



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique de perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliquées dans l'apoptose : applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants

Martina de Pascale

► **To cite this version:**

Martina de Pascale. Conception, synthèse et évaluation biologique de perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliquées dans l'apoptose : applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC414 . tel-04416968

HAL Id: tel-04416968

<https://theses.hal.science/tel-04416968v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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 PHARMACIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Conception, synthèse et évaluation biologique de perturbateurs
d'interactions protéine-protéine impliquées dans l'apoptose.
Applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants.**

**Présentée et soutenue par
Martina DE PASCALE**

**Thèse soutenue publiquement le 15/11/2018
devant le jury composé de**

M. MARCEL HIBERT	Professeur des universités, UNIVERSITE STRASBOURG	Rapporteur du jury
Mme FANNY ROUSSI	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur du jury
M. PHILIPPE BELMONT	Professeur des universités, UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESC	Président du jury
M. LAURENT POULAIN	Directeur de recherche, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Membre du jury
Mme ANNE-SOPHIE VOISIN-CHIRET	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

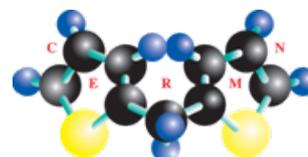
**Thèse dirigée par ANNE-SOPHIE VOISIN-CHIRET, Centre d'études et de recherches
sur le médicament de normandie (Caen)**



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Chimie



À Monsieur Marcel Hibert,

Professeur à l'Université de Strasbourg

À Madame Fanny Roussi,

Directeur de Recherches à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (UPR 2301 CNRS),
Gif-sur-Yvette

À Monsieur Philippe Belmont,

Professeur à l'Université de Paris Descartes

À Monsieur Laurent Poulain,

Directeur de Recherche de l'Unité Interdisciplinaire pour la Prévention et le Traitement des
Cancers (ANTICIPE, Inserm U1086), Caen

À Madame Anne Sophie Voisin-Chiret,

Professeur à l'Université de Caen Normandie

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger mon travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

Remerciements

Je tiens à préciser que celle-ci est la seule partie de ce document que n'a pas été corrigée, donc pardonnez-moi les fautes de français qu'y vous trouverez, je tenais à ce que ce soit authentique !

Je remercie le directeur du CERMN, le Professeur Patrick Dallemagne, de m'avoir accueillie au sein du centre de recherches pour mon stage en 2015 et ensuite pour ma thèse.

La fin est donc arrivée, 1000 jours sont passés (Cit. S. Rault), plus vite de ce que je croyais.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à l'association « La Ligue Contre le Cancer » pour avoir accepté ma candidature et avoir financé ce travail de thèse.

Je tiens à remercier la chef ! Merci Anne So pour la confiance e la liberté que tu m'as accordée dans ce projet de thèse. Je te remercie d'être toujours été présente pour me donner des conseils et pour m'avoir aidée dans ce parcours, parfois compliqué. Je te remercie de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables et de m'avoir soutenue pendant la période au Canada, qu'a été très formatrice pour moi tant du point de vue professionnel que personnel. Enfin je te remercie pour ta simplicité, ta présence et ta gentillesse.

Je souhaite également remercier toutes les personnes impliquées dans ce projet de thèse : Jana, Ronan et Bogdan pour la partie de modélisation moléculaire ; Aurèlie, Anne-Claire et Sophie de la plateforme Screening et Drugabilité ; Peggy de la plateforme chimiothèque ; Laurent, Siham, Emilie, Christophe et Luis-Bastien de l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE. Merci pour l'intérêt et le temps dédié à ce projet, et d'avoir partagé vos connaissances lors des nombreuses réunions que nous avons faites dans ces trois ans.

Je tiens à remercier le Pr Lubell de m'avoir invitée dans son groupe de recherche et le Cancéropôle Nord-Ouest d'avoir supporté le projet proposé.

Je remercie de tout mon cœur l'équipe du CM042 ! Vous êtes tous formidables et je vous adore ! Merci à Charline de m'avoir appris les plus grands chanteurs français (Claude François est devenu mon préféré, désolée la chef... je sais que tu n'aimes pas) et pour avoir toujours su m'arracher un sourire quand je n'avais pas le moral ! Merci aussi d'avoir relis ma thèse n fois en te donnant des maux de tête avec mon français à l'italienne ! Merci de m'avoir supportée en tant qu'amie et collègue !

Merci Marie de m'avoir accueillie lors de mon premier jour à Caen. Depuis on est devenues amies et on a passés des très beaux moments ensables ! Merci pour tes conseils et d'être été toujours à l'écoute, enfin merci de ton amitié.

Je tiens à remercier aussi Seb (élu membre du CM042 à vie !). Grace à toi mon arrivé au labo n'as pas été difficile, t'as su m'intégrer dans l'équipe, et même si je ne parlais pas un mot de français au début, après quelques mois on rigolait bien ensemble... et c'est toujours le cas !

Damien, le dernier arrivé qui a révolutionné le labo ! J'ai envie de te remercier pour ta spontanéité et ta sincérité et bien sûr pour l'aide que t'as apporté au projet dans ci peu de temps !

En particulier, je tiens à remercier Camille et Victor avec lesquels j'ai partagé ces trois années de thèse, on pourrait dire dans le même bateau ! Que ce soit à la paillasse ou dans la vie, j'ai appris plein de choses grace à vous, et je vous en remercie. Camille, on a partagé presque le même sujet de thèse sans jamais se marcher sur les pieds, au contraire nous nous sommes constamment aidées et soutenues l'une avec l'autre. Victor, toujours un pensée pour nous quand il tombait sur une publie avec de nouvelles méthodes pour fonctionnaliser des pyridines. Merci à vos deux pour tout ça et beaucoup plus ! Vous allez vraiment me manquer... La fin de thèse a été douce grâce à vous !

Peggy... merci d'être restée calme et sympa avec moi jusqu'à la fin ! ;)

Je tiens à remercier aussi tous ceux qui ont rendu ces trois années pleines de bons souvenirs. Jean-Pierre qui, entre autres bien sûre, as la bizarre qualité de dire toujours au bon moment (ou au mauvais moment : ça dépend du point de vue) une petite phrase non-sens qui te fait éclater de rire.

MC (officiellement Anne-Claire) pour avoir crée le lien entre le « haut et le bas » et avoir mis en place les jeudis Badminton ! Caro, merci pour les rigolades à la piscine et à salle de sport et pour avoir vécu avec moi le concert de Britney ! Merci FX et Reynald pour les belles soirées chez vous et pour votre sympathie. Merci Alex, Cédric, Rémi et Willy pour les belles soirées passées ensembles.

Merci aussi a ceux qui m'ont aidé dans mes recherches, quand parfois toute espoir été perdue : Christine, Christophe, Julien, Manu, Silvia, Stephan et Thomas.

Enfin je dis merci à tous les membres du CERMN pour avoir pour avoir contribué à rendre cette expérience une très belle expérience.

Une pensé aussi à ceux qui ne font plus partie du CERMN officiellement. Floflo, merci de ta gentillesse et ta sympathie, ton amitié a été une belle découverte ! Enfin, mais pas dernier, le petit Breton- Québécois, il a été un vrai plaisir de faire ta connaissance... Merci de ton amitié !

*Je remercie en particulier Prasad de m'avoir appris plein de choses et de m'avoir supprtée tout au long de mon séjour à Montréal et après, t'es vraiment **a good guy!***

Cette expérience m'as aussi permis de faire des nouvelles connaissance et certaines d'entre elles m'ont beaucoup marquée, une pensé donc à Cynthia, Minh Thao et Ragnhild. Merci les filles pour votre sympathie et simplicité !

*Ai miei genitori,
Carmen e Valerio,
che mi hanno incoraggiato e sostenuto in questa esperienza,
grazie per la fiducia e l'immenso amore che mi dimostrano ogni giorno.*

*Alle mie sorelle,
Francesca e Valentina,
"occhi di gatto un altro colpo è stato fatto!"
grazie di essermi state vicine sempre!*

Alla "Famiglia" intera, grazie di cuore!

Quattro anni lontana da casa sono tanti... mi siete mancati tanto.

Si dice che l'amore accorcia le distanze ed è vero! Anche se 2000 km ci separavano vi ho sempre sentiti vicini. Grazie di essermi venuti a trovare e di aver portato un po' di sole in queste grigie giornate normanne.

Vi amo tanto !

Al mio compagno,

Bernardo,

grazie per esserci sempre stato e per i bei momenti che mi hai regalato,

per avermi sempre incoraggiato,

e per avermi dato la carica!

Sommaire

Sommaire	11
Table des figures	15
Table des schémas	17
Table des graphiques	19
Table des tableaux	19
Abréviations et acronymes	21
Avant-propos	25
CHAPITRE 1 Les cancers de l’ovaire et l’apoptose	32
1. Les cancers de l’ovaire	34
1. 1. L’épidémiologie	34
1. 2. Les différents types de cancer de l’ovaire	34
1. 3. Les facteurs de risque	36
1. 4. Les circonstances de la découverte et la prise en charge thérapeutique	37
1. 5. La chimiorésistance	40
2. L’apoptose	42
2. 1. Les voies d’induction de l’apoptose	43
2. 1. 1. La voie extrinsèque	44
2. 1. 2. La voie intrinsèque.....	46
2. 2. Les protéines régulatrices de l’apoptose : protéines de la famille Bcl-2.....	48
2. 2. 1. Les modes d’inhibition de l’apoptose.....	52
2. 2. 2. L’aspect structural des protéines apoptotiques	53
2. 2. 3. La famille Bcl-2 et le cancer	59
2. 3. Les protéines inhibitrices de l’apoptose (IAPs).....	62
2. 3. 1. Les domaines BIRs et la régulation de l’apoptose	64
2. 3. 2. La protéine Smac : inhibiteur des IAPs	70
2. 3. 3. La protéine Smac et les domaines BIRs des IAPs.....	72
2. 3. 4. Les protéines IAPs et le cancer	76
3. La famille Bcl-2 et la famille des IAPs dans le cancer de l’ovaire	77
CHAPITRE 2 Les interactions protéine-protéine et les perturbateurs de l’apoptose	79

1. Comment perturber l'apoptose ?	81
2. Les interactions protéine-protéine	81
2. 1. Détection et caractérisation des IPPs : application à la conception de perturbateurs.	85
3. Les foldamères	90
3. 1. Définition	90
3. 2. Les principales structures secondaires des protéines	91
3. 3. Les foldamères peptidomimétiques	93
3. 3. 1. Les peptoïdes	94
3. 3. 2. Les β -peptides.....	95
3. 3. 3. Les brins β peptidomimétiques	96
3. 4. Les foldamères abiotiques aromatiques	97
3. 4. 1. Les terphényles d'Hamilton	98
3. 4. 2. Les oligoamides.....	99
3. 4. 3. Les oligopyridines	101
3. 4. 4. Les foldamères du CERMN.....	101
4. Contexte de la découverte de quelques perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliqués dans l'apoptose.....	105
4. 1. Debio1143 : inhibiteur de XIAP.....	108
4. 2. ABT-737 : inhibiteur de Bcl- x_L	113
4. 3. Inhibiteurs de Mcl-1.....	116
4. 3. 1. S63845	118
4. 3. 2. Pyridoclax.....	120
4. 4. Inhibiteurs à dualité d'action Mcl-1/Bcl- x_L	124
CHAPITRE 3 La naissance du projet de recherche et ses objectifs	135
1. Les travaux antérieurs	137
2. Les objectifs	139
CHAPITRE 4 Les travaux personnels	143
Préambule	145
A. Nomenclature.....	145
B. Numérotation	146
C. Évaluation biologique	146
1. Conception rationnelle d'inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L	155

1. 1. Modifications des pyridines terminales	156
1. 1. 1. Introduction d'éléments de flexibilité	160
1. 1. 2. Introduction de fonctions polaires	160
1. 2. Modifications du groupement hydrophobe	180
1. 2. 1. Influence de la taille du groupement hydrophobe.....	180
1. 2. 2. Influence de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale.....	185
1. 3. Conclusion et perspectives	196
2. Conception d'inhibiteurs de membres anti-apoptotiques de la famille des IAP.....	202
2. 1. Synthèse de composés bicycliques de type azabicyclo[5.3.0]décane.....	203
2. 2. Synthèse de composés bicycliques de type azabicyclo[3.4.0]nonane	211
2. 3. Conclusion et perspectives.....	220
3. Conclusion et perspectives	224
Partie expérimentale.....	228
Synthèse d'inhibiteurs de Mcl-1/Bcl-x _L	230
Intermédiaires	234
Analogues du Pyridoclax.....	258
Synthèse d'inhibiteurs de XIAP.....	306
Intermédiaires	310
Mimes contraints d'AVPI	316
Annexes.....	322
A. Conception d'inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x _L	324
1. Résultats biologiques de certains composés M (impédancemétrie)	324
B. Conception d'inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille des IAP.....	340
1. Mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence	340

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1. Structure interne de l'ovaire.	35
Figure 2. Principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire.	38
Figure 3. Changements morphologiques subits par la cellule en cours du processus d'apoptose. ³⁰	43
Figure 4. Voie extrinsèque de l'apoptose.....	45
Figure 5. Voies de signalisation de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque).	48
Figure 6. Protéines de la famille Bcl-2.....	49
Figure 7. Formation des pores mitochondriaux par homo-oligomérisation de Bax et Bak dans la membrane mitochondriale.	50
Figure 8. Modes d'inhibition de l'apoptose par les membres anti-apoptotiques.	52
Figure 9. Noyau Bcl-2 de Bcl-x _L	54
Figure 10. Représentation en ruban de la protéine Bid mettant en évidence le site de clivage de la caspase-8.	55
Figure 11. Alignement des structures 3D de plusieurs complexes de Mcl-1.	56
Figure 12. Interactions validées entre les membres de la famille Bcl-2 (représentées par des lignes de connexion). Les domaines BH présents dans chaque membre de la famille sont également indiqués.	57
Figure 13. Représentation de la voie mitochondriale de l'apoptose.	62
Figure 14. Organigramme de la famille des protéines IAPs.	63
Figure 15. Structure du domaine BIR3 de XIAP (PDB code 1g3f). ⁹⁷	64
Figure 16. Types de domaines BIRs.....	65
Figure 17. Structure cristalline de l'homodimère de la protéine Smac dans le complexe avec les domaines BIR3 de deux protéines XIAP. ^{96a}	66
Figure 18. Comparaison schématique de l'interaction de la caspase-3 avec un substrat (à gauche) et avec XIAP (à droite).....	68
Figure 19. Complexe caspase-9/XIAP-BIR3.	68
Figure 20. Superposition de cIAP1-BIR3 (en violet) et de XIAP-BIR3 (en gris). ¹¹⁰	69
Figure 21. Représentation de l'activation de Smac dans la voie mitochondriale et son interaction avec XIAP pour libérer la caspase-9.	71
Figure 22. Complexes cIAP1-BIR3/ATPF de la caspase-9 (a) et cIAP1-BIR3/AVPI de Smac (b).	72
Figure 23. Comparaison des interactions de cIAP1-BIR3 (jaune) et XIAP-BIR3 (cyan) avec Smac (A) et caspase-9 (B). Représentées en orange dans le complexe avec cIAP1 et violet dans le complexe avec XIAP. ¹¹⁰	74
Figure 24. Cartographie des interactions protéine-protéine binaires humaines.....	82
Figure 25. Représentation d'une IPP.....	83
Figure 26. Représentation des inhibiteurs d'une IPP.....	84
Figure 27. Structure d'une hélice α	92
Figure 28. Structure d'un brin β . ¹⁵⁹	92
Figure 29. Structure d'un feuillet β	93
Figure 30. Les peptoides.....	94
Figure 31. Exemples de structure générale de monomères linéaires et cycliques.....	95
Figure 32. Comparaison des structures des hélices- α et hélice-14. ^{158a}	96
Figure 33. Structure générale des brins β , δ -aminoacides bicycliques, brins β avec proline	97
Figure 34. Exemples de structure type azabicyclo[x.3.0]alcane des mimes de brins β . ^{170a}	97
Figure 35. Les terphényles d'Hamilton.....	98

Figure 36. Exemples de conformations privilégiées de la liaison NHCO-aryle et des interactions ortho adjacentes retrouvées dans la structure d'amides aromatiques.....	99
Figure 37. Structures générales d'exemples d'oligoamides aromatiques.	100
Figure 38. Structure du dérivé terpyridine décrit par Hamilton et coll. ¹⁸²	101
Figure 39. Quaterpyridine diméthylée mime d'hélice α	104
Figure 40. Représentation de la surface d'interaction du complexe XIAP-BIR3/AVPI. ^{115a}	109
Figure 41. Structures de mimes de Smac conçus par Wang et al.	110
Figure 42. Complexes de XIAP-BIR3 avec W02 et W04 et AVPI.	111
Figure 43. Structures de mimes contraints de Smac conçus par Wang et coll. ¹⁹⁷	112
Figure 44. Structure du Debio1143.	112
Figure 45. Alanine scanning du peptide Bak lié à la protéine Bcl-x _L	113
Figure 46. Structures des fragments hits (1 et 2), du composé lead (3) et de l'ABT-737. ²⁰⁰	114
Figure 47. Structure RMN du complexe A) Bcl-x _L /BH3-Bax et B) Bcl-x _L /ABT-737. ⁵⁴	115
Figure 48. ABT-236 (A) ; et l'ABT-199 (B).	116
Figure 49. Structure du composé S63845.	118
Figure 50. Structure co-cristalline du complexe S63845/Mcl-1.....	119
Figure 51. (A) Interactions validées entre les membres de la famille Bcl-2 (représentées par des lignes de connexion). Noxa inhibiteur sélectif de Mcl-1. ⁶⁶ (B) Quaterpyridine diméthylée mime d'hélice α . I) Structure plane ; II) superposition de la structure cristallographique avec une hélice α . ^{189c}	121
Figure 52. Le pyridoclax.....	122
Figure 53. Activité cellulaire en temps réel évaluée par impédancemétrie (technologie xCELLigence).	123
Figure 54. Structure co-cristalline du complexe T01/Mcl-1. ²²⁰	125
Figure 55. Structure co-cristalline du complexe ABT-737/Bcl-x _L	126
Figure 56. Structures co-cristallines du composé T03 avec les protéines Mcl-1 (gauche) et Bcl-x _L (droite). ²²⁰	128
Figure 57. Inhibiteur dual hybride chef de file conçu par Tanaka et al. ²²⁰	129
Figure 58. Fragments R01 et R02 déterminés par analyses RMN et composé R03 issu d'études in silico par fusion des deux fragments. ²²²	130
Figure 59. Complexes in silico du composé R03 avec les protéines Bcl-x _L (gauche) et Mcl-1 (droite). ²²²	130
Figure 60. Inhibiteurs duals conçus par Rega et al. ²²²	131
Figure 61. Meigynine A et son dérivé synthétique F01. ²²³	132
Figure 62. Inhibiteur dual conçu par Roussi et coll.	132
Figure 63. Complexe F02/Bcl-x _L in silico. ²²⁴	133
Figure 64. Analogues carbamate (F03), amide (F04), dicarboxyamide (F05) du composé F02. ²²⁵	133
Figure 65. Requis structuraux du pyridoclax nécessaires à l'activité pro-apoptotique.	137
Figure 66. Modulations du pyridoclax envisagées à partir des premières RSA.	139
Figure 67. Structure générale des mimes de Smac développés.	141
Figure 68. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie en présence des siRNA.....	148
Figure 69. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie en présence de S63845 et d'ABT-737.	150
Figure 70. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie (en présence des inhibiteurs de la littérature) du composé M33 à 25 μ M.....	151
Figure 71. Profils d'activité pro-apoptotique.	151
Figure 72. Graphique de synthèse des résultats biologiques obtenus pour le pyridoclax à 25 μ M (en présence de siRNA).....	153
Figure 73. Modulations du pyridoclax envisagées.	156
Figure 74. Pyridines up (A) et down (D) du pyridoclax.....	157

Figure 75. Complexe in silico M25/Mcl-1. La chaîne O-alkylées de la molécule est dirigée vers la poche P4 de la protéine.	167
Figure 76. Zoom sur la poche P2 de Mcl-1.	180
Figure 77. Modifications envisagées de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale du pyridoclaix.	186
Figure 78. Mode de fixation proposé pour le pyridoclaix dans Mcl-1 : interaction d'une pyridine avec l'Arg ^{263, 218}	200
Figure 79. Développement de mimes contraints du térapeptide AVPI (à gauche) de la protéine Smac.	202
Figure 80. Superposition des complexes d'interaction du térapeptide AVPI et du composé W04 avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP.	203
Figure 81. Structure dipeptidique de type azabicyclo[3.4.0]nonane envisagée (orange), superposée au térapeptide AVPI (bleu).	211
Figure 82. Mécanisme proposé pour la réaction de cyclisation transannulaire en présence d'iode hypervalent. ^{243a}	217
Figure 83. Structures des analogues azabicyclo[3.4.0]nonane des composés 50 , M61 , M62 et M60 de type azabicyclo[5.3.0]décane en cours de synthèse au sein de l'équipe du Pr Lubell.	219
Figure 84. Mimes contraints du térapeptide AVPI obtenus.	220

Table des schémas

Schéma 1. Incidence de certains cancers féminins (en jaune nouveaux cas/an, en rouge décès/an).	34
Schéma 2. Le concept de garlanding. ^{183b}	102
Schéma 3. Inhibiteur de Mcl-1 des laboratoires Abbott® (gauche) et T01 conçu par Tanaka et al. (droite).	125
Schéma 4. Stratégie d'hybridation utilisée par Tanaka <i>et al.</i> pour concevoir des inhibiteurs duals.	127
Schéma 5. Inhibiteur dual hybride conçu par Tanaka et al. Partie W (orange) ; partie E (violet). ²²⁰	127
Schéma 6. Intermédiaires clés 6 et 10 obtenus à partir de l'intermédiaire commun 3	156
Schéma 7. Synthèse de l'intermédiaire 3 à partir de la 5-bromo-2-hydroxypyridine.	157
Schéma 8. Distinction des voies de synthèse up et down grâce à la nature de l'halogène en position 2 sur le composé 3 et 7	158
Schéma 9. Modifications en série down.	161
Schéma 10. Essais réalisés pour introduire un groupement benzyle terminal.	162
Schéma 11. Modifications effectuées en série up.	163
Schéma 12. Voies de synthèse des composés M16 et M21 à partir des intermédiaires 6 et 10	168
Schéma 13. Voie de synthèse utilisée pour l'introduction d'une chaîne O-alkylée terminale à partir de l'intermédiaire 10	168
Schéma 14. Voie de synthèse utilisée pour l'introduction d'une chaîne O-alkylée terminale à partir de l'intermédiaire 6	169
Schéma 15. Conditions d'hydrolyse basique de la fonction nitrile utilisées.	174
Schéma 16. Conditions d'hydrolyse basique de la fonction nitrile utilisées.	174
Schéma 17. Hydrolyse basique du composé M43	175
Schéma 18. Voie de synthèse du composé M32 à partir de l'intermédiaire 9 iodé.	179
Schéma 19. Rétro-synthèse envisagée, permettant la modification du groupement styryle en dernière étape, à partir de l'intermédiaire clé halogéné 18	181
Schéma 20. Rétro-synthèse envisagée pour l'obtention de l'intermédiaire clé 18	181
Schéma 21. Conditions utilisées pour le couplage de type S-M entre la 5-bromo-2-hydroxypyridine et l'acide pyridin-3-ylboronique.	182
Schéma 22. Voie de synthèse de l'intermédiaires clé bromé 18	183
Schéma 23. Conditions de réaction de couplage de type Heck entre le composé 14 et le 2-vinylnaphtalène.	184

