), 79.6 (C-(CH₃)₃), 71.2 (C_q), 55.4 (OCH₃), 40.1 (2 \times CH₂), 38.3 (2 \times CH₂), 28.6 (3 \times CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₇H₂₆NO₄ [M+H]⁺: 308.1862; Found: 308.1859. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁷

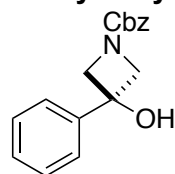
Benzyl 3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)azetidine-1-carboxylate – MR34943

n-BuLi (2.19 M solution in THF, 2.97 mL, 6.50 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 4-bromoanisole (814 μ L, 6.50 mmol, 1.3 equiv) in THF (20 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for a further 30 min. 1-Cbz-3-azetidinone (1.03 g, 5.00 mmol, 1.0 equiv) in THF (3 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (20 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et₂O (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidinol **MR34943** (505 mg, 32%) as a white solid. R_f = 0.30 (30% EtOAc/hexane); mp = 80–82 °C; IR (film)/cm⁻¹ 3308 (br, OH), 1674 (C=O), 1657, 1517, 1458, 1438, 1357, 1249, 1177, 1106, 1026, 949, 827, 756, 702; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41–7.37 (m, 2 H, 2 \times Ar-CH), 7.37–7.30 (m, 5 H, 5 \times Ar-CH), 6.95–6.87 (m, 2 H, 2 \times Ar-CH), 5.11 (s, 2 H, CH₂-Ph), 4.32 (d, J = 9.2 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.23 (d, J = 9.2 Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.81 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.4 (Ar-C_q-OCH₃), 156.8 (C=O), 136.6 (Ar-C_q), 135.2 (Ar-C_q), 128.6 (2 \times Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 128.1 (2 \times Ar-CH), 126.1 (2 \times Ar-CH), 114.2 (2 \times Ar-CH), 71.7 (C_q), 67.1 (CH₂-Ph), 64.5 (2 \times CH₂), 55.5 (OCH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₈H₁₉NO₄ [M+H]⁺: 314.1392; Found: 314.1396.

¹⁵⁷Davidson, R.; Hsu, Y.-T.; Batchelor, T.; Yufit, D.; Beeby, A. The Use of Organolithium Reagents for the Synthesis of 4-Aryl-2-Phenylpyridines and Their Corresponding Iridium(III) Complexes. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (28), 11496–11507.

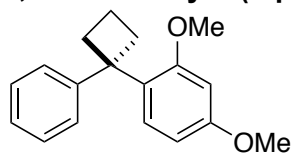
Benzyl 3-(4-hydroxy-3-methylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)azetidone -1-carboxylate – MR34944

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (7.5 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (4.8 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidone **MR34943** (78 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) and 2-methylphenol (135 mg, 1.25 mmol, 5.0 equiv) in CH_2Cl_2 (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (15 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (15 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3×15 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc /hexane) afforded azetidone **MR34944** (83 mg, 82%) as a white solid. $R_f = 0.37$ (30% EtOAc /hexane); mp = 148 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3309 (br, OH), 2958, 1676 (C=O), 1609, 1509, 1421, 1354, 1247, 1179, 1117, 1026, 827, 697; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41–7.29 (m, 5 H, $5 \times \text{Ar-CH}$), 7.13–7.06 (m, 2 H, $2 \times \text{Ar-CH}$), 6.92 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, Ar-CH), 6.89–6.84 (m, 2 H, $2 \times \text{Ar-CH}$), 6.83 (dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1 H, Ar-CH), 6.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, Ar-CH), 5.68 (s, 1 H, OH), 5.14 (s, 2 H, CH_2), 4.58 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 2.22 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.3 (Ar- C_q - OCH_3), 156.7 (C=O), 153.0 (Ar- C_q -OH), 138.5 (Ar- C_q), 138.0 (Ar- C_q), 136.6 (Ar- C_q), 129.3 (Ar-CH), 128.6 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 128.2 (Ar-CH), 128.2 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 127.8 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 125.2 (Ar-CH), 124.3 (Ar- C_q - CH_3), 114.9 (Ar-CH), 114.0 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 67.1 (CH_2 -Ph), 63.9 (CH_2), 63.2 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 45.0 (C_q), 16.1 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 404.1867; Found: 404.1862.

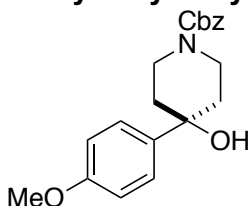
Benzyl 3-hydroxy-3-phenylazetidone-1-carboxylate – MR34945

$n\text{-BuLi}$ (2.19 M solution in THF, 5.90 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of bromobenzene (1.37 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for a further 30 min. 1-Cbz-3-azetidone (2.05 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (20 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et_2O (3×30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc /hexane) afforded azetidone **MR34945** (975 mg, 34%) as a white solid. $R_f = 0.36$ (30% EtOAc /hexane); mp = 136–137 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3284 (br, OH), 2962, 1670 (C=O), 1653 (C=O), 1476, 1456, 1439, 1361, 1241, 1195, 1017, 1118, 948, 761, 750, 700; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.54–7.29 (m, 10 H, $10 \times \text{Ar-CH}$), 5.13 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.35 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.26 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.01 (s, 1 H, OH); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (C=O), 142.8 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 128.7 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 128.5 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 128.1 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 128.0 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 124.5 ($2 \times \text{Ar-CH}$), 71.7 (C_q), 66.9 (CH_2 -Ph), 64.4 ($2 \times \text{CH}_2$); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 284.1293; Found: 284.1287. The observed characterisation data (^1H , ^{13}C NMR) was consistent with that previously reported in the literature.¹⁵⁸

¹⁵⁸Lee, Y. J.; Ling, R.; Mariano, P. S.; Yoon, U. C.; Kim, D. U.; Oh, S. W. Exploratory Studies of H-Atom Abstraction and Silyl-Transfer Photoreactions of Silylalkyl Ketones and (Silylalkyl)phthalimides. *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (10), 3304–3314.

2,4-Dimethoxy-1-(1-phenylcyclobutyl)benzene – MR34946

FeCl₃ (4.0 mg, 0.05 mmol) was added to a solution of 1-phenylcyclobutan-1-ol (74 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) and 1,3-dimethoxybenzene (0.20 mL, 3.0 mmol, 3.0 equiv) in CH₂Cl₂ (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO₃ (30 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (5–10% CH₂Cl₂/pentane) afforded impure product. Second purification by flash chromatography (10% CH₂Cl₂/pentane) cyclobutane **MR34946** (12 mg, 9%) as a white solid. *R*_f = 0.60 (20% CH₂Cl₂/pentane); mp = 73–74 °C; IR (film)/cm⁻¹ 2943, 1608, 1583, 1499, 1458, 1436, 1414, 1318, 1255, 1208, 1155, 1139, 1027, 838, 758; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43–7.40 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.28–7.24 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.14–7.10 (m, 1 H, Ar-H), 6.49 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.36 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 3.79 (s, 3 H, OCH₃), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 2.77–2.62 (m, 4 H, CH₂CH₂CH₂), 2.04–1.96 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂), 1.90–1.81 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.2 (Ar-C_q-OCH₃), 158.0 (Ar-C_q-OCH₃), 148.6 (Ar-C_q), 130.8 (Ar-C_q), 127.7 (2 × Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.4 (2 × Ar-CH), 125.0 (Ar-CH), 103.5 (Ar-CH), 99.3 (Ar-CH), 55.3 (OCH₃), 55.0 (OCH₃), 49.3 (C_q), 34.8 (CH₂CH₂CH₂), 17.2 (CH₂CH₂CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₂₀O₂ [M+H]⁺: 269.1536; Found: 269.1527.

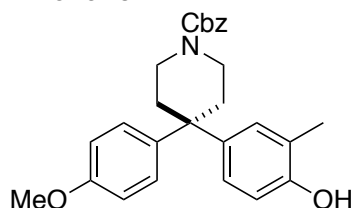
Benzyl 4-hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)piperidine-1-carboxylate – MR34947

n-BuLi (2.19 M solution in THF, 5.9 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 4-bromoanisole (1.63 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at –78 °C. The reaction mixture was stirred at –78 °C for a further 30 min. 1-Cbz-3-piperidinone (2.33 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at –78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et₂O (3 × 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded piperidinol **MR34947** (1.83 g, 54%) as a white solid. *R*_f = 0.34 (30% EtOAc/hexane); mp = 103–104 °C (*litt.* 102–104 °C);¹⁵⁹ IR (film)/cm⁻¹ 3447 (OH), 2956, 1669 (C=O), 1513, 1471, 1427, 1275, 1246, 1216, 1176, 1072, 1022, 923, 825, 730, 694; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41–7.33 (m, 7 H, 7 × Ar-CH), 6.92–6.88 (m, 2 H, 2 × Ar-CH), 5.15 (s, 2 H, CH₂-Ph), 4.10 (s, 2 H, CHHNCHH), 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 3.34 (s, 2 H, CHHNCHH), 1.98 (s, 2 H, CHHCCHH), 1.76 (d, *J* = 13.2 Hz, 2 H, CHHCCHH), 1.68 (s, 1 H, OH); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.7 (Ar-C_q-OCH₃), 155.3 (C=O), 140.0 (Ar-C_q), 136.8 (Ar-C_q), 128.5 (2 × Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 127.9 (2 × Ar-CH), 125.6 (2 × Ar-CH), 113.7 (2 × Ar-CH), 71.0 (C_q), 67.1 (CH₂-Ph), 55.3 (OCH₃), 40.2 (2 × CH₂), 38.0 (2 × CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₂₀H₂₃NO₄ [M+H]⁺: 324.1594; Found: 324.1596.

¹⁵⁹Haradahira, T.; Maeda, J.; Okauchi, T.; Zhang, M.-R.; Hojo, J.; Kida, T.; Arai, T.; Yamamoto, F.; Sasaki, S.; Maeda, M.; Suzuki, K.; Suhara, T. Synthesis, *in Vitro* and *in Vivo* Pharmacology of a C-11 Labeled Analog of CP-101,606, (+/-)Threo-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-[4-Hydroxy-4-(P-[¹¹C]methoxyphenyl)piperidino]-1-Propanol, as a PET Tracer for NR₂B Subunit-Containing NMDA Receptors. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, 29 (5), 517–525.

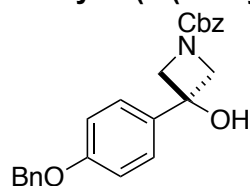
Partie expérimentale

Benzyl 4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) piperidine-1-carboxylate – MR34948

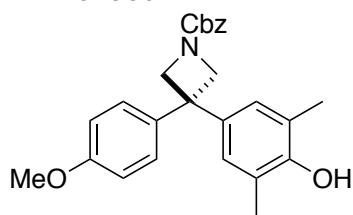


Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (7.5 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (4.8 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of piperidinol **MR34947** (85 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) and 2-methylphenol (81 mg, 0.75 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (15 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (15 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 15 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded piperidine **MR34948** (45 mg, 40%) as a white solid. R_f = 0.41 (30% EtOAc/hexane); mp = 93 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3329 (br, OH), 2932, 1667 (C=O), 1608, 1509, 1438, 1351, 1245, 1181, 1107, 1029, 816, 697; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36–7.30 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.16–7.12 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.95 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.89 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.85–6.81 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar-H), 5.36 (s, 1 H, OH), 5.14 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.78 (s, 3 H, OCH_3), 3.57–3.54 (m, 4 H, CH_2NCH_2), 2.31 (s, 4 H, CH_2CCH_2), 2.20 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 157.5, 155.5, 152.1, 139.0, 138.5, 136.8, 129.5, 128.4 (2C), 127.9, 127.9 (2C), 127.8 (2C), 125.4, 123.8, 114.8, 113.8 (2C), 67.1, 55.2, 43.5, 41.1 (2C), 36.3, 36.1, 16.2; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 432.2175; Found: 432.2166.

Benzyl 3-(4-(benzyloxy)phenyl)-3-hydroxyazetidone-1-carboxylate – MR34949

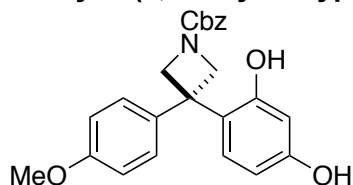


$n\text{-BuLi}$ (2.19 M solution in THF, 5.90 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 1-(benzyloxy)-4-bromobenzene (3.42 g, 13.0 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for a further 30 min. 1-Cbz-3-azetidinone (2.05 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et_2O (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidinol **MR34949** (801 mg, 21%) as a white solid. R_f = 0.36 (30% EtOAc/hexane); mp = 143 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3309 (br, OH), 1671 (C=O), 1655, 1475, 1461, 1440, 1361, 1233, 1108, 1002, 829, 754, 697; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.50–7.30 (m, 12 H, 12 \times Ar-CH), 7.04–6.93 (m, 2 H, 2 \times Ar-CH), 5.12 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.08 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.33 (d, J = 9.3 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.23 (d, J = 9.3 Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.82 (s, 1 H, OH); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.4 (Ar- $\text{C}_q\text{-OBn}$), 156.6 (C=O), 136.7 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 135.2 (Ar- C_q), 128.6 (2 \times Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 127.4 (2 \times Ar-CH), 126.0 (2 \times Ar-CH), 115.0 (2 \times Ar-CH), 71.6 (C_q), 70.0 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 64.3 (2 \times CH_2); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 390.1705; Found: 390.1715.

Benzyl 3-(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl) azetidione-1-carboxylate – MR34950

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidione **MR34943** (157 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and 2,6-dimethylphenol (183 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL).

The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidione **MR34950** (183 mg, 88%) as a white solid. $R_f = 0.41$ (30% EtOAc/hexane); mp = 152 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3407 (br, OH), 2962, 2886, 1682 (C=O), 1423, 1345, 1245, 1177, 1020, 832, 757, 703; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42–7.29 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.15–7.06 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.90–6.82 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.78 (s, 2 H, 2 \times Ar-H), 5.13 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.77 (s, 1 H, OH), 4.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.54 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 2.22 (s, 6 H, 2 \times CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (Ar- $\text{C}_q\text{-OCH}_3$), 156.4 (C=O), 150.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 138.5 (Ar- $\text{C}_q\text{-C}_q$), 137.6 (Ar- $\text{C}_q\text{-C}_q$), 136.5 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_2$), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 127.6 (2 \times Ar-CH), 126.7 (2 \times Ar-CH), 123.1 (2 \times Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 113.8 (2 \times Ar-CH), 66.8 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 63.8 and 63.0 (CH_2NCH_2), 55.3 (OCH_3), 44.8 (C_q), 16.1 (2 \times CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 418.2018; Found: 418.2006.

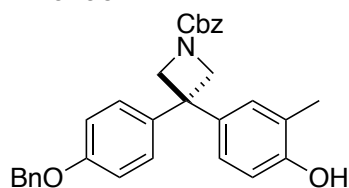
Benzyl 3-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)azetidione-1-carboxylate – MR34951

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidione **MR34943** (157 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and resorcinol (165 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL)

was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/hexane to 50% EtOAc/hexane) afforded azetidione **MR34951** (155 mg, 76%) as a white solid. $R_f = 0.26$ (50% EtOAc/hexane); mp = 231 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3394 (br, OH), 3216 (br, OH), 2965, 1680 (C=O), 1606, 1509, 1455, 1426, 1360, 1242, 1166, 1145, 1115, 1012, 973, 806, 752, 696; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.32 (s, 1 H, OH), 9.18 (s, 1 H, OH), 7.39–7.28 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.29–7.12 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.88 – 6.69 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.25 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.21 (dd, $J = 8.3$, 2.4 Hz, 1 H, Ar-H), 5.04 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.50 (s, 2 H, CHHNCHH), 4.28 (s, 2 H, CHHNCHH), 3.69 (s, 3 H, OCH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 157.4 (Ar- $\text{C}_q\text{-OCH}_3$), 157.2 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 155.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 155.3 (C=O), 138.8 (Ar- C_q), 136.9 (Ar- C_q), 128.4 (2 \times Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.6 (2 \times Ar-CH), 126.9 (2 \times Ar-CH), 121.7 (Ar- C_q), 113.4 (2 \times Ar-CH), 106.0 (Ar-CH), 102.8 (Ar-CH), 65.7 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.5 (CH_2), 61.9 (CH_2), 55.0 (OCH_3), 43.3 (C_q); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 406.1654; Found: 406.1661.

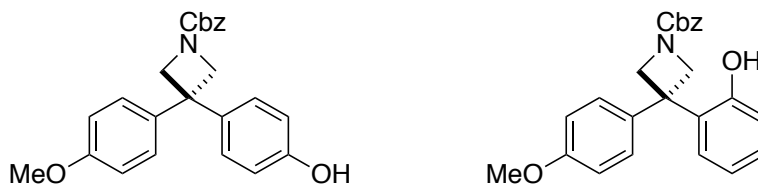
Partie expérimentale

Benzyl 3-(4-(benzyloxy)phenyl)-3-(4-hydroxy-3-methylphenyl) azetidine-1-carboxylate – MR34952



Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidinol **MR34949** (195 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and *o*-cresol (162 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidine **MR34952** (205 mg, 85%) as a white solid. R_f = 0.31 (30% EtOAc/hexane); mp = 168–169 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3283 (br, OH), 2962, 1675 (C=O), 1608, 1508, 1432, 1345, 1232, 1179, 1141, 1023, 826, 760; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.50–7.29 (m, 10 H, 10 \times Ar-H), 7.14–7.05 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.97–6.91 (m, 3 H, 3 \times Ar-H), 6.85 (dd, J = 8.3, 2.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.73 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 5.56 (s, 1 H, OH), 5.14 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 5.06 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.58 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.55 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.22 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 157.4 (Ar- C_q -OBn), 156.5 (C=O), 152.8 (Ar- C_q -OH), 138.6 (Ar- C_q), 137.8 (Ar- C_q), 136.9 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 129.2 (Ar-CH), 128.6 (2 \times Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.02 (2 \times Ar-CH), 127.97 (Ar-CH), 127.6 (2 \times Ar-CH), 127.4 (2 \times Ar-CH), 125.1 (Ar-CH), 124.1 (Ar-CH), 114.8 (3 \times Ar-CH), 70.1 (CH_2 -Ph), 66.9 (CH_2 -Ph), 63.8 (CH_2), 63.1 (CH_2), 44.8 (C_q), 16.0 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 480.2175; Found: 480.2177.

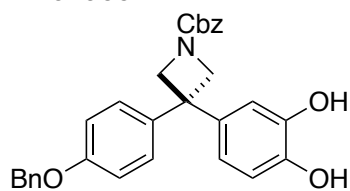
Benzyl 3-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)azetidino-1-carboxylate – MR34953
and Benzyl 3-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)azetidino-1-carboxylate – MR34954



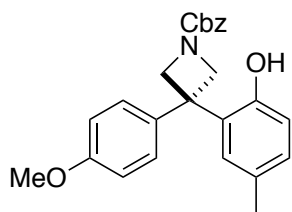
Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidino-1-carboxylate **MR34943** (157 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and phenol (141 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded *ortho*-substitution **MR34954** (43 mg, 22%) as a white solid, followed by azetidine **MR34953** (141 mg, 72%) as a white solid.

MR34953: R_f = 0.37 (30% EtOAc/hexane); mp = 197–199 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3214 (br, OH), 2963, 1670 (C=O), 1609, 1510, 1429, 1349, 1250, 1182, 1143, 1027, 952, 835, 751, 737, 695; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.03 (s, 1 H, OH), 7.43–7.31 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.27–7.20 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.17–7.05 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.91 (td, J = 7.5, 0.9 Hz, 1 H, Ar-H), 6.87–6.75 (m, 3 H, 3 \times Ar-H), 5.16 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.77 (s, 1 H, CH_2NCH_2), 4.60 (s, 1 H, CH_2CHH), 4.39 (s, 1 H, CH_2NCHH), 3.77 (s, 3 H, OCH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (Ar- C_q - OCH_3), 157.1 (Ar- C_q -OH), 154.2 (C=O), 137.9 (Ar- C_q), 136.3 (Ar- C_q), 130.3 (Ar- C_q), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 127.5 (Ar-CH), 127.0 (2 \times Ar-CH), 119.7 (Ar-CH), 116.2 (Ar-CH), 113.7 (2 \times Ar-CH), 67.1 (CH_2 -Ph), 62.9 (2 \times CH_2), 55.2 (CH_3), 43.7 (C_q); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 390.1705; Found: 390.1705.

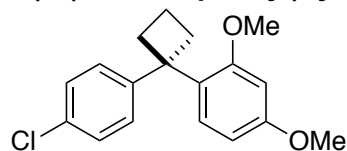
MR34954: R_f = 0.26 (30% EtOAc/hexane). mp = 48–54 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3306 (br, OH), 2957, 2889, 2825, 1676 (C=O), 1611, 1511, 1426, 1355, 1332, 1246, 1178, 1127, 1002, 828, 697; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39–7.30 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.12–7.05 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.04–6.97 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.90–6.83 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.82–6.75 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.28 (s, 1 H, OH), 5.15 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.58 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.55 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.80 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.2 (Ar- C_q - OCH_3), 156.6 (Ar- C_q -OH), 154.7 (C=O), 138.0 (Ar- C_q), 137.8 (Ar- C_q), 136.3 (Ar- C_q), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 127.7 (2 \times Ar-CH), 127.6 (2 \times Ar-CH), 115.4 (2 \times Ar-CH), 113.9 (2 \times Ar-CH), 67.0 (CH_2 -Ph), 64.0 (CH_2), 63.0 (CH_2), 55.3 (OCH_3), 44.8 (C_q); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 390.1705; Found: 390.1710.

Benzyl 3-(4-(benzyloxy)phenyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)azetidine-1-carboxylate – MR34955

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidinol **MR34949** (195 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and 1,2-dihydroxybenzene (165 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/hexane to 50% EtOAc/hexane) afforded azetidine **MR34955** (191 mg, 79%) as a white solid. $R_f = 0.47$ (50% EtOAc/hexane); mp = 151–153 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3430 (br, OH), 3274 (br, OH), 1653 (C=O), 1604, 1510, 1468, 1443, 1353, 1287, 1261, 1227, 1184, 1115, 1002, 831, 817, 745, 696; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.86 (s, 2 H, 2 \times OH), 7.53–7.25 (m, 10 H, 10 \times Ar-H), 7.20–7.15 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.98–6.93 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.61 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.51 (dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz, 1 H, Ar-H), 5.07 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.04 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.42 (s, 4 H, 2 \times CH_2); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 156.7 (Ar- $\text{C}_q\text{-OBn}$), 155.8 (C=O), 145.1 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 143.8 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 138.9 (Ar- C_q), 137.5 (Ar- C_q), 137.1 (Ar- C_q), 136.8 (Ar- C_q), 128.41 (2 \times Ar-CH), 128.40 (2 \times Ar-CH) 127.9 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.63 (2 \times Ar-CH), 127.59 (2 \times Ar-CH), 127.4 (2 \times Ar-CH), 116.9 (Ar-CH), 115.3 (Ar-CH), 114.6 (2 \times Ar-CH), 113.8 (Ar-CH), 69.2 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 65.8 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 63.0 (CH_2), 62.5 (CH_2), 45.0 (C_q); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 482.1967; Found: 482.1969.

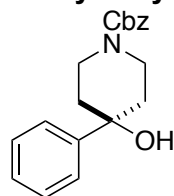
Benzyl 3-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)azetidine-1-carboxylate – MR34956

Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidinol **MR34943** (157 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and *p*-cresol (141 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/pentane to 50% EtOAc/pentane) afforded azetidine **MR34956** (137 mg, 68%) as a white solid. $R_f = 0.44$ (30% EtOAc/hexane); mp = 196 °C; IR (film)/ cm^{-1} 3231 (br, OH), 2958, 1667 (C=O), 1613, 1512, 1420, 1349, 1251, 1184, 1128, 1025, 954, 847, 814, 762, 750, 696; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (s, 1 H, OH), 7.42–7.30 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.29–7.21 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.93 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.90 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.85–6.78 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 5.16 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.57 (s, 1 H, CHHNCHH), 4.39 (s, 1 H, CHHNCHH), 3.77 (s, 3 H, OCH_3), 2.30 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (Ar- $\text{C}_q\text{-OCH}_3$), 157.0 (C=O), 151.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 138.0 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 130.1 (Ar- C_q), 128.8 (Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (3C: 2 \times Ar-CH, Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 127.0 (2 \times Ar-CH), 116.0 (Ar-CH), 113.7 (2 \times Ar-CH), 67.1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.9 (2 \times CH_2), 55.2 (OCH_3), 43.6 (C_q), 20.6 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 404.1862; Found: 404.1866.

1-(1-(4-Chlorophenyl)cyclobutyl)-2,4-dimethoxybenzene – MR34957

FeCl₃ (8.1 mg, 0.05 mmol) was added to a solution of 1-(4-chlorophenyl)cyclobutan-1-ol (195 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) and 1,3-dimethoxybenzene (0.39 mL, 3.0 mmol, 3.0 equiv) in CH₂Cl₂ (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 1 h then sat. aq. NaHCO₃ (15 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (15 mL).

The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic extracts were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% CH₂Cl₂/hexane) afforded cyclobutene **MR34957** (111 mg, 37%) as a colourless oil. *R*_f = 0.69 (50% CH₂Cl₂/hexane); IR (film)/cm⁻¹ 2940, 1609, 1594, 1494, 1490, 1463, 1260, 1207, 1156, 1137, 1094, 1035, 822, 789; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36–7.33 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, Ar-H), 7.24–7.20 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 6.50 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, Ar-H), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 2.70–2.65 (m, 4 H, CH₂CH₂CH₂), 2.03–1.94 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂), 2.91–1.82 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.3 (Ar-C_q-OCH₃), 157.9 (Ar-C_q-OCH₃), 147.2 (Ar-C_q), 130.6 (Ar-C_q-Cl), 130.1 (Ar-CH), 127.9 (2 × Ar-CH), 127.7 (2 × Ar-CH), 126.8 (Ar-C_q), 103.5 (Ar-CH), 99.3 (Ar-CH), 55.3 (OCH₃), 55.0 (OCH₃), 49.0 (C_q), 34.7 (CH₂CH₂CH₂), 17.1 (CH₂CH₂CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₁₉ClO₂ [M+H]⁺: 302.1074; Found: 302.1068.