Schéma 24. Conditions testées pour le couplage de type Heck entre le composé 18 et le 2-vinylnaphtalène.	184
Schéma 25. Retro-synthèse envisagée à partir du composé 14	184
Schéma 26. Voie de synthèse des composés M11 , M30 et M57 à partir du composé 14	185
Schéma 27. Rétro-synthèse envisagée à partir du composé 14 pour la modification de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe.	186
Schéma 28. Réaction de couplage de type Heck permettant la synthèse des composés 22 , 23 et 24 à partir du composé 14	187
Schéma 29. Conditions de réaction testées pour la réduction des composés 23 et 24 en alcools allyliques.	187
Schéma 30. Conditions de réaction testées pour la bromation décarboxylante du composé 22	188
Schéma 31. Conditions de réaction utilisées pour la préparation du bromoalcène 26 à partir de l'acide carboxylique α,β -insaturé 22 et conditions de réaction testées pour la substitution nucléophile sur la fonction bromoalcène du composé 26	188
Schéma 32. Conditions de réaction testées pour le couplage de type Ullmann sur la fonction bromoalcène du composé 26	189
Schéma 33. Retro-synthèse envisagée à partir du composé 26 pour la modification de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe.	189
Schéma 34. Voie de synthèse testée pour un couplage de type S-M sur l'atome d'iode du composé 27	190
Schéma 35. Conditions d'hydrogénation utilisées pour la réduction de la double liaison du pyridoclox. ...	191
Schéma 36. Voie de synthèse du composé M56	191
Schéma 37. Conditions utilisées à partir du composé 14 pour introduire un groupement benzyle.	192
Schéma 38. Voie de synthèse du composé 32 pour l'introduction d'un groupement latéral benzylique....	192
Schéma 39. Exemples de modifications de la fonction aldéhyde du composé 36	193
Schéma 40. Voie de synthèse du précurseur oxo-quaterpyridine 36	194
Schéma 41. RSA établies par le remplacement des pyridines terminales avec des éléments de flexibilité.	196
Schéma 42. RSA établies par le remplacement des pyridines terminales avec des éléments de flexibilité.	197
Schéma 43. RSA établies par introduction de groupements polaires en position 2 d'un cycle benzénique terminal en série up.	198
Schéma 44. RSA établies par introduction d'une fonction phénolique terminale en série up ou down.....	198
Schéma 45. Inhibiteurs duals obtenus par introduction d'une fonction polaire en position 2 d'un cycle benzénique terminal.	199
Schéma 46. RSA établies par remplacement simultané des deux pyridines terminales.	199
Schéma 47. RSA établies par modification du groupement hydrophobe (GH).	200
Schéma 48. Rétrosynthèse envisagée pour la synthèse d'espèces azabicyclo[x.y.0]alcane à partir de deux intermédiaires.	202
Schéma 49. Structures azabicyclo[5.3.0]décane et azabicyclo[3.4.0]nonane.	203
Schéma 50. Voie de synthèse des intermédiaires 41 et 42 à partir de la <i>L</i> -sérine.	204
Schéma 51. Voie de synthèse du composé cyclique à dix membres 44 à partir des intermédiaires 41 et 42	205
Schéma 52. Voie de synthèse du composé 46 , à structure 6-iodo-azabicyclo[5.3.0]décane, à partir du composé cyclique à dix membres 44	205
Schéma 53. Voie de synthèse envisagée pour le composé 50 , mime abiotique d'AVPI à structure centrale 6-hydroxy-azabicyclo[5.3.0]décane, à partir du composé 46	207
Schéma 54. Etapes clés de la voie de synthèse des composés 54 , 56 et 57 à partir du composé monocyclique insaturé 44	208
Schéma 55. Voie de synthèse du composé M60 , mime abiotique d'AVPI à structure cyclique à dix membres, obtenus à partir du composé 44	209

Schéma 56. Voie de synthèse du composé M61 mime abiotique d'AVPI à structure 6-iodo-azabicyclo[5.3.0]décane à partir du composé 53	210
Schéma 57. Voie de synthèse du composé M62 mime abiotique d'AVPI à structure 6-méthoxy-azabicyclo[5.3.0]décane à partir du composé 54	210
Schéma 58. Voie de synthèse de l'intermédiaire 57 à partir du composé 39	212
Schéma 59. Voie de synthèse de l'intermédiaire 62 à partir de la L-méthionine.....	213
Schéma 60. Voie de synthèse du dipeptide 65	214
Schéma 61. Voie de synthèse du composé cyclique à 9 membres 67 à partir du dipeptide 65	216
Schéma 62. Conditions de cyclisation transannulaire testées.....	216
Schéma 63. Voie de synthèse du composé 70 à structure 4-iodo-azabicyclo[3.4.0]nonane, à partir du composé cyclique à neuf membres 67	218
Schéma 64. Voie de synthèse du composé 71 à structure 4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane, à partir du composé 4-iodo-azabicyclo[3.4.0]nonane 74	218
Schéma 65. Voie de synthèse proposée pour le développement d'un mime d'AVPI à structure 4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane.....	219
Schéma 66. Mimes d'AVPI obtenus à partir du composé 44	220
Schéma 67. Etapes clés de la voie de synthèse élaborée pour le développement de mimes d'AVPI à partir d'un composé monocyclique insaturé.	221
Schéma 68. Application de la voie de synthèse élaborée au composé 70 pour le développement de mimes d'AVPI à structure centrale azabicyclo[3.4.0]nonane.	221

Table des graphiques

Graphique 1. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	165
Graphique 2. Effet dose-dépendant.	166
Graphique 3. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	171
Graphique 4. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	172
Graphique 5. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	176
Graphique 6. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	177
Graphique 7. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	178
Graphique 8. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	179
Graphique 9. Histogramme des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.	195

Table des tableaux

Tableau 1. Les principales techniques de détection et caractérisation des IPPs.....	88
Tableau 2. Exemples de perturbateurs d'IPP impliqués dans l'apoptose, retrouvés dans la littérature..	105
Tableau 3. Conditions de réaction utilisées pour l'introduction en série <i>up</i> d'un pont flexible thioéther (1-2), méthylène (3) et éther (4-10).....	163
Tableau 4. Composés obtenus en série <i>up</i> par couplage de type S-M à partir de l'intermédiaire 10 et de différentes espèces boroniques portant des fonctions polaires (FP).	173
Tableau 5. Composés obtenus en série <i>down</i> par couplage type S-M de l'intermédiaire 6 avec différentes espèces boroniques portant des fonctions polaires (FP).	175
Tableau 6. Optimisation des conditions de métathèse pour la synthèse du dipeptide 66	215
Tableau 7. Résultats des tests FPA.....	222

Abréviations et acronymes

- ADN : acide désoxyribonucléique
- AKT : protein kinase B
- Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor 1*
- Bak : *BCL-2 antagonist killer 1*
- Bax : *BCL-2-associated X-protein*
- Bcl-2 B : *cell CLL/lymphoma-2*
- Bcl-x_L : *BCL-2-related gene long isoform*
- BH : *Bcl-2 homology*
- BIR : *Baculovirus IAP Repeat*
- Boc : *tert-Butyloxycarbonyl*
- Boc₂O : *di-tert-butyl dicarbonate*
- BRCA1 : breast cancer 1
- BRCA2 : breast cancer 2
- BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
- *t*BuOK : *tert*-butanol de potassium
- c-FLIP : *FADD-Like Inhibitory Protein*
- CERMN : Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie
- cIAP1 : *cellular IAP1*
- cIAP2 : *cellular IAP2*
- DCM : dichlorométhane
- DEPBT : 3-(diéthoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one
- DIABLO : *Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point*
- DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
- DISC : *Death Inducing Signaling Complex*
- DMAP : 4-diméthylaminopyridine
- DMF : diméthylformamide
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- FA : acide formique

- FADD : *Fas-Associated Death Domain*
- Fmoc : Fluorénylméthylloxycarbonyl
- FmocOSu : 9-fluorénylméthyl *N*-succinimidyl carbonate
- FP : fonction polaire
- FPA : *Fluorescence Polarization Assay*
- FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
- HOBT : Hydroxybenzotriazole
- HTS : *High-Troughput Screening*
- IAPs : *Inhibitor of Apoptosis Protein*
- iPPs : *Interactions Protéine-Protéine*
- *i*PrMgCl LiCl : isopropylmagnesium chloride lithium chloride
- MAPK : mitogen-activated protein kinase
- Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia-1*
- MeOH : méthanol
- MM : Masse Moléculaire
- MOMP : *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*
- NIS : *N*-Iodosuccinimide
- OTs : tosylate
- Pd(dba)₂ : Tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0)
- Pd(dppf)Cl₂ : dichlorure de [1,1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène]palladium(II)
- Pd(OAc)₂ : acétate de palladium(II)
- PI3K : phosphoinositide 3-kinase
- RING : *Really Interesting New Gene*
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- RSA : Relations Structure-Activité
- S-M : Suzuki-Miyaura
- siRNA : *Small interfering RNA*
- Smac : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*
- SN₂ : Substitution Nucléophile aliphatique de type 2
- SN_{Ar} : Substitution Nucléophile Aromatique

- SPR : *Surface Plasmon Resonance*
- TBTU : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylamminium
- Tetrakis (Pd(PPh₃)₄) : Tetrakis(triphénylphosphine)palladium(0)
- TFA : acide trifluoroacétique
- tfp : tri(2-furyl) phosphine
- THF : tétrahydrofurane
- TNF : *Tumor Necrosis Factor*
- TsCl : chlorure de 4-toluènesulfonyle
- XIAP : *X-linked IAP*
- Liste des acides aminés :

Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I

Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Avant-propos

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 financés par la Ligue Contre le Cancer.

Chimiste de formation, j'ai réalisé mes études à la faculté de Chimie de l'Université de Salerno, en Italie. J'ai effectué mes stages de Master I et Master II au sein de l'équipe du Pr Gaetano Guerra à l'Université de Salerno dans le domaine de la chimie des matériaux. Les travaux relatifs au stage de Master I (9 mois) s'intéressaient aux réactions unimoléculaires dans les différentes phases cristallines nano-poreuses du polystyrène syndiotactique (s-PS), dit « polystyrène du future ». Ceux du stage de Master II (12 mois) étaient centrés sur l'utilisation de composés graphitiques comme catalyseurs dans des réactions d'addition de Mukaiyama-Michael et d'addition aldolique de Mukaiyama. Les travaux de ces stages se sont traduits par deux publications, une en 2012 (Albunia, A.; Rizzo, P.; Coppola, M.; De Pascale, M.; Guerra, G. Azobenzene Isomerization in Polymer Co-Crystalline Phases. *Polymer* **2012**, *53*, 2727–2735) et une en 2015 (Acocella M.R., De Pascale M., Maggio M., Guerra G. Graphite oxide as catalyst for Diastereoselective Mukaiyama aldol reaction of 2-(trimethylsilyloxy)furan in solvent free conditions. *J. Mol. Catal. A Chem.*, **2015**, *408*, 237–241). J'ai obtenu la licence en chimie avec la note de 102/110 et le master avec une note de 110/110 « avec félicitations ».

J'ai ensuite candidaté à des sélections nationales (en Italie) pour deux stages financés par des fonds européens. Mes candidatures ont été retenues. Le premier stage, de 4 mois à l'Université de Salerno sous la supervision du Pr Pasquale Longo, avait pour sujet le développement de catalyseurs au ruthénium supportés par des matériaux graphitiques. Le deuxième stage m'a permis d'effectuer ma première expérience à l'étranger. C'est grâce à une collaboration entre le Pr Carmela Saturnino du département de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Salerno et le Pr Anne Sophie Voisin-Chiret de la faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'UFR Santé de l'Université de Caen-Normandie, que ce stage de 6 mois a été effectué au CERMN. Il m'a été confié d'étudier la conception, la synthèse et les propriétés pharmacocinétiques de nouveaux composés polypyridiniques

(une publication est soumise à *J. Med. Chem.*). À la suite de ce stage, j'ai eu l'opportunité de proposer ma candidature à un appel à projet Ligue Contre le Cancer, projet soutenu par le laboratoire et en particulier par le Pr Voisin-Chiret. Ma candidature a été retenue et les travaux de thèse ont commencé en Novembre 2015.

Le CERMN, rattaché à l'Université de Caen-Normandie et dirigé par le Pr 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 sont la cancérologie et les neurosciences avec comme programmes scientifiques prioritaires la polypharmacologie, les interactions protéine-protéine et les outils chimiques pour le diagnostic et l'imagerie.

Mon projet de recherche s'insère dans l'axe cancérologie et plus précisément dans le programme dédié aux interactions protéine-protéine.

Mes travaux de thèse ont consisté à concevoir et synthétiser des molécules inhibitrices des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-x_L et XIAP. Ces protéines sont surexprimées dans différents cancers, dont le cancer de l'ovaire, auquel nous nous sommes particulièrement intéressés, et leur surexpression est liée au développement d'une chimiorésistance.

Dans ce manuscrit seront présentées les protéines cibles et leur implication dans le cancer de l'ovaire chimiorésistant, ainsi que l'intérêt porté par la communauté scientifique dans le développement de stratégies pour inhiber ces protéines.

Récemment, un inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1 a été développé au CERMN. Mes travaux de thèse s'intéressent à la pharmacomodulation de cette molécule pour améliorer son activité inhibitrice de Mcl-1 et pour induire une activité inhibitrice de Bcl-x_L, afin de concevoir des inhibiteurs duals pour ces deux protéines de la même famille. En deuxième année de thèse j'ai répondu à un appel d'offre « Programme de Soutien à la Mobilité » auprès du Cancérôpole Nord-Ouest et le projet proposé a été sélectionné. Au sein du département de chimie de l'Université de Montréal au Canada, j'ai travaillé pendant 8 mois dans le groupe du Pr William D. Lubell. Les recherches du Pr Lubell portent sur la

chimie médicinale et la chimie des peptides. Elles visent à développer des méthodes efficaces pour la synthèse de nouveaux hétérocycles peptidomimétiques. Cette mobilité m'a permis de concevoir de nouvelles molécules à visée anticancéreuse mimant de la protéine Smac (inhibiteur naturel de la protéine XIAP), enrichissant l'espace chimique de mon projet de thèse.

Pendant ces trois années, j'ai eu la possibilité de participer à des réunions pluridisciplinaires avec des spécialistes du domaine de la modélisation moléculaire, de l'analyse RMN et de la biologie. J'ai également effectué 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 organique appliquée aux médicaments (*2^{ème} année de pharmacie*) (64 h), les travaux pratiques de chimie thérapeutique de 3^{ème} année de pharmacie (inflammation et douleur) (30 h), et de 4^{ème} année de pharmacie (pathologies et médicaments du système cardiovasculaire) (18 h), les travaux pratiques de sciences du médicament : accès synthétique en (*2^{ème} année de pharmacie*) (12 h), et les travaux dirigés d'analyses RMN dans le cadre du Master I *drug design* proposé par l'Université (4 h). J'ai également suivi une formation hygiène et sécurité en laboratoire de recherche (20 h).

Ces travaux de thèse se sont traduits par 3 publications, une parue en 2017, une en révision en Septembre 2018 et une soumise en septembre 2018. Ils ont fait l'objet de 3 communications orales, un acte de congrès et 8 communications par affiche dans des congrès nationaux et internationaux de chimie organique, chimie médicinale et oncologie.

- Publications :

Groo, A.-C.; De Pascale, M.; Voisin-Chiret, A.-S.; Corvaisier, S.; Since, M.; Malzert-Fréon, A. Comparison of 2 Strategies to Enhance Pyridoclox Solubility: Nanoemulsion Delivery System versus Salt Synthesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *97*, 218–226.

Hedir, S.; De Pascale, M.; De Giorgi, M.; Fogha, J.; Weiswald, L. B.; Brotin, E.; Marekha, B.; Denoyelle, C.; Denis, C.; Suzanne, P.; et al. Structure-Guided Design of Pyridoclox

Derivatives Based on Noxa / Mcl-1 Interaction Mode. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 357–380.

De Pascale, M.; Iacopetta, D.; Since, M.; Corvarier, S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Vie, V.; Paboeuf, G.; Hennequin, D.; De Giorgi, M.; Sinicropi, M. S.; Voisin-Chiret, A.S.; Malzert-Fréon, A. Structure-property relationships of oligopyridines of therapeutic interest as potential protein-protein interactions disruptors. *J. Med. Chem.* soumission en Septembre **2018**.

- Communications orales :

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

Conception de perturbateurs d'interactions protéine-protéine agissant sur l'apoptose cellulaire pour le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants. De Pascale M., Denis C., Marekha B., Brotin E., Poulain L. et Voisin-Chiret A.S. 17èmes Rencontres en Chimie Organique Biologique, Mars 2018. Aussois, France.

Design of dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancers. De Pascale M., Denis C., Marekha B., Brotin E., Poulain L. et Voisin-Chiret A.S. 32èmes Journées Franco-Belges de Chimie Thérapeutique et 26èmes Rencontres Internationales des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique, Juin 2018. Asnelles sur Mer, France.

- Acte de congrès :

Hedir S., Weiswald L. B., De Giorgi M., Fogha J., De Pascale M., Brotin E., Marekha B., Suzanne P., Gautier F., Juin P., Ligat L., Lopez F., Legay R., Bureau R., Rault S., Sopkova-de Oliveira Santo J., Voisin-Chiret A. S. and Poulain L. Pyridoclastax and its derivatives from oligopyridine family directly inhibit Mcl-1 and exert potent antitumor effects on ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, Juillet **2018**, *78* (13 Supplement) 3996–3996. (DOI:10.1158/1538-7445.AM2018-3996).

- Communications par affiche :

Design and synthesis of Mcl-1/ Bcl-x_L dual inhibitors for treatment of chemoresistant ovarian cancer. M. De Pascale, J. Sopková-de Olivera Santos, A.S. Voisin-Chiret. 23èmes Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Février 2016. Lille, France.

Searching for new dual inhibitors of anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancer. M. De Pascale, A.S. Voisin-Chiret. 19èmes journées de l'école doctorale EdNBISE, Mars 2016. Caen, France.

Design and synthesis of Mcl-1/ Bcl-x_L dual inhibitors for treatment of chemoresistant ovarian cancer. M. De Pascale, C. Denis, R. Bureau, A.S. Voisin-Chiret 16èmes Rencontres de Chimie Organique Biologique, Mars 2016. Aussois, France.

Hit optimization of pyridoclax: to Mcl-1/Bcl-x_L dual inhibitors for the treatment of chemoresistant ovarian cancer. M. De Pascale, A.S. Voisin-Chiret. 13th Anglo-Norman colloquium on organic chemistry, Avril 2016. Rouen, France.

Développement d'inhibiteurs ciblant les protéines antiapoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L: Application au traitement du cancer chimiorésistant des ovaires. M. De Pascale, A.S. Voisin-Chiret. 9èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Mai 2016. Deauville, France.

Pyridoclax Hit Optimization: Searching for new dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancer. M. De Pascale, A.S. Voisin-Chiret. Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery, Juillet 2016. Caen, France.

Discovery of Mcl-1/ Bcl-x_L dual inhibitors for treatment of chemoresistant ovarian cancers. De Pascale M., Denis C., Marekha B., Brotin E., Poulain L. et Voisin-Chiret A.S. 11èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Mai 2018. Deauville, France.

Discovery of dual inhibitors of anti-apoptotic members of Bcl-2 family for the treatment of chemoresistant ovarian cancers. De Pascale M., Denis C., Brotin E. et Voisin-Chiret A.S. Normandy Doctoral School of Chemistry Day, Juin 2018. Le Havre, France.

CHAPITRE 1

Les cancers de l'ovaire et l'apoptose

1. Les cancers de l’ovaire

1. 1. L’épidémiologie

Dans les pays développés, parmi les maladies gynécologiques, le cancer de l’ovaire représente la principale cause de décès.¹ On compte au niveau mondial près de 225 000 nouveaux cas chaque année² (Schéma 1). En France, ce cancer est le huitième plus fréquent, avec près de 4 500 nouveaux cas par an. Malgré une incidence plus faible que celle du cancer du sein par exemple (54 000 nouveaux cas/an), le cancer de l’ovaire représente la quatrième cause de décès par cancer chez la femme, juste derrière le cancer du sein, avec plus de 3000 décès chaque année.³ Le fort taux de mortalité de ce cancer fait

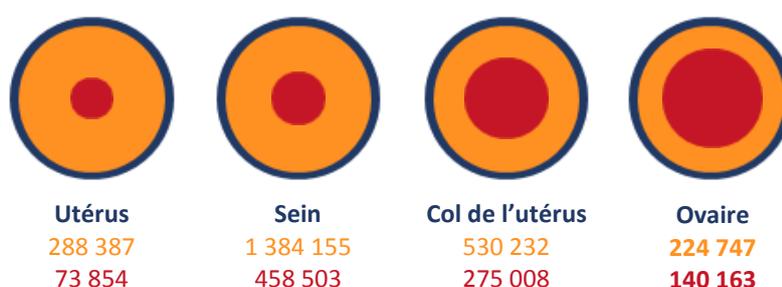


Schéma 1. Incidence de certains cancers féminins (en jaune nouveaux cas/an, en rouge décès/an).

la preuve évidente de sa gravité.

1. 2. Les différents types de cancer de l’ovaire

Les ovaires sont deux glandes de forme ovoïde, mesurant en moyenne 2 cm sur 4 cm. Ils sont situés de part et d’autre de l’utérus et reliés à celui-ci *via* les trompes de Fallope.

Les ovaires font partie des organes génitaux féminins, ils produisent la progestérone et les œstrogènes, deux hormones qui régulent le cycle menstruel et définissent les caractères sexuels secondaires (sein, silhouette, voix). Ils sont constitués de trois différents tissus : l’épithélium, le tissu externe ; le stroma, le tissu dit de « soutien » qui donne forme et consistance à l’organe ; les follicules ovariens (ou cellules germinales) situés sous les cellules épithéliales et à partir desquels les ovules sont produits (Figure 1). Une tumeur

¹ Brett M., R.; Jennifer B., P.; Thomas A., S. Epidemiology of Ovarian Cancer: A Review. *Cancer Biol. Med.* **2017**, 14 (1), 9–32.

² Fact Sheets by Population http://globocan.iarc.fr/pages/fact_sheets_population.aspx (page consultée le 31/05/2018).

³ Les cancers de l’ovaire <https://www.fondation-arc.org/cancers-ovaire> (page consultée le 31/05/2018).

peut se développer dans les trois tissus : 90 % des tumeurs cancéreuses concernent le tissu épithélial, 7 % le stroma et 3 % les follicules.⁴ Parmi les tumeurs épithéliales, on distingue : les tumeurs bénignes, les tumeurs « borderline », comportant des lésions microscopiques anormales à la limite de la néoplasie, et les tumeurs malignes.

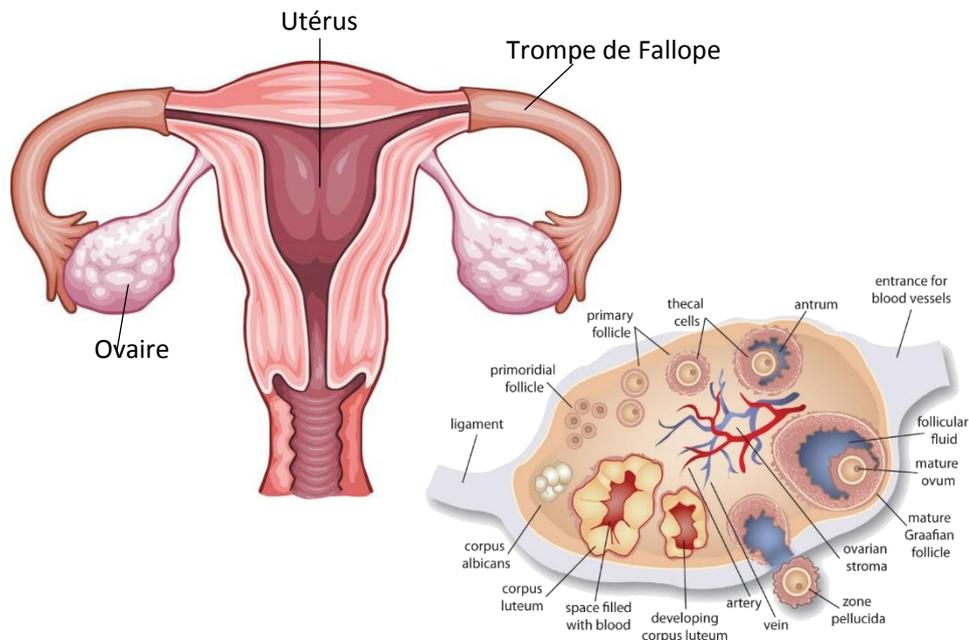


Figure 1. Structure interne de l'ovaire.

Les tumeurs épithéliales malignes sont appelées « carcinomes » et constituent environ 90 % des cancers de l'ovaire. On distingue cinq principaux sous-types de carcinomes ovariens : les Carcinomes Séreux de Haut Grade (CSHG) (70 %), les Carcinomes Séreux de Bas Grade (CSBG) (5 %), les Carcinomes Endométrioides (CE) (10 %), les Carcinomes à Cellules Claires (CCC) (10 %) et les Carcinomes Mucineux (CM) (3 %).⁵

Les tumeurs de cellules germinales et de cellules du stroma sont beaucoup moins fréquentes et ne représentent que 10 % des cancers de l'ovaire. Ils surviennent souvent chez des femmes jeunes dès l'adolescence.

⁴ Romero, I.; Bast, R. C. Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. *Endocrinology* **2012**, *153* (4), 1593–1602.

⁵ Sankaranarayanan, R.; Ferlay, J. Worldwide Burden of Gynaecological Cancer: The Size of the Problem. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2006**, *20* (2), 207–225.

1. 3. Les facteurs de risque

Certains comportements et caractéristiques individuels augmentent le risque de survenue de cancers. Dans le cas du cancer de l'ovaire, les principaux facteurs de risque identifiés sont l'âge et l'hérédité génétique.

L'âge moyen des patientes lors du diagnostic des cancers de l'ovaire est de 65 ans. Concernant l'hérédité, il a été établi qu'environ 5 à 15 % des tumeurs épithéliales de l'ovaire seraient d'origine génétique.^{6, 7} Dans neuf cas sur dix, la mutation concerne les gènes appelés BRCA1 et BRCA2. Une mutation de ces gènes chez la femme augmente le risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire. Ainsi, dans la population générale, une femme non porteuse d'une mutation de ces gènes présente un risque de 4 % de développer un cancer ovarien ; avec une mutation BRCA1, ce risque est compris entre 39 % et 46 % et entre 12 % et 20 % chez les porteuses de la mutation BRCA2.⁸ Les mutations de ces gènes augmentent également le risque de développer un cancer du sein : pour les femmes porteuses de ces mutations génétiques, le risque est compris entre 65 et 74 %, contre 12 % en absence de mutations.¹

Par ailleurs, l'histoire hormonale de la femme influence sa prédisposition au cancer de l'ovaire. Comme le montrent certaines données épidémiologiques, les grossesses, l'allaitement ainsi que l'utilisation de contraceptifs oraux (qui réduisent le nombre d'ovulations durant la vie) semblent diminuer le risque de développer un cancer ovarien, alors qu'une ménopause tardive, ou une puberté précoce, semblent augmenter ce risque.

⁶ Malander, S.; Ridderheim, M.; Måsbäck, A.; Loman, N.; Kristoffersson, U.; Olsson, H.; Nilbert, M.; Borg, A. One in 10 Ovarian Cancer Patients Carry Germ Line BRCA1 or BRCA2 Mutations: Results of a Prospective Study in Southern Sweden. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40* (3), 422–428.

⁷ Menkiszak, J.; Gronwald, J.; Górski, B.; Jakubowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Foszczyńska-Kłoda, M.; Haus, O.; Janiszewska, H.; Perkowska, M.; *et al.* Hereditary Ovarian Cancer in Poland. *Int. J. Cancer* **2003**, *106* (6), 942–945.

⁸ Cuellar-Partida, G.; Lu, Y.; Dixon, S. C.; Australian Ovarian Cancer Study; Fasching, P. A.; Hein, A.; Burghaus, S.; Beckmann, M. W.; Lambrechts, D.; Van Nieuwenhuysen, E.; *et al.* Assessing the Genetic Architecture of Epithelial Ovarian Cancer Histological Subtypes. *Hum. Genet.* **2016**, *135* (7), 741–756.

1. 4. Les circonstances de la découverte et la prise en charge thérapeutique

Le cancer de l'ovaire reste longtemps silencieux. Cela explique le fort taux de mortalité de ces tumeurs dû à un diagnostic souvent tardif. Au stade symptomatique on retrouve : des troubles digestifs tels que nausées, constipation, perte d'appétit et douleur à l'estomac ; des troubles gynécologiques tels que perturbation des menstruations, métrorragies, pertes vaginales anormales. D'autres symptômes, comme des pertes urinaires, des douleurs pelviennes et une augmentation du volume de l'abdomen, sont souvent liés à la présence d'une masse tumorale importante. Ces symptômes aspécifiques rendent le diagnostic compliqué et expliquent le retard de prise en charge. Ainsi, le cancer de l'ovaire est souvent diagnostiqué tardivement et dans 75 % des cas il a déjà atteint d'autres organes (métastases), le traitement devient alors plus difficile et plus de 3000 patientes décèdent chaque année.⁹

Une fois le diagnostic posé, le choix du traitement repose essentiellement sur deux facteurs : les caractéristiques de la tumeur (taille, localisation, stade et grade tumoral) et l'état général de la patiente. En France, la décision de prise en charge thérapeutique est l'objet d'une concertation entre la patiente et le corps médical. Le protocole de soin est décidé lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP), les différents protocoles de soin sont discutés puis soumis aux patientes avant d'être validés.

Le traitement du cancer de l'ovaire fait principalement appel à la chirurgie et à la chimiothérapie.

- **La chirurgie**

La chirurgie est systématiquement proposée pour des tumeurs en stade initial, à moins que l'état général de la patiente ne le permette pas. La chirurgie permet de retirer l'ensemble de la tumeur et de réduire le risque de rechute. Dans le cas de tumeurs à un stade plus avancé, la chirurgie sera associée à une chimiothérapie anticancéreuse.

⁹ Cancer de l'ovaire <https://curie.fr/dossier-pedagogique/cancer-de-lovaire>, page consultée le 31/05/18.

▪ La chimiothérapie

Dans le cas du cancer de l'ovaire, la chimiothérapie peut être utilisée à différents moments du protocole de soin : la chimiothérapie néo-adjuvante est effectuée avant toute intervention chirurgicale afin de réduire la taille des tumeurs et augmenter la réussite de l'intervention chirurgicale ; la chimiothérapie adjuvante a lieu après la chirurgie, afin de consolider le bénéfice de l'intervention et limiter le risque de rechute. Dans le cas de tumeurs métastasées la chirurgie est inefficace : la chimiothérapie reste donc la seule option thérapeutique possible. Les protocoles font appel à des polychimiothérapies, utilisant des médicaments anticancéreux qui ciblent généralement les cellules en division rapide, ce qui est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses.¹⁰ Les agents anticancéreux les plus couramment utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire sont :¹¹ les sels de platine (cisplatine, carboplatine et oxaliplatine) et les taxanes (paclitaxel ou docétaxel) (Figure 2).

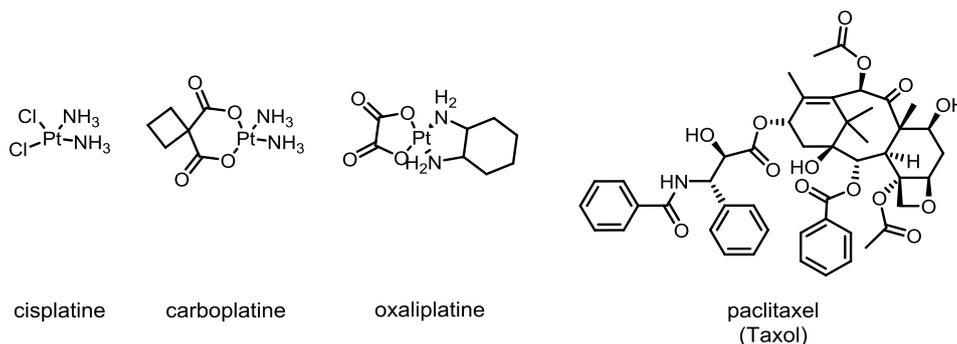


Figure 2. Principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire.

Tout d'abord, parmi les sels de platine on retrouve le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine. Le cisplatine a été synthétisé pour la première fois par M. Peyrone en 1844. Cependant, ses propriétés anticancéreuses n'ont été mises en évidence qu'à partir des années 1960, quand l'Université d'État du Michigan (USA) a montré que certains produits issus de l'électrolyse d'électrodes en maille de Platine étaient capables d'inhiber la division cellulaire d'*Escherichia coli*. Après l'identification du *cis*-dichlorodiamineplatine (II)

¹⁰ Brasseur, K.; Gévry, N.; Asselin, E. Chemoresistance and Targeted Therapies in Ovarian and Endometrial Cancers. *Oncotarget* **2016**, *8* (3), 4008–4042.

¹¹ a) Plataniotis, G.; Castiglione, M.; ESMO Guidelines Working Group. Endometrial Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2010**, *21* (5), 41–45 ; b) Lalwani, N.; Prasad, S. R.; Vikram, R.; Shanbhogue, A. K.; Huettner, P. C.; Fasih, N. Histologic, Molecular, and Cytogenetic Features of Ovarian Cancers: Implications for Diagnosis and Treatment. *Radiographics* **2011**, *31* (3), 625–646.

(cisplatine) comme agent responsable de cette activité, l'utilisation de complexes de coordination du platine, du palladium et d'autres métaux nobles a suscité un grand intérêt dans le traitement des cancers. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses due au cisplatine, au carboplatine et à l'oxaliplatine se fait grâce à la formation d'adduits platine-ADN qui endommagent l'ADN et inhibent sa réplication, menant les cellules à l'apoptose (mort cellulaire programmée).¹² Le carboplatine est utilisé pour les cancers de l'ovaire, du poumon, de la tête et du cou. Il est moins réactif que le cisplatine et il se lie à l'ADN plus lentement. Par rapport au cisplatine, le plus grand avantage du carboplatine est une réduction des effets secondaires, en particulier l'élimination des effets néphrotoxiques, même si, selon le type de cancer, le carboplatine est habituellement administré avec un rapport de 4/1 comparé au cisplatine pour obtenir le même effet thérapeutique que ce dernier.

Ensuite, concernant les taxanes, l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses se fait par un mécanisme différent, ciblant la polymérisation des microtubules : ceci a pour conséquence d'inhiber la mitose (division cellulaire) et d'induire ainsi l'apoptose.^{13, 14} Parmi les taxanes, le paclitaxel a été isolé pour la première fois de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*), grâce à un projet de recherche financé par le National Cancer Institute (NCI) en Maryland, en 1987. Il a été décrit comme « la seule substance dérivée d'une plante capable d'arrêter la croissance tumorale ». ¹⁵ Les résultats des essais cliniques effectués à la fin des années 1980 ont montré une réponse positive au traitement par paclitaxel chez 30 % des patientes atteintes de cancers de l'ovaire en stade avancé.¹⁶ Jusque dans les années 1980, le paclitaxel était obtenu par extraction de *T. brevifolia* : les ressources naturelles étant limitées et la demande croissante ont amené à revoir la voie d'obtention de cette molécule. Ainsi en 1988, 30 laboratoires du monde entier ont concouru à développer une synthèse totale du paclitaxel. Cependant, en raison de la complexité de la molécule, ces

¹² Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (4), 307–320.

¹³ Orr, G. A.; Verdier-Pinard, P.; McDaid, H.; Horwitz, S. B. Mechanisms of Taxol Resistance Related to Microtubules. *Oncogene* **2003**, *22* (47), 7280–7295.

¹⁴ Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265.

¹⁵ McGuire, W. P.; Rowinsky, E. K.; Rosenshein, N. B.; Grumbine, F. C.; Ettinger, D. S.; Armstrong, D. K.; Donehower, R. C. Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms. *Ann. Intern. Med.* **1989**, *111* (4), 273–279.

¹⁶ Weaver, B. A. How Taxol/Paclitaxel Kills Cancer Cells. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25* (18), 2677–2681.

efforts ont échoué jusqu'en 1994,¹⁷ la plupart des méthodes de synthèse proposées nécessitant chacune environ 40 étapes. Finalement, un protocole semi-synthétique à partir de l'if européen est devenu l'approche standard de production. Le paclitaxel (taxol) représente le médicament chimiothérapeutique le plus rentable de l'histoire.¹⁸

1. 5. La chimiorésistance

Le cancer de l'ovaire représente, parmi les maladies gynécologiques, la principale cause de décès pour deux raisons : premièrement à cause d'un diagnostic tardif; deuxièmement parce que les approches chimiothérapeutiques à base de taxol et de carboplatine échouent, à cause du développement de chimiorésistance. Les cellules de cancers récidivants acquièrent souvent une chimiorésistance aux molécules de première ligne, ce qui impose la recherche d'alternative de traitements. La chimiorésistance est un problème thérapeutique majeur. Ceci est particulièrement vrai pour le cancer de l'ovaire où le développement de résistances est un phénomène qui touche jusqu'à 75 % des patientes.¹⁹ La survie à 5 ans est estimée à moins de 45 %.²⁰ Chez les patientes porteuses de tumeurs résistantes, aucune alternative thérapeutique n'est actuellement disponible, ce qui explique ce faible taux de survie. Ainsi, il est urgent et nécessaire de trouver de nouveaux médicaments capables de traiter les cancers de l'ovaire récidivants et chimiorésistants. Les mécanismes responsables du développement de la chimiorésistance sont nombreux.¹⁰ Ils incluent les pompes d'efflux (pour exemple : glycoprotéine-P²¹), les mécanismes de

¹⁷ a) Holton, R. A.; Somoza, C.; Kim, H. B.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S. First Total Synthesis of Taxol. 1. Functionalization of the B Ring. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (4), 1597–1598 ; b) Holton, R. A.; Kim, H. B.; Somoza, C.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S. First Total Synthesis of Taxol. 2. Completion of the C and D Rings. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (4), 1599–1600 ; c) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K.; *et al.* Total Synthesis of Taxol. *Nature* **1994**, *367* (6464), 630–634.

¹⁸ a) Walsh, V.; Goodman, J. Cancer Chemotherapy, Biodiversity, Public and Private Property: The Case of the Anti-Cancer Drug Taxol. *Soc. Sci. Med.* **1999**, *49* (9), 1215–1225 ; b) Walsh, V.; Goodman, J. From Taxol to Taxol®: The Changing Identities and Ownership of an Anti-Cancer Drug. *Med. Anthropol.* **2002**, *21*, 307–336 ; c) The billion dollar molecule: Taxol in historical and theoretical perspective. *Clio Med.* **2002**, *66*, 245–267.

¹⁹ Wong Te Fong, A.-C.; Thavasu, P.; Gargica, S.; Swales, K. E.; Leach, M. O.; Cosulich, S. C.; Chung, Y.-L.; Banerji, U. Evaluation of the Combination of the Dual M-TORC1/2 Inhibitor Vistusertib (AZD2014) and Paclitaxel in Ovarian Cancer Models. *Oncotarget* **2017**, *8* (69), 113874–113884.

²⁰ Allemani, C.; Weir, H. K.; Carreira, H.; Harewood, R.; Spika, D.; Wang, X.-S.; Bannon, F.; Ahn, J. V.; Johnson, C. J.; Bonaventure, A.; *et al.* Global Surveillance of Cancer Survival 1995-2009: Analysis of Individual Data for 25,676,887 Patients from 279 Population-Based Registries in 67 Countries (CONCORD-2). *Lancet* **2015**, *385* (9972), 977–1010.

²¹ Kamazawa, S.; Kigawa, J.; Kanamori, Y.; Itamochi, H.; Sato, S.; Iba, T.; Terakawa, N. Multidrug Resistance Gene-1 Is a Useful Predictor of Paclitaxel-Based Chemotherapy for Patients with Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2002**, *86* (2), 171–176.

réparation de l'ADN (comme la recombinaison homologue des gènes BRCA1²² et BRCA2²³), les voies de survie cellulaire (pour exemple : PI3KT/AKT²⁴ et MAPK²⁵) et le suppresseur de tumeur (p53²⁶). Différentes thérapies ciblent ces mécanismes mais elles ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

Aujourd'hui, un fort intérêt est porté au développement de nouvelles stratégies de traitement des cancers en ciblant les agents cellulaires inhibiteurs d'apoptose.

²² a) Husain, A.; He, G.; Venkatraman, E. S.; Spriggs, D. R. BRCA1 Up-Regulation Is Associated with Repair-Mediated Resistance to Cis-Diaminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* **1998**, *58* (6), 1120–1123 ; b) Weberpals, J.; Garbuio, K.; O'Brien, A.; Clark-Knowles, K.; Doucette, S.; Antoniouk, O.; Goss, G.; Dimitroulakos, J. The DNA Repair Proteins BRCA1 and ERCC1 as Predictive Markers in Sporadic Ovarian Cancer. *Int. J. Cancer* **2008**, *124* (4), 806–815 ; Bartz, S. R.; Zhang, Z.; Burchard, J.; Imakura, M.; Martin, M.; Palmieri, A.; Needham, R.; Guo, J.; Gordon, M.; Chung, N.; et al. Small Interfering RNA Screens Reveal Enhanced Cisplatin Cytotoxicity in Tumor Cells Having Both BRCA Network and TP53 Disruptions. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26* (24), 9377–9386.

²³ Tan, D. S. P.; Rothermundt, C.; Thomas, K.; Bancroft, E.; Eeles, R.; Shanley, S.; Ardern-Jones, A.; Norman, A.; Kaye, S. B.; Gore, M. E. "BRCAness" Syndrome in Ovarian Cancer: A Case-Control Study Describing the Clinical Features and Outcome of Patients with Epithelial Ovarian Cancer Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (34), 5530–5536.

²⁴ Lee, S.; Choi, E.-J.; Jin, C.; Kim, D.-H. Activation of PI3K/Akt Pathway by PTEN Reduction and PIK3CA mRNA Amplification Contributes to Cisplatin Resistance in an Ovarian Cancer Cell Line. *Gynecol. Oncol.* **2005**, *97* (1), 26–34.

²⁵ Villedieu, M.; Deslandes, E.; Guillamin, M.; Heron, J.; Gauduchon, P.; Poulain, L. Acquisition of Chemoresistance Following Discontinuous Exposures to Cisplatin Is Associated in Ovarian Carcinoma Cells with Progressive Alteration of FAK, ERK and P38 Activation in Response to Treatment. *Gynecol. Oncol.* **2006**, *101* (3), 507–519.

²⁶ Fraser, M.; Bai, T.; K Tsang, B. AKT Promotes Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells through Inhibition of P53 Phosphorylation and Nuclear Function. *Int. J. Cancer* **2008**, *122* (3), 534–546.