Benzyl 4-hydroxy-4-phenylpiperidine-1-carboxylate – MR34958

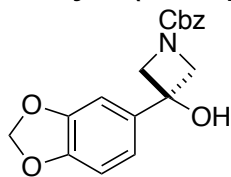
n-BuLi (2.40 M solution in THF, 5.0 mL, 12.0 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of bromophenol (1.37 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at –78 °C. The reaction mixture was stirred at –78 °C for a further 30 min. 1-Cbz-3-piperidinone (2.33 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at –78 °C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water

(30 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et₂O (3 × 30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded piperidinol **MR34958** (1.74 mg, 56%) as a white solid. *R*_f = 0.39 (30% EtOAc/hexane); mp = 81–82 °C (*lit.* 83–85 °C);¹⁶⁰ IR (film)/cm⁻¹ 3465 (br, OH), 2957, 1668 (C=O), 1474, 1442, 1355, 1277, 1212, 1199, 1088, 1074, 1022, 1002, 916, 756, 700; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.49–7.46 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.40–7.27 (m, 8 H, 8 × Ar-H), 5.16 (s, 2 H, CH₂-Ph), 4.13 (s, 2 H, CH₂), 3.35 (s, 2 H, CH₂), 2.03 (s, 2 H, CH₂), 1.76 (br, d, *J* = 13.2 Hz, 2 H, CH₂), 1.72 (s, 1 H, OH); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.3 (C=O), 147.8 (Ar-C_q), 136.8 (Ar-C_q), 128.4 (4 × Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 127.8 (2 × Ar-CH), 127.2 (Ar-CH), 124.4 (2 × Ar-CH), 71.3 (C_q), 67.1 (CH₂-Ph), 40.1 (2 × CH₂), 38.0 (2 × CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₉H₂₁NO₃ [M+H]⁺: 312.1600; Found: 312.1611.

¹⁶⁰Hydro, W. R.; Sundberg, R. J. Preparation of 4-phenyl-4-acyloxy piperidine. U.S. Patent 3,551,433, Dec 29, 1970.

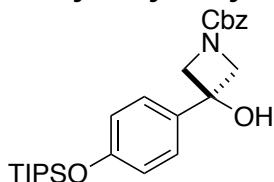
Partie expérimentale

Benzyl 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-hydroxyazetidone-1-carboxylate – MR34959



n-BuLi (2.19 M solution in THF, 5.90 mL, 13.0 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of 5-bromobenzo[d][1,3]dioxole (1.57 g, 13.0 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at -78°C . The reaction mixture was stirred at -78°C for a further 30 min. 1-Cbz-3-azetidone (2.05 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78°C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et_2O (3×30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded azetidinol **MR34959** (624 mg, 19%) as a white solid. $R_f = 0.20$ (30% EtOAc/hexane); mp = $68\text{--}70^{\circ}\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3264 (br, OH), 2884, 1649 (C=O), 1455, 1363, 1250, 1208, 1190, 1096, 1039, 916, 877, 808, 748, 701; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44–7.28 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 6.96 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.93 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 5.97 (s, 2 H, OCH_2O), 5.12 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.30 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.21 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.99 (s, 1 H, OH); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (C=O), 148.1 (Ar- $\text{C}_q\text{-O}$), 147.3 (Ar- $\text{C}_q\text{-O}$), 136.9 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 118.0 (Ar-CH), 108.2 (Ar-CH), 105.6 (Ar-CH), 101.3 (OCH_2O), 71.7 (C_q), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 64.4 (2 \times CH_2); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 328.1185; Found: 328.1180.

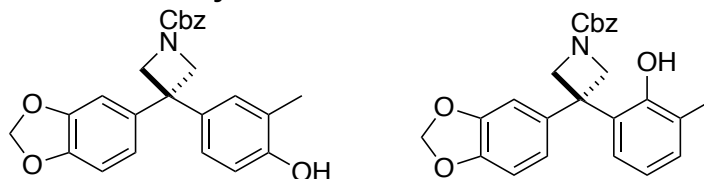
Benzyl 3-hydroxy-3-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)azetidone-1-carboxylate – MR34960



n-BuLi (2.19 M solution in THF, 4.90 mL, 10.7 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise over 5 min to a solution of (4-bromophenoxy)triisopropylsilane **21** (3.54 g, 10.7 mmol, 1.3 equiv) in THF (40 mL) at -78°C . The reaction mixture was stirred at -78°C for a further 30 min. 1-Cbz-3-azetidone (1.69 g, 8.23 mmol, 1.0 equiv) in THF (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture. Following a further 10 min at -78°C the reaction mixture was warmed to rt then quenched with water (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion extracted with Et_2O (3×30 mL). The organic extracts were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (5% $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) afforded azetidinol **MR34960** (336 mg, 9%) as a colourless oil. $R_f = 0.32$ (5% $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$); IR (film)/ cm^{-1} 3395 (br, OH), 2945, 2867, 1685 (C=O), 1607, 1512, 1427, 1264, 1171, 1099, 911, 882, 835, 738; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38–7.29 (m, 7 H, 7 \times Ar-H), 6.92–6.86 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 5.12 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.33 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.23 (d, $J = 9.3$ Hz, 2 H, CHHNCHH), 3.00 (s, 1 H, OH), 1.26 (m, 3 H, 3 \times CH), 1.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 18H, 6 \times CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (Ar- $\text{C}_q\text{-OTIPS}$), 155.8 (C=O), 136.5 (Ar- C_q), 135.3 (Ar- C_q), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 125.8 (2 \times Ar-CH), 119.9 (2 \times Ar-CH), 71.6 (C_q), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 64.3 (2 \times CH_2), 17.9 (3 \times CH), 12.6 (6 \times CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 456.2570; Found: 456.2576.

Partie expérimentale

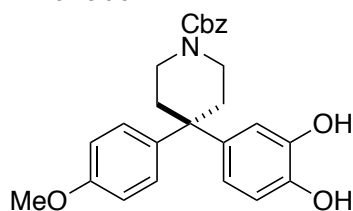
Benzyl 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(4-hydroxy-3-methylphenyl) azetidine-1-carboxylate – MR34961 and **Benzyl 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(2-hydroxy-3-methylphenyl)azetidine-1-carboxylate – MR34962**



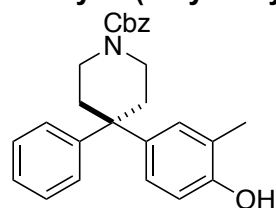
Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfoni-mide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutyl-ammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidol **MR34959** (164 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and *o*-cresol (162 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded *ortho*-substitution by-product **MR34962** (12 mg, 6%) as a white solid, followed by azetidine **MR34961** (139 mg, 66%) as a white solid.

MR34961: R_f = 0.33 (30% EtOAc/hexane); mp = 57–60 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3310 (br, OH), 2959, 2889, 1677 (C=O), 1610, 1504, 1434, 1354, 1218, 1116, 1037, 932, 812, 764, 733, 697; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43–7.29 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 6.92 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Ar-H), 6.85 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1 H, Ar-H), 6.75 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, Ar-H), 6.73 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 6.68 (d, J = 1.8 Hz, 1 H, Ar-H), 6.63 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1 H, Ar-H), 5.95 (s, 2 H, OCH_2O), 5.65 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.14 (s, 1 H, OH), 4.55 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.52 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.22 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.5 (C=O), 152.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{OCH}_2$), 147.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 146.2 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{OCH}_2$), 140.3 (Ar- C_q), 137.6 (Ar- C_q), 136.4 (Ar- C_q), 129.1 (Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 125.0 (Ar-CH), 124.2 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 119.6 (Ar-CH), 114.8 (Ar-CH), 108.0 (Ar-CH), 107.3 (Ar-CH), 101.1 (OCH_2O), 67.0 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 63.7 (CH_2), 63.0 (CH_2), 45.3 (C_q), 16.0 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 418.1654; Found: 418.1646.

MR34962: R_f = 0.37 (30% EtOAc/hexane); mp = 158 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3251 (br, OH), 2959, 2890, 1689 (C=O), 1487, 1433, 1361, 1248, 1214, 1187, 1150, 1120, 1029, 925, 750, 699; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42–7.29 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.09 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.02 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.90 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.86 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, Ar-H), 6.75 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1 H, Ar-H), 6.71 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, Ar-H), 5.93 (s, 2 H, OCH_2O), 5.12 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.08 (s, 1 H, OH), 4.69 (d, J = 8.9 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.44 (d, J = 8.9 Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.23 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (C=O), 151.5 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{OCH}_2$), 147.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-OH}$), 146.3 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_2\text{OCH}_2$), 139.6 (Ar- C_q), 136.6 (Ar- C_q), 130.4 (Ar- C_q), 129.9 (Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 125.7 (Ar-CH), 123.9 (Ar- $\text{C}_q\text{-CH}_3$), 120.5 (Ar-CH), 119.0 (Ar-CH), 108.0 (Ar-CH), 106.8 (Ar-CH), 101.1 (OCH_2O), 66.8 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.6 (2 \times CH_2), 44.2 (C_q), 15.7 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 418.1654; Found: 418.1665.

Benzyl 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)piperidine-1-carboxylate – MR34963

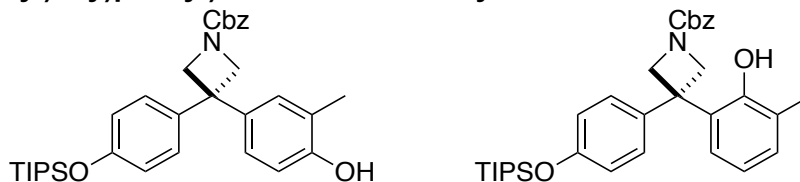
Calcium(II) bis(trifluoromethanesulfonimide) (15 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of piperidinol **MR34947** (171 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and catechol (165 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded piperidine **MR34963** (20 mg, 10%) as a brown oil. R_f = 0.14 (50% EtOAc/hexane); IR (film)/ cm^{-1} 3308 (br, OH), 2954, 1663 (C=O), 1607, 1510, 1352, 1276, 1245, 1181, 1105, 1028, 967; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37–7.30 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.10–7.07 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.82–6.79 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.77–6.74 (m, 2 H, 3 \times Ar-H), 6.61 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1 H, Ar-H), 6.20 (br, s, 2 H, 2 \times OH), 5.13 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 3.55 (br, s, 4 H, CH_2NCH_2), 2.26–2.23 (m, 4 H, CH_2CCH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 157.5, 155.7, 143.9, 142.1, 139.0, 138.9, 136.4, 128.5 (2C), 128.1, 127.8 (2C), 127.8 (2C), 119.1, 115.2, 114.2, 113.8 (2C), 67.4, 55.2, 43.5, 41.1 (2C), 36.2, 36.0; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 434.1967; Found: 434.1988.

Benzyl 4-(4-hydroxy-3-methylphenyl)-4-phenylpiperidine-1-carboxylate – MR34964

FeCl_3 (4.0 mg, 12.5 μmol) was added to a solution of piperidinol **MR34958** (157 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and *o*-cresol (162 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (20% EtOAc/hexane) afforded piperidine **MR34964** (128 mg, 64%) as a colourless oil. R_f = 0.15 (30% EtOAc/hexane); IR (film)/ cm^{-1} 3324 (br, OH), 2950, 1667 (C=O), 1609, 1509, 1437, 1351, 1247, 1028, 1107, 816, 752, 696; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37–7.23 (m, 9 H, 9 \times Ar-CH), 7.18 (t, J = 7.1 Hz, 1 H, Ar-CH), 6.98 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Ar-CH), 6.91 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1 H, Ar-H), 6.71 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar-H), 5.82 (s, 1 H, OH), 5.15 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 3.57 (m, 4 H, CH_2NCH_2), 2.35 (br, s, 4 H, CH_2CCH_2), 2.21 (s, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.5, 152.3, 147.0, 137.8, 136.7, 129.5, 128.4 (4C), 127.9 (2C), 127.8 (2C), 126.8 (2C), 125.9, 125.5, 123.9, 114.8, 67.1, 44.0, 41.0 (2C), 36.1, 35.9, 16.2; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 402.2069; Found: 402.2072.

Partie expérimentale

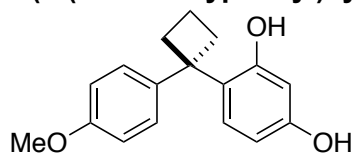
Benzyl 3-(4-hydroxy-3-methylphenyl)-3-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)azetidinde-1-carboxylate – MR34965 and Benzyl 3-(2-hydroxy-3-methylphenyl)-3-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)azetidinde-1-carboxylate – MR34966



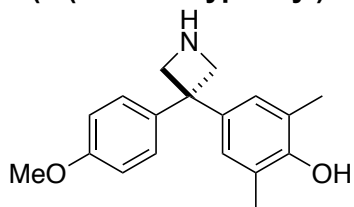
Calcium(II) bis(trifluoromethane-sulfonimide) (15.0 mg, 12.5 μmol) and tetrabutylammonium hexafluoro-phosphate (9.7 mg, 12.5 μmol) were added to a solution of azetidinol **MR34960** (226 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv) and *o*-cresol (162 mg, 1.50 mmol, 3.0 equiv) in CH_2Cl_2 (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h then sat. aq. NaHCO_3 (30 mL) was added followed by CH_2Cl_2 (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10–30% EtOAc/hexane) afforded *ortho*-substitution by-product **MR34966** (16 mg, 6%) as a pale-yellow solid, followed by azetidine **MR34965** (155 mg, 57%) as a white solid.

MR34965: R_f = 0.51 (30% EtOAc/hexane); mp = 125–127 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 3360 (br, OH), 2947, 2868, 1679 (C=O), 1606, 1509, 1442, 1413, 1355, 1261, 1215, 1169, 1142, 1121, 905, 884, 843, 823, 754, 679; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43–7.28 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.05–6.93 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 6.91–6.79 (m, 4 H, 4 \times Ar-H), 6.72 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, Ar-H), 5.29 (s, 1 H, OH), 5.14 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.56 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, *CHHNCHH*), 4.53 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, *CHHNCHH*), 2.21 (s, 3 H, CH_3), 1.37–1.14 (m, 3 H, 3 \times CH), 1.11 (d, J = 7.2 Hz, 18 H, 6 \times CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.5 (Ar- C_q -OTIPS), 154.6 (C=O), 152.6 (Ar- C_q -OH), 138.4 (Ar- C_q), 138.2 (Ar- C_q), 136.5 (Ar- C_q), 129.3 (Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 127.6 (2 \times Ar-CH), 125.2 (Ar-CH), 123.9 (Ar- C_q - CH_3), 119.8 (2 \times Ar-CH), 114.8 (Ar-CH), 66.9 (CH_2 -Ph), 63.9 (CH_2), 63.2 (CH_2), 44.8 (C_q), 17.9 (6 \times CH_3), 16.0 (CH_3), 12.6 (3 \times CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{Si}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 546.3040; Found: 546.3021.

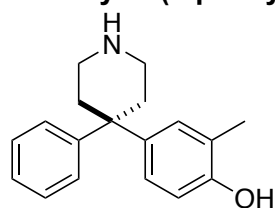
MR34966: R_f = 0.69 (30% EtOAc/hexane); mp = 137–139 $^\circ\text{C}$; IR (film)/ cm^{-1} 2940, 1687 (C=O), 1608, 1583, 1508, 1461, 1437, 1318, 1240, 1205, 1183, 1137, 1031, 909, 824, 805; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.47–7.28 (m, 5 H, 5 \times Ar-H), 7.18–7.11 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.08 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.03 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.90 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, Ar-H), 6.84–6.72 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 5.12 (s, 2 H, CH_2 -Ph), 4.97 (s, 1 H OH), 4.69 (d, J = 8.8 Hz, 2 H, *CHHNCHH*), 4.46 (d, J = 8.8 Hz, 2 H, *CHHNCHH*), 2.23 (s, 3 H, CH_3), 1.24 (m, 3 H, 3 \times CH), 1.09 (d, J = 7.2 Hz, 18 H, 6 \times CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (C=O), 154.8 (Ar- C_q -OTIPS), 151.7 (Ar- C_q -OH), 137.6 (Ar- C_q), 136.6 (Ar- C_q), 130.7 (Ar- C_q), 129.8 (Ar-CH), 128.5 (2 \times Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (2 \times Ar-CH), 126.9 (2 \times Ar-CH), 125.7 (Ar-CH), 124.1 (Ar- C_q - CH_3), 120.4 (Ar-CH), 119.7 (2 \times Ar-CH), 66.7 (CH_2 -Ph), 62.8 (2 \times CH_2), 43.8 (C_q), 17.9 (3 \times CH), 15.7 (6 \times CH_3), 12.6 (CH_3); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{Si}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 546.3040; Found: 546.3027.

4-(1-(4-Methoxyphenyl)cyclobutyl)benzene-1,3-diol – MR34970

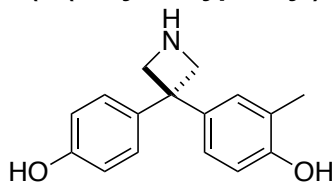
FeCl₃ (4.0 mg, 0.05 mmol) was added to a solution of 1-(4-methoxyphenyl)cyclobutan-1-ol (89 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) and resorcinol (165 mg, 3.0 mmol, 3.0 equiv) in CH₂Cl₂ (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h then sat. aq. NaHCO₃ (30 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (30 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The organic extracts were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (2-5% EtOAc/CH₂Cl₂) afforded cyclobutane **MR34970** (58 mg, 42%) as a pale-yellow solid. *R_f* = 0.21 (10% CH₂Cl₂/pentane); mp = 152 °C; IR (film)/cm⁻¹ 3371 (br, OH), 3251 (br, OH), 2975, 1606, 1509, 1460, 1294, 1234, 1163, 1116, 1020, 974, 823, 805, 762; ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆) δ 7.93 (s, 1 H, OH), 7.84 (s, 1 H, OH), 7.40–7.37 (m, 2 H, 2 × Ar-CH), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, Ar-CH), 6.80–6.76 (m, 2 H, 2 × Ar-CH), 6.32 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1 H, Ar-CH), 6.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, Ar-CH), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 2.74–2.66 (m, 4 H, CH₂CH₂CH₂), 1.97–1.87 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂), 1.86–1.79 (m, 1 H, CH₂CHHCH₂); ¹³C NMR (101 MHz, acetone-*d*₆) 158.1 (Ar-C_q-OCH₃), 157.3 (Ar-C_q-OH), 156.1 (Ar-C_q-OH), 141.9 (Ar-C_q), 128.6 (Ar-C_q), 128.3 (2 × Ar-CH), 128.1 (Ar-CH), 113.8 (2 × Ar-CH), 106.8 (Ar-CH), 103.9 (Ar-CH), 55.3 (OCH₃), 49.6 (C_q), 35.6 (2 × CH₂), 17.8 (CH₂); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₇H₁₈O₃ [M+H]⁺: 269.1178; Found: 269.1180.

4-(3-(4-Methoxyphenyl)azetidyl)-2,6-dimethylphenol – MR34971

Palladium on carbon (10 mol% w/w, 10 mg) was added to a solution of azetidine **MR34950** (100 mg, 0.24 mmol) in ethanol (2.25 mL). The reaction mixture was stirred under atmosphere of hydrogen at 25 °C overnight. The reaction mixture was filtered through celite, washed through with ethanol and then concentrated under reduced pressure to afford azetidine **MR34971** (22 mg, 33%) as yellow solid. *R_f* = 0.26 (20% MeOH/CH₂Cl₂); mp = 78–81 °C; IR (film)/cm⁻¹ 2924 (br, NH/OH), 2836 (br, NH/OH), 1699, 1581, 1488, 1511, 1296, 1242, 1206, 1178, 1029, 828, 807, 736; ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.31–7.21 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 6.89–6.75 (m, 4 H, 4 × Ar-H), 3.88–3.67 (m, 7 H, 2 × CH₂ and OCH₃), 2.19 (s, 6 H, 3 × CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, Acetone-*d*₆) δ 158.6, 152.0, 141.7, 140.0, 128.4 and 128.3 (2C), 127.3 and 127.2 (2C), 124.4 and 124.3 (2C), 114.2 (2C), 67.2, 59.7, 55.4, 44.4, 16.8 (2C); HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₂₁NO₂ [M+H]⁺: 284.1651; Found: 284.1664.

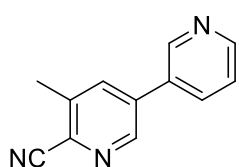
2-Methyl-4-(4-phenylpiperidin-4-yl)phenol – MR34972

Palladium on carbon (10 mol% w/w, 9.4 mg) was added to a solution of azetidine **MR34964** (94 mg, 0.23 mmol) in ethanol (2.25 mL). The reaction mixture was stirred under atmosphere of hydrogen at 25 °C overnight. The reaction mixture was filtered through celite, washed through with ethanol and then concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (10% MeOH/CH₂Cl₂) afforded azetidine **MR34972** (17 mg, 28%) as pale-yellow solid. *R_f* = 0.28 (20% MeOH/CH₂Cl₂); mp = 149 °C; IR (film)/cm⁻¹ 3236 (br, NH/OH), 2934 (br, NH/OH), 1608, 1509, 1444, 1261, 1120, 821, 754, 699; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.31–7.29 (m, 4 H, 4 × Ar-H), 7.19–7.15 (m, 1 H, Ar-H), 7.02 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Ar-H), 6.97 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1 H, Ar-H), 6.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, Ar-H), 3.21–3.19 (m, 4 H, CH₂NCH₂), 2.69–2.55 (m, 4 H, CH₂CCH₂), 2.15 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 155.1 (Ar-C_q-OH), 147.5 (Ar-C_q), 136.5 (Ar-C_q), 130.2 (Ar-CH), 129.8 (2 × Ar-CH), 127.5 (2 × Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 126.1 (Ar-CH), 115.8 (Ar-CH), 44.2 (C_q), 42.7 (2 × CH₂), 33.9 (2 × CH₂), 16.5 (CH₃), C_q-CH₃ not observed; HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₂₁NO [M+H]⁺: 268.1701; Found: 268.1713.

4-(3-(4-Hydroxyphenyl)azetid-3-yl)-2-methylphenol – MR34973

Palladium on carbon (20 mol% w/w, 24 mg) was added to a solution of azetidine **MR34952** (120 mg, 0.25 mmol) in ethanol (2.25 mL). The reaction mixture was stirred under atmosphere of hydrogen at 25 °C overnight. The reaction mixture was filtered through celite, washed through with ethanol and then concentrated under reduced pressure to afford azetidine

MR34973 (56 mg, 88%) as pale-yellow solid. R_f = 0.23 (20% MeOH/CH₂Cl₂); mp = 175–183 °C; IR (film)/cm⁻¹ 2951 (br, NH/OH), 1595, 1506, 1445, 1379, 1231, 1174, 1124, 821; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 6.99–6.96 (m, 1 H, Ar-H), 6.89 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1 H, Ar-H), 6.73 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 6.68 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar-H), 4.20 (d, J = 9.1 Hz, 2 H, CHHNCHH), 4.18 (d, J = 9.1 Hz, 2 H, CHHNCHH), 2.15 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 156.8 (Ar-C_q-OH), 154.8 (Ar-C_q-OH), 139.8 (Ar-C_q), 139.6 (Ar-C_q), 129.7 (Ar-CH), 128.3 (2 × Ar-CH), 125.5 (Ar-CH), 116.1 (2 × Ar-CH), 115.4 (Ar-CH), 60.3 (2 × CH₂), 50.7 (C_q), 16.4 (CH₃), C_q-CH₃ not observed; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₆H₁₇NO₂ [M+H]⁺: 256.1338; Found: 256.1330.

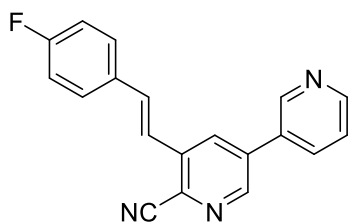
5-Methyl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34986

(6-Cyano-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (264 mg, 1.09 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K₃PO₄ (462 mg, 2.18 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (50.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of 3-bromopyridine (85 μL, 0.87 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 101 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The

layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (100% EtOAc) afforded 5-methyl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34986** (86 mg, 51%) as a white solid. mp = 185 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.26 min m/z [M+H]⁺: 196.44; IR/cm⁻¹ 3443, 3038, 2231 (CN), 1591, 1560, 1384, 1140, 1026, 1140, 1026, 918, 821, 710; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.88 (s, 1 H, Pyr-H), 8.77 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.74 (d, J = 4.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.92 (dt, J = 7.9, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.87 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.48 (dd, J = 7.9, 4.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 2.67 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.3 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 146.7 (Pyr-CH), 138.6 (C_q-Pyr), 136.4 (C_q-CH₃), 136.1 (Pyr-CH), 134.6 (Pyr-CH), 133.4 (C_q-CN), 131.9 (C_q-Pyr), 124.0 (Pyr-CH), 116.2 (CN), 18.8 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₂H₉N₃ [M+H]⁺: 196.0875; Found: 196.0880.

Partie expérimentale

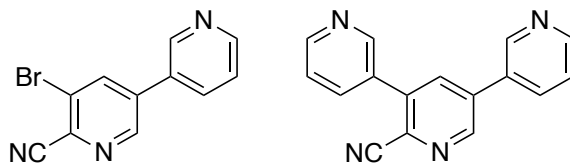
(*E*)-5-(4-Fluorostyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34987



(*E*)-(4-Fluorostyryl)boronic acid (279 mg, 1.68 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (716 mg, 3.38 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (78.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34988** (350 mg, 1.35 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 1 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (5 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30–50% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-5-(4-fluorostyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34987** (270 mg, 66%) as a white solid. mp = 233 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.09 min m/z [M+H]⁺: 302.53; IR/cm⁻¹ 3433, 2229 (CN), 1633, 1600, 1511, 1231, 1164, 963, 814, 706, 531; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.95 (s, 1 H, Pyr-H), 8.79 (d, J = 1.9 Hz, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.24 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.00 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.63–7.60 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.53 (dd, J = 7.9, 4.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.72 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.37 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16–7.11 (m, 2 H, 2 × Ar-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.4 (d, J = 250.6 Hz, C_q-F), 150.2 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 147.7 (Pyr-CH), 137.3 (C_q-Pyr), 136.6 (C_q-Pyr), 135.0 (Pyr-CH), 134.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.6 (C_q-Pyr), 131.6 (d, J = 3.3 Hz, C_q-Ar), 131.6 (C_q-CN), 131.4 (Pyr-CH), 129.1 (d, J = 8.4 Hz, 2 × Ar-CH), 124.1 (Pyr-CH), 120.5 (d, J = 2.7 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 116.2 (d, J = 22.0 Hz, 2 × Ar-CH), 116.1 (CN); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -110.6; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₉H₁₂FN₃ [M+H]⁺: 302.1094; Found: 302.1095.

Partie expérimentale

5-Bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34988 and [3,3':5',3''-Terpyridine]-2'-carbonitrile – MR34993



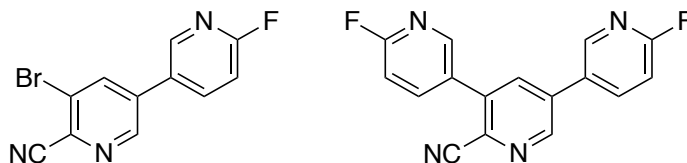
Pyridin-3-ylboronic acid (2.15 g, 17.5 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (7.43 g, 35.0 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (809 mg, 5 mol%) were added to a solution of 3,5-dibromopicolinonitrile **MR36100** (3.67 g, 14.0 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (100 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (100 mL) was added followed by EtOAc (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (50–100% EtOAc/cyclohexane) afforded 5-bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34988** (2.57 g, 71%) as a white solid followed by [3,3':5',3''-terpyridine]-2'-carbonitrile **MR34993** (775 mg, 21%) as a pale yellow solid.