2. L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique qui joue un rôle critique dans le développement et l'homéostasie tissulaire, mais également dans la défense de l'organisme, permettant l'élimination des cellules endommagées par des infections virales et des mutations.²⁷ Ce phénomène, également appelé mort cellulaire programmée, gère l'équilibre entre la survie et la mort des cellules animales. La dérégulation de l'apoptose est impliquée dans de nombreuses pathologies. Ainsi, un défaut d'apoptose favorise la prolifération anarchique et non contrôlée des cellules, ce qui peut conduire au développement de maladies auto-immunes et de pathologies cancéreuses.²⁸ À l'inverse une stimulation excessive de l'apoptose contribue à l'apparition de certaines maladies neurodégénératives, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson.²⁹

Le terme apoptose (*a-po-toe-sis*) a été utilisé pour la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie pour décrire une forme de mort cellulaire morphologiquement distincte de la nécrose.^{27a} En effet, la cellule apoptotique subit des modifications morphologiques spécifiques, parmi lesquelles on retrouve successivement au cours du processus : une fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine dans le noyau, le rétrécissement du cytoplasme, puis la désagrégation de la cellule en vésicules, appelées « corps apoptotiques ».³⁰ Ces derniers, grâce à l'exposition des phosphatidylsérines sur la bicouche externe de la membrane plasmique, sont ensuite reconnus et phagocytés par les macrophages. L'intégrité de la membrane est conservée pendant tout le processus, ce qui permet de minimiser les actions destructives envers les tissus adjacents (Figure 3).³¹

²⁷ a) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26* (4), 239–257 ; b) Cotter, T. G. Apoptosis and Cancer: The Genesis of a Research Field. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (7), 501–507.

²⁸ Thompson, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* **1995**, *267* (5203), 1456–1462.

²⁹ a) Shafi, O. Inverse Relationship between Alzheimer's Disease and Cancer, and Other Factors Contributing to Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *BMC Neurol.* **2016**, *16* (1), 236 ; b) Ethell, D. W.; Buhler, L. A. Fas Ligand-Mediated Apoptosis in Degenerative Disorders of the Brain. *J. Clin. Immunol.* **2003**, *23* (6), 439–446.

³⁰ Kerr, J. F.; Gobé, G. C.; Winterford, C. M.; Harmon, B. V. Anatomical Methods in Cell Death. *Methods Cell Biol.* **1995**, *46*, 1–27.

³¹ a) Nagata, S.; Hanayama, R.; Kawane, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **2010**, *140* (5), 619–630 ; b) Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35* (4), 495–516.

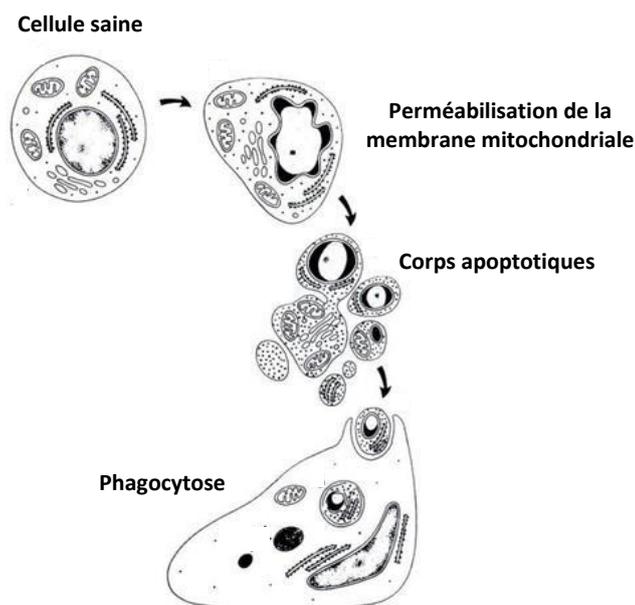


Figure 3. Changements morphologiques subits par la cellule en cours du processus d'apoptose.³⁰

En réponse à des stimuli apoptotiques physiologiques ou pathologiques, aux radiations et aux chimiothérapies anticancéreuses, la cellule peut enclencher le processus d'apoptose.

2. 1. Les voies d'induction de l'apoptose

L'enclenchement de l'apoptose peut se faire par deux voies de signalisation majeures : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.³² Les deux voies convergent vers l'activation d'une famille de protéases spécifiques, appelées caspases,³³ dont l'activation conduit aux modifications morphologiques citées précédemment.

Les caspases (*cysteinyl-aspartate-cleaving proteases*) sont un groupe de protéases à cystéine. Elles sont généralement divisées en deux classes : les caspases initiatrices, qui comprennent les caspases-2, -8, -9 et -10 et les caspases effectrices, à savoir les caspases-3, -6 et -7. L'activation des caspases effectrices est réalisée par les caspases initiatrices.

L'activation de l'une ou l'autre voie de signalisation est conditionnée par la nature du signal de mort auquel la cellule est exposée. Enfin, les deux voies convergent et conduisent à une amplification du signal apoptotique.³⁴

³² a) Jin, Z.; El-Deiry, W. S. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4* (2), 139–163 ; b) Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **2004**, *116* (2), 205–219.

³³ Thornberry, N. A.; Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. *Science* **1998**, *281* (5381), 1312–1316.

³⁴ Igney, F. H.; Krammer, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (4), 277–288.

2. 1. 1. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est médiée par l'activation de récepteurs transmembranaires, appelés « récepteurs de mort » (FasR ou TNFR1). Les récepteurs de mort font partie de la superfamille du gène du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF, *Tumor Necrosis Factor*).³⁵ Ils possèdent des domaines extracellulaires riches en cystéine, et un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé « domaine de mort » (DD, *death domain* en figure 4).³⁶ Ce domaine joue un rôle essentiel dans la transmission du signal de mort de la surface cellulaire vers les voies de signalisation intracellulaires. À ce jour, les couples ligands/récepteurs de mort les mieux caractérisés comprennent FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 et Apo2L/DR5.³⁷ L'activation se fait par liaison des ligands spécifiques aux récepteurs. L'interaction des récepteurs avec leurs ligands spécifiques induit leur trimérisation et le recrutement, au niveau du domaine de mort, des protéines adaptatrices, spécifiques pour chaque récepteur (Figure 4 : exemples de liaisons FasL/FasR et TNF- α /TNFR1). Pour exemples, l'interaction de FasL avec FasR permet l'interaction de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain*), l'interaction de TNF- α avec TNFR1 permet l'interaction de la protéine adaptatrice TRADD (*TNFReceptor-Associated Death Domain*) et le recrutement des protéines adaptatrices FADD et RIP (*Receptor-Interacting Protein*).³⁸

³⁵ Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **2001**, *104* (4), 487–501.

³⁶ Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* **1998**, *281* (5381), 1305–1308.

³⁷ a) Suliman, A.; Lam, A.; Datta, R.; Srivastava, R. K. Intracellular Mechanisms of TRAIL: Apoptosis through Mitochondrial-Dependent and -Independent Pathways. *Oncogene* **2001**, *20* (17), 2122–2133 ; b) Peter, M. E.; Krammer, P. H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10* (5), 545–551.

³⁸ a) Hsu, H.; Xiong, J.; Goeddel, D. V. The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-Kappa B Activation. *Cell* **1995**, *81* (4), 495–504 ; b) Kelliher, M. A.; Grimm, S.; Ishida, Y.; Kuo, F.; Stanger, B. Z.; Leder, P. The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF-KappaB Signal. *Immunity* **1998**, *8* (3), 297–303 ; c) Wajant, H. The Fas Signaling Pathway: More than a Paradigm. *Science* **2002**, *296* (5573), 1635–1636.

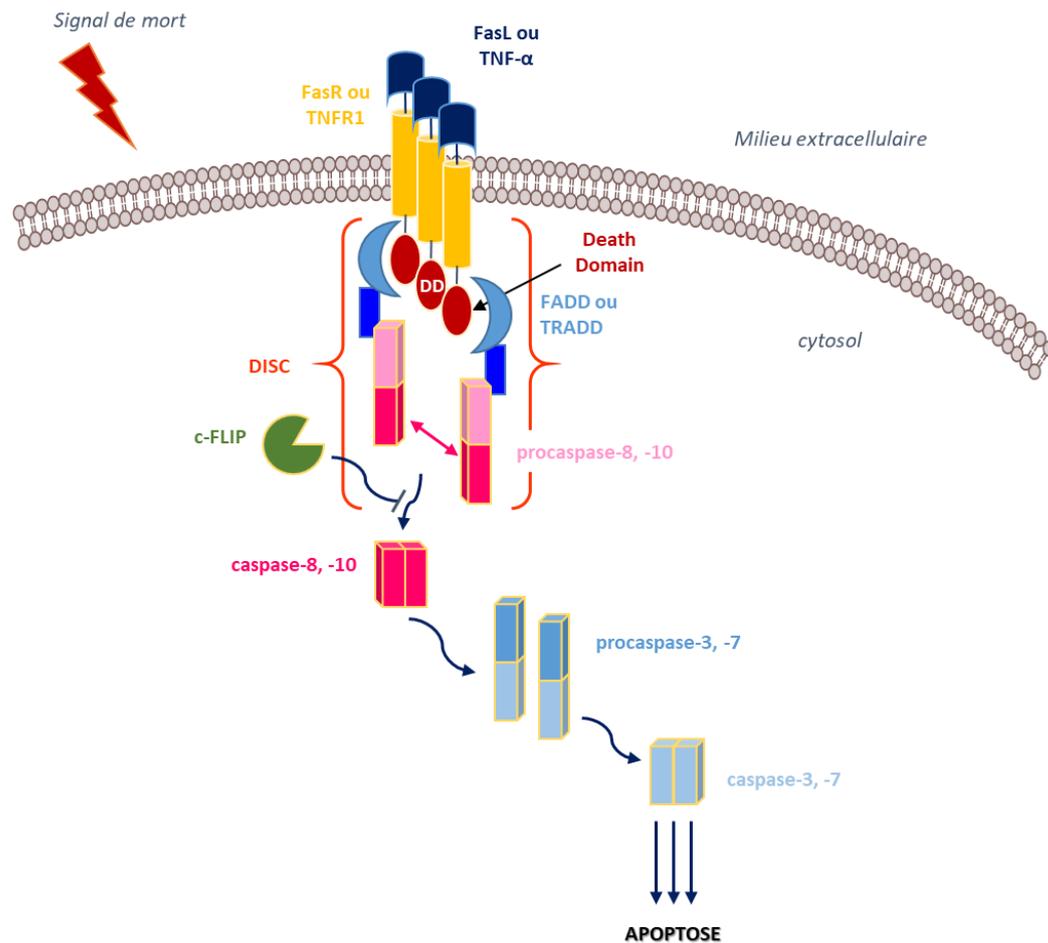


Figure 4. Voie extrinsèque de l'apoptose.

Ces protéines adaptatrices se lient à leur tour à la procaspase-8 par dimérisation du domaine effecteur de mort, pour former le complexe de signalisation inducteur de mort (DISC, *Death Inducing Signaling Complex*).³⁹ La formation de ce complexe de signalisation entraîne l'auto-activation de la caspase-8 et induit l'apoptose par déclenchement d'une cascade protéolytique passant par l'activation de caspases effectrices, telles que les caspases-3 et -7 (Figure 4).⁴⁰

³⁹ Ghobrial, I. M.; Witzig, T. E.; Adjei, A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J. Clin.* **2005**, *55* (3), 178–194.

⁴⁰ Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F. Death Receptors as Targets in Cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169* (8), 1723–1744.

2. 1. 2. La voie intrinsèque

Cette voie est déclenchée par des facteurs de stress intracellulaires, tels que l'endommagement de l'ADN ou du cytosquelette, la perte d'adhésion cellulaire, ainsi que par des facteurs extracellulaires, tels que des radiations, des toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres.^{31b} Elle met en jeu soit la mitochondrie, soit le réticulum endoplasmique (RE) dont le stress a également été identifié comme étant capable de déclencher l'apoptose.⁴¹ Les mitochondries jouent un rôle central dans l'activation de l'apoptose. En effet, une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, la formation et l'ouverture des pores mitochondriaux (MPT *pores*, *Mitochondrial Permeability Transition pores*), ainsi que la translocation des protéines apoptogéniques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme, ont été mises en évidence dans la plupart des cellules en apoptose. En réponse aux facteurs de stress, la membrane mitochondriale se dépolarise et la perméabilisation de la membrane externe (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) se traduit par le relargage, dans le cytosol, des facteurs apoptogéniques tels que le cytochrome *c* ou encore la protéine Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point*).⁴²

Ainsi, d'une part, le relargage du cytochrome *c* dans le cytosol fournit le signal pour l'assemblage de l'apoptosome, un complexe à plusieurs sous-unités protéiques. Le cytochrome *c* se lie aux protéines adaptatrices, telles que Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), pour former l'apoptosome. En réponse aux stimuli apoptotiques, la caspase-9 initiateur est activée dans l'apoptosome.

Ceci passe par le clivage protéolytique d'un résidu aspartate interne spécifique,⁴³ ce qui permet ensuite la dimérisation et l'activation des caspases effectrices (caspases-3 et -7) induisant ainsi la mort cellulaire (Figure 5).⁴⁴

⁴¹ Kim, 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.

⁴² Saelens, X.; Festjens, N.; Vande Walle, L.; van Gurp, M.; van Loo, G.; Vandennebeele, P. Toxic Proteins Released from Mitochondria in Cell Death. *Oncogene* **2004**, *23* (16), 2861–2874.

⁴³ a) Riedl, S. J.; Shi, Y. Molecular Mechanisms of Caspase Regulation during Apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (11), 897–907 ; b) Logue, S. E.; Martin, S. J. Caspase Activation Cascades in Apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36* (1), 1–9.

D'autre part, la libération des protéines Smac/DIABLO et HTRA2 (*High Temperature Requirement protein A2*) enclenche également l'apoptose. Ces facteurs apoptogéniques sont capables d'induire la mort cellulaire en levant l'inhibition des caspases par les protéines IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)⁴⁵ et c-FLIP (*FADD-Like Inhibitory Protein*).⁴⁶ La protéine c-FLIP est une protéine capable d'inhiber la voie des récepteurs de mort en se liant à FADD et aux caspases-8 et -10 dans le complexe DISC, rendant celui-ci inefficace (Figure 4 et 5).⁴⁷ L'inhibition de c-FLIP par les facteurs apoptogéniques libérés dans la voie mitochondriale représente un exemple de communication entre les deux voies de signalisation de l'apoptose (Figure 5). De plus, les caspases-8 et -10 actives sont connues pour cliver un membre pro-apoptotique de la famille de protéines Bcl-2, Bid, qui dans sa forme tronquée (tBid) induit la libération des facteurs apoptogéniques dans le cytosol (Figure 5), liant ainsi les deux voies.⁴⁸

⁴⁴ a) Cain, K.; Bratton, S. B.; Cohen, G. M. The Apaf-1 Apoptosome: A Large Caspase-Activating Complex. *Biochimie* **2002**, *84* (2), 203–214 ; b) Bratton, S. B.; Walker, G.; Srinivasula, S. M.; Sun, X. M.; Butterworth, M.; Alnemri, E. S.; Cohen, G. M. Recruitment, Activation and Retention of Caspases-9 and -3 by Apaf-1 Apoptosome and Associated XIAP Complexes. *EMBO J.* **2001**, *20* (5), 998–1009.

⁴⁵ a) Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* **2000**, *102* (1), 33–42 ; b) Ekert, P. G.; Silke, J.; Hawkins, C. J.; Verhagen, A. M.; Vaux, D. L. Diablo Promotes Apoptosis by Removing Miha/Xiap from Processed Caspase 9. *J. Cell Biol.* **2001**, *152* (3), 483–490.

⁴⁶ a) Kataoka, T.; Schröter, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Irmler, M.; Thome, M.; Froelich, C. J.; Tschopp, J. FLIP Prevents Apoptosis Induced by Death Receptors But Not by Perforin/Granzyme B, Chemotherapeutic Drugs, and Gamma Irradiation. *J. Immunol.* **1998**, *161* (8), 3936–3942 ; b) Scaffidi, C.; Schmitz, I.; Krammer, P. H.; Peter, M. E. The Role of C-FLIP in Modulation of CD95-Induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (3), 1541–1548.

⁴⁷ a) Bagnoli, M.; Canevari, S.; Mezzanzanica, D. Cellular FLICE-Inhibitory Protein (c-FLIP) Signalling: A Key Regulator of Receptor-Mediated Apoptosis in Physiologic Context and in Cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42* (2), 210–213 ; b) Safa, A.; Day, T.; Wu, C.-H. Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein (C-FLIP): A Novel Target for Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8* (1), 37–46.

⁴⁸ Safa, A. R. C-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp. Oncol.* **2012**, *34* (3), 176–184.

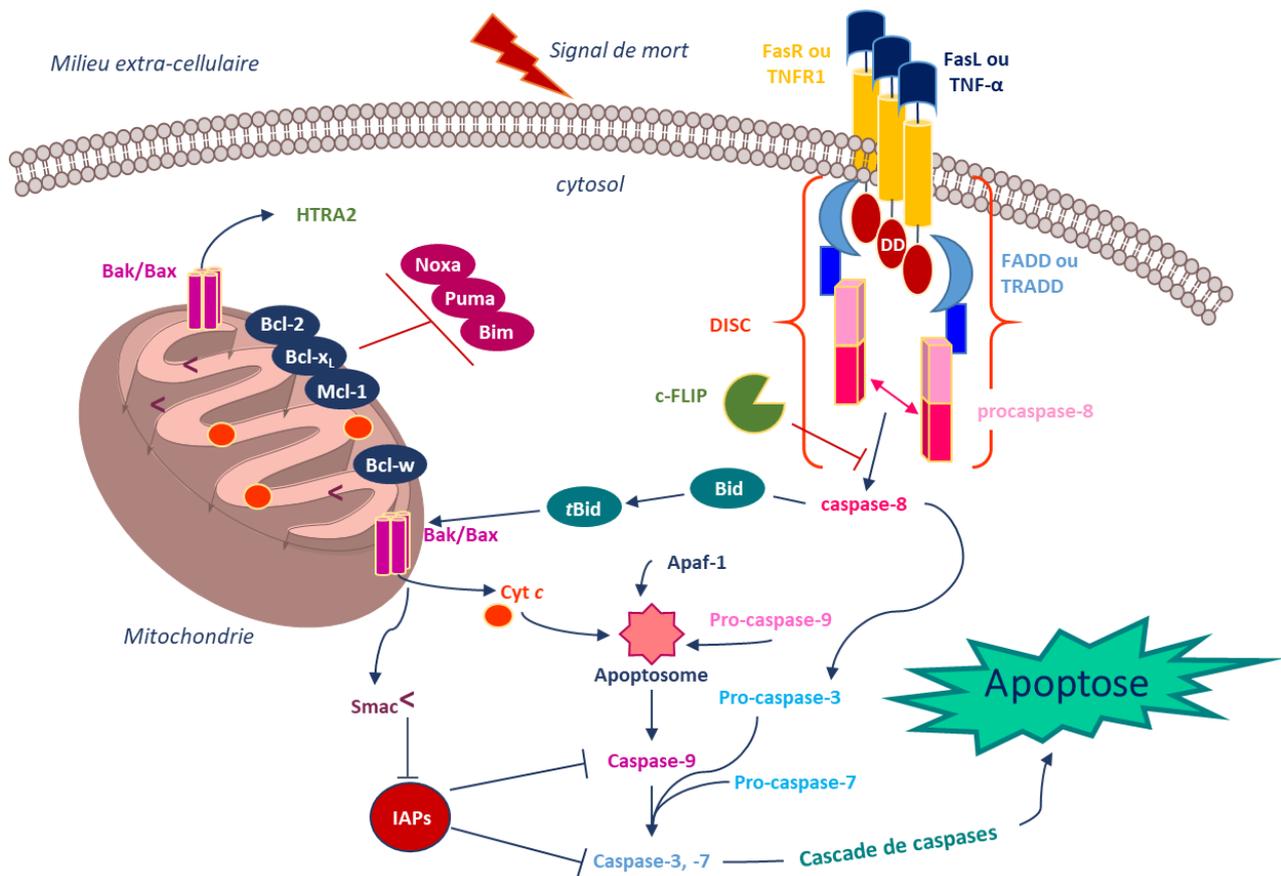


Figure 5. Voies de signalisation de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque).

2. 2. Les protéines régulatrices de l'apoptose : protéines de la famille Bcl-2

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), qui permet le relargage dans le cytosol des facteurs apoptogéniques responsables de l'activation des caspases effectrices et de l'apoptose, est régulée par une famille de protéines appelée famille B cell CLL/lymphoma-2 (Bcl-2). Cette famille de protéines est constituée de membres

anti-apoptotiques et de membres pro-apoptotiques. L'équilibre entre les membres de cette famille joue un rôle crucial dans la régulation de la vie et la mort des cellules. Le premier membre de la famille Bcl-2, la protéine Bcl-2 elle-même, a été décrit pour la première fois en 1986, identifié dans les cellules de patients atteints de lymphome

folliculaire à cellules B.⁴⁹ Cela a rapidement conduit à l'identification d'une famille de protéines apparentées définies par quatre motifs de séquences uniques, appelées domaines Bcl-2 *homology* (BH) et numérotés de BH1 à BH4 suivant leur ordre de découverte.⁵⁰

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être subdivisées en trois catégories basées sur leur fonction : anti-apoptotique, pro-apoptotique liée aux effecteurs, et pro-apoptotique liée aux membres BH3-only (Figure 6).

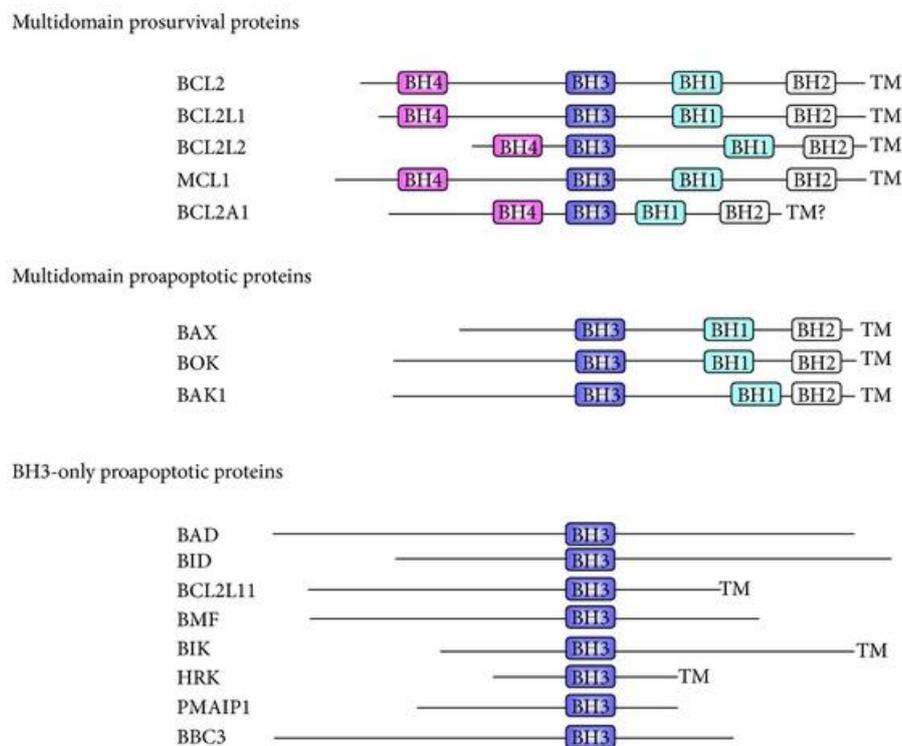


Figure 6. Protéines de la famille Bcl-2.⁵¹

Les membres anti-apoptotiques comprennent entre autres Bcl-2, Bcl-x_L (*BCL-2-related gene long isoform*), Bcl-w et Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*). Ces protéines contiennent les 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4) et le domaine transmembranaire (TM) nécessaire à

⁴⁹ Tsujimoto, Y.; Finger, L. R.; Yunis, J.; Nowell, P. C.; Croce, C. M. Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation. *Science* **1984**, 226 (4678), 1097–1099.