MR34988: mp = 195 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.92 min m/z [M+H]⁺: 260.42; IR/cm⁻¹ 3434, 3042, 2917, 2233 (CN), 1593, 1574, 1483, 1439, 1053, 1017, 811, 708; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89–8.87 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 8.77 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.93 (dt, J = 8.0, 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.50 (dd, J = 8.0, 4.8 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151.0 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 147.3 (Pyr-CH), 138.4 (Pyr-CH), 137.8 (C_q-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 134.2 (C_q-CN), 130.5 (C_q-Pyr), 124.8 (C_q-Br), 124.1 (Pyr-CH), 115.6 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₁H₆BrN₃ [M+H]⁺: 259.9823; Found: 259.9819.

MR34993: mp = 213 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.14 min m/z [M+H]⁺: 259.48; IR/cm⁻¹ 3427, 2924, 2232 (CN), 1628, 1591, 1404, 1387, 1346, 1000, 804, 706; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.00 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.94 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.86 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.81 (dd, J = 4.9, 1.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.78 (dd, J = 4.9, 1.5 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.06–8.03 (m, 2 H, 2 × Pyr-H), 7.99 (ddd, J = 8.0, 2.4, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.56–7.50 (m, 2 H, 2 × Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.9 (Pyr-CH), 150.8 (Pyr-CH), 149.2 (Pyr-CH), 148.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 138.9 (C_q-Pyr), 136.9 (C_q-Pyr), 136.1 (Pyr-CH), 135.5 (Pyr-CH), 134.7 (Pyr-CH), 131.6 (C_q-Pyr), 131.3 (C_q-Pyr), 131.0 (C_q-CN), 124.1 (Pyr-CH), 123.7 (Pyr-CH), 116.4 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₆H₁₀N₄ [M+H]⁺: 259.0984; Found: 259.0983.

Partie expérimentale

5-Bromo-6'-fluoro-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34989 and 6,6''-Difluoro-[3,3':5',3''-terpyridine]-2'-carbonitrile – MR34990



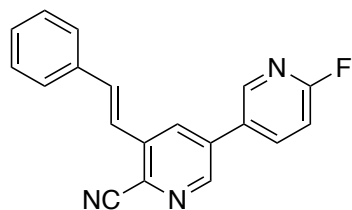
(6-Fluoropyridin-3-yl)boronic acid (325 mg, 2.31 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (955 mg, 4.61 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (104 mg, 5 mol%) were added to a solution of 3,5-dibromopicolinonitrile **MR36100** (483 mg, 1.84 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 12 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (25% EtOAc/cyclohexane) afforded 5-bromo-6'-fluoro-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34989** (184 mg, 36%) as a pale yellow solid followed by 6,6''-difluoro-[3,3':5',3''-terpyridine]-2'-carbonitrile **MR34990** (165 mg, 30%) as a pale yellow solid.

MR34989: mp = 182–183 °C; LC-MS t_R = 4.54 min; IR/cm⁻¹ 3434, 3033, 2922, 2236 (CN), 1599, 1494, 1441, 1350, 1271, 1016, 923, 840, 744; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.84 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.49 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.20 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.06–8.02 (m, 1 H, Pyr-H), 7.15 (dd, J = 8.5, 3.1 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.3 (d, J = 244 Hz, C_q-F), 147.1 (Pyr-CH), 146.5 (d, J = 15.6 Hz, Pyr-CH), 140.0 (d, J = 8.5 Hz, Pyr-CH), 138.3 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Pyr), 134.3 (C_q-CN), 128.6 (d, J = 4.6 Hz, C_q-Pyr), 124.8 (C_q-Br), 115.5 (CN), 110.6 (d, J = 37.7 Hz, Pyr-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ –65.4; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₁H₅BrFN₃ [M+H]⁺: 277.9729; Found: 297.9727.

MR34990: mp = 180 °C; LC-MS t_R = 4.42 min; IR/cm⁻¹ 3433, 2921, 2232 (CN), 1594, 1587, 1482, 1438, 1246, 1112, 1020, 840; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.97 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.54 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.47 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.14 (ddd, J = 8.5, 7.3, 2.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.09 (ddd, J = 8.5, 7.3, 2.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.20–7.15 (m, 2 H, 2 × Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.3 (d, J = 244 Hz, C_q-F), 163.3 (d, J = 244 Hz, C_q-F), 148.4 (Pyr-CH), 147.7 (d, J = 15.8 Hz, Pyr-CH), 146.5 (d, J = 15.5 Hz, Pyr-CH), 141.4 (d, J = 8.5 Hz, Pyr-CH), 140.0 (d, J = 8.4 Hz, Pyr-CH), 137.8 (C_q-Pyr), 135.8 (C_q-Pyr), 135.3 (Pyr-CH), 131.7 (C_q-CN), 129.4 (d, J = 4.9 Hz, C_q-Pyr), 128.9 (d, J = 4.7 Hz, C_q-Pyr), 116.1 (CN), 110.6 (d, J = 37.7 Hz, Pyr-CH), 110.3 (d, J = 37.9 Hz, Pyr-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ –65.3, –65.7; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₆H₈F₂N₄ [M+H]⁺: 295.0795; Found: 295.0797.

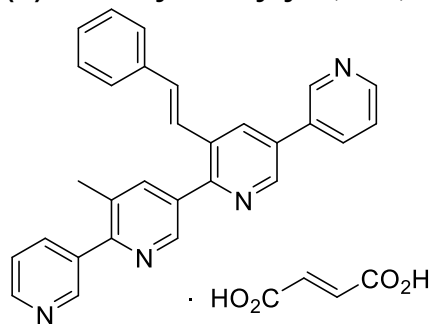
Partie expérimentale

(*E*)-6'-Fluoro-5-styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34991

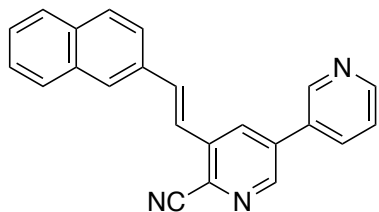


(*E*)-Styrylboronic acid (100 mg, 0.67 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (287 mg, 1.35 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (31.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-6'-fluoro-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34989** (150 mg, 0.54 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% EtOAc/cyclohexane) afforded (*E*)-6'-fluoro-5-styryl-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34991** (121 mg, 74%) as a white solid. mp = 199 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.36 min m/z [M+H]⁺: 302.53; IR/cm⁻¹ 3434, 2225 (CN), 1639, 1594, 1492, 1451, 1417, 1250, 967, 824, 739, 687; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.75 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.54 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.22 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.09 (ddd, J = 8.5, 7.3, 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.64–7.62 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.49 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.46–7.38 (m, 4 H, 3 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16 (dd, J = 8.5, 2.6 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.1 (d, J = 243 Hz, C_q-F), 147.4 (Pyr-CH), 146.4 (d, J = 15.4 Hz, Pyr-CH), 140.0 (d, J = 8.4 Hz, Pyr-CH), 137.5 (C_q-Ar), 136.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 135.6 (C_q-Pyr), 135.3 (C_q-Pyr), 131.4 (C_q-CN), 130.5 (Pyr-CH), 130.1 (d, J = 4.8 Hz, C_q-Pyr), 129.7 (Ar-CH), 129.0 (2 × Ar-CH), 127.4 (2 × Ar-CH), 120.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.1 (CN), 110.4 (d, J = 37.6 Hz, Pyr-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -66.5; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₉H₁₂FN₃ [M+H]⁺: 302.1094; Found: 302.1098.

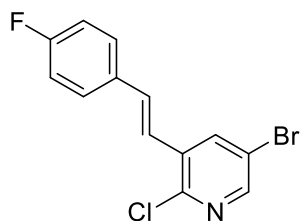
(*E*)-3'-Methyl-3''-styryl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine fumarate – MR34992



Fumaric acid (14.0 mg, 0.12 mmol, 1.00 equiv) was added to a solution of (*E*)-3'-methyl-3''-styryl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine **MR29072** (50.0 mg, 0.12 mmol, 1.00 equiv) in propan-2-ol (10 mL). The reaction mixture was stirred at 80 °C for 12 h then cooled to rt. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to afford (*E*)-3'-methyl-3''-styryl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine fumarate **MR34992** (53.0 mg, 81%) as a yellow solid. mp = 184 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.37 min m/z [M+H]⁺: 427.59; IR/cm⁻¹ 3437, 2924, 1702, 1624, 1594, 1448, 1264, 1194, 1085, 983, 898; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.15 (s, 2 H, 2 × CO₂H), 9.16 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.04 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.89 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.77 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, J = 4.7, 1.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.66 (dd, J = 4.6, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.65 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.36 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.12 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.07 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.64–7.53 (m, 5 H, 2 × Pyr-H, 2 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.33–7.25 (m, 2 H, Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.62 (s, 2 H, HO₂C-CH=CH-CO₂H), 2.48 (s, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.0 (2 × C=O), 154.5 (C_q-Pyr), 152.7 (C_q-Pyr), 149.7 (Pyr-CH), 149.4 (Pyr-CH), 149.1 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 147.5 (Pyr-CH), 146.7 (Pyr-CH), 139.7 (Pyr-CH), 136.7 (C_q-Ar), 136.6 (Pyr-CH), 135.4 (C_q-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 134.0 (2 × CH-CO₂H), 133.9 (C_q-Pyr), 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5 (Pyr-CH), 132.2 (C_q-Pyr), 131.5 (2 × C_q-Pyr), 131.0 (C_q-CH₃), 128.9 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0 (Pyr-CH), 123.2 (Pyr-CH), 19.6 (CH₃); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₉H₂₂N₄ [M+H]⁺: 427.1923; Found: 427.1936.

(E)-5-(2-(Naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile – MR34994

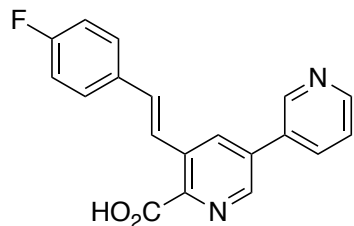
2-Vinylnaphthalene (170 mg, 1.11 mmol, 1.15 equiv), hexan-2,5-dione (20.0 μ L, 0.19 mmol, 0.20 equiv), K_2CO_3 (265 mg, 1.92 mmol, 2.00 equiv) and palladium(II) acetate (22.0 mg, 0.096 mmol, 0.10 equiv) were added to a solution of 5-bromo-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34988** (250 mg, 0.96 mmol, 1.00 equiv) in DMF (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at 130 °C for 12 h then cooled to rt. The reaction mixture was filtered through celite, washed with CH_2Cl_2 (20 mL) and concentrated under reduce pressure. Purification by flash chromatography (50–70% EtOAc/cyclohexane) afforded (E)-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34994** (82 mg, 26%) as a yellow solid. mp = 199 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.80 min m/z [M+H]⁺: 334.53; IR/cm⁻¹ 3440, 2222 (CN), 1628, 1584, 1417, 1383, 1254, 1024, 962, 803; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.80 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.78 (dd, J = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.01–7.99 (m, 2 H, Pyr-H, Ar-H), 7.92–7.82 (m, 4 H, 4 \times Ar-H), 7.62 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.65 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.53 (m, 3 H, 2 \times Ar-H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 150.5 (Pyr-CH), 148.3 (Pyr-CH), 147.7 (Pyr-CH), 137.5 (C_q-Pyr), 136.7 (C_q-CN), 136.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 134.7 (Pyr-CH), 133.9 (C_q-Ar), 133.4 (C_q-Ar), 132.8 (C_q-Ar), 132.0 (C_q-Pyr), 131.3 (C_q-Pyr), 130.6 (Pyr-CH), 128.9 (Ar-CH), 128.6 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.8 (Ar-CH), 124.0 (Pyr-CH), 123.3 (Ar-CH), 120.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.3 (CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{23}H_{15}N_3$ [M+H]⁺: 334.1344; Found: 334.1342.

(E)-5-Bromo-2-chloro-3-(4-fluorostyryl)pyridine – MR34995

(E)-(4-Fluorostyryl)boronic acid (131 mg, 0.79 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (334 mg, 1.58 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (36.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-2-chloro-3-iodopyridine **2** (200 mg, 0.63 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 \times 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (30% CH_2Cl_2 /cyclohexane) afforded (E)-5-bromo-2-chloro-3-(4-fluorostyryl)pyridine **MR34995** (146 mg, 74%) as a white solid. mp = 112 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.07 min m/z [M+H]⁺: 312.07; IR/cm⁻¹ 3433, 1628, 1597, 1505, 1386, 1225, 1154, 1117, 1059, 963, 855, 825, 509; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.34 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.08 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.56–7.52 (m, 2 H, 2 \times Ar-H), 7.23 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.13–7.05 (m, 3 H, 2 \times Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.1 (d, J = 250.5 Hz, C_q-F), 148.6 (Pyr-CH), 148.4 (C_q-Cl), 136.6 (Pyr-CH), 133.6 (C_q-Pyr), 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.2 (d, J = 3.4 Hz, C_q-Ar), 128.8 (d, J = 8.2 Hz, 2 \times Ar-CH), 121.7 (d, J = 2.5 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 119.4 (C_q-Br), 116.0 (d, J = 21.9 Hz, 2 \times Ar-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -111.6; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{13}H_8BrClFN$ [M+H]⁺: 311.9591; Found: 311.9596.

Partie expérimentale

(*E*)-5-(4-Fluorostyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylic acid – MR34996

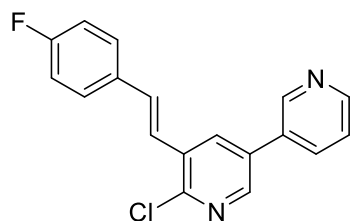


(*E*)-5-(4-Fluorostyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carbonitrile **MR34987**

(100 mg, 0.33 mmol, 1.00 equiv) was stirred in a mixture of NaOH (2N, 4 mL) and MeOH (6 mL) at 100 °C for 2 days. The reaction mixture was cooled at rt and acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (*E*)-5-(4-fluorostyryl)-[3,3'-bipyridine]-6-carboxylic acid **MR34996** (162 mg, 46%) as a pale yellow solid. mp = 282 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 3.91 min *m/z* [M+H]⁺: 321.49; IR/cm⁻¹ 3435, 2924, 1624,

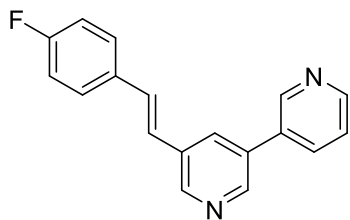
1512, 1383, 1234, 1118, 1027; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.95 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.65 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.62 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.48 (s, 1 H, Pyr-H), 8.25 (dt, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.64–7.59 (m, 4 H, 2 × Ar-H, Pyr-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.41 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.13–7.09 (m, 2 H, 2 × Ar-H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 174.1 (C=O), 164.1 (d, *J* = 246.4 Hz, C_q-F), 156.5 (C_q-CO), 149.8 (Pyr-CH), 148.6 (Pyr-CH), 146.0 (Pyr-CH), 136.9 (Pyr-CH), 135.1 (C_q-Pyr), 135.0 (d, *J* = 3.2 Hz, C_q-Ar), 134.4 (C_q-Pyr), 133.1 (Pyr-CH), 132.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.5 (C_q-Pyr), 129.8 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 × Ar-CH), 125.7 (Pyr-CH), 124.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.6 (d, *J* = 22.0 Hz, 2 × Ar-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -115.8;

(*E*)-6-Chloro-5-(4-fluorostyryl)-3,3'-bipyridine – MR34997

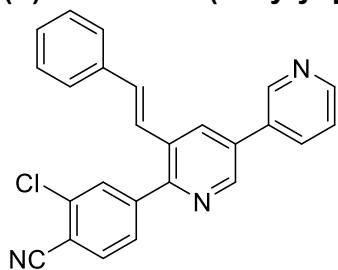


Pyridin-3-ylboronic acid (58.0 mg, 0.48 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K₃PO₄ (202 mg, 0.95 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (22.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-(4-fluorostyryl)pyridine **MR34995** (119 mg, 0.38 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added

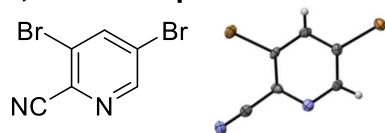
followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (EtOAc) afforded (*E*)-6-chloro-5-(4-fluorostyryl)-3,3'-bipyridine **MR34997** (71.0 mg, 60%) as a white solid. mp = 182 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.53 min *m/z* [M+H]⁺: 311.45; IR/cm⁻¹ 3440, 2924, 2856, 1638, 1601, 1509, 1431, 1383, 1237, 1159, 1027, 959, 803; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.78 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.60–7.55 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.50 (br, s, 1 H, Pyr-H), 7.37 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14–7.09 (m, 2 H, 2 × Ar-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.0 (d, *J* = 246.3 Hz, C_q-F), 149.9 (C_q-Cl), 149.6 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 146.1 (Pyr-CH), 134.5 (Pyr-CH), 133.0 (C_q-Pyr), 132.8 (2C: Pyr-CH, C_q-Pyr), 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.4 (d, *J* = 3.9 Hz, C_q-Ar), 132.2 (C_q-Pyr), 128.7 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 × Ar-CH), 123.9 (Pyr-CH), 122.5 (d, *J* = 2.4 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 116.0 (d, *J* = 22.2 Hz, 2 × Ar-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -112.0; HRMS (ESI) *m/z* Calcd. for C₁₈H₁₂ClF₂ [M+H]⁺: 311.0751; Found: 311.0755.

(E)-5-(4-Fluorostyryl)-3,3'-bipyridine – MR34998

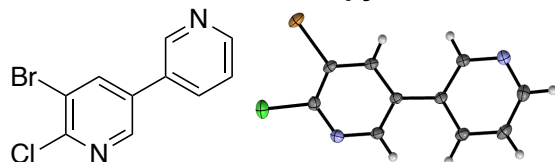
(E)-(4-Fluorostyryl)boronic acid (221 mg, 1.33 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (563 mg, 2.65 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (61.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of 5-bromo-3,3'-bipyridine **MR27830** (218 mg, 1.06 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (EtOAc) afforded (E)-5-(4-fluorostyryl)-3,3'-bipyridine **MR34998** (126 mg, 43%) as a white solid. LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.47 min m/z [M+H]⁺: 277.49; mp = 113 °C; IR/cm⁻¹ 3433, 2924, 1601, 1508, 1225, 1159, 1020, 970, 820, 715; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.91 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.77–7.72 (m, 3 H, 3 × Pyr-H), 7.99 (br, s, 1 H, Pyr-H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.53 (dd, J = 8.5, 5.4 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.47–7.46 (m, 1 H, Pyr-H), 7.23 (d, J = 16.4 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.12–7.04 (m, 3 H, Ar-CH=CH-Pyr, 2 × Ar-H); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) 162.7 (d, J = 249 Hz, C_q-F), 149.4 (Pyr-CH), 148.2 (Pyr-CH), 147.8 (Pyr-CH), 146.9 (Pyr-CH), 134.5 (Pyr-CH), 133.6 (C_q-Pyr), 133.1 (C_q-Pyr), 132.6 (d, J = 3 Hz, C_q-Ar), 131.0 (Pyr-CH), 130.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.3 (d, J = 8 Hz, 2 × Ar-CH), 124.1 (Pyr-CH), 124.1 (d, J = 2 Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 123.8 (C_q-Pyr), 115.8 (d, J = 22 Hz, 2 × Ar-CH); ¹⁹F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -112.7; HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₁₈H₁₃FN₂ [M+H]⁺: 277.1141; Found: 277.1142.

(E)-2-Chloro-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzotrile – MR34999

(3-Chloro-4-cyanophenyl)boronic acid (295 mg, 1.63 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (690 mg, 3.25 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (150 mg, 5 mol%) were added to a solution of (E)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **11** (500 mg, 1.30 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (50 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 7 h then cooled to rt. Water (50 mL) was added followed by EtOAc (50 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The organic extracts were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane) afforded (E)-2-chloro-4-(5-styryl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzotrile **MR34999** (366 mg, 72%) as a pale yellow solid. mp = 189 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 6.05 min m/z [M+H]⁺: 394.46; IR/cm⁻¹ 3440, 2232 (CN), 1724, 1641, 1598, 1422, 1374, 1190, 1024, 807; ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.99 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.85 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.75 (br, s, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.02 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.94 (d, J = 1.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ar-H), 7.69 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1 H, Ar-H), 7.52–7.46 (m, 3 H, Pyr-H, 2 × Ar-H), 7.40 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 2 × Ar-H), 7.36–7.33 (m, 1 H, Ar-H), 7.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 153.3 (C_q-Pyr), 149.7 (Pyr-CH), 148.1 (Pyr-CH), 146.8 (Pyr-CH), 145.1 (C_q-Cl), 137.1 (C_q-Pyr), 136.1 (C_q-Ar), 134.6 (Pyr-CH), 133.6 (Ar-CH), 133.6 (2 × C_q-Pyr), 133.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9 (Pyr-CH), 132.0 (C_q-Pyr), 131.2 (Ar-CH), 129.0 (2 × Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 126.8 (2 × Ar-CH), 124.1 (Pyr-CH), 124.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 115.9 (CN), 113.1 (C_q-CN); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₅H₁₆ClN₃ [M+H]⁺: 394.1111; Found: 394.1107.

3,5-Dibromopicolinonitrile – MR36100

Trimethylsilyl cyanide (6.3 mL, 50.0 mmol, 2.5 equiv) and triethylamine (4.7 mL, 33.4 mmol, 1.7 equiv) were added to a solution of 3,5-dibromopyridine 1-oxide **7** (5.0 g, 19.8 mmol, 1.0 equiv) in acetonitrile (250 mL). The reaction mixture was stirred for 12 h at 80 °C then cooled at rt. The reaction mixture was concentrated under reduce pressure. A solution of Na₂CO₃ (3N, 100 mL) was added followed by CH₂Cl₂ (100 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (0–10% EtOAc/cyclohexane) afforded 3,5-dibromopicolinonitrile **MR36100** (3.7 g, 71%) as a white solid. mp = 113 °C; LC-MS t_R = 4.73 min; IR/cm⁻¹ 3434, 3042, 2236 (CN), 1542, 1529, 1421, 1361, 1101, 1044, 909, 821, 739, 667, 565; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.5 (Pyr-CH), 142.8 (Pyr-CH), 133.4 (C_q-CN), 124.7 (C_q-Br), 124.6 (C_q-Br), 115.2 (CN); RX (ORTEP): Orthorhombic, *Pca*2₁, *a* = 14.5849(12) Å, *b* = 4.0415(3) Å, *c* = 12.4131(11) Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°, *V* = 731.69(10) Å³, *Z* = 4, *d* = 2.805, μ = 6.30 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.041, *R*[*F*²>2σ(*F*²)] = 0.031, *wR*(*F*²) = 0.054. The observed characterisation data was consistent with that previously reported in the literature.¹⁶¹

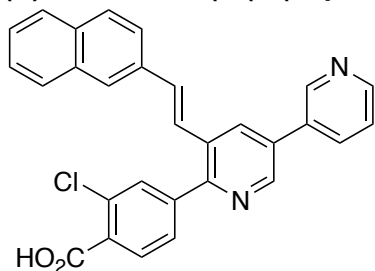
5-Bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine – MR36101

NaNO₂ (1.0 g, 24.0 mmol, 3.0 equiv) was added to a solution of 5-bromo-[3,3'-bipyridin]-6-amine **4** (2.0 g, 8.0 mmol, 1.0 equiv) in HCl (12N, 30 mL). The reaction mixture was stirred for 3 h at 25 °C then diluted with water (100 mL) and basified with NaOH (4N) until pH=8. The precipitate formed was filtered and washed with Et₂O to afford 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **MR36101** (2.4 g, quant) as a pale yellow solid. mp = 184–186 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 4.25 min *m/z* [M+H]⁺: 269.29; IR/cm⁻¹ 3011, 2927, 1595, 1573, 1532, 1421, 1366, 1161, 1013, 923, 805, 712; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.15 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.87 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 7.45 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1 H, Pyr-H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 150.6, 149.8, 147.8, 145.9, 140.4, 134.7, 133.8, 131.2, 124.0, 120.7; RX (ORTEP): Monoclinic, *P*2₁/*n*, *a* = 14.1461(6) Å, *b* = 3.7943(2) Å, *c* = 18.0885(8) Å, β = 95.459(2)°, *V* = 966.49(8) Å³, *Z* = 4, *d* = 1.852, μ = 4.49 mm⁻¹, *R*_{int} = 0.046, *R*[*F*²>2σ(*F*²)] = 0.021, *wR*(*F*²) = 0.054.

¹⁶¹Blank, B.; DiTullio, N. W.; Owings, F. F.; Deviney, L.; Miao, C. K.; Saunders, H. L. Mercapto Heterocyclic Carboxylic Acids, Analogs of 3-Mercaptopicolinic Acid. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (4), 572–576.

Partie expérimentale

(*E*)-2-Chloro-4-(5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid – MR36102



4-Borono-2-chlorobenzoic acid (144 mg, 0.72 mmol, 1.25 equiv), aq. sat. K_3PO_4 (308 mg, 1.45 mmol, 2.50 equiv) and tetrakis(triphenyl-phosphine) palladium(0) (34.0 mg, 5 mol%) were added to a solution of (*E*)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **12** (250 mg, 0.58 mmol, 1.00 equiv) in 1,4-dioxane (25 mL). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h then cooled to rt. Water (25 mL) was added followed by EtOAc (25 mL). The layers were separated and the aqueous portion was extracted with EtOAc (3 × 25 mL).

The aqueous layer was acidified by AcOH until the apparition of a precipitate. The precipitate was filtered to afford (*E*)-2-chloro-4-(5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzoic acid **MR36102** (209 mg, 78%) as a pale yellow solid. mp = 242 °C; LC-MS (ESI⁺) t_R = 5.62 min m/z [M+H]⁺: 463,56; IR/cm⁻¹ 3433, 2923, 1713, 1630, 1600, 1424, 1375, 1304, 1265, 1132, 1050, 812; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, Pyr-H), 9.00 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.69 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.64 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.35 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Pyr-H), 8.00 (s, 1 H, Ar-H), 7.92–7.87 (m, 3 H, 3 × Ar-H), 7.76–7.68 (m, 4 H, 3 × Ar-H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.61–7.57 (m, 2 H, Ar-H, Pyr-H), 7.53–7.47 (m, 2 H, 2 × Ar-H), 7.31 (d, J = 16.2 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9 (C=O), 154.0 (C_q-Pyr), 149.4 (Pyr-CH), 148.0 (Pyr-CH), 146.5 (Pyr-CH), 140.5 (C_q-Cl), 137.4 (C_q-CO), 134.6 (Pyr-CH), 134.4 (C_q-Ar), 133.2 (C_q-Ar), 132.8 (C_q-Ar), 132.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5 (Pyr-CH), 132.2 (C_q-Pyr), 132.1 (C_q-Pyr), 131.1 (C_q-Pyr), 130.7 (Ar-CH), 130.4 (C_q-Ar), 129.5 (Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 128.0 (Ar-CH), 127.6 (Ar-CH), 127.0 (Ar-CH), 126.6 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0 (Pyr-CH), 123.4 (Ar-CH); HRMS (ESI) m/z Calcd. for C₂₉H₁₉ClN₂O₂ [M+H]⁺: 463.1213; Found: 463.1228.

Annexes

I. Cibler une autre protéine : la protéine HSP110

Pendant mon doctorat, des composés de notre chimiothèque ont été testés par l'équipe du Docteur Carmen Garrido de l'Inserm UMR866 avec qui nous avons tissé une collaboration.

Cette équipe étudie les protéines HSP, et notamment la protéine HSP110, comme cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer colorectal. Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu dans le monde avec presque 1,4 million de nouveaux cas chaque année. Les HSP sont des chaperons impliqués dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées et dénaturées. Les HSP sont surexprimées lors des stress et participent à la survie des cellules par leurs propriétés anti-apoptotiques et anti-agrégations. HSP110 est surexprimée dans le cancer colorectal et est associée à un mauvais pronostic. HSP110 est donc une cible thérapeutique potentielle.

Un criblage *in vitro* réalisé avec les molécules du CERMN a permis de mettre en évidence trois composés (**MR31378**, **MR30850** et **MR30847**) qui auraient un effet sur l'activité d'anti-agrégation de la protéine HSP110 (Figure 94).

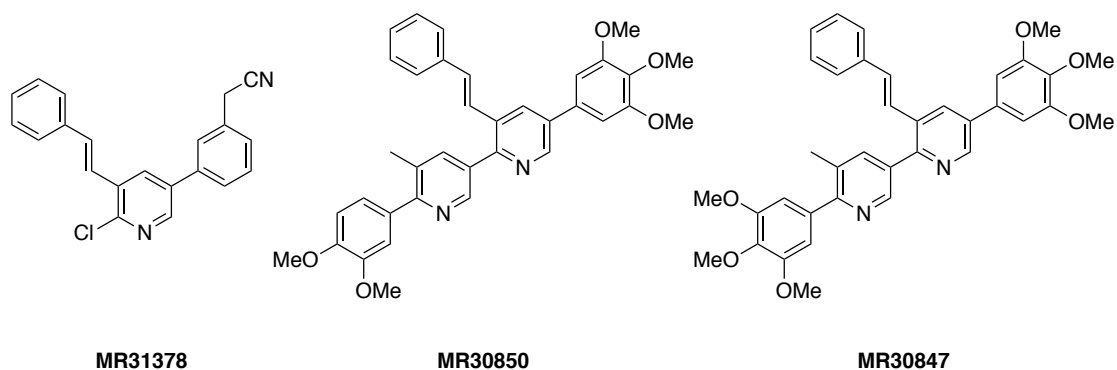


Figure 94 : Structure des trois composés potentiellement inhibiteurs de la protéine HSP110.

Dans la perspective de réaliser des tests *in vivo*, la synthèse à l'échelle du gramme de ces trois composés m'a été confiée. Elle a été réalisée par moi-même et par Laurianne Hardy que j'ai encadré lors de son stage de M1 *Drug Design*.

• **Synthèse du composé MR31378 :**

La molécule **MR31378** a été obtenue à partir de l'intermédiaire **MR29058** par une réaction de type Suzuki–Miyaura (Schéma 55).

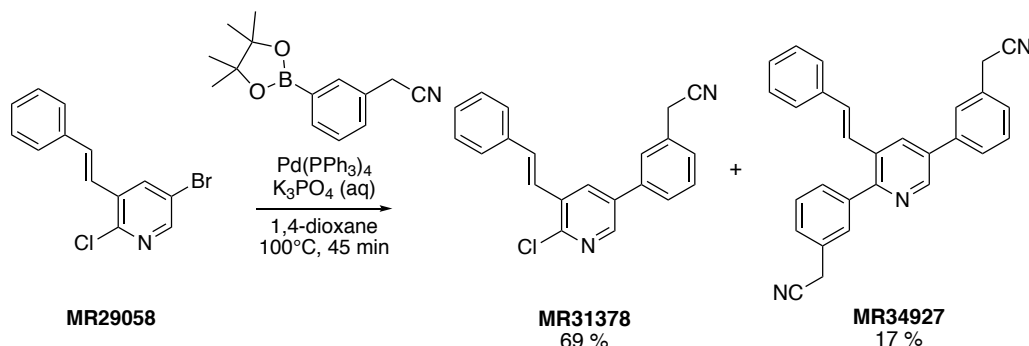


Schéma 55 : Synthèse du composé **MR31378**.

Le composé **MR31378** a été obtenu avec un rendement de 69 % et un produit secondaire **MR34927**, issu du bi-couplage, a été isolé avec un rendement de 17 %.

• **Synthèse des composés MR30850 et MR30847 :**

La rétrosynthèse suivante (Schéma 56) est envisagée pour accéder aux composés **MR30850** et **MR30847** à partir de la molécule **MR29058**, dont la synthèse, comprenant trois étapes, a déjà été présentée dans la section Travaux Personnels, Chapitre 2, partie II.2.

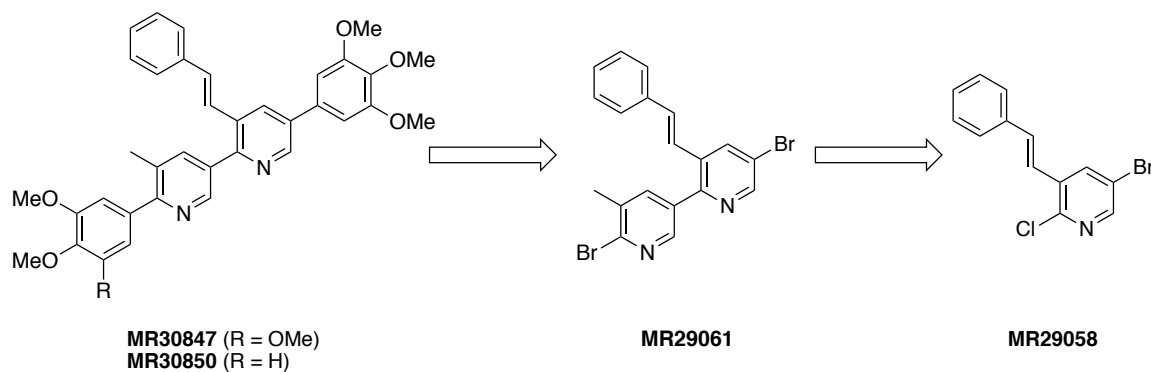


Schéma 56 : Rétrosynthèse pour accéder aux composés **MR30847** et **MR30850**.

Les molécules **MR30850** et **MR30847** sont synthétisées à partir de l'intermédiaire **MR29061**. Celui-ci est obtenu par un échange halogène–halogène suivi d'une réaction de couplage pallado-catalysée à partir de la molécule **MR29058**.

Annexe 1 – Cibler une autre protéine : la protéine HSP110

Deux étapes sont nécessaires pour synthétiser l'intermédiaire **MR29061** (Schéma 57).

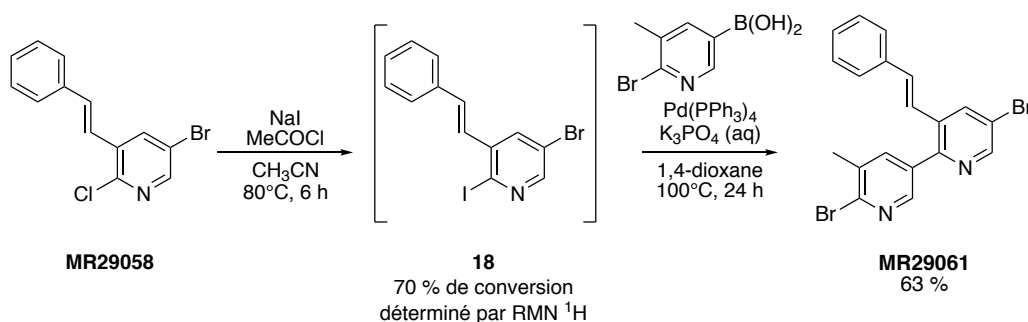


Schéma 57 : Synthèse du composé **MR29061**.

La première étape est un échange halogène–halogène pour augmenter la réactivité de la position 2 de la pyridine. Une substitution nucléophile par un iode nucléophile permet de convertir à 70 % (déterminé par RMN ^1H) le composé chloré **MR29058** en composé iodé **18**. Ce composé n'est pas isolé et il est directement engagé dans une réaction de type Suzuki–Miyaura pour obtenir le **MR29061** avec un rendement de 63 %.

Le composé **MR30847** est obtenu en une étape à partir du **MR29061** par une réaction de couplage pallado-catalysée (Schéma 58).

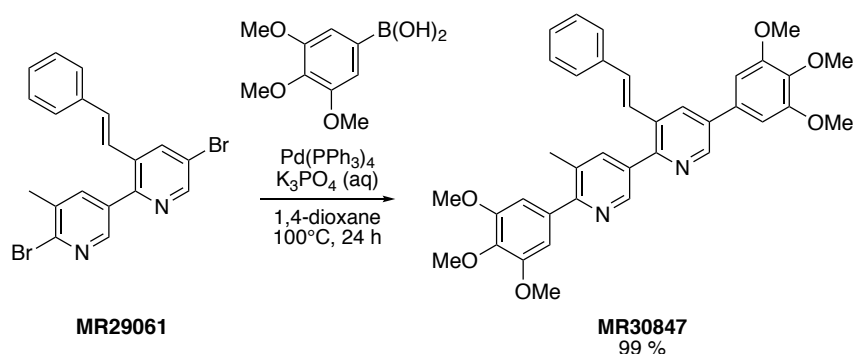


Schéma 58 : Synthèse du composé **MR30847**.

La réaction de couplage de type Suzuki–Miyaura est réalisée sur les deux atomes de brome de la molécule **MR29061** pour introduire un triméthoxybenzène sur chaque pyridine. La molécule résultante **MR30847** est obtenue avec un rendement de 99 %.

Concernant la molécule **MR30850**, les deux groupements (triméthoxyphényle et diméthoxyphényle) ne peuvent pas être introduits en même temps sur le composé **MR29061**. Il faut préalablement différencier les positions des deux atomes de brome pour ensuite introduire le groupement diméthoxyphényle puis le groupement triméthoxyphényle (Schéma 59).

Annexe 1 – Cibler une autre protéine : la protéine HSP110

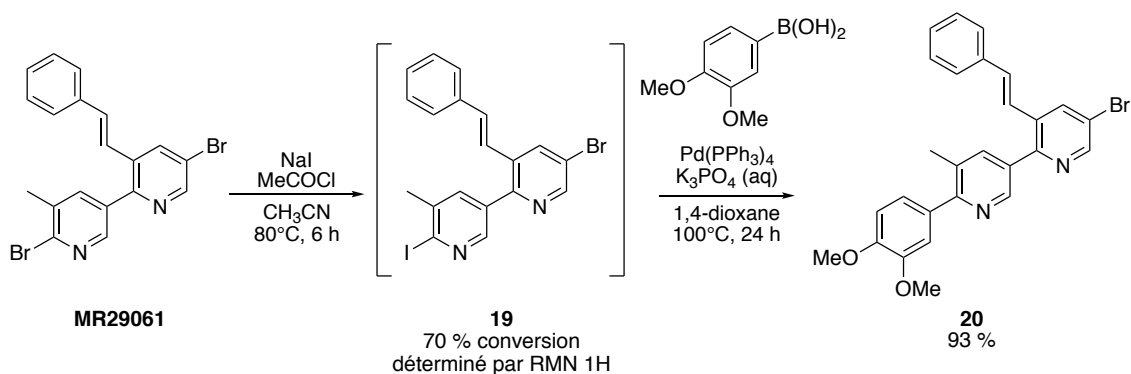


Schéma 59 : Synthèse de l'intermédiaire **20**.

L'échange de l'atome de brome en position 2 de la pyridine du composé **MR29061** par un atome d'iode permet d'obtenir l'intermédiaire **19**. Le composé **19** n'a pas été isolé et il a été engagé directement dans l'étape suivante. Une réaction de type Suzuki-Miyaura permet de synthétiser l'intermédiaire **20** avec un rendement de 93 %. La réaction, sélective de l'atome d'iode, permet d'introduire le diméthoxybenzène à la position souhaitée.

Enfin, une réaction pallado-catalysée à partir du composé **20** permet de synthétiser la molécule **MR30850** (Schéma 60).

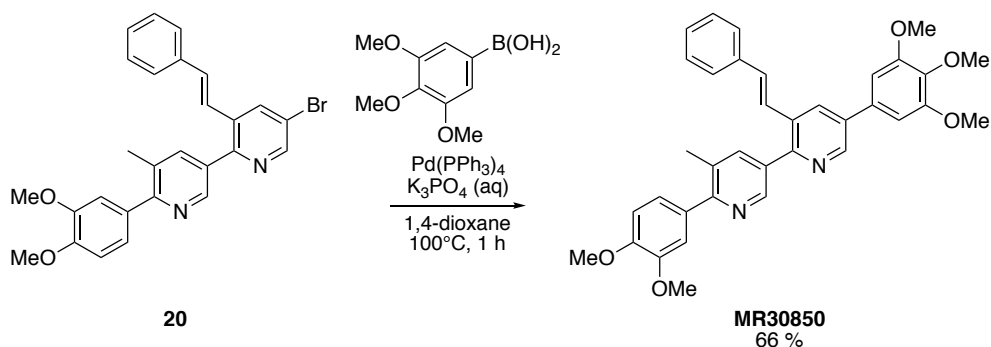


Schéma 60 : Synthèse du composé **MR30850**.

L'évaluation biologique de ces trois composés, réalisée par l'équipe du Docteur Garrido fait l'objet d'une publication intitulée *Abiotic foldamer targeting HSP110, a lead compound for colorectal Cancer Therapy* est en cours de soumission.

La molécule **MR30850** a été identifiée comme inhibiteur de HSP110. Elle se lie spécifiquement à HSP110 et inhibe la croissance des cellules cancéreuses colorectales *in vitro* et *in vivo*, sans qu'aucune toxicité ou qu'aucun effet indésirable ne soient observés. C'est alors le premier candidat médicament ciblant spécifiquement la protéine HSP110 pour le traitement personnalisé des patients atteints du cancer colorectal exprimant HSP110.

II. Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 issues de la Protein Data Bank

1. Structures tridimensionnelles de la protéine Bcl-x_L

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
1MAZ	Bcl-x _L	-	RX	2,2	Muchmore, S. W. <i>et al.</i> , 1996 ¹⁶²
1LXL	Bcl-x _L	-	RMN	-	Muchmore, S. W. <i>et al.</i> , 1996 ¹⁶²
1R2D	Bcl-x _L	-	RX	1,95	Manion, M. K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁶³
2B48	Bcl-x _L	-	RX	3,45	O'Neill, J. W. <i>et al.</i> , 2006 ¹⁶⁴
2LPC	Bcl-x _L	-	RMN	-	Wysoczanski, P. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁶⁵
2M03	Bcl-x _L	-	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁶⁶
2ME9	Bcl-x _L	-	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁶⁷
2M03	Bcl-x _L hexamère	-	RX	2,85	Rajan, S. <i>et al.</i> , 2015 ¹⁶⁸
1R2I	Bcl-x _L mutant	-	RX	2	Manion, M. K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁶³
1R2H	Bcl-x _L mutant	-	RX	2,2	Manion, M. K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁶³
1R2G	Bcl-x _L mutant	-	RX	2,7	Manion, M. K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁶³
1R2E	Bcl-x _L mutant	-	RX	2,1	Manion, M. K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁶³
3CVA	Bcl-x _L mutant	-	RX	2,7	Feng, Y. <i>et al.</i> , 2009 ¹⁶⁹

¹⁶²Muchmore, S. W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Yoon, H. S.; Nettlesheim, D.; Chang, B. S.; Thompson, C. B.; Wong, S.-L.; Ng, S. C.; Fesik, S. W. X-Ray and NMR Structure of Human Bcl-x_L, an Inhibitor of Programmed Cell Death. *Nature* **1996**, *381* (6580), 335–341.

¹⁶³Manion, M. K.; O'Neill, J. W.; Giedt, C. D.; Kim, K. M.; Zhang, K. Y. Z.; Hockenbery, D. M. Bcl-x_L Mutations Suppress Cellular Sensitivity to Antimycin A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (3), 2159–2165.

¹⁶⁴O'Neill, J. W.; Manion, M. K.; Maguire, B.; Hockenbery, D. M. BCL-x_L Dimerization by Three-Dimensional Domain Swapping. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356* (2), 367–381.

¹⁶⁵Wysoczanski, P.; Mart, R. J.; Loveridge, E. J.; Williams, C.; Whittaker, S. B.-M.; Crump, M. P.; Allemann, R. K. NMR Solution Structure of a Photoswitchable Apoptosis Activating Bak Peptide Bound to Bcl-x_L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (18), 7644–7647.

¹⁶⁶Follis, A. V.; Chipuk, J. E.; Fisher, J. C.; Yun, M.-K.; Grace, C. R.; Nourse, A.; Baran, K.; Ou, L.; Min, L.; White, S. W.; Green, D. R.; Kriwacki, R. W. PUMA Binding Induces Partial Unfolding within BCL-x_L to Disrupt p53 Binding and Promote Apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (3), 163–168.

¹⁶⁷Follis, A. V.; Llambi, F.; Ou, L.; Baran, K.; Green, D. R.; Kriwacki, R. W. The DNA-Binding Domain Mediates Both Nuclear and Cytosolic Functions of p53. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21* (6), 535–543.

¹⁶⁸Rajan, S.; Choi, M.; Nguyen, Q. T.; Ye, H.; Liu, W.; Toh, H. T.; Kang, C.; Kamariah, N.; Li, C.; Huang, H.; White, C.; Baek, K.; Gruber, G.; Yoon, H. S. Structural Transition in Bcl-x_L and Its Potential Association with Mitochondrial Calcium Ion Transport. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 10609.

¹⁶⁹Feng, Y.; Zhang, L.; Hu, T.; Shen, X.; Ding, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Liu, D. A Conserved Hydrophobic Core at Bcl-x_L Mediates Its Structural Stability and Binding Affinity with BH3-Domain Peptide of pro-Apoptotic Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *484* (1), 46–54.

**Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank**

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
6BF2	Bcl-x _L mutant	-	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2018 ¹⁷⁰
2MEJ	Bcl-x _L	p53	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁶⁷
2ME8	Bcl-x _L	p53	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁶⁷
4Z9V	Bcl-x _L	protéine TCTP	RX	2,10	Thébault, S. <i>et al.</i> , 2016 ¹⁷¹
1G5J	Bcl-x _L	Bad	RMN	-	Petros, A. M. <i>et al.</i> , 2000 ¹⁷²
2P1L	Bcl-x _L	Beclin 1	RX	2,5	Oberstein, A. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁷³
2PON	Bcl-x _L	Beclin 1	RMN	-	Feng, W. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁷⁴
3FDL	Bcl-x _L	BH3 Bim	RX	1,78	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2009 ¹⁷⁵
4QVF	Bcl-x _L	BH3 Bim	RX	1,53	Rajan, S. <i>et al.</i> , 2015 ¹⁷⁶
3R85	Bcl-x _L	BH3 Soul	RX	1,95	Ambrosi, E. <i>et al.</i> , 2011 ¹⁷⁷
3PL7	Bcl-x _L	BH3 Bak	RX	2,61	Czabotar, P. E. <i>et al.</i> , 2011 ¹⁷⁸
5FMK	Bcl-x _L	BH3 Bak	RX	1,73	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2016 ¹⁷⁹
5FMJ	Bcl-x _L	BH3 Bak souris	RX	2,43	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2016 ¹⁷⁹
4HNJ	Bcl-x _L	BH3 Puma	RX	2,9	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁶⁶
2M04	Bcl-x _L	BH3 Puma	RMN	-	Follis, A. V. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁶⁶

¹⁷⁰Follis, A. V.; Llambi, F.; Kalkavan, H.; Yao, Y.; Phillips, A. H.; Park, C.-G.; Marassi, F. M.; Green, D. R.; Kriwacki, R. W. Regulation of Apoptosis by an Intrinsically Disordered Region of Bcl-x_L. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14* (5), 458–465.

¹⁷¹Thébault, S.; Agez, M.; Chi, X.; Stojko, J.; Cura, V.; Telerman, S. B.; Maillet, L.; Gautier, F.; Billas-Massobrio, I.; Bircck, C.; Troffer-Charlier, N.; Karafin, T.; Honoré, J.; Senff-Ribeiro, A.; Montessuit, S.; Johnson, C. M.; Juin, P.; Cianférani, S.; Martinou, J.-C.; Andrews, D. W.; Amson, R.; Telerman, A.; Cavarelli, J. TCTP Contains a BH3-like Domain, Which instead of Inhibiting, Activates Bcl-x_L. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 19725.

¹⁷²Petros, A. M.; Nettesheim, D. G.; Wang, Y.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Mack, J.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Thompson, C. B. Rationale for Bcl-x_L/Bad Peptide Complex Formation from Structure, Mutagenesis, and Biophysical Studies. *Protein Sci.* **2000**, *9* (12), 2528–2534.

¹⁷³Oberstein, A.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y. Crystal Structure of the Bcl-x_L-Beclin 1 Peptide Complex: Beclin 1 Is a Novel BH3-Only Protein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (17), 13123–13132.

¹⁷⁴Feng, W.; Huang, S.; Wu, H.; Zhang, M. Molecular Basis of Bcl-x_L's Target Recognition Versatility Revealed by the Structure of Bcl-x_L in Complex with the BH3 Domain of Beclin-1. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372* (1), 223–235.

¹⁷⁵Lee, E.F., Sadowsky, J.D., Smith, B.J., Czabotar, P.E., Peterson-Kaufman, K.J., Colman, P.M., Gellman, S.H., Fairlie, W. D. High-Resolution Structural Characterization of a Helical α/β -Peptide Foldamer Bound to the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x(L). *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **2009**, *48*, 4318–4322.

¹⁷⁶Rajan, S.; Choi, M.; Baek, K.; Yoon, H. S. Bh3 Induced Conformational Changes in Bcl-x_L Revealed by Crystal Structure and Comparative Analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2015**, *83* (7), 1262–1272.

¹⁷⁷Ambrosi, E.; Capaldi, S.; Bovi, M.; Saccomani, G.; Perduca, M.; Monaco, H. L. Structural Changes in the BH3 Domain of SOUL Protein upon Interaction with the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x_L. *Biochem. J.* **2011**, *438* (2), 291–301.

¹⁷⁸Czabotar, P. E.; Lee, E. F.; Thompson, G. V.; Wardak, A. Z.; Fairlie, W. D.; Colman, P. M. Mutation to Bax beyond the BH3 Domain Disrupts Interactions with pro-Survival Proteins and Promotes Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (9), 7123–7131.

¹⁷⁹Lee, E. F.; Grabow, S.; Chappaz, S.; Dewson, G.; Hockings, C.; Kluck, R. M.; Debrincat, M. A.; Gray, D. H.; Witkowski, M. T.; Evangelista, M.; Pettikiriachchi, A.; Bouillet, P.; Lane, R. M.; Czabotar, P. E.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Kile, B. T.; Fairlie, W. D. Physiological Restraint of Bak by Bcl-x_L Is Essential for Cell Survival. *Genes Dev.* **2016**, *30* (10), 1240–1250.

**Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank**

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
4CIN	Bcl-x _L	BH3 Bcl-x _L	RX	2,69	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁸⁰
4QVE	Bcl-x _L	BH3 Bid	RX	2,05	Rajan, S. <i>et al.</i> , 2015 ¹⁷⁶
3IO8	Bcl-x _L	Bim mutant (BimL12Y)	RX	2,3	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2009 ¹⁸¹
5VX3	Bcl-x _L	Bim-h3Pc-RT	RX	1,95	Brouwer, J. M. <i>et al.</i> , 2017 ¹⁸²
2LP8	Bcl-x _L	Bak mutant	RMN	-	Wysoczanski, P. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁶⁵
3FDM	Bcl-x _L	α/β -Peptide Foldamer	RX	2,26	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2009 ¹⁸¹
2YJ1	Bcl-x _L	α/β -Puma BH3 Foldamer	RX	2,24	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2011 ¹⁸³
4BPK	Bcl-x _L	α/β -Puma BH3 Foldamer	RX	1,76	Smith, B. J. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁴
4A1W	Bcl-x _L	α/β -Bim BH3 Foldamer	RX	2,50	Boersma, M. D. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁸⁵
4A1U	Bcl-x _L	α/β -Bim BH3 Foldamer	RX	1,54	Boersma, M. D. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁸⁵
2YQ7	Bcl-x _L	BimLOCK	RX	1,90	Okamoto, T. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁶
2YQ6	Bcl-x _L	BimSAHB	RX	1,80	Okamoto, T. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁶
5C3G	Bcl-x _L	Peptide contraint Bim-MM	RX	2,45	Miles, J. A. <i>et al.</i> , 2016 ¹⁸⁷
1YSN	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Oltersdorf, T. <i>et al.</i> , 2005 ¹⁸⁸

¹⁸⁰Lee, E. F.; Dewson, G.; Evangelista, M.; Pettikirarachchi, A.; Gold, G. J.; Zhu, H.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. The Functional Differences between pro-Survival and pro-Apoptotic B Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) Proteins Depend on Structural Differences in Their Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domains. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (52), 36001–36017.

¹⁸¹Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Yang, H.; Sleeb, B. E.; Lessene, G.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Fairlie, W. D. Conformational Changes in Bcl-2 pro-Survival Proteins Determine Their Capacity to Bind Ligands. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (44), 30508–30517.

¹⁸²Brouwer, J. M.; Lan, P.; Cowan, A. D.; Bernardini, J. P.; Birkinshaw, R. W.; van Delft, M. F.; Sleeb, B. E.; Robin, A. Y.; Wardak, A.; Tan, I. K.; Reljik, B.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Call, M. J.; Smith, B. J.; Dewson, G.; Lessene, G.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E. Conversion of Bim-BH3 from Activator to Inhibitor of Bak through Structure-Based Design. *Mol. Cell* **2017**, *68* (4), 659–672.

¹⁸³Lee, E. F.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Mayer, K. N.; Evangelista, M.; Colman, P. M.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. Structural Basis of Bcl-x_L Recognition by a BH3-Mimetic α/β -Peptide Generated by Sequence-Based Design. *ChemBioChem* **2011**, *12* (13), 2025–2032.

¹⁸⁴Smith, B. J.; Lee, E. F.; Checco, J. W.; Evangelista, M.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. Structure-Guided Rational Design of α/β -Peptide Foldamers with High Affinity for BCL-2 Family Prosurvival Proteins. *ChemBioChem* **2013**, *14* (13), 1564–1572.