⁵⁰ a) Chipuk, J. E.; Moldoveanu, T.; Llambi, F.; Parsons, M. J.; Green, D. R. The Bcl-2 Family Reunion. *Mol. Cell* **2010**, 37 (3), 299–310 ; b) Aouacheria, A.; Rech de Laval, V.; Combet, C.; Hardwick, J. M. Evolution of Bcl-2 Homology Motifs: Homology *versus* Homoplasy. *Trends Cell Biol.* **2013**, 23 (3), 103–111.

⁵¹ Olsson Åkefeldt, S.; Ismail, M. B.; Valentin, H.; Aricò, M.; Henter, J. I.; Delprat, C. Targeting BCL2 Family in Human Myeloid Dendritic Cells: A Challenge to Cure Diseases with Chronic Inflammations Associated with Bone Loss. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 2013, ID 701305.

leur localisation au niveau de la membrane mitochondriale. Elles préservent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe en inhibant directement les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les membres pro-apoptotiques sont subdivisés en **effecteurs** et protéines **BH3-only**. Les membres effecteurs tels que Bak (*BCL-2 antagonist killer 1*), Bax (*BCL-2-associated X-protein*) et Bok (*BCL-2-related ovarian killer*) contiennent 3 domaines BH (BH1-BH3) et le domaine TM.⁵¹ Lors de l'activation de l'apoptose, Bak et Bax s'homo-oligomérisent, forment des pores protéolipidiques dans la membrane mitochondriale externe (Figure 7), entraînent sa perméabilisation (MOMP) et la libération des facteurs apoptogéniques.

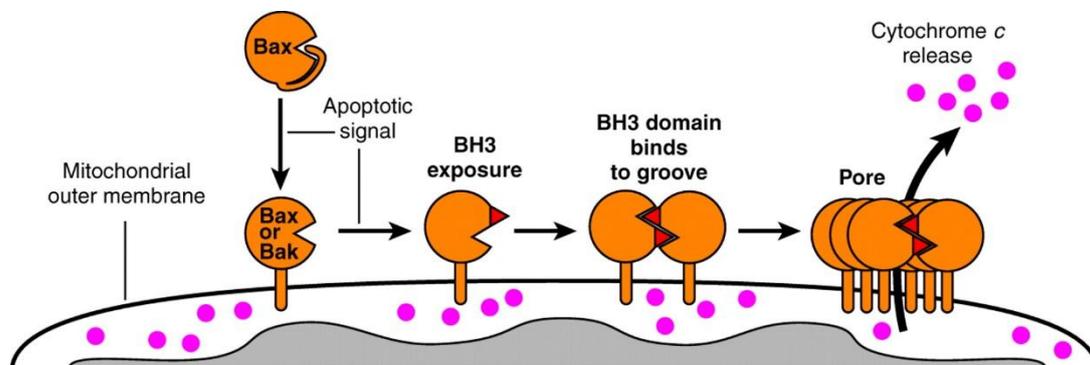


Figure 7. Formation des pores mitochondriaux par homo-oligomérisation de Bax et Bak dans la membrane mitochondriale.⁵²

Les protéines BH3-only telles que Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Noxa et Puma contiennent uniquement le domaine BH3 et le domaine TM. Parmi les protéines BH3-only, sont différenciées celles qui sont capables d'interagir uniquement avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, et celles qui interagissent à la fois avec les membres anti-apoptotiques et les effecteurs. Les protéines BH3-only interagissant uniquement avec les membres anti-apoptotiques sont nommées « sensibilisateurs » : il s'agit des protéines Bad (*BCL-2 antagonist of cell death*) et Noxa. Les protéines Bid (*BCL-2-interacting domain death agonist*), Bim (*BCL-2-interacting mediator of cell death*) et Puma sont quant à elles capables d'agir comme « activateur direct » des membres effecteurs, permettant leur l'homo-oligomérisation et la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.⁵⁰

⁵² Zhang, M.; Zheng, J.; Nussinov, R.; Ma, B. Release of Cytochrome C from Bax Pores at the Mitochondrial Membrane. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2635.

2. 2. 1. Les modes d'inhibition de l'apoptose

Les effecteurs de l'apoptose se trouvent initialement sous forme de monomères inactifs. La protéine Bax est dans le cytosol et la protéine Bak est intégrée dans la membrane mitochondriale. Lorsqu'elles sont activées, Bax s'insère dans la membrane mitochondriale, s'homo-oligomérisise avec Bak et entraînent la formation de pores membranaires. L'activation de Bak et Bax se fait grâce aux protéines BH3-only qui sont exprimées ou activées en réponse à des stimuli apoptotiques. Le mécanisme avec lequel la famille Bcl-2 régule l'apoptose a longtemps été sujet de débats, à ce jour un modèle unifié a été décrit⁵³ et il prévoit deux modes d'inhibition de l'apoptose mis en place par les protéines anti-apoptotiques : en séquestrant les activateurs directs des effecteurs (MODE 1) ou les effecteurs eux-mêmes (MODE 2) (Figure 8).

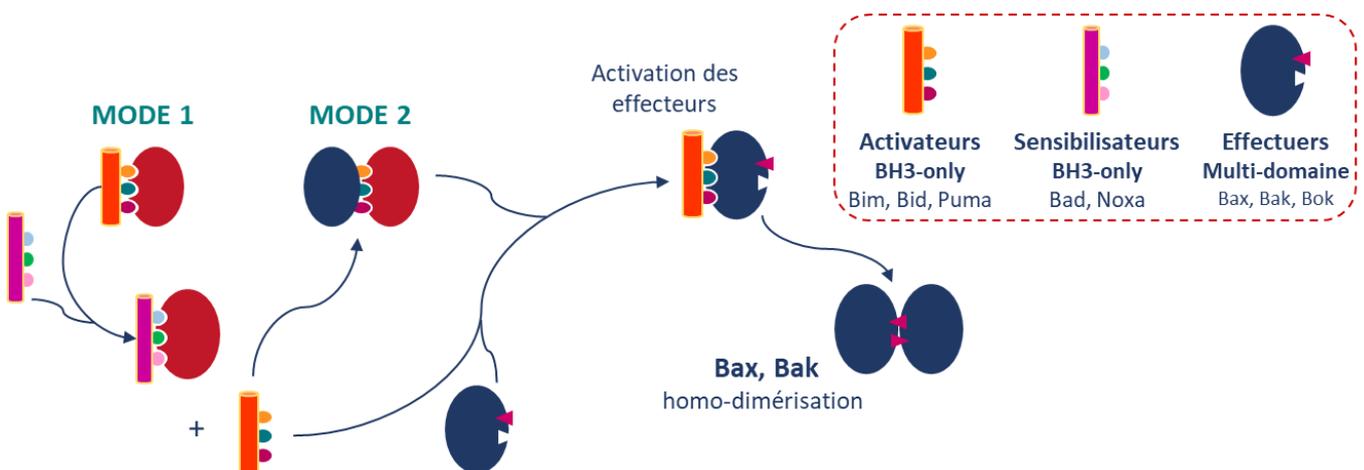


Figure 8. Modes d'inhibition de l'apoptose par les membres anti-apoptotiques.

Dans le **MODE 1**, l'activateur BH3-only interagit directement avec les effecteurs pour les activer. Si l'activateur BH3-only est séquestré dans l'interaction avec une protéine anti-apoptotique, une surexpression des sensibilisateurs peut entraîner son déplacement et donc favoriser l'activation directe de Bak et Bax par les BH3-only activateurs.

Dans le **MODE 2**, les protéines Bak et Bax sont séquestrées par des protéines anti-apoptotiques et cette interaction inhibe leur oligomérisation. Les protéines BH3-only déplacent les protéines anti-apoptotiques pour interagir directement avec les effecteurs et les activer. D'un côté, les sensibilisateurs se fixent aux protéines anti-apoptotiques en

⁵³ Llambi, F.; Moldoveanu, T.; Tait, S. W. G.; Bouchier-Hayes, L.; Temirov, J.; McCormick, L. L.; Dillon, C. P.; Green, D. R. A Unified Model of Mammalian Bcl-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Molecular Cell* **2011**, *44* (4), 517–531.

permettant le déplacement de Bak et Bax ; de l'autre, les protéines anti-apoptotiques libérées peuvent se fixer aux activateurs BH3-only (MODE 1) en empêchant l'activation de Bak et Bax. Les sensibilisateurs sont alors surexprimés pour libérer les activateurs et promouvoir l'activation des effecteurs et la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

La famille Bcl-2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose et cette régulation se fait exclusivement par l'interaction entre les membres de cette famille. La formation d'homodimères d'effecteurs favorise l'apoptose, tandis que la formation d'hétérodimères entre les membres anti- et pro-apoptotiques favorise la survie cellulaire.

2. 2. 2. L'aspect structural des protéines apoptotiques

Tous les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent quatre domaines d'homologie (BH1 à BH4) et présentent une conformation hélicoïdale globulaire composée de 9 hélices α dont 8 (α 1-8) forment le « noyau Bcl-2 ». ^{54, 50a}

Ces hélices sont majoritairement de nature amphiphile, à l'exception de deux hélices hydrophobes (α 5 et α 9). L'hélice α 9 est séparée du noyau globulaire, et ancrée dans la membrane externe de la mitochondrie. En revanche, autour de l'hélice α 5, se disposent les hélices du noyau Bcl-2. Elle constitue donc la base du corps globulaire, protégée du milieu aqueux par les hélices amphipathiques qui l'entourent.

Dans les membres anti-apoptotiques, le domaine BH1 relie les hélices α 4 et α 5, le domaine BH2 relie les hélices α 7 et α 8, le domaine BH3 se trouve au sein de l'hélice α 2 et le domaine BH4 se trouve au sein de l'hélice α 1. Les domaines BH1 et BH2 d'un côté, et le domaine BH3 et l'hélice α 3 de l'autre, délimitent une cavité hydrophobe (Figure 9A). Contrairement aux autres domaines, le domaine BH4, situé dans la partie N-terminale de la protéine, ne participe pas à la formation de la cavité hydrophobe.

⁵⁴ Birkinshaw, R. W.; Czabotar, P. E. The Bcl-2 Family of Proteins and Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, 72, 152–162.

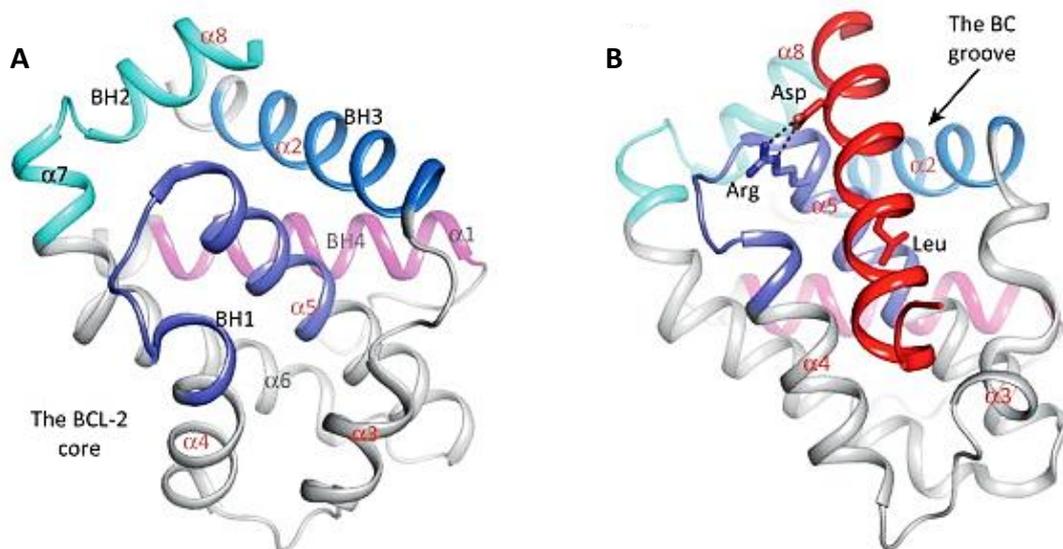


Figure 9. Noyau Bcl-2 de Bcl-x_L.

A) Structure du noyau Bcl-2 de Bcl-x_L avec les hélices α et les domaines BH identifiés ; B) Interactions entre le domaine BH3 de Bad (rouge) et la cavité de liaison de Bcl-x_L, avec mise en évidence de la liaison entre le résidu Asp¹⁵⁶ de Bad (rouge) et le résidu Arg¹³⁹ de Bcl-x_L.⁵⁵

Cette cavité hydrophobe, caractéristique également des membres effecteurs, fournit un site sur la protéine dans lequel une hélice amphipathique C-terminale peut se lier : il s'agit principalement des domaines BH3 provenant d'autres protéines de la famille Bcl-2. Cette capacité à se lier à des hélices « entrantes » constitue la principale fonctionnalité de la cavité hydrophobe des protéines multi-domaines de la famille Bcl-2. À l'intérieur des cavités sur les différentes protéines, des poches hydrophobes fournissent des points d'interaction pour des résidus hydrophobes sur le domaine BH3 entrant. On distingue quatre poches fixes (p1-4),⁵⁶ une poche p5 (sur certaines des protéines anti-apoptotiques)⁵⁷ et une poche p0 sur Bax.⁵⁸ De plus, une arginine (Arg) présente dans l'hélice $\alpha 5$ (dans le domaine BH1) permet une interaction supplémentaire avec les BH3 « entrants » grâce à la formation d'un pont salin avec un aspartate (Asp), présent dans tous les domaines BH3 (Figure 9B).⁵⁶

⁵⁵ Monaco, G.; Decrock, E.; Nuyts, K.; Wagner, L. E.; Luyten, T.; Strelkov, S. V.; Missiaen, L.; De Borggraeve, W. M.; Leybaert, L.; Yule, D. I.; *et al.* Alpha-Helical Destabilization of the Bcl-2-BH4-Domain Peptide Abolishes Its Ability to Inhibit the IP3 Receptor. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e73386.

⁵⁶ Sattler, 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.; *et al.* Structure of Bcl-XL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* **1997**, *275* (5302), 983–986.

⁵⁷ Liu, X.; Dai, S.; Zhu, Y.; Marrack, P.; Kappler, J. W. The Structure of a Bcl-XL/Bim Fragment Complex: Implications for Bim Function. *Immunity* **2003**, *19* (3), 341–352.

⁵⁸ Robin, A. Y.; Kumar, K. K.; Westphal, D.; Wardak, A. Z.; Thompson, G. V.; Dewson, G.; Colman, P. M.; Czabotar, P. E. Crystal Structure of Bax Bound to the BH3 Peptide of Bim Identifies Important Contacts for Interaction. *Cell Death Dis.* **2015**, *6* (7), e1809.

Les protéines BH3-only sont typiquement constituées d'une seule hélice amphipatique ($\alpha 2$, du domaine BH3), à l'exception de Bid qui possède un noyau Bcl-2 complet (hélices $\alpha 1-8$) dans son état natif, bien qu'il soit clivé (Figure 10) au cours de l'apoptose pour pouvoir interagir avec les autres membres de la famille Bcl-2.⁵⁹

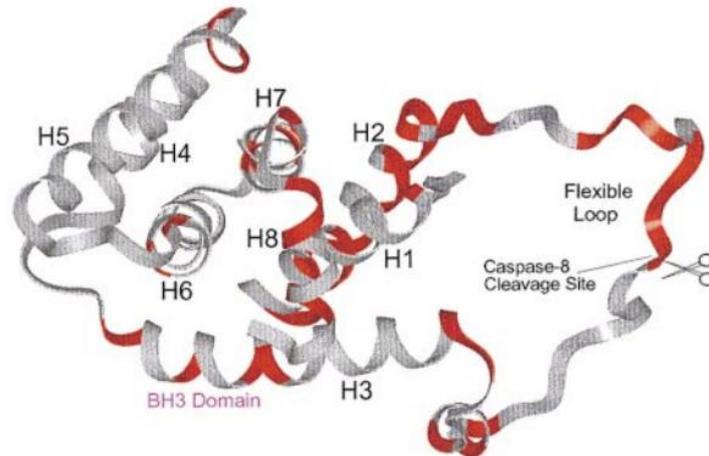


Figure 10. Représentation en ruban de la protéine Bid mettant en évidence le site de clivage de la caspase-8.⁶⁰

L'interaction entre les membres de la famille Bcl-2 se fait *via* la cavité hydrophobe des protéines multi-domaines (anti-apoptotiques et effectrices) et le domaine BH3 commun à tous les membres de cette famille. Ceci permet plusieurs combinaisons possibles :

- hétérodimères anti-apoptotiques / pro-apoptotiques à multi-domaines (effecteurs, Bak et Bax)
- hétérodimères anti-apoptotiques / BH3-only
- hétérodimères BH3-only / pro-apoptotiques à multi-domaines
- homodimères anti-apoptotiques / anti-apoptotiques
- homodimères Bax / Bax et Bak / Bak

L'équilibre entre les différents homo- et hétérodimères joue un rôle essentiel dans le sort cellulaire (survie ou mort).⁶¹

⁵⁹ McDonnell, J. M.; Fushman, D.; Milliman, C. L.; Korsmeyer, S. J.; Cowburn, D. Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists. *Cell* **1999**, *96* (5), 625–634.

⁶⁰ Chou, J. J.; Li, H.; Salvesen, G. S.; Yuan, J.; Wagner, G. Solution Structure of BID, an Intracellular Amplifier of Apoptotic Signaling. *Cell* **1999**, *96* (5), 615–624.

⁶¹ Hsu, S. Y.; Kaipia, A.; McGee, E.; Lomeli, M.; Hsueh, A. J. W. Bok Is a Pro-Apoptotic Bcl-2 Protein with Restricted Expression in Reproductive Tissues and Heterodimerizes with Selective Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94* (23), 12401–12406.

2. 2. 2. 1. La structure du domaine BH3

Le domaine BH3 est constitué d'une hélice amphipatique α_2 . Sur l'une des faces de cette hélice, sont projetés quatre résidus hydrophobes (h1-h4) appartenant aux chaînes latérales des acides aminés situés en position i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ (Figure 11).

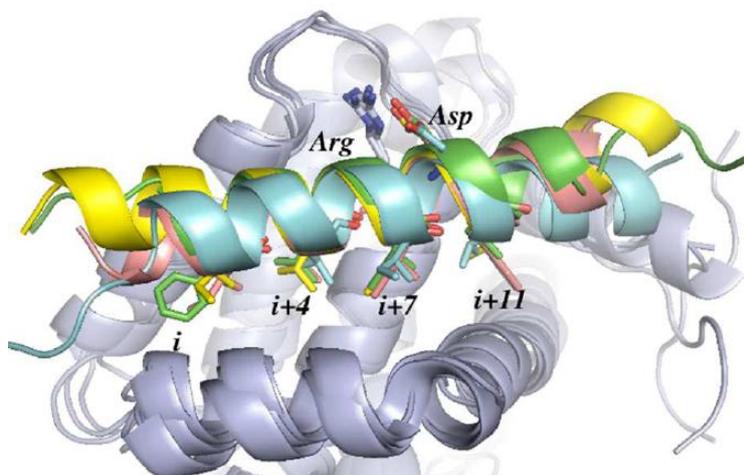


Figure 11. Aligment des structures 3D de plusieurs complexes de Mcl-1.

Mcl-1 (en gris) avec les BH3-only PUMA (jaune), BIM (rose), NOXA (A : vert) et NOXA (B : cyan).

Ces résidus sont responsables des interactions avec les poches hydrophobes (p1-p4) des protéines multi-domaines, avec lesquelles s'établissent des interactions électrostatiques.⁶² Les domaines BH3 présentent des résidus leucine et acide aspartique conservés.⁶³ Le résidu leucine (Leu) occupe la position $i+4$ de l'hélice α et l'acide aspartique (Asp) occupe la position $i+9$. Les positions sur l'hélice α_2 occupées par ces résidus sont les mêmes dans les domaines BH3 de Bad (Leu¹⁵¹/Asp¹⁵⁶), de Bak (Leu⁷⁸/Asp⁸³), de Bim (Leu⁹⁴/Asp⁹⁹) et de Bid (Leu¹⁴/Asp¹⁹).⁶³ En particulier, le résidu acide aspartique se lie, par une interaction de type ionique, avec un résidu arginine situé au niveau du domaine BH1 des protéines anti-apoptotiques (Arg¹³⁹ dans Bcl-x_L ; Arg²⁶³ dans Mcl-1).⁶³

De petites variations dans la séquence du domaine BH3 du ligand ou de la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques conditionnent la sélectivité et l'affinité

⁶² Lee, E. F.; Dewson, G.; Evangelista, M.; Pettikiriachchi, 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.