¹⁸⁵Boersma, M. D.; Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Fairlie, W. D.; Gellman, S. H. Evaluation of Diverse α/β -Backbone Patterns for Functional α -Helix Mimicry: Analogues of the Bim BH3 Domain. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 315–323.

¹⁸⁶Okamoto, T.; Zobel, K.; Fedorova, A.; Quan, C.; Yang, H.; Fairbrother, W. J.; Huang, D. C. S.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Czabotar, P. E. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (2), 297–302.

¹⁸⁷Miles, J. A.; Yeo, D. J.; Rowell, P.; Rodriguez-Marin, S.; Pask, C. M.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Hydrocarbon Constrained Peptides – Understanding Preorganisation and Binding Affinity. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (6), 3694–3702.

¹⁸⁸Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettlesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H. An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Induces Regression of Solid Tumours. *Nature* **2005**, *435* (7042), 677–681.

**Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank**

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
1YSI	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Oltersdorf, T. <i>et al.</i> , 2005 ¹⁸⁸
1YSG	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Oltersdorf, T. <i>et al.</i> , 2005 ¹⁸⁸
2O2M	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁸⁹
2O2N	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁸⁹
2O1Y	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RMN	-	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁸⁹
2YXJ	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,2	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2007 ¹⁹⁰
3INQ	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2009 ¹⁸¹
3QKD	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,02	Sleebbs, B. E., 2011 ¹⁹¹
4EHR	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,09	Schroeder, G. M. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁹²
4AQ3	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,4	Perrez, H. L. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁹³
3SPF	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	1,7	Zhou, H. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁹⁴
3SP7	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	1,4	Zhou, H. <i>et al.</i> , 2012 ¹⁹⁴
3ZLR	Bcl-x _L	Molécule synthétique WEHI-539	RX	2,03	Lessene, G. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁵
3ZLO	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,60	Lessene, G. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁵
3ZLN	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,29	Lessene, G. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁵
3ZK6	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,48	Lessene, G. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁵

¹⁸⁹Bruncko, M.; Oost, T. K.; Belli, B. A.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Kunzer, A.; Martineau, D.; McClellan, W. J.; Mitten, M.; Ng, S.-C.; Nimmer, P. M.; Oltersdorf, T.; Park, C.; Petros, A. M.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. Studies Leading to Potent, Dual Inhibitors of Bcl-2 and Bcl-x_L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (4), 641–662.

¹⁹⁰Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. Crystal Structure of ABT-737 Complexed with Bcl-x_L: Implications for Selectivity of Antagonists of the Bcl-2 Family. *Cell Death Differ.* **2007**, *14* (9), 1711–1713.

¹⁹¹Sleebbs, B. E.; Czabotar, P. E.; Fairbrother, W. J.; Fairlie, W. D.; Flygare, J. A.; Huang, D. C. S.; Kersten, W. J. A.; Koehler, M. F. T.; Lessene, G.; Lowes, K.; Parisot, J. P.; Smith, B. J.; Smith, M. L.; Souers, A. J.; Street, I. P., Yang, H.; Baell, J. B. Quinazoline Sulfonamides as Dual Binders of the Proteins B-Cell Lymphoma 2 and B-Cell Lymphoma Extra Long with Potent Proapoptotic Cell-Based Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (6), 1914–1926.

¹⁹²Schroeder, G. M.; Wei, D.; Banfi, P.; Cai, Z.-W.; Lippy, J.; Menichincheri, M.; Modugno, M.; Naglich, J.; Penhallow, B.; Perez, H. L.; Sack, J.; Schmidt, R. J.; Tebben, A.; Yan, C.; Zhang, L.; Galvani, A.; Lombardo, L. J.; Borzilleri, R. M. Pyrazole and Pyrimidine Phenylacetylsulfonamides as Dual Bcl-2/Bcl-x_L Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (12), 3951–3956.

¹⁹³Perez, H. L.; Banfi, P.; Bertrand, J.; Cai, Z.-W.; Grebinski, J. W.; Kim, K.; Lippy, J.; Modugno, M.; Naglich, J.; Schmidt, R. J.; Tebben, A.; Vianello, P.; Wei, D. D.; Zhang, L.; Galvani, A.; Lombardo, L. J.; Borzilleri, R. M. Identification of a Phenylacetylsulfonamide Series of Dual Bcl-2/Bcl-x_L Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (12), 3946–3950.

¹⁹⁴Zhou, H.; Chen, J.; Meagher, J. L.; Yang, C.-Y.; Aguilar, A.; Liu, L.; Bai, L.; Cong, X.; Cai, Q.; Fang, X.; Stuckey, J. A.; Wang, S. Design of Bcl-2 and Bcl-x_L Inhibitors with Subnanomolar Binding Affinities Based upon a New Scaffold. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (10), 4664–4682.

¹⁹⁵Lessene, G.; Czabotar, P. E.; Sleebbs, B. E.; Zobel, K.; Lowes, K. N.; Adams, J. M.; Baell, J. B.; Colman, P. M.; Deshayes, K.; Fairbrother, W. J.; Flygare, J. A.; Gibbons, P.; Kersten, W. J. A.; Kulasegaram, S.; Moss, R. M.; Parisot, J. P.; Smith, B. J.; Street, I. P.; Yang, H.; Huang, D. C. S.; Watson, K. G. Structure-Guided Design of a Selective BCL-X_L Inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (6), 390–397.

Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
4IEH	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,1	Touré, B. B. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁶
3WIZ	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,45	Tanaka, Y. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁷
4C5D	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,3	Brady, R. M. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁹⁸
4C52	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,05	Brady, R. M. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁹⁸
4TUH	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	1,8	Koehler, M. F. <i>et al.</i> , 2014 ¹⁹⁹
4QVX	Bcl-x _L	Molécule synthétique	RX	2,1	Tao, Z. F. <i>et al.</i> , 2014 ²⁰⁰

Tableau 15 : Structures tridimensionnelles de la protéine Bcl-x_L en forme apo ou complexées déterminées par RMN ou diffraction RX.

¹⁹⁶Touré, B. B.; Miller-Moslin, K.; Yusuff, N.; Perez, L.; Doré, M.; Joud, C.; Michael, W.; DiPietro, L.; van der Plas, S.; McEwan, M.; Lenoir, F.; Hoe, M.; Karki, R.; Springer, C.; Sullivan, J.; Levine, K.; Fiorilla, C.; Xie, X.; Kulathila, R.; Herlihy, K.; Porter, D.; Visser, M. The Role of the Acidity of N-Heteroaryl Sulfonamides as Inhibitors of Bcl-2 Family Protein–Protein Interactions. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (2), 186–190.

¹⁹⁷Tanaka, Y.; Aikawa, K.; Nishida, G.; Homma, M.; Sogabe, S.; Igaki, S.; Hayano, Y.; Sameshima, T.; Miyahisa, I.; Kawamoto, T.; Tawada, M.; Imai, Y.; Inazuka, M.; Cho, N.; Imaeda, Y.; Ishikawa, T. Discovery of Potent Mcl-1/Bcl-x_L Dual Inhibitors by Using a Hybridization Strategy Based on Structural Analysis of Target Proteins. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9635–9645.

¹⁹⁸Brady, R. M.; Vom, A.; Roy, M. J.; Toovey, N.; Smith, B. J.; Moss, R. M.; Hatzis, E.; Huang, D. C. S.; Parisot, J. P.; Yang, H.; Street, I. P.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E.; Baell, J. B.; Lessene, G. De-Novo Designed Library of Benzoylureas as Inhibitors of BCL-X_L: Synthesis, Structural and Biochemical Characterization. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1323–1343.

¹⁹⁹Koehler, M. F. T.; Bergeron, P.; Choo, E. F.; Lau, K.; Ndubaku, C.; Dudley, D.; Gibbons, P.; Sleebbs, B. E.; Rye, C. S.; Nikolakopoulos, G.; Bui, C.; Kulasegaram, S.; Kersten, W. J. A.; Smith, B. J.; Czabotar, P. E.; Colman, P. M.; Huang, D. C. S.; Baell, J. B.; Watson, K. G.; Hasvold, L.; Tao, Z. -F.; Wang, L.; Souers, A. J.; Elmore, S. W.; Flygare, J. A.; Fairbrother, W. J.; Lessene, G. Structure-Guided Rescaffolding of Selective Antagonists of BCL-X_L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (6), 662–667.

²⁰⁰Tao, Z.-F.; Hasvold, L.; Wang, L.; Wang, X.; Petros, A. M.; Park, C. H.; Boghaert, E. R.; Catron, N. D.; Chen, J.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E.; Deshayes, K.; Fairbrother, W. J.; Flygare, J. A.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Judge, R. A.; Koehler, M. F. T.; Kovar, P. J.; Lessene, G.; Mitten, M. J.; Ndubaku, C. O.; Nimmer, P.; Purkey, H. E.; Oleksijew, A.; Phillips, D. C.; Sleebbs, B. E.; Smith, B. J.; Smith, M. L.; Tahir, S. K.; Watson, K. G.; Xiao, Y.; Xue, J.; Zhang, H.; Zobel, K.; Rosenberg, S. H.; Tse, C.; Levenson, J. D.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. Discovery of a Potent and Selective BCL-X_L Inhibitor with *in Vivo* Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (10), 1088–1093.

Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank

2. Structures tridimensionnelles de la protéine Mcl-1

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
2MHS	Mcl-1	-	RMN	-	Liu, G. <i>et al.</i> , 2014 ²⁰¹
4WMS	Maltose-Binding Protein (MBP) Mcl-1	-	RX	1,9	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4HW4	BH3 Mcl-1	-	RX	1,53	Friberg, A. <i>et al.</i> , 2013 ²⁰³
3MK8	Mcl-1	Mcl-1 BH3	RX	2,32	Stewart, M. L. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁴
2KBW	Mcl-1	BH3 Bid	RMN	-	Liu, Q. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁵
3PK1	Mcl-1	BH3 Bak	RX	2,49	Czabotar, P. E. <i>et al.</i> , 2011 ²⁰⁶
2NLA	Mcl-1 humain, souris	BH3 mNoxaB souris	RX	2,8	Czabotar, P. E. <i>et al.</i> , 2007 ²⁰⁷
2NL9	Mcl-1 humain, souris	Bim	RX	1,55	Czabotar, P. E. <i>et al.</i> , 2007 ²⁰⁷
2PQK	Mcl-1	BH3 Bim	RX	2	Fire, E. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁸
3KJ0	Mcl-1	Bim BH3 mutant (I2dY)	RX	1,7	Fire, E. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁸
3KJ1	Mcl-1	Bim BH3 mutant (I2dA)	RX	1,95	Fire, E. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁸
3KJ2	Mcl-1	Bim BH3 mutant (F4aE)	RX	2,35	Fire, E. <i>et al.</i> , 2010 ²⁰⁸
3IO9	Mcl-1	Bim mutant (BimL12Y)	RX	2,4	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2009 ²⁰⁹

²⁰¹Liu, G.; Poppe, L.; Aoki, K.; Yamane, H.; Lewis, J.; Szyperski, T. High-Quality NMR Structure of Human Anti-Apoptotic Protein Domain Mcl-1(171-327) for Cancer Drug Design. *PLoS One* **2014**, *9* (5), e96521.

²⁰²Clifton, M. C.; Dranow, D. M.; Leed, A.; Fulroth, B.; Fairman, J. W.; Abendroth, J.; Atkins, K. A.; Wallace, E.; Fan, D.; Xu, G.; Ni, Z. J.; Daniels, D.; Van Drie, J.; Wei, G.; Burgin, A. B.; Golub, T. R. Hubbard, B. K.; Serrano-Wu, M. H. A Maltose-Binding Protein Fusion Construct Yields a Robust Crystallography Platform for MCL1. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0125010.

²⁰³Friberg, A.; Vigil, D.; Zhao, B.; Daniels, R. N.; Burke, J. P.; Garcia-Barrantes, P. M.; Camper, D.; Chauder, B. A.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of Potent Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (1), 15–30.

²⁰⁴Stewart, M. L.; Fire, E.; Keating, A. E.; Walensky, L. D. The MCL-1 BH3 Helix Is an Exclusive MCL-1 Inhibitor and Apoptosis Sensitizer. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (8), 595–601.

²⁰⁵Liu, Q.; Moldoveanu, T.; Sprules, T.; Matta-Camacho, E.; Mansur-Azzam, N.; Gehring, K. Apoptotic Regulation by MCL-1 through Heterodimerization. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (25), 19615–19624.

²⁰⁶Czabotar, P. E.; Lee, E. F.; Thompson, G. V.; Wardak, A. Z.; Fairlie, W. D.; Colman, P. M. Mutation to Bax beyond the BH3 Domain Disrupts Interactions with pro-Survival Proteins and Promotes Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (9), 7123–7131.

²⁰⁷Czabotar, P. E.; Lee, E. F.; Van Delft, M. F.; Day, C. L.; Smith, B. J.; Huang, D. C. S.; Fairlie, W. D.; Hinds, M. G.; Colman, P. M. Structural Insights into the Degradation of Mcl-1 Induced by BH3 Domains. **2007**, *104* (15) 6217–6222.

²⁰⁸Fire, E.; Gullá, S. V.; Grant, R. A.; Keating, A. E. Mcl-1–Bim Complexes Accommodate Surprising Point Mutations via Minor Structural Changes. *Protein Sci.* **2010**, *19* (3), 507–519.

²⁰⁹Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Yang, H.; Sleebbs, B. E.; Lessene, G.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Fairlie, W. D. Conformational Changes in Bcl-2 pro-Survival Proteins Determine Their Capacity to Bind Ligands. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (44), 30508–30517.

*Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank*

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
5VX2	Mcl-1 humain, souris	Bim-h3Pc-RT	RX	1,85	Brouwer, J. M. <i>et al.</i> , 2017 ²¹⁰
5W8F	Mcl-1	Bim BH3 peptide SAH-MS1-14	RX	1,85	Rezaei Araghi, R. <i>et al.</i> , 2018 ²¹¹
5W89	Mcl-1	Bim BH3 peptide SAH-MS1-18	RX	1,42	Rezaei Araghi, R. <i>et al.</i> , 2018 ²¹¹
3D7V	Mcl-1	Mcl-1 selective BH3 ligand	RX	2,03	Lee, E. F. <i>et al.</i> , 2008 ²¹²
3KZ0	Mcl-1	Mcl-1-specific selected peptide	RX	2,35	Dutta, S. <i>et al.</i> , 2010 ²¹³
4BPJ	Mcl-1 humain, souris	α/β -Puma BH3 peptide	RX	1,60	Smith, B. J. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁴
4BPI	Mcl-1 humain, souris	α/β -Puma BH3 peptide	RX	1,98	Smith, B. J. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁸⁴
5C3F	Mcl-1	Peptide contraint Bid-MM	RX	1,43	Miles, J. A. <i>et al.</i> , 2016 ²¹⁴
3JSB	Mcl-1	Peptide non naturel	RX	2,74	Berger, S. <i>et al.</i> , 2016 ²¹⁵
5KU9	Mcl-1 humain, souris	Peptide non naturel	RX	2,2	Johannes, J. W. <i>et al.</i> , 2017 ²¹⁶
5MEV	Mcl-1 humain, souris	Peptide non naturel	RX	2,94	Johannes, J. W. <i>et al.</i> , 2017 ²¹⁶
5MES	Mcl-1 humain, souris	Peptide non naturel	RX	2,24	Johannes, J. W. <i>et al.</i> , 2017 ²¹⁶
5UUM	Mcl-1	Bfl-1-specific selected peptide	RX	2,35	Jenson, J. M. <i>et al.</i> , 2017 ²¹⁷
4HW3	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,4	Friberg, A. <i>et al.</i> , 2013 ²⁰³
4HW2	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,8	Friberg, A. <i>et al.</i> , 2013 ²⁰³
3WIY	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,15	Tanaka, Y. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁷

²¹⁰Brouwer, J. M.; Lan, P.; Cowan, A. D.; Bernardini, J. P.; Birkinshaw, R. W.; van Delft, M. F.; Sleeb, B. E.; Robin, A. Y.; Wardak, A.; Tan, I. K.; Reljik, B.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Call, M. J.; Smith, B. J.; Dewson, G.; Lessene, G.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E. Conversion of Bim-BH3 from Activator to Inhibitor of Bak through Structure-Based Design. *Mol. Cell* **2017**, *68* (4), 659–672.

²¹¹Rezaei Araghi, R.; Bird, G. H.; Ryan, J. A.; Jenson, J. M.; Godes, M.; Pritz, J. R.; Grant, R. A.; Letai, A.; Walensky, L. D.; Keating, A. E. Iterative Optimization Yields Mcl-1-Targeting Stapled Peptides with Selective Cytotoxicity to Mcl-1-Dependent Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (5), 886–895.

²¹²Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; van Delft, M. F.; Michalak, E. M.; Boyle, M. J.; Willis, S. N.; Puthalakath, H.; Bouillet, P.; Colman, P. M.; Huang, D. C. S.; Fairlie, W. D. A Novel BH3 Ligand That Selectively Targets Mcl-1 Reveals That Apoptosis Can Proceed without Mcl-1 Degradation. *J. Cell Biol.* **2008**, *180* (2), 341–355.

²¹³Dutta, S.; Gullá, S.; Chen, T. S.; Fire, E.; Grant, R. A.; Keating, A. E. Determinants of BH3 Binding Specificity for Mcl-1 versus Bcl-x_L. *J. Mol. Biol.* **2010**, *398* (5), 747–762.

²¹⁴Miles, J. A.; Yeo, D. J.; Rowell, P.; Rodriguez-Marin, S.; Pask, C. M.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Hydrocarbon Constrained Peptides – Understanding Preorganisation and Binding Affinity. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (6), 3694–3702.

²¹⁵Berger, S.; Procko, E.; Margineantu, D.; Lee, E. F.; Shen, B. W.; Zelter, A.; Silva, D.-A.; Chawla, K.; Herold, M. J.; Garnier, J.-M.; Johnson, R.; MacCoss, M. J.; Lessene, G.; Davis, T. N.; Stayton, P. S.; Stoddard, B. L.; Fairlie, W. D.; Hockenbery, D. M.; Baker, D. Computationally Designed High Specificity Inhibitors Delineate the Roles of BCL2 Family Proteins in Cancer. *Elife* **2016**, *5*, e20352.

²¹⁶Johannes, J. W.; Bates, S.; Beigie, C.; Belmonte, M. A.; Breen, J.; Cao, S.; Centrella, P. A.; Clark, M. A.; Cuozzo, J. W.; Dumelin, C. E.; Ferguson, A. D.; Habeshian, S.; Hargreaves, D.; Joubran, C.; Kazmirski, S.; Keefe, A. D.; Lamb, M. L.; Lan, H.; Li, Y.; Ma, H.; Mlynarski, S.; Packer, M. J.; Rawlins, D. M.; Robbins, D. W.; Shen, H.; Sigel, E. A.; Soutter, H. H.; Su, N.; Troast, D. M.; Wang, H.; Wickson, K. F.; Wu, C.; Zhang, Y.; Zhao, Q.; Zheng, X.; Hird, A. W. Structure Based Design of Non-Natural Peptidic Macrocyclic Mcl-1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (2), 239–244.

²¹⁷Jenson, J. M.; Ryan, J. A.; Grant, R. A.; Letai, A.; Keating, A. E. Epistatic Mutations in PUMA BH3 Drive an Alternate Binding Mode to Potently and Selectively Inhibit Anti-Apoptotic Bfl-1. *Elife* **2017**, *6*, e25541.

*Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank*

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
3WIX	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,9	Tanaka, Y. <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹⁷
4OQ6	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,81	Petros, A. M. <i>et al.</i> , 2014 ²¹⁸
4OQ5	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,86	Petros, A. M. <i>et al.</i> , 2014 ²¹⁸
4WGI	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,85	Fang, C. <i>et al.</i> , 2014 ²¹⁹
4ZBI	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,5	Burke, J. P. <i>et al.</i> , 2015 ²²⁰
4ZBF	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,2	Burke, J. P. <i>et al.</i> , 2015 ²²⁰
4WMX	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4WMW	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,9	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4WMV	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,4	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4WMU	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,55	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4WMT	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,35	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
4WMR	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,7	Clifton, M. C. <i>et al.</i> , 2015 ²⁰²
5FDR	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,6	Pelz, N. F. <i>et al.</i> , 2016 ²²¹
5FDO	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,8	Pelz, N. F. <i>et al.</i> , 2016 ²²¹
5FC4	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,5	Pelz, N. F. <i>et al.</i> , 2016 ²²¹
5LOF	MBP-Mcl-1	Molécule synthétique S63845	RX	2,2	Kotschy, A. <i>et al.</i> , 2016 ²²²

²¹⁸Petros, A. M.; Swann, S. L.; Song, D.; Swinger, K.; Park, C.; Zhang, H.; Wendt, M. D.; Kunzer, A. R.; Souers, A. J.; Sun, C. Fragment-Based Discovery of Potent Inhibitors of the Anti-Apoptotic MCL-1 Protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (6), 1484–1488.

²¹⁹Fang, C.; D'Souza, B.; Thompson, C. F.; Clifton, M. C.; Fairman, J. W.; Fulroth, B.; Leed, A.; McCarren, P.; Wang, L.; Wang, Y.; Feau, C.; Kaushil, V. K.; Palmer, M.; Wei, G.; Golub, T. R.; Hubbard, B. K.; Serrano-Wu, M. H. Single Diastereomer of a Macrolactam Core Binds Specifically to Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL1). *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (12), 1308–1312.

²²⁰Burke, J. P.; Bian, Z.; Shaw, S.; Zhao, B.; Goodwin, C. M.; Belmar, J.; Browning, C. F.; Vigil, D.; Friberg, A.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of Tricyclic Indoles That Potently Inhibit Mcl-1 Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3794–3805.

²²¹Pelz, N. F.; Bian, Z.; Zhao, B.; Shaw, S.; Tarr, J. C.; Belmar, J.; Gregg, C.; Camper, D. V.; Goodwin, C. M.; Arnold, A. L.; Sensintaffar, J. L.; Friberg, A.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery of 2-Indole-Acylsulfonamide Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (5), 2054–2066.

²²²Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G. L.; Gong, J.-N.; Moujalled, D. M.; Bruno, A.; Csekei, M.; Paczal, A.; Szabo, Z. B.; Sipos, S.; Radics, G.; Proszenyak, A.; Balint, B.; Ondi, L.; Blasko, G.; Robertson, A.; Surgenor, A.; Dokurno, P.; Chen, I.; Matassova, N.; Smith, J.; Pedder, C.; Graham, C.; Studeny, A.; Lysiak-Auvity, G.; Girard, A. -M.; Gravé, F.; Segal, D.; Riffkin, C. D.; Pomilio, G.; Galbraith, L. C. A.; Aubrey, B. J.; Brennan, M. S.; Herold, M.; Chang, C.; Guasconi, G.; Cauquil, N.; Melchiorre, F.; Guigal-Stephan, N.; Lockhart, B.; Colland, F.; Hickman, J. A.; Roberts, A. W.; Huang, D. C. S.; Wei, A. H.; Strasser, A.; Lessene, G.; Geneste, O. The MCL1 Inhibitor S63845 Is Tolerable and Effective in Diverse Cancer Models. *Nature* **2016**, *538* (7626), 477–482.

**Annexe 2 – Structures tridimensionnelles des protéines Bcl-x_L et Mcl-1
issues de la Protein Data Bank**

Code PDB	Protéine	Ligand	Méthode	Résolution (Å)	Référence
5IF4	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,39	Lee, T. <i>et al.</i> , 2017 ²²³
5IEZ	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,6	Lee, T. <i>et al.</i> , 2017 ²²³
5VKC	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,31	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2015 ²²⁴
6B4U	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	1,95	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2015 ²²⁴
6B4L	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,25	Bruncko, M. <i>et al.</i> , 2015 ²²⁴
6BW8	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2,9	Shaw, S. <i>et al.</i> , 2018 ²²⁵
6BW2	Mcl-1	Molécule synthétique	RX	2.75	Shaw, S. <i>et al.</i> , 2018 ²²⁵

Tableau 16 : Structures tridimensionnelles de la protéine Mcl-1 en forme apo ou complexées déterminées par RMN ou diffraction RX.

²²³Lee, T.; Bian, Z.; Zhao, B.; Hogdal, L. J.; Sensintaffar, J. L.; Goodwin, C. M.; Belmar, J.; Shaw, S.; Tarr, J. C.; Veerasamy, N.; Matulis, S. M.; Koss, B.; Fisher, M. A.; Arnold, A. L.; Camper, D. V.; Browning, C. F.; Rossanese, O. W.; Budhreja, A.; Opferman, J.; Boise, L. H.; Savona, M. R.; Letai, A.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Discovery and Biological Characterization of Potent Myeloid Cell Leukemia-1 Inhibitors. *FEBS Lett.* **2017**, *591* (1), 240–251.

²²⁴Bruncko, M.; Wang, L.; Sheppard, G. S.; Phillips, D. C.; Tahir, S. K.; Xue, J.; Erickson, S.; Fidanze, S.; Fry, E.; Hasvold, L.; Jenkins, G. J.; Jin, S.; Judge, R. A.; Kovar, P. J.; Madar, D.; Nimmer, P.; Park, C.; Petros, A. M.; Rosenberg, S. H.; Smith, M. L.; Song, X.; Sun, C.; Tao, Z. -F.; Wang, X.; Xiao, Y.; Zhang, H.; Tse, C.; Levenson, J. D.; Elmore, S. W.; Souers, A. J. Structure-Guided Design of a Series of MCL-1 Inhibitors with High Affinity and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (5), 2180–2194.

²²⁵Shaw, S.; Bian, Z.; Zhao, B.; Tarr, J. C.; Veerasamy, N.; Jeon, K. O.; Belmar, J.; Arnold, A. L.; Fogarty, S. A.; Perry, E.; Sensintaffar, J. L.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Lee, T.; Olejniczak, A. T.; Fesik, S. W. Optimization of Potent and Selective Tricyclic Indole Diazepinone Myeloid Cell Leukemia-1 Inhibitors Using Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2410–2421.

III. Acides aminés définissant les poches hydrophobes des protéines Bcl-x_L et Mcl-1

Les acides aminés (AA) définissant les poches hydrophobes de la protéine Bcl-x_L à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Bcl-x_L et les acides aminés dans l'environnement de la molécule sont présentés dans le Tableau 17.

Résidu	Code PDB																	Poches				
	Bim (3FDL)	1YSI	1YSN	2O1Y	2O2M	2O2N	2YXJ	3INQ	3QKD	3SP7	3SPF	3WIZ	3ZK6	3ZLN	3ZLO	3ZLR	4C5D		4C52	4EHR	4TUH	
THR109																						P1
LEU112	x																					
VAL126			x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PHE105	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	P2
LEU108		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
LEU130		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ALA142	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
SER145							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PHE146	x						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
TYR101		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	P3
GLU96	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PHE97	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
GLY138		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	P4
VAL141	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
TYR195		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ALA93		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ARG100		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ALA104		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
SER106																						
GLN111		x	x	x	x	x	x															
VAL127																						
GLU129			x	x	x	x	x															
ARG132																						
ASN136		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
TRP137		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ARG139	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PHE143																						
ALA149																						
PHE191		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Tableau 17 : Acides aminés définissant les poches hydrophobes de la protéine Bcl-x_L (P1 en saumon, P2 en cyan, P3 en orange, P4 en vert) à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Bcl-x_L et les acides aminés dans l'environnement de la molécule (en blanc).