⁶³ Auouacheria, A.; Cibiel, A.; Guillemin, Y.; Gillet, G.; Lalle, P. Modulating Mitochondria-Mediated Apoptotic Cell Death through Targeting of Bcl-2 Family Proteins. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **2007**, *1* (1), 43–61.

d'interaction entre les différents partenaires.⁶⁴ Certaines séquences du domaine BH3 permettent une interaction avec tous les membres anti-apoptotiques (ex : Bim) tandis que d'autres induisent une sélectivité d'interaction, comme par exemple dans les couples Noxa/Mcl-1 et Bad/Bcl-x_L (Figure 12).⁶⁵

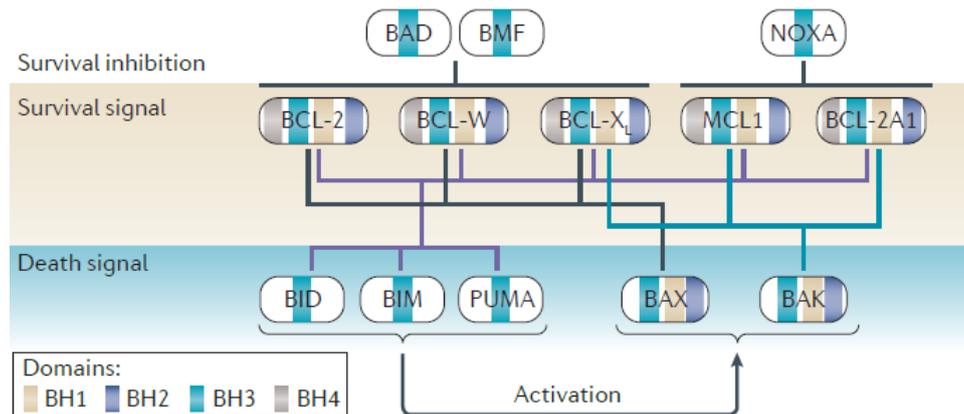


Figure 12. Interactions validées entre les membres de la famille Bcl-2 (représentées par des lignes de connexion). Les domaines BH présents dans chaque membre de la famille sont également indiqués.⁶⁶

2. 2. 2. 2. La structure de la cavité hydrophobe des protéines anti-apoptotiques

Parmi les membres anti-apoptotiques, les protéines Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w présentent une structure proche. Elles sont composées de quatre domaines d'homologie avec Bcl-2 (BH1-4) et présentent environ 24 % de séquences identiques et de 35 % à 46 % de similitudes.⁶⁷ Les protéines Mcl-1 et Bcl-2 possèdent une séquence C-terminale identique.⁶⁸ La cavité hydrophobe de la protéine Bcl-x_L présente une conformation fermée : stabilisée grâce à une liaison hydrogène entre les hélices α_3 et α_4 . Cette liaison entre une glutamine (Gln¹¹¹), dans l'hélice α_3 , et un acide glutamique (Glu¹²⁹), dans l'hélice α_4 , n'est pas possible dans la protéine Mcl-1, où les résidus correspondant sont

⁶⁴ Petros, 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.

⁶⁵ Dutta, 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.

⁶⁶ Juin, P.; Geneste, O.; Gautier, F.; Depil, S.; Campone, M. Decoding and Unlocking the Bcl-2 Dependency of Cancer Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (7), 455–465.

⁶⁷ Day, 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.

⁶⁸ Kozopas, K. M.; Yang, T.; Buchan, H. L.; Zhou, P.; Craig, R. W. Mcl-1, a Gene Expressed in Programmed Myeloid Cell Differentiation, Has Sequence Similarity to BCL2. *PNAS* **1993**, *90* (8), 3516–3520.

respectivement une lysine (Lys²¹⁵) et une histidine (His²³³). Ceci confère à la protéine Mcl-1 une conformation ouverte et disponible à l'interaction avec son ligand. De plus, ces résidus rendent la cavité hydrophobe d'interaction de la protéine Mcl-1 plus électropositive que celle des autres protéines de la même famille, elle se lie donc de préférence à des ligands plus électronégatifs.⁶⁷ Comme Mcl-1, la protéine Bcl-w présente aussi les hélices α 3 et α 4 dans une conformation ouverte, mais ici les résidus C-terminaux occupent la cavité de liaison en modifiant sa conformation.⁶⁹ Ces différences de conformation entre la protéine Mcl-1 et les autres protéines de cette famille sont cruciales, et expliquent très probablement la sélectivité de liaison des différents ligands pour Mcl-1.

La comparaison entre la structure de la protéine Bcl-x_L et celle de la protéine Bcl-2 a mis en évidence des différences qui impactent fortement l'affinité des ligands. Dans la protéine Bcl-x_L, une tyrosine (Tyr¹²⁷) de l'hélice α 4 établit des interactions hydrophobes avec une thréonine (Thr¹⁷⁹) et une tyrosine (Tyr¹⁸⁰) de l'hélice α 6. Ceci rapproche l'extrémité N-terminale de l'hélice α 4 vers l'hélice α 6 en stabilisant la conformation fermée de la cavité de la protéine Bcl-x_L. Dans la protéine Bcl-2, ces résidus des hélices α 4 et α 6 sont remplacés par l'arginine Arg¹²⁷ et l'acide glutamique Glu¹⁷⁹ respectivement, ce qui empêche toute liaison entre ces hélices.

En plus des différences structurales, il a été observé, dans la séquence du site d'interaction des protéines Bcl-2 et Bcl-x_L, une substitution de l'aspartate Asp¹¹¹ et de l'arginine Arg¹²⁹ de Bcl-2 en alanine Ala¹¹¹ et sérine Ser¹²⁹ dans Bcl-x_L. Ces substitutions influencent la charge de la protéine. Les résidus acides (Asp¹¹⁴ et Glu¹³⁵) rendent le bas de la cavité de liaison de Bcl-x_L plus électronégatif, tandis que dans Bcl-2, cette charge négative est compensée par l'arginine Arg¹²⁹ (Ser¹²⁹ dans Bcl-x_L). Cette différence de potentiel du site d'interaction explique l'affinité plus élevée de la protéine Bcl-x_L pour les peptides Bad et Bak, qui interagissent avec la protéine grâce à leur région N-terminale électropositive.⁷⁰

⁶⁹ Hinds, M. G.; Lackmann, M.; Skea, G. L.; Harrison, P. J.; Huang, D. C. S.; Day, C. L. The Structure of Bcl-w Reveals a Role for the C-terminal Residues in Modulating Biological Activity. *EMBO J.* **2003**, 22 (7), 1497–1507.

⁷⁰ Willis, S. N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J. I.; Adams, J. M.; Huang, D. C. S. Proapoptotic Bak Is Sequestered by Mcl-1 and Bcl-XL, but Not Bcl-2, until Displaced by BH3-Only Proteins. *Genes Dev.* **2005**, 19 (11), 1294–1305.

2. 2. 3. La famille Bcl-2 et le cancer

Il a été démontré que l'échappement à l'apoptose est un point clé dans l'oncogenèse.⁷¹ Il existe une variété de mécanismes moléculaires que les cellules cancéreuses utilisent pour échapper à l'apoptose. Plusieurs types de cellules cancéreuses acquièrent une résistance à l'apoptose en surexprimant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ou en supprimant l'expression des protéines pro-apoptotiques, telles que Bax.⁷² Une altération de l'équilibre entre les activités pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est fréquemment retrouvée dans les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses peuvent résister aux stimuli de mort, physiologiques ou induits par la thérapie anti-tumorale, à cause d'une surexpression des protéines anti-apoptotiques. La survie de ces cellules devient donc dépendante de ces protéines.

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 représentent donc une vulnérabilité moléculaire, car l'inhibition de leur expression ou de leur activité de survie peut permettre la libération des protéines pro-apoptotiques qu'elles séquestrent et l'élimination des cellules cancéreuses.⁶⁶

Par ailleurs, la suppression de l'apoptose joue un rôle central dans le développement, la progression⁷³ et la résistance aux médicaments⁷⁴ de certains cancers. Ainsi les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L sont surexprimées dans plus du 50 % des cancers.⁷⁵ Des concentrations élevées de ces protéines ont été mesurées dans certains lymphomes et cancers épithéliaux, généralement de type agressif, chimiorésistants et de mauvais pronostic.⁷⁶ Il a également été démontré que l'inhibition des protéines Bak et Bax et/ou la suppression des peptides BH3-only tels que Noxa, Puma et Bim, suite à des mutations ou

⁷¹ Green, D. R.; Evan, G. I. A Matter of Life and Death. *Cancer Cell* **2002**, *1* (1), 19–30.

⁷² Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–23.

⁷³ Kerr, J. F.; Searle, J. A Mode of Cell Loss in Malignant Neoplasms. *J. Pathol.* **1972**, *106* (1), Pxi.

⁷⁴ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70.

⁷⁵ Amundson, S. A.; Myers, T. G.; Scudiero, D.; Kitada, S.; Reed, J. C.; Fornace, A. J. An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **2000**, *60* (21), 6101–6110.

⁷⁶ Letai, A. G. Diagnosing and Exploiting Cancer's Addiction to Blocks in Apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (2), 121–132.

altérations épigénétiques, constituent des facteurs responsables de la résistance au traitement dans plusieurs types de cancers.⁷⁷

Par ailleurs, une amplification des gènes codant pour les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 apparaît très fréquemment parmi les altérations somatiques retrouvées dans différents types de cellules tumorales, ce qui suggère une importance cruciale de ces protéines pour la survie des cellules cancéreuses.⁷⁸ La protéine Bcl-x_L est fortement exprimée dans plusieurs cancers hématologiques tels que les myélomes, et dans plusieurs cancers solides tels que les glioblastomes⁷⁹ et certains cancers de la prostate.⁸⁰ La surexpression de la protéine Mcl-1 a été observée dans plusieurs cancers solides tels que le cancer du sein,⁸¹ de la prostate,⁸² des poumons⁸³ et de l'ovaire,⁸⁴ ainsi que dans les cancers hématologiques tels que les myélomes⁸⁵ et diverses leucémies.⁸⁶

Dans les cancers de l'ovaire, les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 sont surexprimées et sont associées à une chimiorésistance et à un mauvais pronostic.^{87, 84} Ainsi, Mcl-1 est particulièrement surexprimée dans les tissus cancéreux ; sa surexpression est retrouvée dans 85 % des lymphomes de type B et le stade d'avancement de la maladie est corrélé à

⁷⁷ Lindsten, T.; Ross, A. J.; King, A.; Zong, W. X.; Rathmell, J. C.; Shiels, H. A.; Ulrich, E.; Waymire, K. G.; Mahar, P.; Frauwirth, K.; *et al.* The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Mol. Cell* **2000**, *6* (6), 1389–1399.

⁷⁸ Beroukhi, R.; Mermel, C. H.; Porter, D.; Wei, G.; Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J. S.; Dobson, J.; Urashima, M.; *et al.* The Landscape of Somatic Copy-Number Alteration across Human Cancers. *Nature* **2010**, *463* (7283), 899–905.

⁷⁹ Nagane, M.; Levitzki, A.; Gazit, A.; Cavenee, W. K.; Huang, H.-J. S. Drug Resistance of Human Glioblastoma Cells Conferred by a Tumor-Specific Mutant Epidermal Growth Factor Receptor through Modulation of Bcl-x_L and Caspase-3-like Proteases. *PNAS* **1998**, *95* (10), 5724–5729.

⁸⁰ Castilla, C.; Congregado, B.; Chinchón, D.; Torrubia, F. J.; Japón, M. A.; Sáez, C. Bcl-x_L Is Overexpressed in Hormone-Resistant Prostate Cancer and Promotes Survival of LNCaP Cells via Interaction with Proapoptotic Bak. *Endocrinology* **2006**, *147* (10), 4960–4967.

⁸¹ Ding, Q.; He, X.; Xia, W.; Hsu, J.-M.; Chen, C.-T.; Li, L.-Y.; Lee, D.-F.; Yang, J.-Y.; Xie, X.; Liu, J.-C.; *et al.* Myeloid Cell Leukemia-1 Inversely Correlates with Glycogen Synthase Kinase-3 β Activity and Associates with Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67* (10), 4564–4571.

⁸² Krajewska, M.; Krajewski, S.; Epstein, J. I.; Shabaik, A.; Sauvageot, J.; Song, K.; Kitada, S.; Reed, J. C. Immunohistochemical Analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 Expression in Prostate Cancers. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148* (5), 1567–1576.

⁸³ Song, L.; Coppola, D.; Livingston, S.; Cress, W. D.; Haura, E. B. Mcl-1 Regulates Survival and Sensitivity to Diverse Apoptotic Stimuli in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4* (3), 267–276.

⁸⁴ Shigemasa, K.; Katoh, O.; Shiroyama, Y.; Mihara, S.; Mukai, K.; Nagai, N.; Ohama, K. Increased Mcl-1 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93* (5), 542–550.

⁸⁵ Derenne, S.; Monia, B.; Dean, N. M.; Taylor, J. K.; Rapp, M.-J.; Harousseau, J.-L.; Bataille, R.; Amiot, M. Antisense Strategy Shows That Mcl-1 Rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) Is an Essential Survival Protein of Human Myeloma Cells. *Blood* **2002**, *100* (1), 194–199.

⁸⁶ Andersen, M. H.; Becker, J. C.; Stratton, P. The Antiapoptotic Member of the Bcl-2 Family Mcl-1 Is a CTL Target in Cancer Patients. *Leukemia* **2005**, *19* (3), 484–485.

⁸⁷ a) Marone, M.; Ferrandina, G.; Macchia, G.; Mozzetti, S.; de Pasqua, A.; Benedetti-Panici, P.; Mancuso, S.; Scambia, G. Bcl-2, Bax, Bcl-x_L and Bcl-x_S Expression in Neoplastic and Normal Endometrium. *Oncology* **2000**, *58* (2), 161–168 b) Liu, J. R.; Fletcher, B.; Page, C.; Hu, C.; Nunez, G.; Baker, V. Bcl-x_L Is Expressed in Ovarian Carcinoma and Modulates Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Gynecol. Oncol.* **1998**, *70* (3), 398–403.

la concentration de la protéine dans les cellules tumorales.⁸⁸ De plus, des concentrations élevées de Mcl-1 sont souvent associées à un mauvais pronostic⁸⁹ dû au développement d'une résistance à plusieurs agents chimio-thérapeutiques, tel que le taxol.⁹⁰

L'inhibition de l'activité anti-apoptotique médiée par les membres de la famille Bcl-2 représente donc, à ce jour, une stratégie pertinente pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. L'inhibition des membres anti-apoptotiques peut se faire à l'aide de petites molécules capables de mimer le domaine BH3 des protéines BH3-only. Ces molécules vont alors agir comme des sensibilisateurs pour libérer les protéines effectrices et les activateurs BH3-only, et favoriser l'apoptose.

Il a été démontré que l'inhibition concomitante de l'activité des protéines anti-apoptotiques Mcl-1/Bcl-x_L conduit à une apoptose massive des cellules cancéreuses ovariennes en absence de cisplatine. En effet, les deux protéines coopèrent pour empêcher l'apoptose, et leur inhibition pourrait être suffisante pour restaurer l'apoptose des cellules du carcinome ovarien chimiorésistantes.⁹¹

Les efforts de notre équipe visent à restaurer l'apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes en inhibant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Une partie de mon projet de thèse vise donc à la découverte d'inhibiteurs BH3-mimétiques à dualité d'action agissant sur les protéines Bcl-x_L et Mcl-1, pour le traitement des cancers de l'ovaire fortement réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle.

⁸⁸ Quinn, B. A.; Dash, R.; Azab, B.; Sarkar, S.; Das, S. K.; Kumar, S.; Oyesanya, R. A.; Dasgupta, S.; Dent, P.; Grant, S.; *et al.* Targeting Mcl-1 for the Therapy of Cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2011**, *20* (10), 1397–1411.

⁸⁹ Goncharenko-Khaider, N.; Matte, I.; Lane, D.; Rancourt, C.; Piché, A. Ovarian Cancer Ascites Increase Mcl-1 Expression in Tumor Cells through ERK1/2-Elk-1 Signaling to Attenuate TRAIL-Induced Apoptosis. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 84.

⁹⁰ Wertz, I. E.; Kusam, S.; Lam, C.; Okamoto, T.; Sandoval, W.; Anderson, D. J.; Helgason, E.; Ernst, J. A.; Eby, M.; Liu, J.; *et al.* Sensitivity to Antitubulin Chemotherapeutics Is Regulated by Mcl-1 and FBW7. *Nature* **2011**, *471* (7336), 110–114.

⁹¹ Brotin, 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* **2009**, *126* (4), 885–895.

2. 3. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs)

Bien que la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, réglée par les protéines de la famille Bcl-2, soit considérée le « point de non-retour » qui assure l'induction de la mort par apoptose, certaines cellules peuvent survivre à cet événement. D'autres facteurs anti-apoptotiques, présents dans le cytosol, tels que les protéines IAPs, peuvent interférer avec l'activation des caspases (Figure 13).⁹²

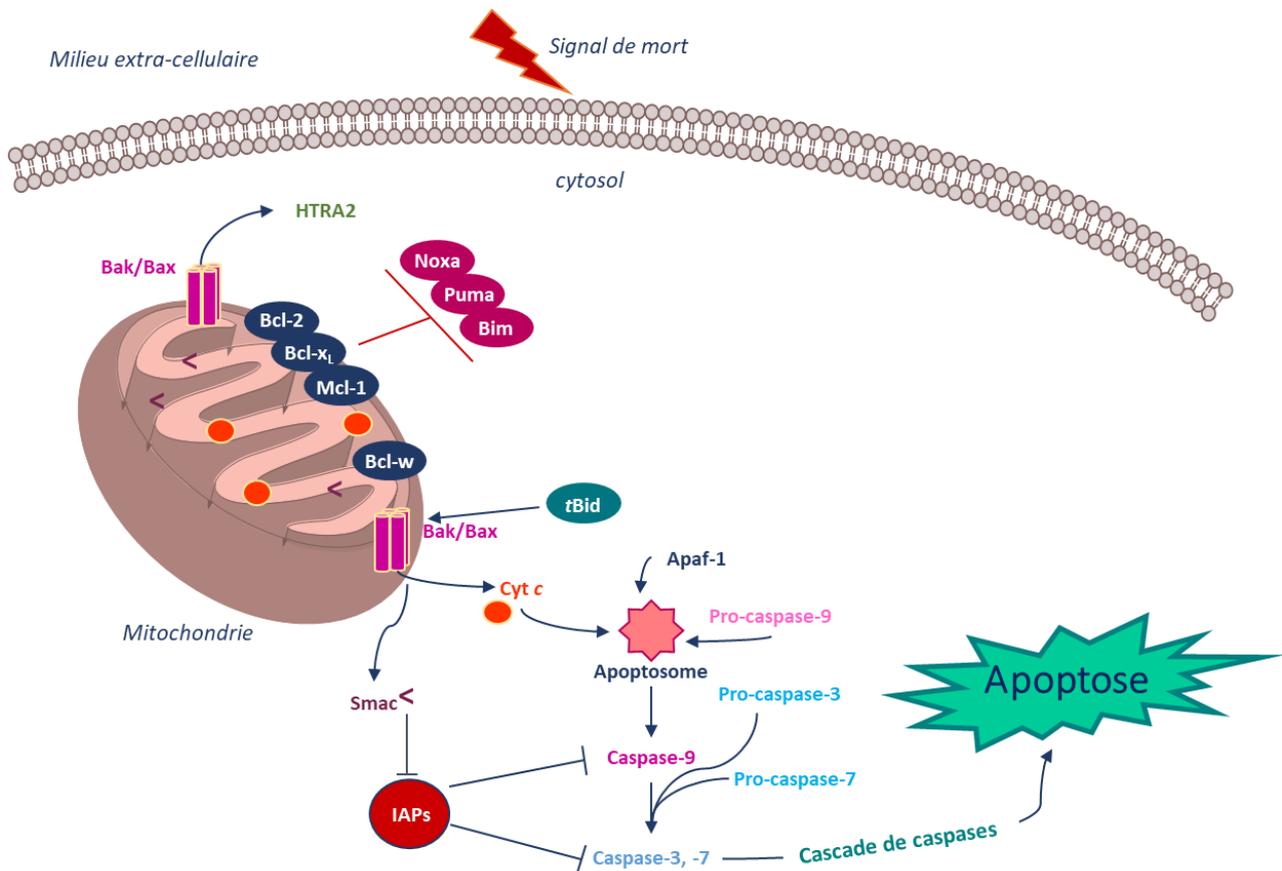


Figure 13. Représentation de la voie mitochondriale de l'apoptose.

La survie cellulaire due à l'inhibition des caspases est assurée par les membres de la famille des IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*). Les protéines IAPs ont été identifiées pour la première fois dans les *baculovirus* pour leur capacité à inhiber l'apoptose. Cette famille compte 8 protéines, parmi lesquelles cIAP1 (*cellular IAP1*), cIAP2 (*cellular IAP2*) et XIAP (*X-linked IAP*). Les membres de cette famille présentent par définition au moins une copie (et jusqu'à trois copies) d'un domaine surnommé BIR (*Baculovirus IAP Repeat*), nécessaire

⁹² Martinou, J.-C. Apoptosis: Key to the Mitochondrial Gate. *Nature* **1999**, 399 (6735), 411–412.

à l'activité anti-apoptotique et responsable des interactions avec divers agents pro-apoptotiques. La plupart des protéines de la famille des IAPs présentent 3 copies du domaine BIR (BIR1-3) situées dans leur région N-terminale (Figure 14).⁹³ Certains membres de cette famille, tels que cIAP1/2 et XIAP possèdent également un domaine UBA (*Ubiquitin Binding-Associated*) qui leur permet de se lier aux chaînes de polyubiquitine, et un domaine RING (*Really Interesting New Gene*) C-terminal qui lui confère une activité commune aux ubiquitine ligases E3.⁹⁴

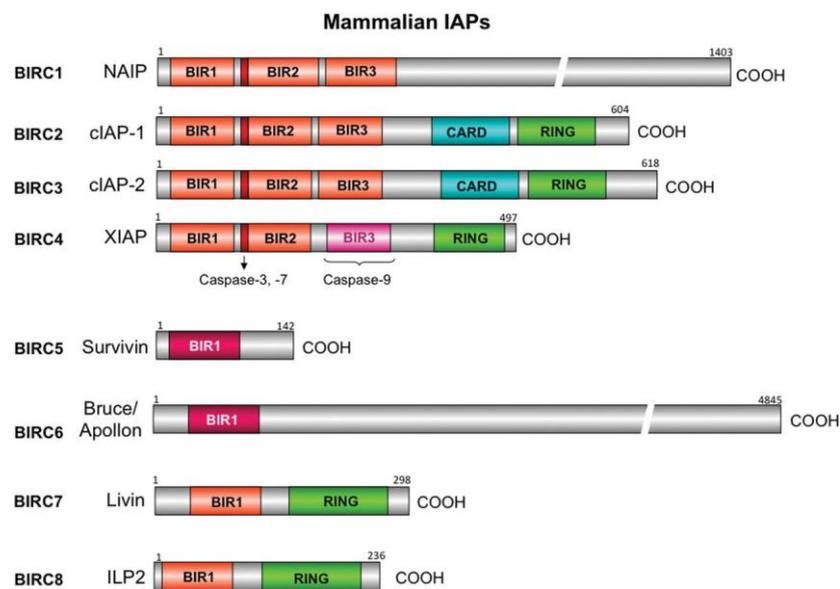


Figure 14. Organigramme de la famille des protéines IAPs.