Les AA définissant les poches de Mcl-1 à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Mcl-1 et les acides aminés dans l'environnement de la molécule sont présentés dans le Tableau 18.

Résidu	Code PDB															Poches		
	Bim (2PQK)	3WIX	3WIY	4HW2	4HW3	4OQ5	4OQ6	4WGI	4ZBF	4ZBI	4WMR	4WMT	4WMU	4WMV	4WMW		4WMX	5FC4
LEU235	x	x	x	x	x	x	x											P1
LEU246		x	x	x	x	x	x											
VAL249	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
MET231		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	P2
MET250	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
LEU267	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PHE270	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
GLY271		x	x	x	x	x	x											
VAL274		x	x	x	x	x	x											
LEU290		x	x	x	x	x	x											
ILE294		x	x	x	x	x	x											
HIS224		x	x															P3
PHE228	x	x	x	x	x	x												
VAL253		x	x	x	x	x	x											
THR266	x	x	x	x	x	x	x											
VAL216																		P4
VAL220	x																	
VAL265	x																	
ALA227		x	x	x														
LYS234																		
PHE254		x	x	x	x	x												
ARG263	x	x	x	x	x	x	x											

Tableau 18 : Acides aminés définissant les poches hydrophobes de la protéine Mcl-1 (P1 en saumon, P2 en cyan, P3 en orange, P4 en vert) à partir de l'observation visuelle des complexes molécule/Mcl-1 et les acides aminés dans l'environnement de la molécule (en blanc).

IV. Résultats bruts de l'évaluation biologique (impédancemétrie)

1. Résultats du MR34923

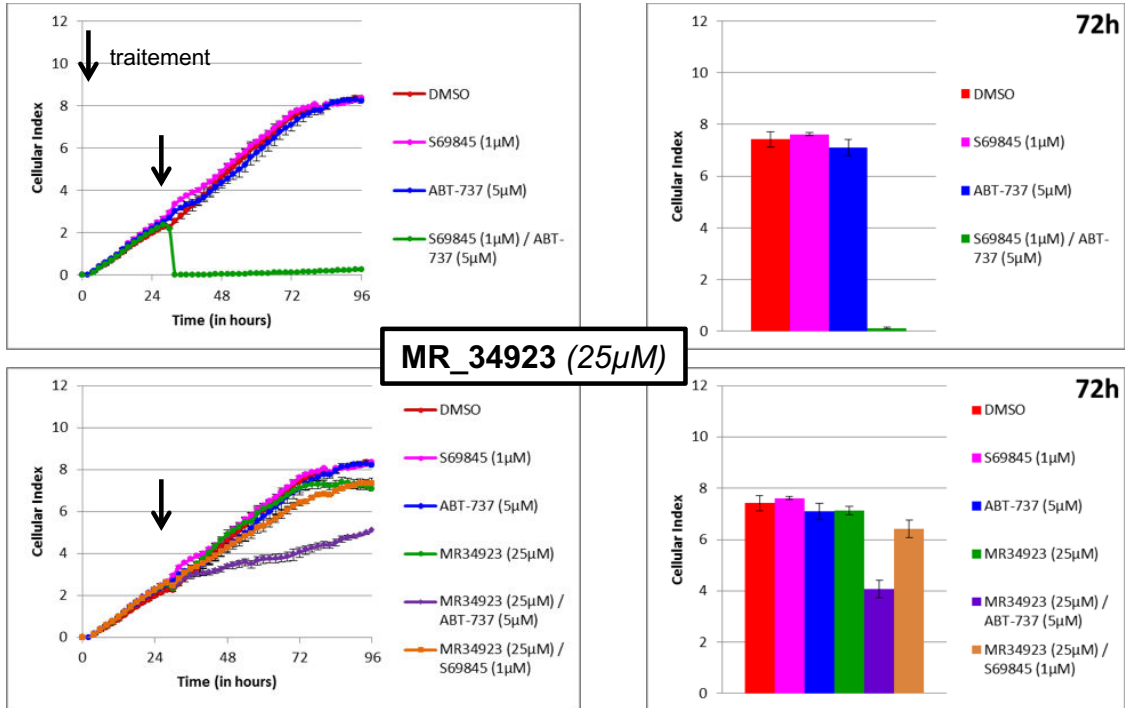


Figure 95 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34923** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 95 :

Le test est réalisé sur la lignée cellulaire IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta, les cellules cancéreuses sont en présence du S63845 : la protéine Mcl-1 est inhibée.
- en bleu, les cellules cancéreuses sont en présence de l'ABT-737 : la protéine Bcl-x_L est inhibée.
- en vert, les cellules cancéreuses sont en présence du S63845 et de l'ABT-737, ce qui entraîne la mort des cellules cancéreuses par inhibition concomitante des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34923** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR34923** n'a aucun effet.
- en violet, le traitement par le **MR34923** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne un léger ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.
- en orange, le traitement par le **MR34923** des cellules cancéreuses en présence du S63845 n'a aucun effet.

A 25 µM, le **MR34923** n'a pas d'effet sur l'inhibition de la protéine Bcl-x_L : la molécule est non toxique.
A 25 µM, le **MR34923** entraîne un léger ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'activité anti-apoptotique de la protéine Mcl-1

2. Résultats du MR34934

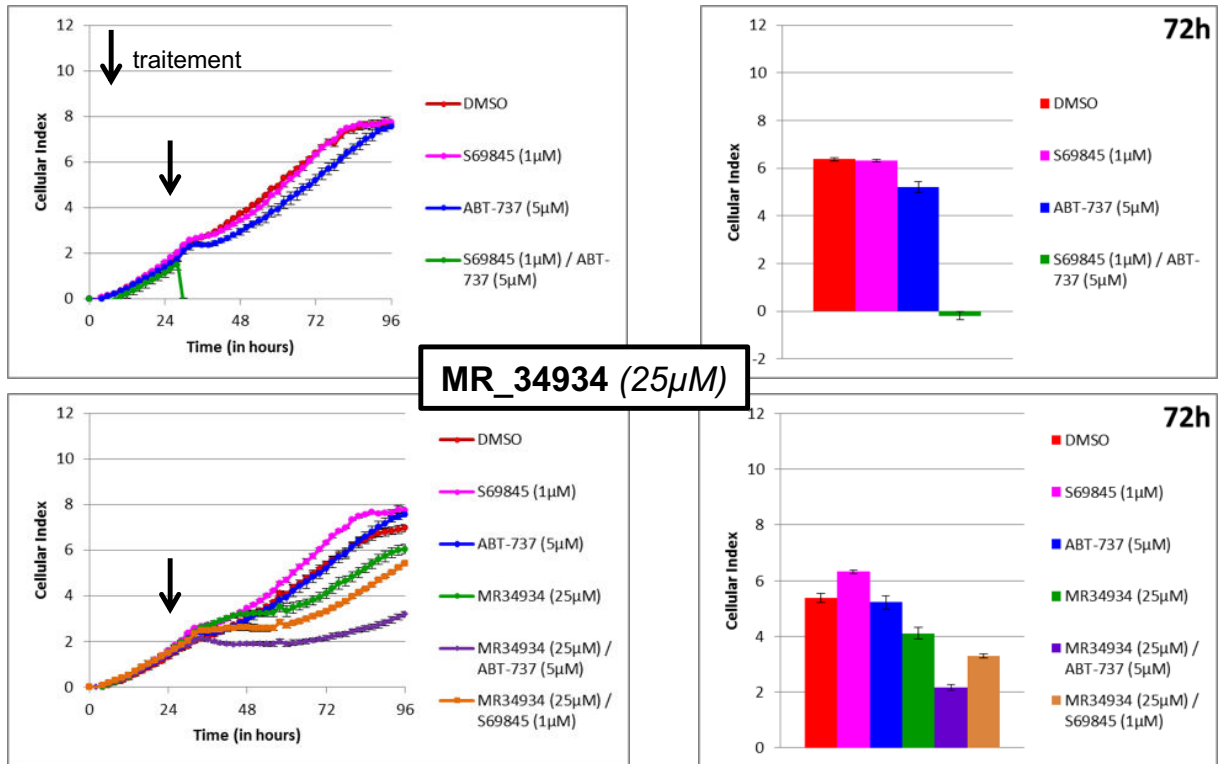


Figure 96 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34934** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 96 :

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé (comme précédemment).

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34934** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR34934** entraîne un ralentissement temporaire de la croissance des cellules cancéreuses.
- en violet, le traitement par le **MR34934** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne un ralentissement temporaire de la croissance des cellules cancéreuses.
- en orange, le traitement par le **MR34934** des cellules cancéreuses en présence du S63845 entraîne un ralentissement temporaire de la croissance des cellules cancéreuses.

A 25 µM, le **MR34934** entraîne un ralentissement temporaire de la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L : l'effet est cytostatique temporaire.

3. Résultats du MR34921

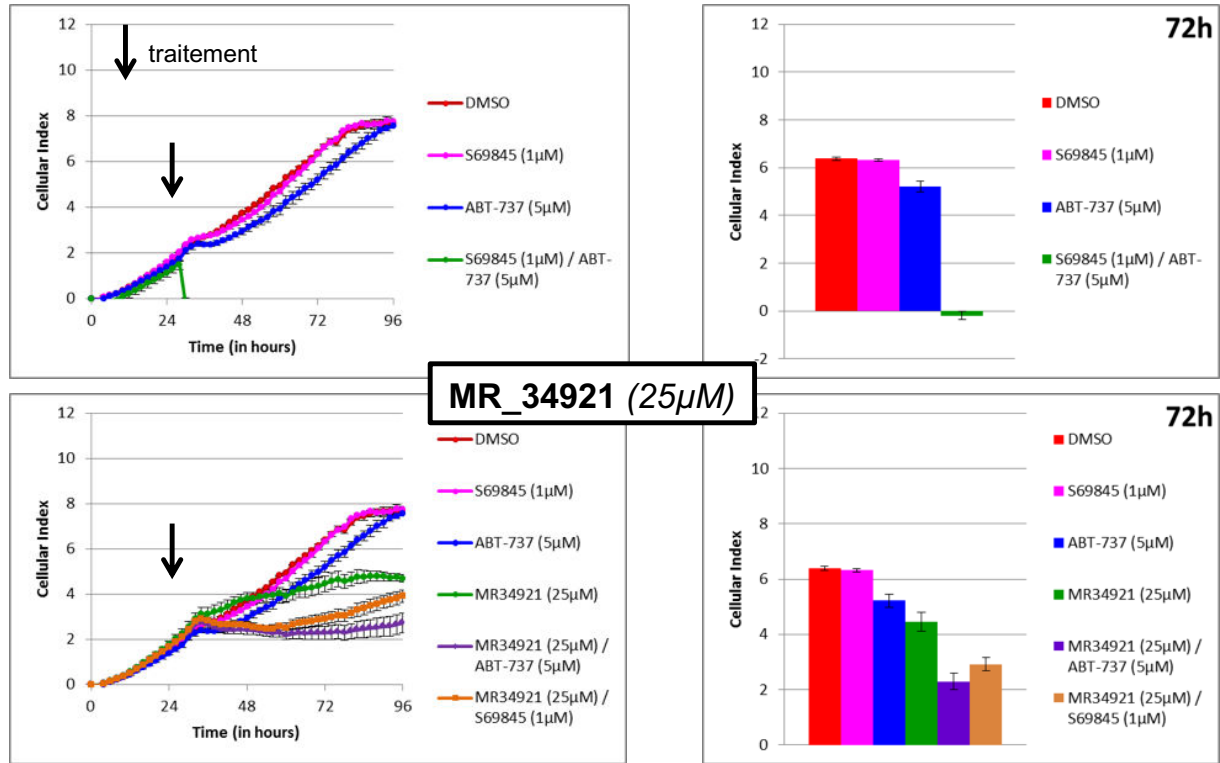


Figure 97 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34921** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 97 :

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer (comme précédemment).

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34921** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR34921** entraîne un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.
- en violet, le traitement par le **MR34921** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.
- en orange, le traitement par le **MR34921** des cellules cancéreuses en présence du S63845 entraîne un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.

A 25 µM, le **MR34921** un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-xL : l'effet est cytotatique.

4. Résultats du MR34963

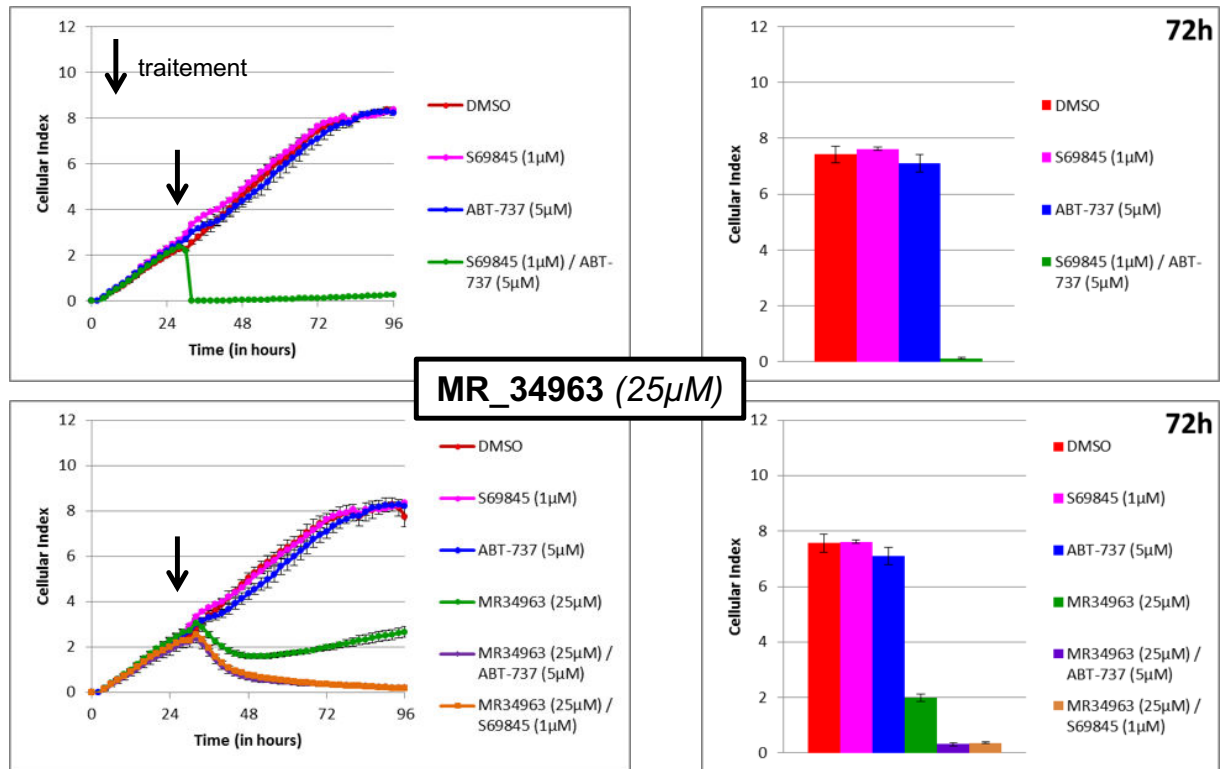


Figure 98 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34963** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 98 :

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer (comme précédemment).

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34963** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR34963** entraîne partiellement la chute de l'index cellulaire.
- en violet, le traitement par le **MR34963** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne la chute de l'index cellulaire.
- en orange, le traitement par le **MR34963** des cellules cancéreuses en présence du S63845 entraîne la chute de l'index cellulaire.

A 25 µM, le **MR34963** entraîne un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-xL : l'effet est cytotoxique. En agent seul, le **MR34963** a un effet cytotoxique partiel.

5. Résultats du MR34937

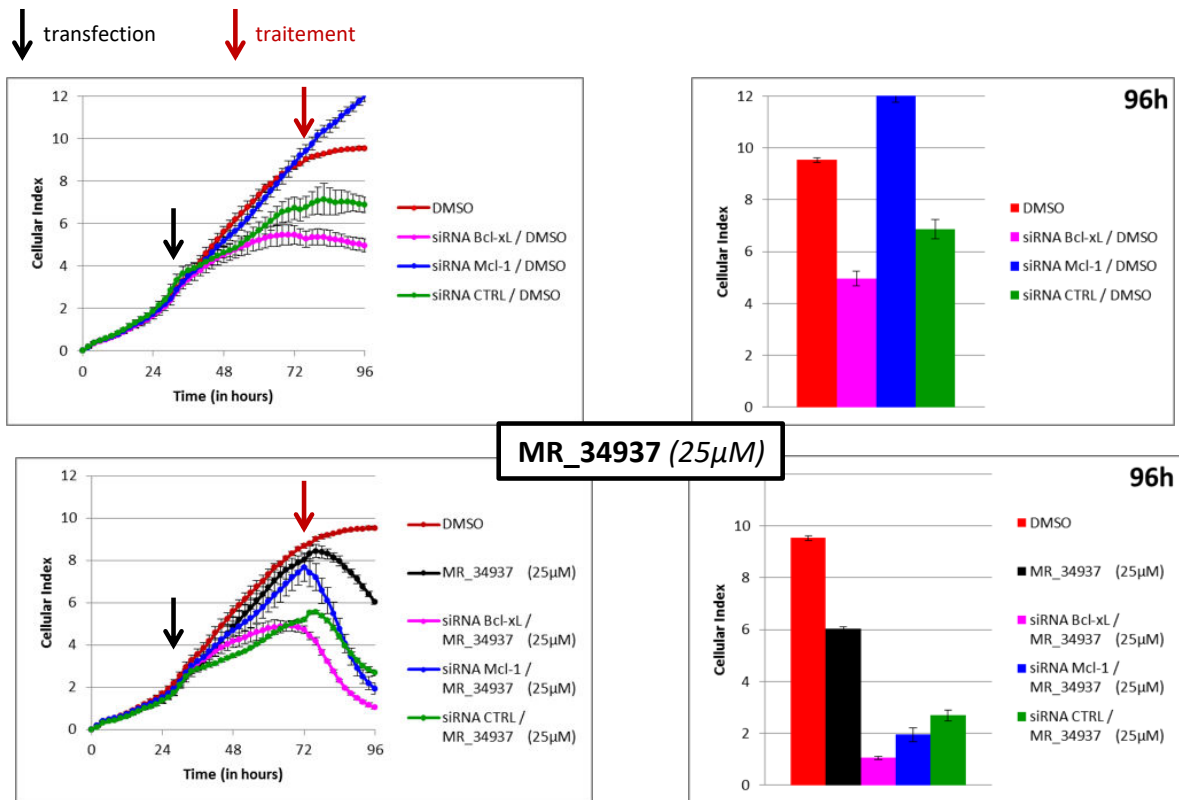


Figure 99 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34937** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 99 :

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA Bcl-x_L : la protéine Bcl-x_L est inhibée.
- en bleu, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA Mcl-1 : la protéine Mcl-1 est inhibée.
- en vert, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA contrôle, qui permet de s'assurer que la transfection n'a pas d'effet sur les cellules.

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34937** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en noir, en agent seul, le **MR34937** entraîne la chute de l'index cellulaire.
- en magenta, le traitement par le **MR34937** des cellules cancéreuses transfectées par un siRNA Bcl-x_L entraîne la chute de l'index cellulaire.
- en bleu, le traitement par le **MR34937** des cellules cancéreuses transfectées par un siRNA Mcl-1 entraîne également la chute de l'index cellulaire.

A 25 µM, le **MR34937** entraîne la mort cellulaire en inhibant l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L : l'effet est cytotoxique.

6. Résultats du MR36102

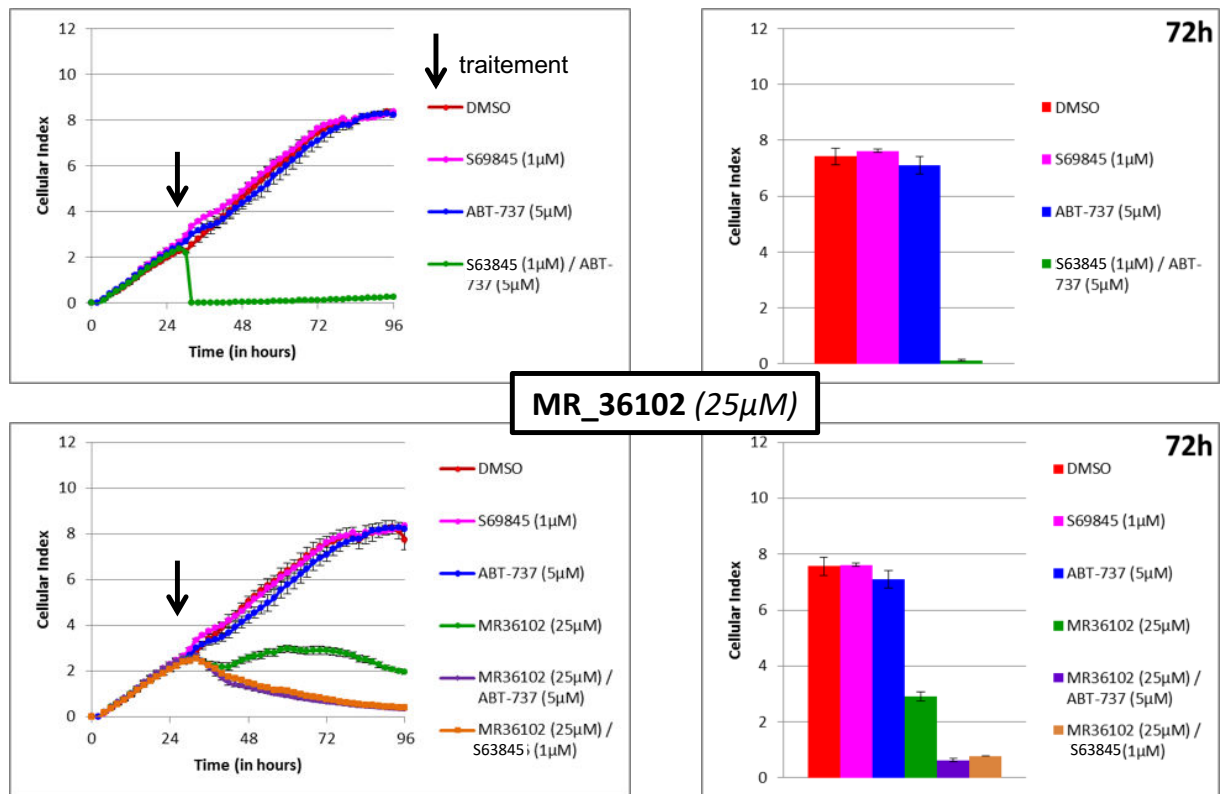


Figure 100 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR36102** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 100:

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer (comme précédemment).

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR36102** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR36102** entraîne le ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.
- en violet, le traitement par le **MR36102** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne la chute de l'index cellulaire.
- en orange, le traitement par le **MR36102** des cellules cancéreuses en présence du S63845 entraîne la chute de l'index cellulaire.

A 25 µM, le **MR36102** entraîne la mort cellulaire en inhibant l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L : l'effet est cytotoxique.

7. Résultats du MR34944

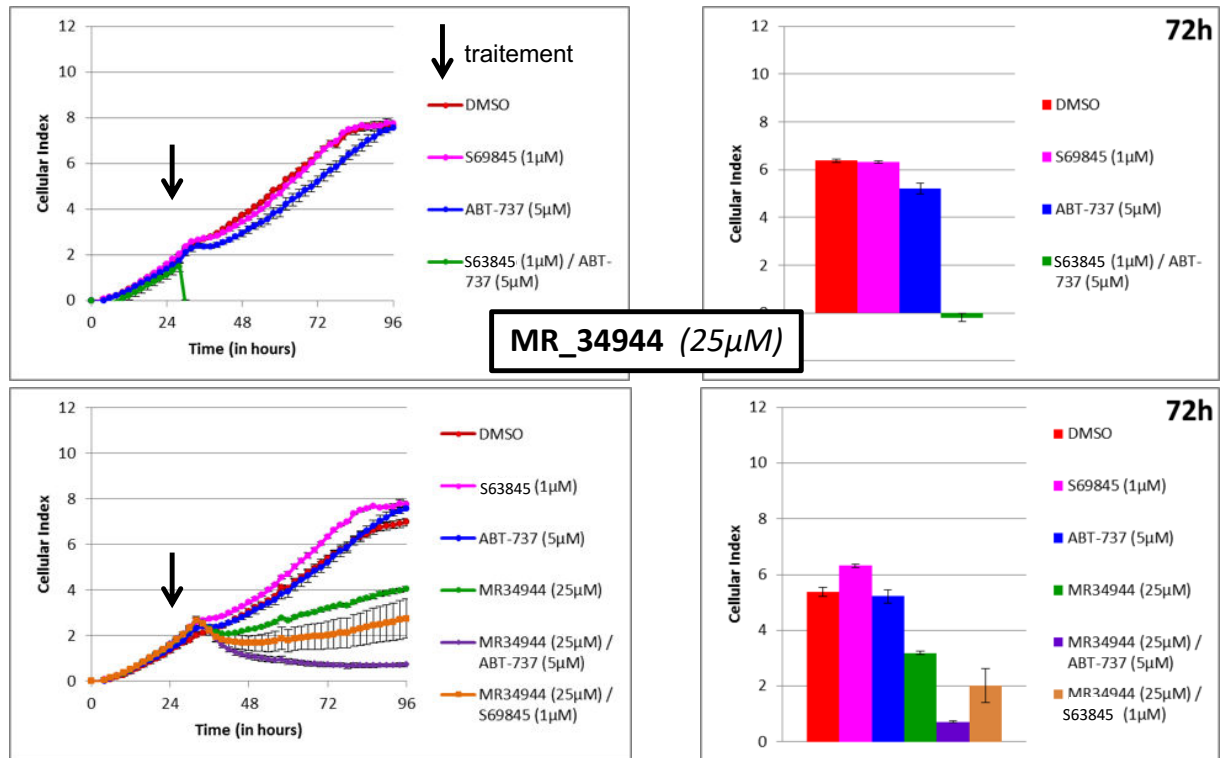


Figure 101 : Résultats bruts de l'évaluation biologique du **MR34944** par impédancemétrie.

Commentaires de la Figure 101:

Le test est réalisé sur les cellules IGROV1-R10.

Les deux encadrés en première ligne correspondent au témoin, c'est-à-dire aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie en absence de composé à évaluer (comme précédemment)

Les deux encadrés en seconde ligne correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie du composé **MR34944** à la dose de 25 µM :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta et en bleu, les témoins présentés ci-dessus.
- en vert, en agent seul, le **MR34944** entraîne le ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.
- en violet, le traitement par le **MR34944** des cellules cancéreuses en présence de l'ABT-737 entraîne la chute de l'index cellulaire.
- en orange, le traitement par le **MR34944** des cellules cancéreuses en présence du S63845 entraîne le ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses.