Les différents domaines protéiques incluent : BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) ; UBA (*Ubiquitin Binding-Associated*) ; CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) ; RING (*Really Interesting New Gene*).⁹⁵

La famille des IAPs régule l'apoptose en agissant sur les deux voies de signalisation.⁹⁶ La protéine XIAP, par exemple, inhibe les caspases initiatrices et effectrices dans la voie intrinsèque ; les protéines cIAP1/2 inhibent la formation de complexes de signalisation pro-apoptotique dans la voie extrinsèque.

⁹³ Chai, J.; Du, C.; Wu, J.-W.; Kyin, S.; Wang, X.; Shi, Y. Structural and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *406* (6798), 855–862.

⁹⁴ a) Deveraux, Q. L.; Reed, J. C. IAP Family Proteins-Suppressors of Apoptosis. *Genes Dev.* **1999**, *13* (3), 239–252 ; b) Vaux, D. L.; Silke, J. IAPs, RINGs and Ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (4), 287–297.

⁹⁵ Ribe, E. M.; Serrano-Saiz, E.; Akpan, N.; Troy, C. M. Mechanisms of Neuronal Death in Disease: Defining the Models and the Players. *Biochem. J.* **2008**, *415* (2), 165–182.

⁹⁶ a) Bai, L.; Smith, D. C.; Wang, S. Small-Molecule SMAC Mimetics as New Cancer Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *144* (1), 82–95 ; b) Dubrez, L.; Berthelet, J.; Glorian, V. IAP Proteins as Targets for Drug Development in Oncology. *Onco. Targets Ther.* **2013**, *9*, 1285–1304 ; c) Fulda, S.; Vucic, D. Targeting IAP Proteins for Therapeutic Intervention in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (2), 109–124.

2. 3. 1. Les domaines BIRs et la régulation de l'apoptose

Les domaines BIRs, qui caractérisent les membres de cette famille, représentent la surface d'interaction à travers laquelle les IAPs se lient à différentes protéines pro-apoptotiques.

Les domaines BIRs sont identifiés par la présence de trois cystéines (Cys) et une histidine (His), conservées, qui coordonnent un ion Zn^{2+} . Ce domaine compte environ 80 résidus, il présente 3 brins β , 4 ou 5 hélices α selon l'isoforme, et l'ion Zn^{2+} se trouvant au centre de la structure protéique (Figure 15).⁹⁷

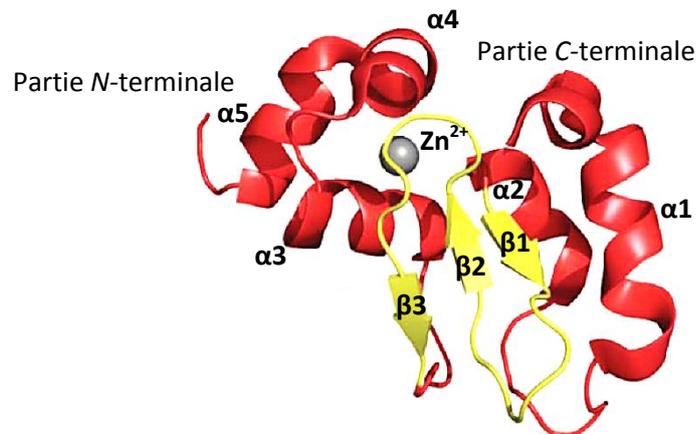


Figure 15. Structure du domaine BIR3 de c-IAP1 (PDB code 1g3f).⁹⁷

Il existe différents types de domaines BIRs : ils peuvent être classés en type-I et type-II en fonction de la présence ou non d'une profonde cavité de liaison, ce qui leur confère des fonctions différentes.⁹⁸

Les domaines de type-I ne possèdent pas de poche ou une de taille réduite, tandis que les domaines de types-II présentent une cavité hydrophobe distincte dans laquelle se lient les « motifs de liaison pour IAP » (IBM, IAP-Binding Motif) des caspases ou des inhibiteurs des IAPs (Figure 16). Les IBMs ont pour caractéristique principale de posséder une alanine N-terminale, qui dans certains cas peut être remplacée par une sérine, et qui permet l'interaction avec la profonde cavité hydrophobe des domaines BIR de type-II, *via* la formation de liaisons hydrogène.⁹⁹

⁹⁷ Mace, P. D.; Shirley, S.; Day, C. L. Assembling the Building Blocks: Structure and Function of Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Cell Death Differ.* **2010**, *17* (1), 46–53.

⁹⁸ a) Eckelman, B. P.; Salvesen, G. S.; Scott, F. L. Human Inhibitor of Apoptosis Proteins: Why XIAP Is the Black Sheep of the Family. *EMBO Rep.* **2006**, *7* (10), 988–994 ; b) Srinivasula, S. M.; Ashwell, J. D. IAPs: What's in a Name? *Mol. Cell* **2008**, *30* (2), 123–135.

⁹⁹ Verhagen, A. M.; Kratina, T. K.; Hawkins, C. J.; Silke, J.; Ekert, P. G.; Vaux, D. L. Identification of Mammalian Mitochondrial Proteins That Interact with IAPs *via* N-Terminal IAP Binding Motifs. *Cell Death Differ.* **2007**, *14* (2), 348–357.

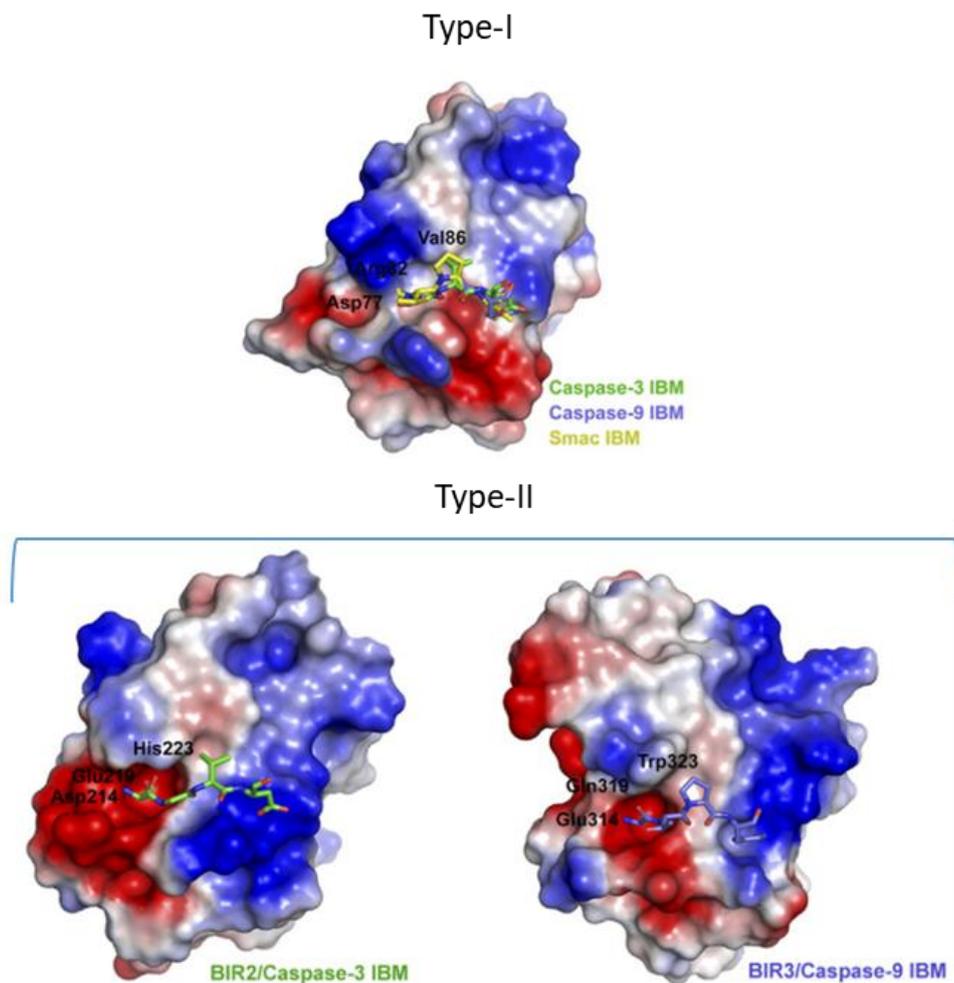


Figure 16. Types de domaines BIRs.

Structure du domaine BIR1 de XIAP (de type-I) en présence de différents IBMs (à gauche) : aucune poche définie pour l'interaction avec le résidu N-terminal des IBMs. Structure des complexes d'interaction des domaines BIR2 et BIR3 (de type-II) de XIAP avec les IBMs des caspases-3 et -9 (à droite) : le résidu N-terminal des IBMs interagit avec la profonde poche hydrophobe.¹⁰⁰

¹⁰⁰ Lin, S.-C.; Huang, Y.; Lo, Y.-C.; Lu, M.; Wu, H. Crystal Structure of the BIR1 Domain of XIAP in Two Crystal Forms. *Biochem. Mol. Biol. J.* **2007**, 372 (4), 847–854.

Des différences subtiles dans la séquence peptidique de la cavité de liaison des domaines BIRs de type-II sont à l'origine des spécificités d'interactions avec les « motifs de liaison pour IAP » de différentes protéines cibles. Les différents domaines BIRs de type-II sont responsables de l'inhibition de différentes caspases :¹⁰¹ il s'agit des caspases-3 et -7, communes aux deux voies de signalisation de l'apoptose, ainsi que de la caspase-9, activée par l'apoptosome dans la voie intrinsèque.

Certains membres de la famille des IAPs, tels que XIAP et cIAP1/2 présentent deux domaines BIR de type-II dans leur structure. Ceci permet d'élargir le répertoire de protéines avec lesquelles la protéine peut interagir et explique la plus grande affinité de liaison pour certaines protéines ayant un « motif de liaison pour IAP » particulier, surtout quand il s'agit de protéines sous forme de dimères ou oligomères (Figure 17).¹⁰²

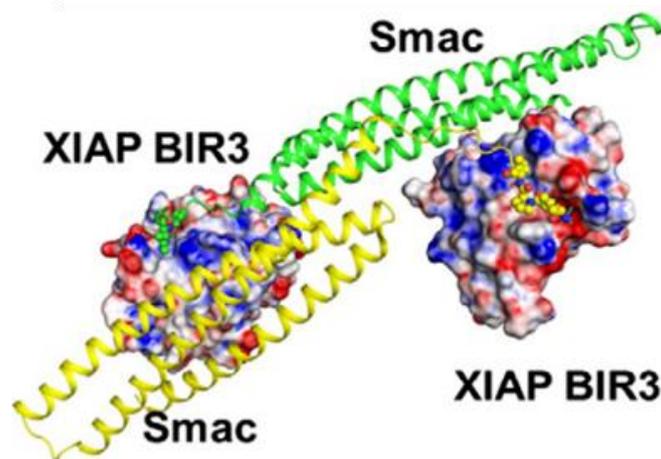


Figure 17. Structure cristalline de l'homodimère de la protéine Smac dans le complexe avec les domaines BIR3 de deux protéines XIAP.^{96a}

Les protéines XIAP et cIAP1/2 présentent aussi un domaine BIR de type-I. Ce domaine ne présente pas de poche de liaison pour interagir avec les « motifs de liaison pour IAP » des caspases ou des inhibiteurs des IAPs. Il interagit donc avec une classe de protéines différentes : le domaine BIR1 de la protéine XIAP interagit avec le TAB1 (TGF- β Activated

¹⁰¹ a) Deveraux, Q. L.; Leo, E.; Stennicke, H. R.; Welsh, K.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. Cleavage of Human Inhibitor of Apoptosis Protein XIAP Results in Fragments with Distinct Specificities for Caspases. *EMBO J.* **1999**, *18* (19), 5242–5251 ; b) Takahashi, R.; Deveraux, Q.; Tamm, I.; Welsh, K.; Assa-Munt, N.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. A Single BIR Domain of XIAP Sufficient for Inhibiting Caspases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (14), 7787–7790.

¹⁰² Silke, J.; Meier, P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins-Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5* (2).

Kinase 1);¹⁰³ et les domaines BIR1 des protéines cIAP1 et cIAP2 interagissent avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), impliqué dans la voie extrinsèque de l'apoptose.¹⁰⁴

- **Les domaines BIRs de XIAP**

Le membre de la famille des IAPs le plus étudié est la protéine XIAP. Il possède trois domaines BIRs : deux copies de type-II (BIR2 et BIR3), avec lesquelles il interagit avec les caspases-3, -7 et -9, et une copie de type-I (BIR 1), avec laquelle il interagit avec TAB1 (*TGF-Beta Activated Kinase 1*, qui intervient dans l'activation des macrophages) ; ainsi qu'un domaine RING C-terminal.⁹⁷

Le domaine BIR2 de la protéine XIAP est impliqué dans l'inhibition des caspases-3 et -7. Plus précisément, la liaison entre la protéine XIAP et les caspases met en jeu une région de liaison non structurée située sur la partie N-terminale de la protéine XIAP, entre les domaines BIR1 et BIR2. Cette région est capable de se lier à la surface du site actif des caspases-3 et -7 en limitant alors l'accès de la protéine aux substrats, et en inhibant l'activité catalytique des caspases (Figure 18).¹⁰⁵

Le domaine BIR2 joue un rôle peu important dans l'inhibition puisqu'il n'intervient pas directement dans l'interaction inhibitrice avec la caspase-3. Cependant, le domaine BIR2 est nécessaire car il établit des contacts supplémentaires avec des acides aminés situés à l'extérieur de la poche catalytique de la caspase.

¹⁰³ Lu, M.; Lin, S.-C.; Huang, Y.; Kang, Y. J.; Rich, R.; Lo, Y.-C.; Myszkka, D.; Han, J.; Wu, H. XIAP Induces NF-KappaB Activation *via* the BIR1/TAB1 Interaction and BIR1 Dimerization. *Mol. Cell* **2007**, *26* (5), 689–702.

¹⁰⁴ a) Varfolomeev, E.; Goncharov, T.; Fedorova, A. V.; Dynek, J. N.; Zobel, K.; Deshayes, K.; Fairbrother, W. J.; Vucic, D. c-IAP1 and c-IAP2 Are Critical Mediators of Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-Induced NF-KB Activation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (36), 24295–24299 ; b) Vince, J. E.; Wong, W. W.-L.; Khan, N.; Feltham, R.; Chau, D.; Ahmed, A. U.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Condon, S. M.; McKinlay, M.; *et al.* IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF α -Dependent Apoptosis. *Cell* **2007**, *131* (4), 682–693.

¹⁰⁵ a) Huang, Y.; Park, Y. C.; Rich, R. L.; Segal, D.; Myszkka, D. G.; Wu, H. Structural Basis of Caspase Inhibition by XIAP: Differential Roles of the Linker *versus* the BIR Domain. *Cell* **2001**, *104* (5), 781–790 ; b) Riedl, S. J.; Renatus, M.; Schwarzenbacher, R.; Zhou, Q.; Sun, C.; Fesik, S. W.; Liddington, R. C.; Salvesen, G. S. Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell* **2001**, *104* (5), 791–800 ; c) Chai, J.; Shiozaki, E.; Srinivasula, S. M.; Wu, Q.; Datta, P.; Alnemri, E. S.; Shi, Y.; Dataa, P. Structural Basis of Caspase-7 Inhibition by XIAP. *Cell* **2001**, *104* (5), 769–780.

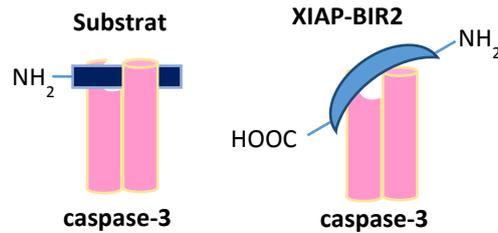


Figure 18. Comparaison schématique de l'interaction de la caspase-3 avec un substrat (à gauche) et avec XIAP (à droite).

Le domaine BIR3 de la protéine XIAP est impliqué dans l'inhibition de la caspase-9. Lors de l'activation protéolytique de la pro-caspase-9, le « motif de liaison pour IAP » de la caspase-9 mature, constitué du motif Alanine-Thréonine-Proline-Phénylalanine (Ala-Thr-Pro-Phe, ATPF, résidus 316-319) est exposé, ce qui est nécessaire pour l'activation de la caspase.¹⁰⁶ Ce motif interagit directement avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP, entraînant l'inactivation de la caspase. La structure cristalline du domaine BIR3 de la protéine XIAP en complexe avec la caspase-9 mature montre une hélice α distante du domaine BIR3 qui se lie à la surface d'auto-dimérisation de la caspase-9, empêchant sa dimérisation et son auto-activation (Figure 19).¹⁰⁷

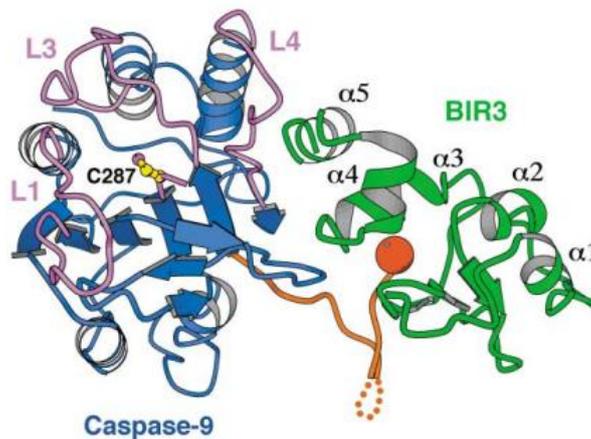


Figure 19. Complexe caspase-9/XIAP-BIR3.

Structure cristalline de la caspase-9 (bleu) dans un complexe inhibiteur avec XIAP-BIR3 (vert).

L'extrémité N-terminale de la caspase mise en évidence en or, la Cys²⁸⁷ nécessaire pour l'activation de la caspase est représentée ; ainsi que l'atome de zinc du domaine XIAP-BIR3 (en rouge).¹⁰⁷

¹⁰⁶ Srinivasula, S. M.; Hegde, R.; Saleh, A.; Datta, P.; Shiozaki, E.; Chai, J.; Lee, R. A.; Robbins, P. D.; Fernandes-Alnemri, T.; Shi, Y.; et al. A Conserved XIAP-Interaction Motif in Caspase-9 and Smac/DIABLO Regulates Caspase Activity and Apoptosis. *Nature* **2001**, 410 (6824), 112–116.

¹⁰⁷ Shiozaki, E. N.; Chai, J.; Rigotti, D. J.; Riedl, S. J.; Li, P.; Srinivasula, S. M.; Alnemri, E. S.; Fairman, R.; Shi, Y. Mechanism of XIAP-Mediated Inhibition of Caspase-9. *Mol. Cell* **2003**, 11 (2), 519–527.

- Les domaines BIRs de cIAP1/2

Les domaines BIR2 des protéines cIAP1/2 sont très similaires au domaine BIR2 de la protéine XIAP : pour cette raison, ces deux protéines ont également été considérées comme des inhibiteurs des caspases-3 et -7. Cependant, des études ultérieures ont démontré que, bien que les protéines cIAP1/2 interagissent avec ces caspases, elles n'en étaient pas des inhibiteurs puissants.¹⁰⁸ Les premières études concluant que les protéines cIAP1/2 étaient des inhibiteurs directs des caspases-3 et -7¹⁰⁹ ont été largement révisées : les protéines cIAP1/2 peuvent être considérées comme des inhibiteurs indirects alors que la protéine XIAP est à ce jour le seul membre de la famille des IAPs à être inhibiteur direct des caspases-3 et -7.^{98a}

Par ailleurs, **les domaines BIR3** des protéines cIAP1/2 sont très similaires au domaine BIR3 de la protéine XIAP (Figure 20). Ils interagissent avec la caspase-9 et empêchent son activation.¹¹⁰



Figure 20. Superposition de cIAP1-BIR3 (en violet) et de XIAP-BIR3 (en gris).¹¹⁰

¹⁰⁸ Eckelman, B. P.; Salvesen, G. S. The Human Anti-Apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (6), 3254–3260

¹⁰⁹ Roy, N.; Deveraux, Q. L.; Takahashi, R.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. The cIAP1 and cIAP2 Proteins Are Direct Inhibitors of Specific Caspases. *EMBO J.* **1997**, *16* (23), 6914–6925.

¹¹⁰ Kulathila, R.; Vash, B.; Sage, D.; Cornell-Kennon, S.; Wright, K.; Koehn, J.; Stams, T.; Clark, K.; Price, A. The Structure of the BIR3 Domain of cIAP1 in Complex with the N-Terminal Peptides of SMAC and Caspase-9. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **2009**, *65* (1), 58–66.

Dans les cellules humaines, en conditions physiologiques, l'inhibition (directe ou indirecte) des caspases par les IAPs peut être levée par libération de la protéine mitochondriale Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*). En réponse à des stimuli apoptotiques, cette protéine pro-apoptotique est libérée dans le cytosol suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale régulée par les protéines de la famille Bcl-2.

2. 3. 2. La protéine Smac : inhibiteur des IAPs

Suite à des stimuli pro-apoptotiques, la protéine mitochondriale Smac est libérée dans le cytosol, où elle acquiert son activité apoptotique après le clivage d'une région peptidique spécifique.

D'un point de vue structural, la protéine Smac compte 239 acides aminés. Sa région *N*-terminale est constituée d'une séquence d'acides aminés typique, servant au ciblage mitochondrial : il s'agit d'une hélice α amphipathique avec des chaînes latérales d'acides aminés chargés positivement sur une face.¹¹¹ Les acides aminés 1-55 constituent le peptide signal de ciblage mitochondrial. Il est clivé dans la mitochondrie pour obtenir la forme activée de la protéine, qui est ensuite libérée dans le cytosol pour interagir avec les IAPs, inhiber leur activité anti-apoptotique et libérer les caspases (Figure 21).

Le clivage du peptide signal de la protéine Smac permet l'exposition de son « motif de liaison pour XIAP », une séquence *N*-terminale Alanine-Valine-Proline-Isoleucine (Ala-Val-Pro-Ile, résidus 56-59, connu sur le nom de AVPI) qui se lie aux domaines BIR2 et BIR3 (de type-II) de XIAP et aux domaines BIR3 de cIAP1/2.^{45a, 112}

¹¹¹ Schatz, G.; Dobberstein, B. Common Principles of Protein Translocation across Membranes. *Science* **1996**, *271* (5255), 1519–1526.