A 25 µM, le **MR34944** entraîne la mort cellulaire en inhibant l'activité anti-apoptotique de la protéine Mcl-1 l'effet est cytotoxique. A 25 µM, le **MR34944** entraîne le ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'activité anti-apoptotique de la protéine Bcl-xL : l'effet est cytotatique.

V. Criblage des molécules par polarisation de fluorescence

Pour évaluer l'affinité sur la protéine Mcl-1, nos composés ont été criblés par la technique de polarisation de fluorescence (FPA) mise en place dans notre laboratoire par le Docteur Marie Jouanne lors de son stage post-doctoral.

Par ce test, nous avons accès à la valeur de la constante d'inhibition K_i . Par cette valeur, nous pouvons comparer l'affinité des composés entre eux mais également avec les molécules de la littérature dont la valeur de K_i est connue. Le Tableau 19 regroupe les composés pour lesquels il a été possible de déterminer cette valeur.

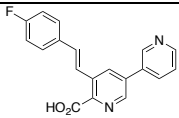
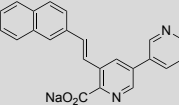
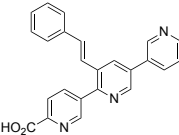
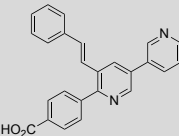
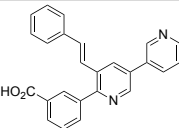
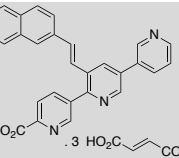
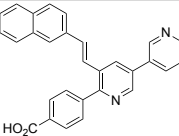
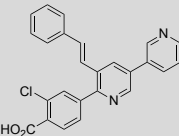
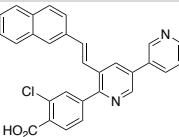
MR	Structure	K_i (μM) Mcl-1
MR34996		$14,1 \pm 0,2$
MR34917		31^1
MR34916		$45,8^1$
MR34913		$17,6^1$
MR34906		$19,6 \pm 1,3$
MR34932		$35,0 \pm 0,9$
MR34937		$18,8 \pm 2,2$
MR34938		$25,2 \pm 0,5$
MR36102		$3,9 \pm 0,7$

Tableau 19 : Résultats du criblage des composés par FPA.

Les valeurs de K_i sont mesurées en duplicat. ¹n = 3 nécessaire pour confirmer la valeur.

Annexe 5 – Criblage des molécules par polarisation de fluorescence

Les molécules dont nous avons pu calculer le K_i ont un point en commun : elles possèdent toutes un acide carboxylique. Celui-ci permettrait de former une interaction forte avec la protéine (liaison hydrogène).

Nous pouvons étudier l'influence des points suivant quant à l'affinité pour la protéine Mcl-1 :

Nature de la troisième unité aromatique : Lorsque la troisième unité est une pyridine, il semble que l'affinité soit moins forte que lorsque la troisième unité est un benzène (**MR34916** ($K_i = 45,8 \mu\text{M}$) vs **MR34913** ($K_i = 17,6 \mu\text{M}$) et **MR34932** ($K_i = 35 \mu\text{M}$) vs **MR34937** ($K_i = 18,8 \mu\text{M}$)).

Position du substituant : La position du substituant sur la troisième unité aromatique (en *meta* ou *para* de la liaison de jonction) ne semble pas modifier l'affinité pour Mcl-1 (**MR34906** ($K_i = 19,6 \mu\text{M}$) et **MR34913** ($K_i = 17,6 \mu\text{M}$)).

Nature du groupement hydrophobe : L'influence du groupement styryle et du groupement 2-vinylnaphtalène peut être étudiée avec les molécules **MR34913/MR34937** et **MR34938/MR36102**. Les valeurs de K_i sont similaires pour les molécules **MR34913** et **MR34937** (respectivement $17,6 \mu\text{M}$ et $18,8 \mu\text{M}$). Tandis que le composé **MR36102** est nettement plus affiné pour Mcl-1 comparé au composé **MR34938** (respectivement $K_i = 3,9 \mu\text{M}$ et $25,2 \mu\text{M}$). Nous ne pouvons donc pas conclure de façon claire sur l'influence de la nature du groupement hydrophobe sur l'affinité du composé pour Mcl-1.

La molécule **MR36102** a la meilleure affinité pour Mcl-1 comparée à nos autres molécules. Ces résultats coïncident avec les résultats obtenus dans l'étude de modélisation moléculaire et avec les résultats de l'évaluation biologique (impédancemétrie).

Materials and methods:

Carboxy-fluorescein labeled Mcl-1-BH3 Bid peptide (5-FAM-EDIIRNIARHLAQVGDSMDR-NH₂) was purchased from GENEPEP and used without further purification. h-Mcl-1 (172-327)²²⁶ was produced in collaboration with Biomolecules laboratory of Pierre and Marie Curie University. FPA measurements were carried out in 96-well, black, flat-bottom plates (Greiner Bio-One) using the Biotek microplate reader Synergy 2. All assays were conducted in assay buffer containing 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.05% Pluronic F-68. For IC₅₀ determination, compounds were diluted in DMSO in a 8-point, serial dilution scheme, added to assay plates and incubated with 100 nM Mcl-1 for 15 minutes. Then, to measure inhibition of Mcl-1/FAM-Bid interaction, 15 nM 5-FAM-Bid peptide were added and plates were incubated for 2 hour at room temperature. The change in polarization was measured and used to calculate an IC₅₀ (inhibitor concentration at which 50% of bound peptide is displaced), by fitting the inhibition data using GraphPad Prism 6 software to a sigmoidal, 4PL, X is log(concentration). This was converted into a binding dissociation constant (K_i) according to the formula described by Nikolovska-Coleska *et al.*²²⁷

²²⁶The gene encoding the region 172-327 of human Mcl-1 (Uniprot accession number Q07820) was synthesised and cloned into a modified pET-15b plasmid (Genscript). The resulting expression vector encodes a 60 kDa fusion protein that comprises an amino-terminal (His)₆-tag, a maltose-binding protein (MBP), a PreScission protease cleavage site, and the Mcl-1 fragment (18 kDa). The pET-15b plasmid was transformed into an *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL expression strain (Agilent). Recombinant protein was prepared from cells grown to an OD₆₀₀ of 0.8 at 37 °C in a bacterial culture supplemented by 100 µg/mL ampicillin and 35 µg/mL chloramphenicol. Protein expression was then induced by addition of 0.25 mM IPTG, and the culture was further grown for 16 h at 20 °C. The cells were pelleted by centrifugation (3000 xg for 25 min), resuspended in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH=7.8) containing 500 mM NaCl and 1 mM DTT, and lysed by sonication. The soluble fraction containing the Mcl-1 fragment was separated from cell debris by centrifugation (30000 xg for 40 min at 4 °C), and loaded on a Ni-NTA column (GE Healthcare). The fusion protein was purified using IMAC standard protocols. Eluted fractions were pooled and dialyzed against PBS buffer, and recombinant (His)₆-PreScission was added to cleave the MBP fusion partner. A second step of purification was performed with the Ni-NTA column to remove (His)₆-PreScission and the cleaved (His)₆-MBP partner. A third step of purification was finally performed using size exclusion chromatography on a Superdex 75 16/60 column (GE Healthcare).

²²⁷Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; Wang, S. Development and Optimization of a Binding Assay for the XIAP BIR3 Domain Using Fluorescence Polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, 332 (2), 261–273.

VI. Résultats des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire

Les travaux présentés dans cette annexe ont été réalisés et rédigés par Asma Bourafai-Aziez de l'équipe du Professeur Hassan Oulyadi du laboratoire COBRA à Rouen.

1. Sample preparation

The Mcl-1 domain, used in this study, contains 156 amino acids (Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷). The production of the unlabeled and labeled Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷ domain was carried out following the protocol set by Friberg *et al.*

Fragments **MR34911**, **MR34916** and **MR34917** were synthesized at CERMN.

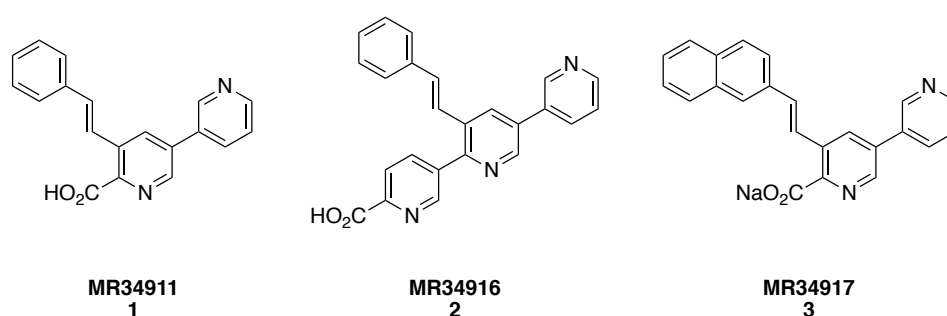


Figure 102 : The structure of fragments.

1.1. Sample preparation for STD experiments

Highlighting the interaction between Mcl-1 and **MR34911**

Two samples were prepared to highlight the interaction between Mcl-1 and **MR34911**:

- Sample A₁, containing **MR34911** at 3 mM.
- Sample B₁, containing unlabeled Mcl-1 (30 μM) and **MR34911** (3 mM) at P:L ratio equal to 1:100.

Highlighting the interaction between Mcl-1 and **MR34916**

Two samples were prepared to highlight the interaction between Mcl-1 and **MR34916**:

- Sample A₂, containing **MR34916** at 1 mM.
- Sample B₂, containing unlabeled Mcl-1 (10 μM) and **MR34916** (1 mM) at P:L ratio equal to 1:100.

Highlighting the interaction between Mcl-1 and **MR34917**

Two samples were prepared to highlight the interaction between Mcl-1 and **MR34917**:

- Sample A₃, containing **MR34917** at 1 mM.
- Sample B₃, containing unlabeled Mcl-1 (10 μM) and **MR34917** (1 mM) at P:L ratio equal to 1:100.

1.2. Sample preparation for ^1H - ^{15}N HSQC experiments

For each product (1-3), two samples were prepared to carry out the titration experiments. The first sample ($D_{1,2,3}$), containing 600 μL of a stock solution of uniformly ^{15}N labelled Mcl-1 (final concentration, 50 μM) prepared in PBS buffer with 5% (v/v) D_2O (molar ratio 1:0), and the second one ($E_{1,2,3}$), prepared by mixing 400 μL of stock solution of uniformly ^{15}N labelled Mcl-1 (final concentration, 50 μM) and 200 μL stock solution of ligand (final concentration, 1mM), prepared in PBS buffer with 5% (v/v) D_2O (molar ratio 1:20). The titration series were incremented in steps between 1 and 2 molar equivalents of ligand. To do this, adequate volume of each sample ($D_{1,2,3}$ and $E_{1,2,3}$) were mixed to obtain intermediary ratios.

2. NMR experiments

NMR spectra were recorded at 298K on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer equipped with a triple resonance cryoprobe including shielded z-gradients.

All NMR spectra were acquired and processed using Topspin3.5 (Bruker). Protein spectra were analyzed using Sparky and CCPNMR.

2.1. STD experiments

To highlight the interaction between Mcl-1:Ligands (1-3), samples $A_{(1,2,3)}$ and $B_{(1,2,3)}$ were used to record 1D ^1H and pseudo 2D STD experiments. Measurements were made with standard Bruker pulses sequences (zgesgp and stddiffesgp.3).

For each STD experiment, the reference spectrum was obtained by the saturation of a signal-free region (off-resonance) at -16 ppm and was compared to the spectrum obtained after saturation at 1.5 ppm, in a spectral region devoid of ligand signals. The selective saturation was achieved by a train of 50 ms Eburp1 pulses. The water signal was suppressed by the excitation sculpting method [4] and residual protein signal was eliminated by a 40ms spin-lock prior to detection. The number of scans was 1024 (ns 32 * L4 32), receptor gain value (512), and relaxation delay (5s) were kept constant.

The amplification factor (STD-AF) for each proton of the ligand was calculated using equation (1).

$$STD - AF = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} \quad (1)$$

where I_0 and I_{SAT} are the intensity of the signals in the reference and saturated spectra, respectively, $[L]$ and $[P]$ are ligand and protein concentration.

2.2. ^1H - ^{15}N HSQC experiments

2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra were collected using standard Bruker pulse sequence (fhsqcf3gp) with 256 indirect points and 64 scans. A one-second relaxation delay was used, and quadrature detection in the indirect dimensions was obtained with states-time proportional phase incrementation (TPPI) phase cycling.

For each product, two samples were prepared, one of Mcl-1 alone ($D_{1,2,3}$) and the other with Mcl-1 and ligand ($E_{1,2,3}$) at the concentration of its maximum titre-estimated. 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum was recorded for each sample, giving the initial and end points of the titration series. Assuming 600 μL sample volumes and that the titration series is to be incremented in steps of 1 or 2 molar equivalents of ligand, adequate volume of each sample was removed and mixed with the other so giving intermediary ratios. This procedure was repeated until both samples are of equal concentration of Mcl-1 and Ligand (1:10). Spectra were recorded for each point in the titration series.

For a given ^1H - ^{15}N HSQC cross peak, proton and nitrogen chemical shift perturbation induced by Pyridoclox binding was defined as the combined difference between the corresponding chemical shifts in the bound and the free states: The combined chemical shift perturbations (CCSP) were calculated from the ^1H and ^{15}N shift coordinates of the cross peaks (Equation 2).

$$CCSP = \sqrt{\{\Delta\delta(1\text{H})\}^2 + \{0.2\Delta\delta(15\text{N})\}^2} \quad (2)$$

Using all spectra recorded, dissociation constants were then obtained by monitoring the chemical shift changes of the backbone amide as a function of ligand concentration (Equation 3).

$$\Delta\delta_{obs} = \frac{\Delta\delta_{max}}{2} \left[1 + x + \frac{K_D}{P_0} - \sqrt{\left(1 + x + \frac{K_D}{P_0}\right)^2 - 4x} \right] \quad (3)$$

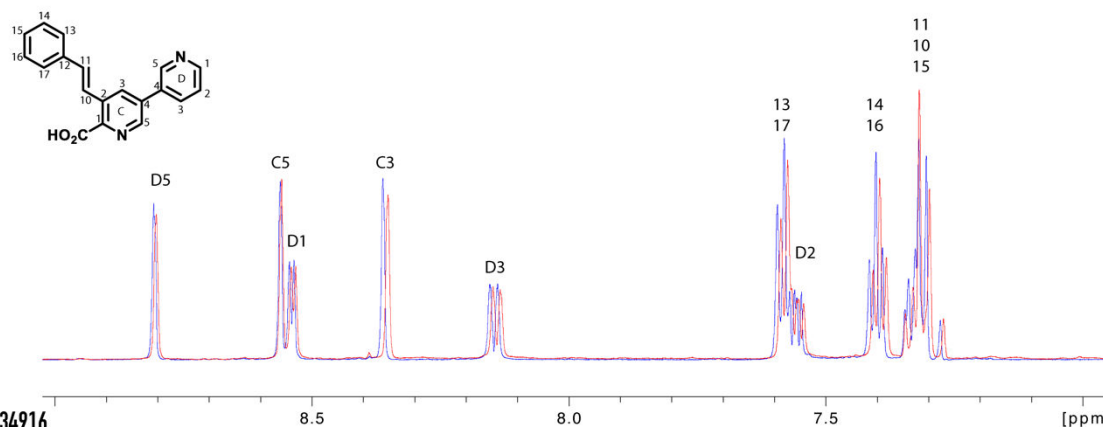
3. Results

3.1. Effect of the interaction on 1D ^1H spectra

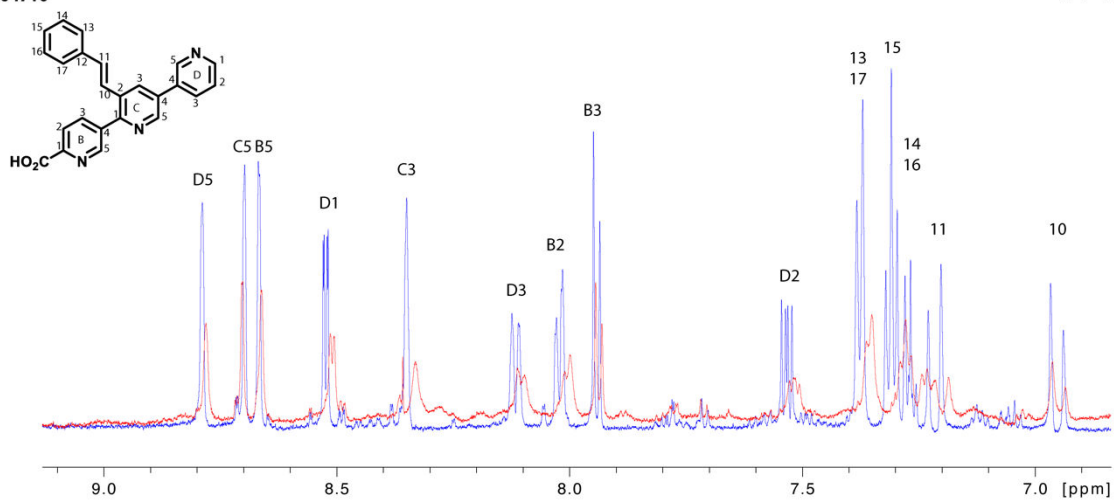
Upon binding of a ligand to a receptor protein, the chemical shifts of both the ligand and protein proton resonance signals are affected. In this study, 1H 1D spectra of ligands were used to probe the interaction with the unlabelled Mcl-1. The addition of unlabelled Mcl-1 to **MR34911** led to low chemical shift perturbation of ^1H signals of **MR34911** (Figure 103: 1), this may be explained by the fact that **MR34911** display a low affinity to Mcl-1. However, the addition of Mcl-1 to **MR34916** and **MR34917** led to stronger perturbation of ligands signals with broadening of someone (Figure 103: 2-3). Thus, may reflect a strong affinity of **MR34916** and **MR34917** to Mcl-1.

Annexe 6 – Résultats des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire

1-MR34911



2-MR34916



3-MR34917

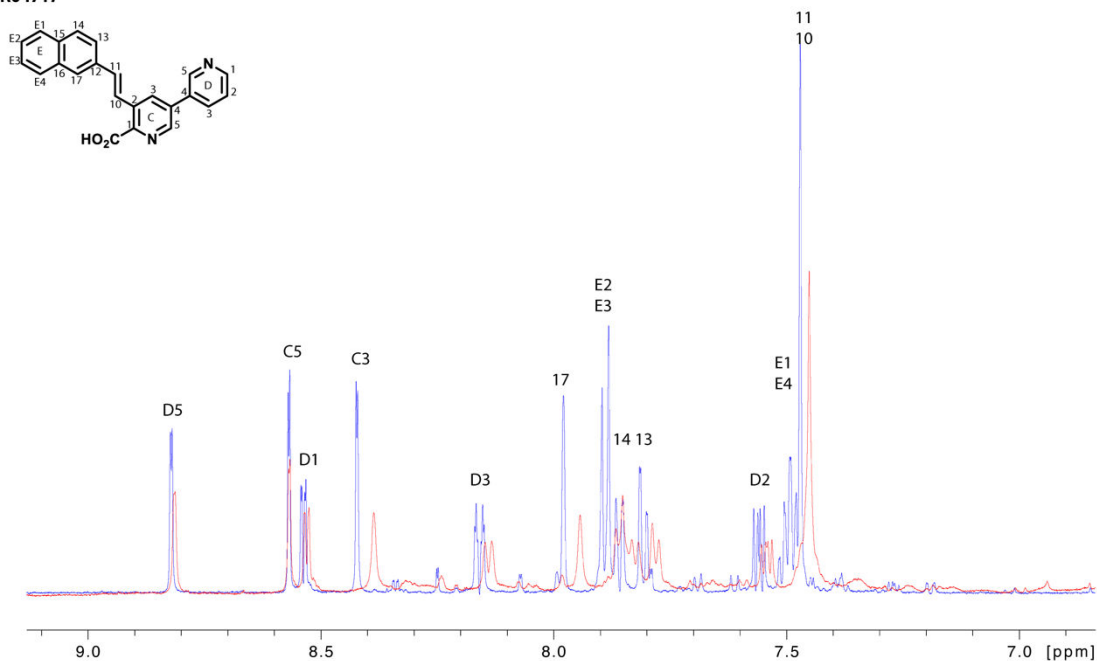


Figure 103: 1D ^1H spectra of **MR34911**, **MR34916**, **MR34917** in **absence** and in **presence** of unlabelled protein Mcl-1. Ratio (1:100) in PBS buffer (pH 7) at 298 K.

3.2. STD NMR experiments and epitope mapping

The STD NMR experiments were performed to explore the binding nature and propensity of ligand (1-3) to interact with Mcl-1.

For **MR34911**, reference and STD spectra exhibited narrow and well resolved lines. However, for **MR34916** and **MR34917**, low intense and large signals were observed (Figure 104).

For 1-3, the most intense STD signals were observed between (7.2 and 7.7 ppm, 6.8 and 7.4 ppm, 7.3 and 7.5 ppm). Which suggested that the styryl moiety (for **MR34911** and **MR34916**) and the naphtyl moiety (for **MR34917**) was closest in contact with the surface of Mcl-1. The other protons exhibited weaker STD effects in comparison to the styryl and naphtyl moieties.

To increase accuracy of epitope mapping we used only well resolved and isolated NMR resonances of the individual ligand, avoiding uncertain contributions in the case of signal overlap. The amplification factor (STD-AF) was calculated using equation 1. The differences in STD-AF for different hydrogens was quantitatively expressed by analyzing the relative STD effects at a given saturation time and mapping of moieties of the ligand important for interaction. The procedure used was simple, for a given saturation time, the relative STD (or STD-AF) with the highest intensity was set to 100%, and all other STD signals were calculated accordingly. This was done for the data obtained with 2.50 s saturation time for **MR34911** and **MR34917**. The relative STD was mapped onto the structure of ligand as depicted in Figure 104. The differences in the relative STD response (STD-AF) for each ligand hydrogen reflect the relative proximity of that hydrogen to the receptor-binding site.

For **MR34916**, due the severe resonance overlap observed in the proton NMR spectra and the signal broadening after protein addition, quantitative group epitope mapping and STD amplification factors cannot be accurately measured from the STD-NMR experiments to disclose the precise protein binding profile for this ligand. Instead, the definition of a qualitative epitope was attempted based on the analysis of STD spectra, it seems that the styryl moiety has the most important STD response (Figure 104).

Annexe 6 – Résultats des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire

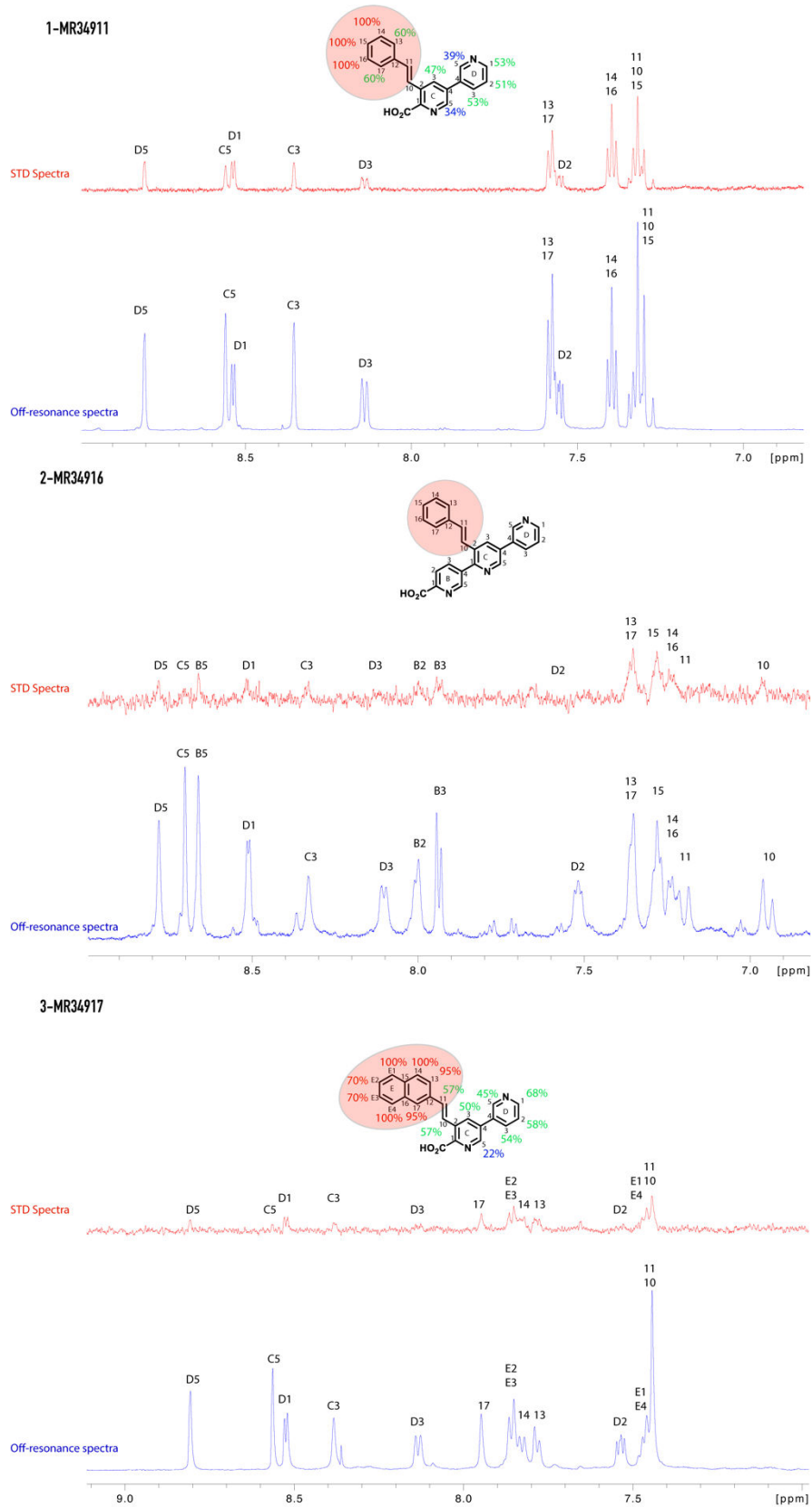


Figure 104: Off-resonance and STD spectra of **MR34911**, **MR34916** and **MR34917**, respectively, in the presence of unlabelled Mcl-1. NMR spectra were recorded at 298 K, 2.5 s saturation time. ratio protein-to-ligands (1:100) in PBS buffer (pH 7) at 600 MHz.

3.3. Mcl-1 titration: hotspots determination and K_D estimation

To localize the protein interaction site, Mcl-1 titration by **MR34911**, **MR34916** and **MR34917** were performed. For this purpose, the assignment of Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷ signals was firstly carried out basing on the work by Liu *et al.*, then the evidence for the direct binding of ligands to Mcl-1 was provided by 2D ¹H-¹⁵N HSQC using ¹⁵N-Labeled Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷.

- **MR34911**

Figure 105 shows an overlay of the 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectra of Labeled Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷ in the absence (blue) and in the presence of **MR34911** (red).

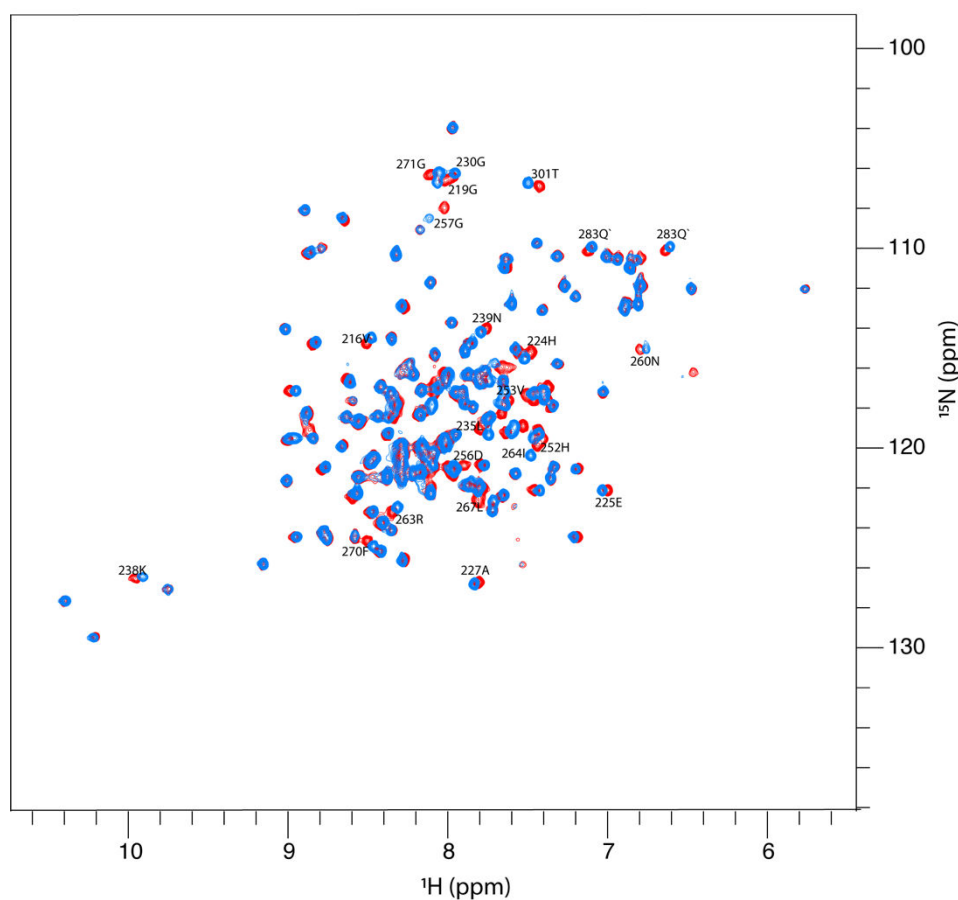


Figure 105: Overlay of ¹H-¹⁵N HSQC spectra of ¹⁵N Mcl-1 in **absence** and in **presence** of **MR34911** (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.

The addition of **MR34911** induced significant backbone amide chemical shift changes (residues depicted in Figure 103). Combined Chemical Shift Perturbations (CCSP) of all residues were calculated using equation 2.

A plot of CCSPs values against the overall Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷ protein residues was depicted in Figure 106. The significance threshold for backbone amide chemical shift changes was calculated based on the standard deviation, in accordance with standard method. Most affected residues corresponding to Arg184, Arg215, Val216, Gly219, His224, Leu235, Ile237, Val243, Met250, His252, Val253, Gly257, Arg263, Val265, Leu267, Phe270, Gly271, Thr301 and Lys302, are represented as red bars in Figure 106. They are mainly localized in the P2 and P4 pockets within the BH3-binding groove of Mcl-1.

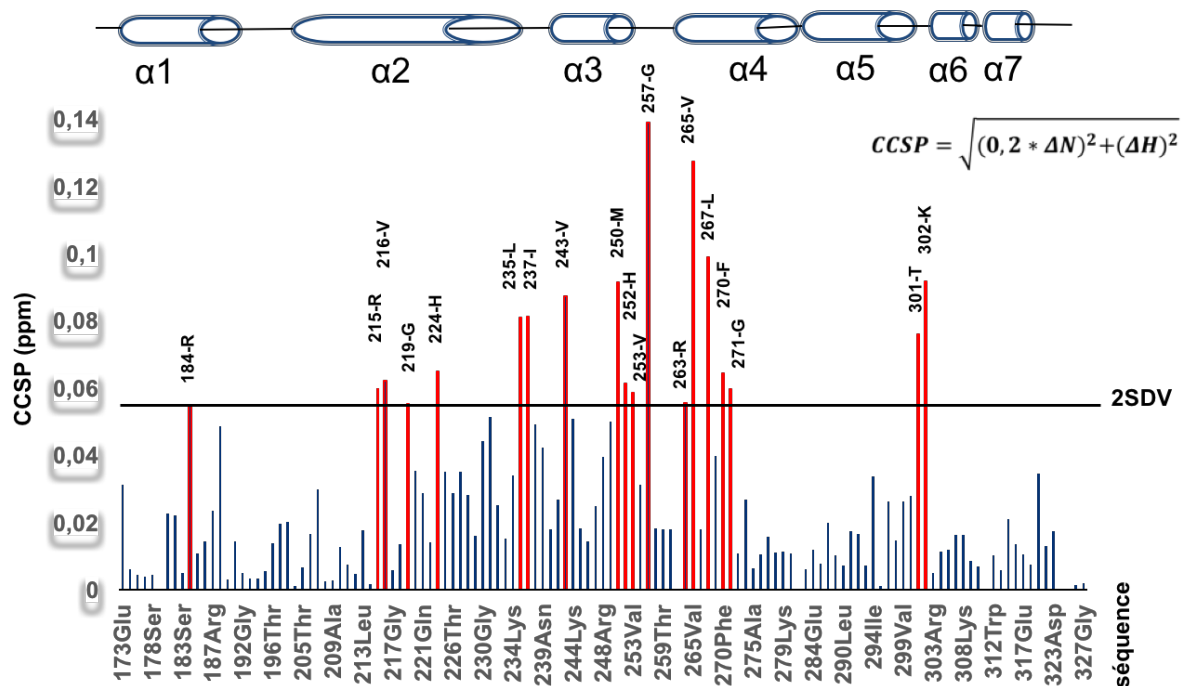


Figure 106: ¹⁵N and ¹H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ¹⁵N hMcl-1 after addition of **MR34911** (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.

We investigated this interaction further by NMR at the residue level. Chemical shift perturbations induced in ¹H-¹⁵N HSQC spectra of Mcl-1¹⁷²⁻³²⁷ induced by adding **MR34911** were monitored. Then, combined chemical shift differences of backbone amides were displayed versus the ratio of **MR34911** concentration relative to protein for selected residues showing the largest chemical shift perturbation amplitudes. Titration curves were fitted using equation 3 under CCPNMR software (Figure 107).

Annexe 6 – Résultats des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire

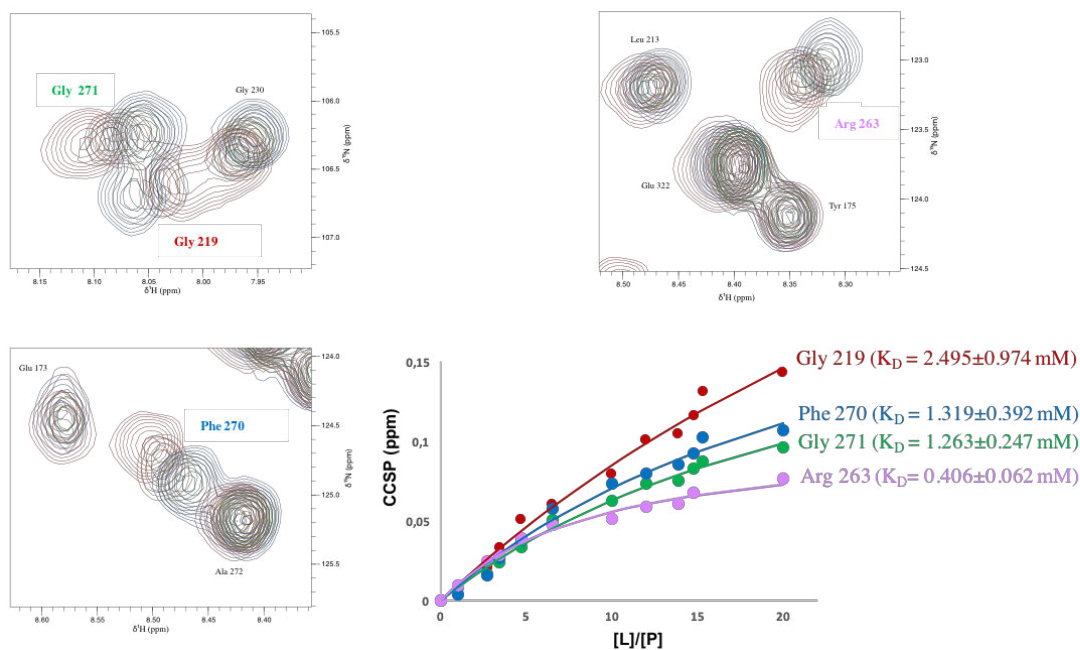


Figure 107 : Titration curves of **MR34911**.

Apparent K_D of each perturbed residue was obtained. The mean value of apparent K_D is in millimolar range. We have observed that peaks corresponding to residues most affected by the interaction were moved gradually in a straight line with increasing concentrations of **MR34911**, from their positions in the free protein toward their positions corresponding to the bound species. Consequently, the exchange regime was determined as very fast.

Further, 2D line-shape analyses were carried out using TITAN software to extract the k_{off} value, in addition to the K_D value that was consistent with the CCSP-based fitting results (millimolar range). Importantly, TITAN analyses revealed a markedly fast k_{off} value ($1341.968 \pm 40.637 \text{ s}^{-1}$) and low residence time (0.75 ms).

From the method presented with the example of **MR34911**, we analysed **MR34916** and **MR34917**. The results for the molecules **MR34916** and **MR34917** are presented respectively in the Figure 108 and Figure 109 ; and Figure 110 and Figure 111.

• **MR34916**

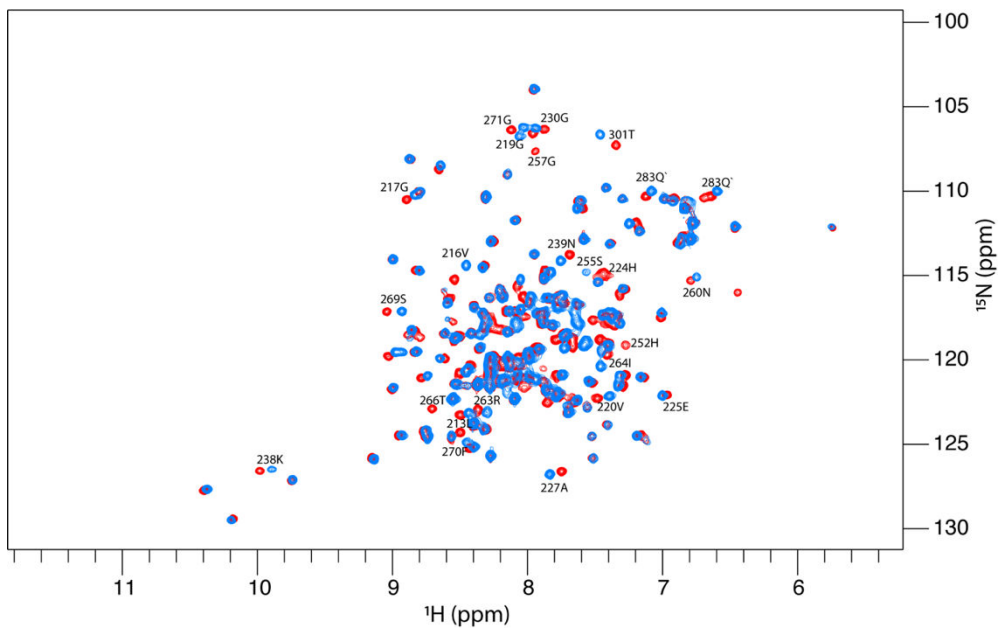


Figure 108: Overlay of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N Mcl-1 in **absence** and in **presence** of **MR34916** (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.

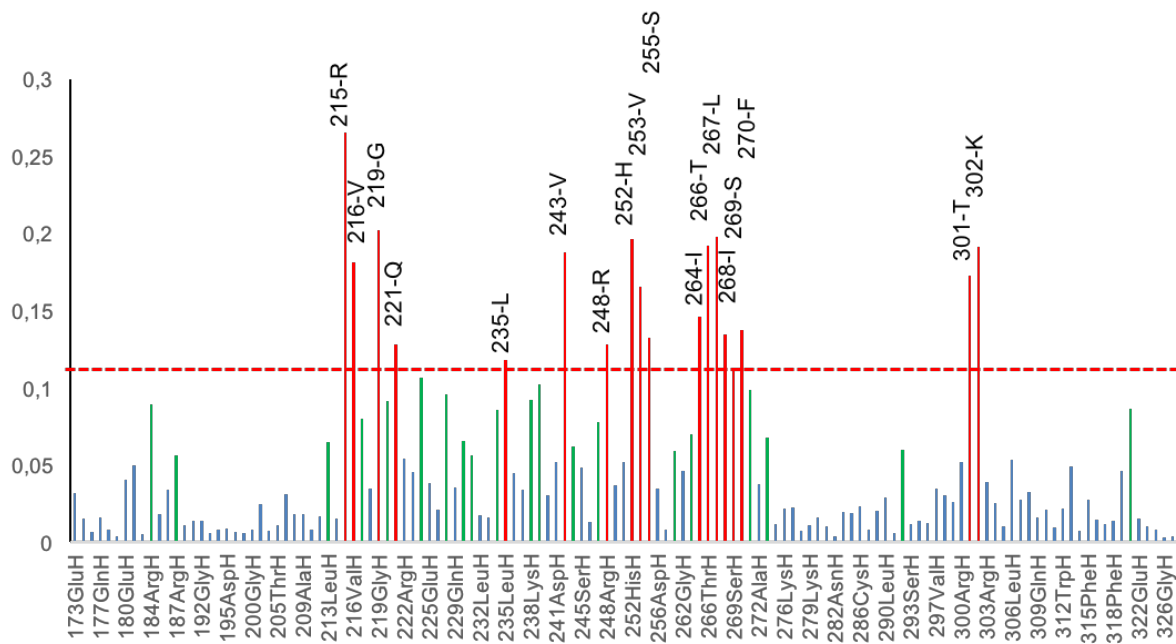


Figure 109: ^{15}N and ^1H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ^{15}N hMcl-1 after addition of **MR34916** (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.

• **MR34917**

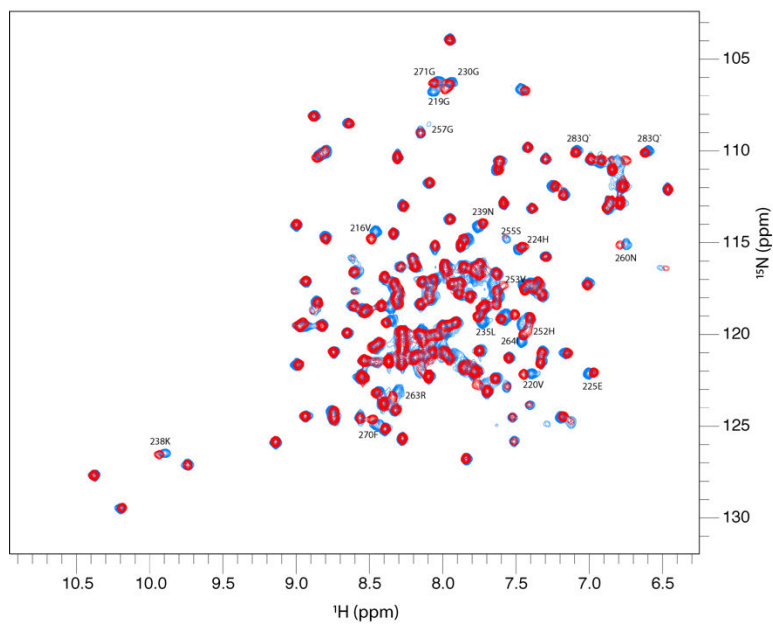


Figure 110: Overlay of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N Mcl-1 in **absence** and in **presence** of **MR34917** (Ratio 1:20) - PBS buffer, pH 7, 298 K.

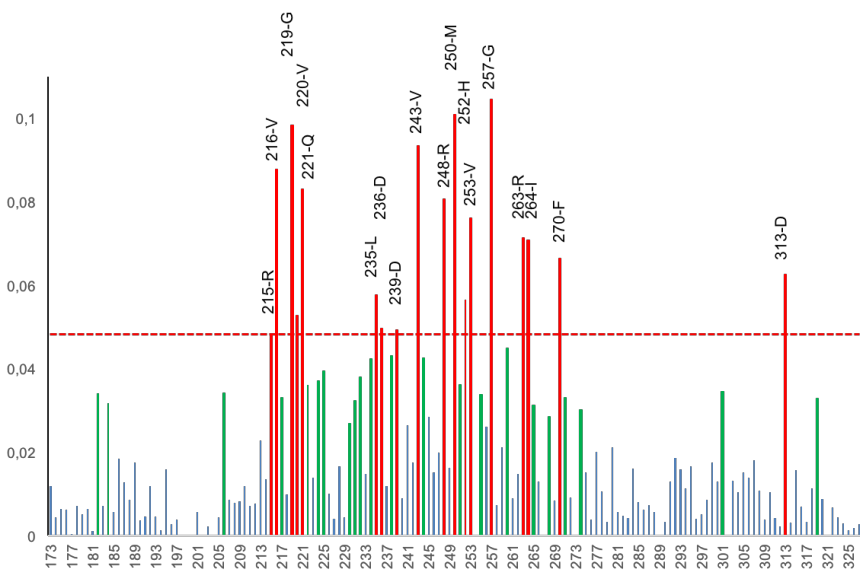


Figure 111: ^{15}N and ^1H combined chemical shifts perturbations (CCSP) of ^{15}N hMcl-1 after addition of **MR34917** (Ratio 1:20) – Residues most perturbed are shown with red bars.

VII. Couplage de Suzuki–Miyaura

Le couplage de Suzuki–Miyaura est l'une des réactions les plus utilisées pour la formation de liaison carbone–carbone (C–C). Cette réaction, telle que Suzuki et Miyaura l'ont décrite pour la première fois, met en jeu un acide boronique et un halogénure ou triflate d'aryle et elle est catalysée par palladium (0) en présence d'une base.²²⁸ Le mécanisme de cette réaction est décrit en trois étapes (Schéma 61).

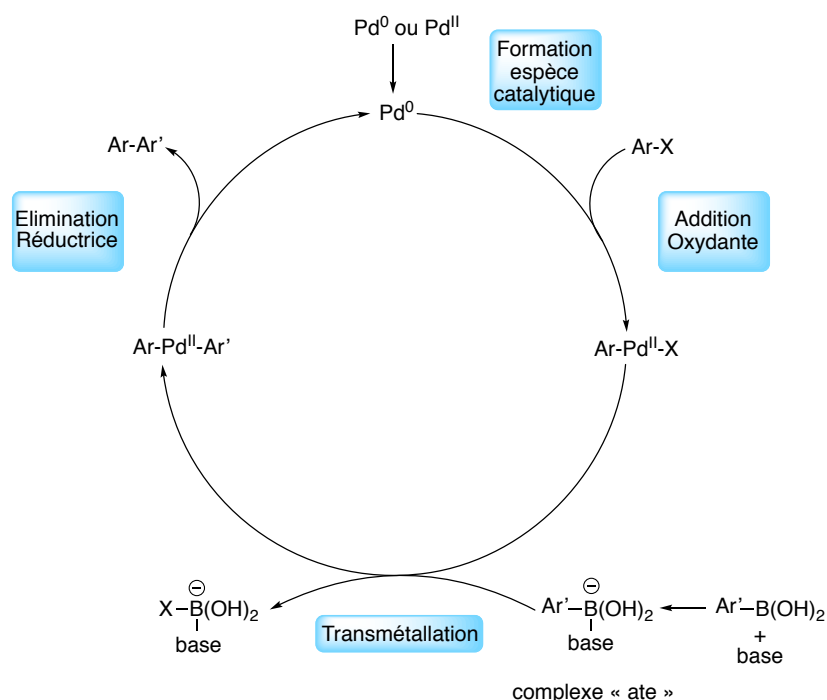


Schéma 61 : Cycle catalytique général de la réaction de couplage de Suzuki–Miyaura.

L'addition oxydante correspond à l'insertion de l'espèce Pd^0 dans la liaison carbone–halogène du réactif halogéné (Ar-X) pour former l'espèce organopalladiée ($\text{Ar-Pd}^{\text{II}}\text{-X}$). En s'insérant dans la liaison $\text{Csp}_2\text{-X}$, le degré d'oxydation du palladium passe de 0 à 2.

Pour cette étape, différents dérivés électrophiles peuvent être engagés comme par exemple les triflates (Ar-OTf) ou les diazoniums ($\text{Ar-N}_2^+\text{X}^-$). Cependant les dérivés halogénés restent les plus utilisés. En fonction de la nature de l'atome d'halogène, on peut établir le classement de réactivité suivant : $\text{Ar-I} > \text{Ar-Br} >> \text{Ar-Cl}$.²²⁹

^{228a)} Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 36, 3437-3440. b) Miyaura, N.; Yanagi T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513. c) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457-2483.

²²⁹Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C. Versatile Catalysts for the Suzuki Cross-Coupling of Arylboronic Acids with Aryl and Vinyl Halides and Triflates under Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4020-4028.

Annexe 7 – Couplage de Suzuki–Miyaura

En ce qui concerne le catalyseur, les sources de palladium sont les plus couramment engagées. Pour réaliser l'insertion du palladium dans la liaison Ar-X, il faut utiliser du Pd⁰. Ainsi, soit le catalyseur présente un Pd⁰, par exemple dans le tétrakis triphénylphosphine palladium (0) (Pd(PPh₃)₄), soit le catalyseur peut être généré *in situ* à partir d'une espèce Pd^{II} telle que l'acétate de palladium (Pd(OAc)₂).

La transmétallation est le transfert d'un groupement organique de l'espèce organoborée vers le complexe organopalladié (II), pour former le complexe Ar-Pd^{II}-Ar'. Pour cette étape le rôle de la base est crucial. En effet, dans les espèces boroniques l'atome de bore présente une orbitale p vacante et l'ajout d'une base aboutit à la formation d'un complexe « ate ». Dans ce complexe, la charge négative est délocalisée sur les quatre substituants. Le fragment organique Ar' est plus nucléophile, ce qui facilite son transfert. Les espèces organoborées peuvent être de différentes natures, on trouve couramment les esters (Ar'-B(OR)₂) et les acides boroniques (Ar'-B(OH)₂) mais on peut également citer les trifluoroborates (Ar'-BF₃K) ou encore les trialkylborates de lithium (Ar'-B(OR)₃Li).

L'élimination réductrice des groupements organiques du complexe diorganopalladié (II) mène à la formation de la liaison carbone-carbone qui s'accompagne de la réduction du degré d'oxydation du palladium, le rendant ainsi de nouveau accessible pour une nouvelle addition oxydante.

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines de la famille Bcl-2 à visée anti-cancéreuse. Application aux cancers de l'ovaire chimiorésistants.

Les interactions protéine-protéine (IPPs) contrôlent de nombreux processus physiologiques importants dans les cellules humaines. Une caractéristique des cancers est l'échappement des cellules à l'apoptose, qui est souvent associé à la surexpression de protéines anti-apoptotiques, membres de la famille de protéines Bcl-2. Cette famille comprend des membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) et pro-apoptotiques. Dans de nombreux cancers dont les cancers de l'ovaire chimiorésistants, l'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille de protéines Bcl-2 est altéré et conduit à la survie des cellules cancéreuses. Une des stratégies envisagées pour surmonter cette chimiorésistance est rétablir l'apoptose par l'inhibition concomitante des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. L'objectif est de concevoir des inhibiteurs à dualité d'action visant les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis la découverte d'un inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1, appelé Pyridoclax. Par une approche combinant les méthodes de *Fragment-Based Drug Design* et *Structure-Based Drug Design*, à partir de la structure du Pyridoclax, la conception de *dual* inhibiteurs, leur synthèse et leur évaluation biologique, sont rapportées dans cette thèse. L'exploration de nouveaux espaces chimiques et biologiques est ainsi rendue possible par la mise en œuvre de cette approche au sein de laquelle le développement de nouvelles méthodologies de synthèse dans le but de concevoir des fragments tridimensionnels originaux sera présenté.

Ces travaux de thèse ont permis de concevoir, synthétiser et caractériser plus de 90 molécules. Certaines ont montré une activité pro-apoptotique intéressante en inhibant les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L notamment.

Mots clés : cancer, ovaire, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L, Suzuki-Miyaura, Friedel-Crafts, pyridine, Fragment-Based Drug Design, Structure-Based Drug Design, chimie organique, modélisation moléculaire.

Design, synthesis and biological evaluation of anti-cancer inhibitors targeting Bcl-2 proteins. Application to chemoresistant ovarian cancers.

Protein-protein interactions (PPIs) control many important physiological processes within human cells. A hallmark of cancers is the escape of cells from apoptosis, which is often associated with the overexpression of the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. This family comprises pro-survival (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) and pro-apoptotic members. In many cancers and, in particular, chemoresistant ovarian cancers, the balance between the pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members is altered leading to the survival of cancerous cells. One of the strategies used to overcome chemoresistance is to re-establish apoptosis by the concomitant inhibition of Mcl-1 and Bcl-x_L proteins. Therefore, the objective is to design dual Mcl-1/Bcl-x_L inhibitors.

Our groups previous work allowed the discovery of a selective Mcl-1 inhibitor, named Pyridoclax. Using Fragment-Based Drug Design and Structure-Based Drug Design approaches, from the structure of Pyridoclax, the design, synthesis and biological evaluation of dual inhibitors are reported in this thesis. The exploration of novel chemical and biological space is possible by the implementation of this approach. The development of synthetic methodologies for the design of new 3-dimensional fragments will be presented.

In this work, around 90 molecules were synthesized using an approach which combined Fragment-Based Drug Design and Structure-Based Drug Design methods. Some showed a pro-apoptotic activity by inhibiting Mcl-1 and Bcl-x_L proteins.

Key words: cancer, ovary, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L, Suzuki-Miyaura, Friedel-Crafts, pyridine, Fragment-Based Drug Design, Structure-Based Drug Design, organic chemistry, molecular modeling.