¹¹² a) Scott, F. L.; Denault, J.-B.; Riedl, S. J.; Shin, H.; Renatus, M.; Salvesen, G. S. XIAP Inhibits Caspase-3 and -7 Using Two Binding Sites: Evolutionarily Conserved Mechanism of IAPs. *EMBO J.* **2005**, *24* (3), 645–655 ; b) Verhagen, A. M.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L. M.; Reid, G. E.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J.; Vaux, D. L. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein That Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **2000**, *102* (1), 43–53.

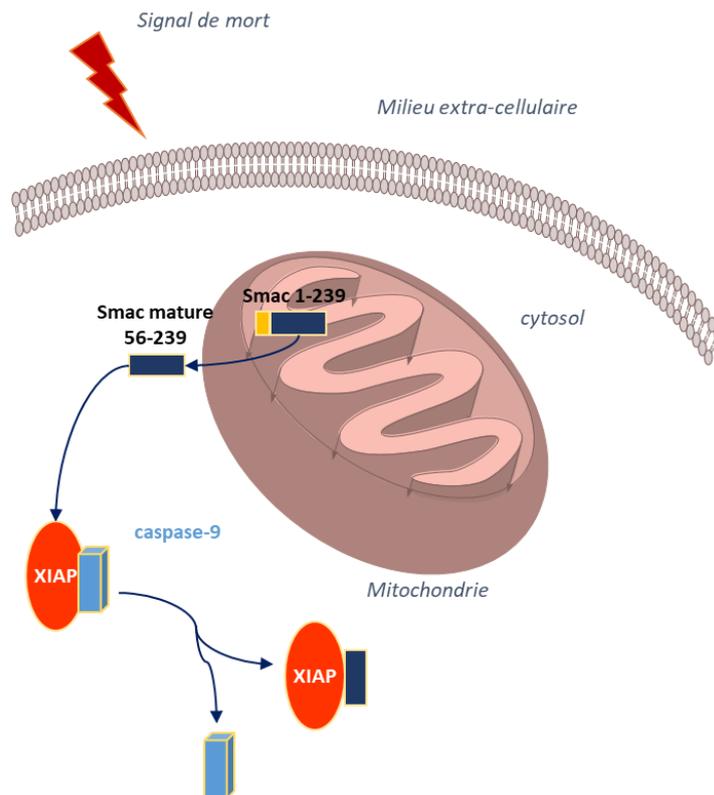


Figure 21. Représentation de l'activation de Smac dans la voie mitochondriale et son interaction avec XIAP pour libérer la caspase-9.

Le peptide Smac mature compte 184 acides aminés repliés dans trois hélices α tressées ; dans sa forme cristalline, il se trouve sous forme d'homodimère (Figure 17). L'interaction de Smac avec les domaines BIRs de certaines IAPs a été élucidée, et il est évident que le « motif de liaison pour IAP » de la protéine Smac entre en compétition avec celui des caspases pour se lier au domaine BIR de type-II, en augmentant ainsi la population de caspase libre.

2. 3. 3. La protéine Smac et les domaines BIRs des IAPs

La structure du « motif de liaison pour IAP » de la protéine Smac est proche de la structure des « motifs de liaison pour IAP » des caspases-3, -7 et -9 (Figure 22), ce qui explique la capacité de la protéine Smac à se lier aux domaines BIRs des différentes protéines IAPs. En effet, la protéine Smac est capable d'interagir avec le domaine BIR2 de la protéine XIAP, où il entre en compétition avec les caspases-3 et -7, et avec le domaine BIR3 des protéines XIAP et cIAP1/2, où il entre en compétition avec la caspase-9.¹¹³

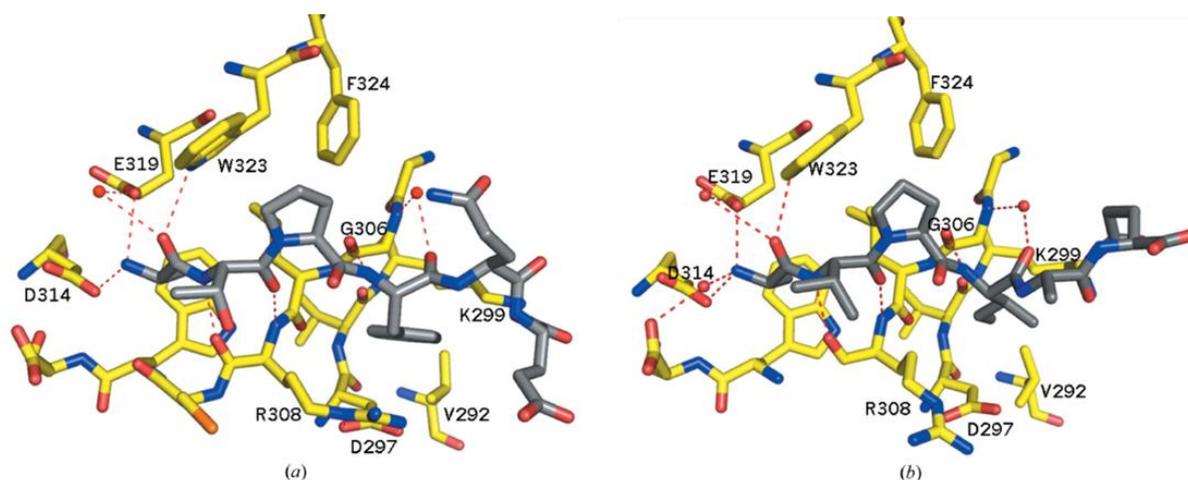


Figure 22. Complexes cIAP1-BIR3/ATPF de la caspase-9 (a) et cIAP1-BIR3/AVPI de Smac (b). cIAP1-BIR3 en jaune, les peptides en gris, les liaisons hydrogène en rouge.¹¹⁰

▪ Le complexe XIAP-BIR2/Smac

Dans l'interaction avec le domaine BIR2 de la protéine XIAP, le térapeptide AVPI de la protéine Smac est indispensable mais pas suffisant pour stabiliser le complexe : le site de liaison d'AVPI sur le domaine BIR2 ne correspond pas exactement à celui de la caspase-3.¹¹⁴ La présence du peptide Smac complet est nécessaire : il permet d'instaurer des interactions supplémentaires avec des régions du domaine communes à la caspase. Il a été démontré que la protéine Smac favorise l'activité de la caspase-3 de deux façons : d'une part, elle interagit avec le domaine BIR2 de la protéine XIAP ; d'autre part, la protéine Smac induit l'activation protéolytique de la pro-caspase-3 : elle libère la caspase-3

¹¹³ Shi, Y. Caspase Activation, Inhibition, and Reactivation: A Mechanistic View. *Protein Sci.* **2004**, 13 (8), 1979–1987.

¹¹⁴ Lukacs, C.; Belunis, C.; Crowther, R.; Danho, W.; Gao, L.; Goggin, B.; Janson, C. A.; Li, S.; Remiszewski, S.; Schutt, A.; *et al.* The Structure of XIAP BIR2: Understanding the Selectivity of the BIR Domains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, 69 (9), 1717–1725.

mature, séquestrée par le domaine BIR2 de la protéine XIAP, et promeut son activité enzymatique.⁹³

- **Le complexe XIAP-BIR3/Smac**

Il a été montré que, dans l'interaction avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP, le térapeptide AVPI de la protéine Smac lève l'inhibition de la caspase-9 par compétition directe entre les deux protéines sur le site de liaison de XIAP-BIR3.¹¹⁵

Dans le complexe XIAP-BIR3/Smac, l'AVPI se place dans une cavité située à la surface du domaine XIAP-BIR3, par la formation de liaisons hydrogène et d'interactions de van der Waals : la chaîne latérale d'Ala⁵⁶ de la protéine Smac rentre dans une poche hydrophobe, formée en partie par le Trp³¹⁰ de XIAP-BIR3, où elle établit des liaisons hydrogène charge-stabilisées avec le Glu³¹⁴ de XIAP-BIR3 (Figure 23A). Dans le complexe XIAP-BIR3/caspase-9, l'Ala³¹⁶ N-terminale de la caspase se lie également dans cette poche hydrophobe de XIAP-BIR3 où elle forme des liaisons hydrogène avec le Glu³¹⁴ (Figure 23B). Il est également connu que des mutations dans les résidus du térapeptide AVPI¹¹⁶ ou dans les résidus du domaine XIAP-BIR3¹¹⁷ empêchent la formation du complexe XIAP-BIR3/Smac. Plus particulièrement, des mutations du Trp³¹⁰ et du Glu³¹⁴ suppriment la formation des complexes XIAP-BIR3/Smac et XIAP-BIR3/caspase-9, prouvant le caractère essentiel de ces interactions.⁹³

¹¹⁵ a) Liu, Z.; Sun, C.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Betz, S. F.; Oost, T.; Herrmann, J.; Wu, J. C.; Fesik, S. W. Structural Basis for Binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 Domain. *Nature* **2000**, *408* (6815), 1004–1008 ; b) Wu, G.; Chai, J.; Suber, T. L.; Wu, J.-W.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. Structural Basis of IAP Recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *408* (6815), 1008–1012.

¹¹⁶ a) Srinivasula, S. M.; Datta, P.; Fan, X.-J.; Fernandes-Alnemri, T.; Huang, Z.; Alnemri, E. S. Molecular Determinants of the Caspase-Promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (46), 36152–36157; b) Chai, J.; Du, C.; Wu, J. W.; Kyin, S.; Wang, X.; Shi, Y. Structural and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *406* (6798), 855–862.

¹¹⁷ Srinivasula, S. M.; Hegde, R.; Saleh, A.; Datta, P.; Shiozaki, E.; Chai, J.; Lee, R.-A.; Robbins, P. D.; Fernandes-Alnemri, T.; Shi, Y.; et al. A Conserved XIAP-Interaction Motif in Caspase-9 and Smac/DIABLO Regulates Caspase Activity and Apoptosis. *Nature* **2001**, *410* (6824), 112–116.

- Le complexe cIAP1-BIR3/Smac

Dans le complexe cIAP1-BIR3/Smac, la Val⁵⁷ du térapeptide AVPI forme des liaisons hydrogène avec l'Arg³⁰⁸ sur la surface du domaine cIAP1-BIR3 ; l'Ala⁵⁶ forme des liaisons charge-stabilisées avec l'Asp³¹⁴ ; enfin, la chaîne latérale de l'Ile⁵⁹ du térapeptide interagit dans une poche formée par la Gly³⁰⁶, la Lys²⁹⁹, l'Arg³⁰⁸ et l'Asp²⁹⁷ (Figure 23A). Dans le complexe cIAP1-BIR3/caspase-9, la Phe³¹⁹ N-terminale de la caspase se superpose avec l'Ile⁵⁹ de la protéine Smac (Figure 23B); la conformation des deux peptides est très similaire pour les quatre premiers acides aminés (AVPI dans la protéine Smac et ATPF dans la caspase-9) impliqués dans l'interaction.

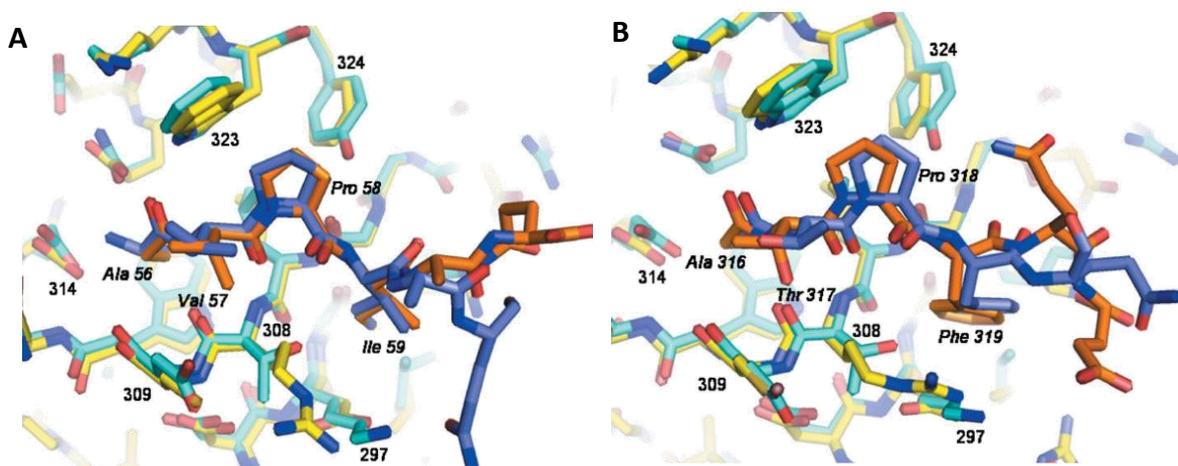


Figure 23. Comparaison des interactions de cIAP1-BIR3 (jaune) et XIAP-BIR3 (cyan) avec Smac (A) et caspase-9 (B). Représentées en orange dans le complexe avec cIAP1 et violet dans le complexe avec XIAP.¹¹⁰

- Les domaines BIR3 des protéines XIAP et cIAP1

Les domaines BIR3 de la protéine XIAP et de la protéine cIAP1 présentent 48 % d'homologie de séquence.¹¹⁰ Le site d'interaction sur les domaines BIR3 des deux protéines présente de nombreuses similitudes, les acides aminés nécessaires à l'interaction avec les peptides (appelés *hot spots*) sont en grande partie conservés dans les domaines BIR3 de la protéine XIAP et de la protéine cIAP1 : la Leu³⁰⁷ et le Trp³¹⁰, qui forment la poche hydrophobe pour accueillir la chaîne latérale de l'alanine N-terminale de la protéine Smac, ou de la caspase-9 ; la Gly³⁰⁶ et la Lys²⁹⁹, dans la poche qui accueille la large chaîne latérale de l'isoleucine Ile⁵⁹ de la protéine Smac, ou de la phénylalanine Phe³¹⁸ de la caspase-9.

Inversement, certains *hot spots* ne sont pas conservés : dans la poche qui accueille la chaîne latérale de l'isoleucine Ile⁵⁹ de la protéine Smac, ou de la phénylalanine Phe³¹⁸ de la caspase-9, la Lys²⁹⁷ du domaine BIR3 de XIAP est remplacée par l'Asp²⁹⁷ dans le domaine BIR3 de cIAP1. L'Asp²⁹⁷ forme un pont salin avec l'Arg³⁰⁸ qui confère à cIAP1-BIR3 une poche hydrophobe plus profonde que celle de XIAP-BIR3. De plus, le Glu³¹⁴, qui forme des liaisons charge-stabilisées avec l'alanine *N*-terminale des deux protéines (Smac et la caspase-9) est remplacée par l'Asp³¹⁴ dans la protéine c-IAP1.

Ces différences dans la séquence peptidique des domaines BIR3 des protéines XIAP et cIAP1 n'ont pas de conséquences importantes sur le mode de fixation de la protéine Smac : les deux complexes sont en effet superposables, à l'exception de subtiles variations dans la conformation de la Val⁵⁷ de la protéine Smac, probablement dues au remplacement de l'Asp³⁰⁹ de XIAP-BIR3 avec la Cys³⁰⁹ dans cIAP1-BIR3.¹¹⁰

En effet, les interactions majeures entre les domaines BIR3, des protéines XIAP et cIAP1, et la protéine Smac, ou la caspase-9, se font essentiellement grâce à des liaisons hydrophobes sur la surface des domaines BIRs et les quatre premiers acides aminés des peptides matures. L'interaction de la protéine Smac avec les protéines IAPs dépend fortement de l'intégrité du peptide *N*-terminal, car le remplacement de l'Ala⁵⁶ par une méthionine supprime totalement l'interaction de la protéine avec les IAPs.^{116b}

L'interaction avec le térapeptide AVPI est donc suffisante pour stabiliser les complexes de la protéine Smac avec les domaines BIR3 des protéines XIAP, cIAP1 et cIAP2.

2. 3. 4. Les protéines IAPs et le cancer

Les protéines de la famille des IAPs interviennent dans l'orientation des cellules vers la mort ou la survie. Pour cette raison, elles représentent des cibles thérapeutiques attrayantes pour le développement de nouveaux médicaments anticancéreux.^{96c, 118} La surexpression des IAPs, en particulier des protéines XIAP et cIAP1/2, a été observée dans divers cancers.¹¹⁹ Elle contribue au développement d'une chimiorésistance, et est souvent liée à un mauvais pronostic. Le problème de la résistance à la chimiothérapie acquise par les cellules tumorales est une préoccupation majeure dans la thérapie du cancer, et cibler les protéines IAPs présente une potentielle stratégie thérapeutique alternative et novatrice pour lutter contre cette résistance.^{96b} De plus, des études récentes suggèrent que les IAPs jouent un rôle dans la migration des cellules cancéreuses et donc le développement de métastases.¹²⁰ Un certain nombre de stratégies pour cibler les protéines IAPs dans le cancer a été exploré.

L'identification de la protéine Smac en tant qu'antagoniste naturel des protéines IAPs et la détermination des *hot spots* impliqués dans les interactions entre le peptide et les domaines BIRs des IAPs a permis le développement de petites molécules Smac-mimétiques avec un potentiel pro-apoptotique. Au cours de la dernière décennie, un grand nombre de Smac-mimétiques a été conçu et développé, et plusieurs molécules sont actuellement en essais cliniques chez l'homme pour le traitement de différents cancers.^{96c}

L'activité antitumorale des mimes de Smac a été prouvée dans plusieurs types de modèles précliniques de leucémie lymphocytaire aiguë,¹²¹ de cancer du sein,¹²² de fibrosarcome,¹²³

¹¹⁸ Mizutani, Y.; Nakanishi, H.; Li, Y. N.; Matsubara, H.; Yamamoto, K.; Sato, N.; Shiraishi, T.; Nakamura, T.; Mikami, K.; Okihara, K.; et al. Overexpression of XIAP Expression in Renal Cell Carcinoma Predicts a Worse Prognosis. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30* (4), 919–925 ; b) Hunter, A. M.; LaCasse, E. C.; Korneluk, R. G. The Inhibitors of Apoptosis (IAPs) as Cancer Targets. *Apoptosis* **2007**, *12* (9), 1543–1568 ; c) LaCasse, E. C.; Mahoney, D. J.; Cheung, H. H.; Plenchette, S.; Baird, S.; Korneluk, R. G. IAP-Targeted Therapies for Cancer. *Oncogene* **2008**, *27* (48), 6252–6275.

¹¹⁹ Vischioni, B.; van der Valk, P.; Span, S. W.; Kruyt, F. A. E.; Rodriguez, J. A.; Giaccone, G. Expression and Localization of Inhibitor of Apoptosis Proteins in Normal Human Tissues. *Hum. Pathol.* **2006**, *37* (1), 78–86.

¹²⁰ Mehrotra, S.; Languino, L. R.; Raskett, C. M.; Mercurio, A. M.; Dohi, T.; Altieri, D. C. IAP Regulation of Metastasis. *Cancer Cell* **2010**, *17* (1), 53–64.

¹²¹ Fakler, M.; Loeder, S.; Vogler, M.; Schneider, K.; Jeremias, I.; Debatin, K.-M.; Fulda, S. Small Molecule XIAP Inhibitors Cooperate with TRAIL to Induce Apoptosis in Childhood Acute Leukemia Cells and Overcome Bcl-2-Mediated Resistance. *Blood* **2009**, *113* (8), 1710–1722.

¹²² Bockbrader, K. M.; Tan, M.; Sun, Y. A Small Molecule Smac-Mimic Compound Induces Apoptosis and Sensitizes TRAIL- and Etoposide-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Oncogene* **2005**, *24* (49), 7381–7388.

de glioblastome,¹²⁴ de mélanome,¹²³ de neuroblastome,¹²⁵ et de carcinome pancréatique.¹²⁶ De plus, les mimes de Smac sensibilisent significativement les lignées cellulaires de différents cancers à l'apoptose induite par la chimiothérapie conventionnelle (paclitaxel^{96c} ou cisplatine¹²⁷).

3. La famille Bcl-2 et la famille des IAPs dans le cancer de l'ovaire

Dans les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes, la surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que la protéine Bcl-x_L et la protéine Mcl-1, réduit ou supprime l'activation de la protéine Bax et d'autres membres pro-apoptotiques de la famille. Dans son état inactif, la protéine Bax se trouve dans le cytosol ; en réponse à des stimuli apoptotiques, elle subit des changements conformationnels spécifiques qui permettent sa reconnaissance et son insertion dans la membrane mitochondriale externe où elle s'homomoligomérisent pour former les pores qui permettent la libération, dans le cytosol, des facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c et la protéine Smac.¹²⁸ Il a été démontré que la protéine Smac favorise l'activation de la protéine Bax et que son inhibition empêche les changements conformationnels de la protéine Bax et donc son activation. La libération de Smac dans le cytosol est donc l'évènement qui entraîne l'activation de la protéine Bax.¹²⁸ La surexpression de la protéine XIAP réduit l'activation de

¹²³ Varfolomeev, E.; Alicke, B.; Elliott, J. M.; Zobel, K.; West, K.; Wong, H.; Scheer, J. M.; Ashkenazi, A.; Gould, S. E.; Fairbrother, W. J.; *et al.* X Chromosome-Linked Inhibitor of Apoptosis Regulates Cell Death Induction by Proapoptotic Receptor Agonists. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (50), 34553–34560.

¹²⁴ Li, L.; Thomas, R. M.; Suzuki, H.; De Brabander, J. K.; Wang, X.; Harran, P. G. A Small Molecule Smac Mimic Potentiates TRAIL- and TNF α -Mediated Cell Death. *Science* **2004**, *305* (5689), 1471–1474.

¹²⁵ Abhari, B. A.; Cristofanon, S.; Kappler, R.; von Schweinitz, D.; Humphreys, R.; Fulda, S. RIP1 Is Required for IAP Inhibitor-Mediated Sensitization for TRAIL-Induced Apoptosis *via* a RIP1/FADD/Caspase-8 Cell Death Complex. *Oncogene* **2013**, *32* (27), 3263–3273.

¹²⁶ a) Vogler, M.; Walczak, H.; Stadel, D.; Haas, T. L.; Genze, F.; Jovanovic, M.; Bhanot, U.; Hasel, C.; Möller, P.; Gschwend, J. E.; *et al.* Small Molecule XIAP Inhibitors Enhance TRAIL-Induced Apoptosis and Antitumor Activity in Preclinical Models of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* **2009**, *69* (6), 2425–2434 ; b) Stadel, D.; Mohr, A.; Ref, C.; MacFarlane, M.; Zhou, S.; Humphreys, R.; Bachem, M.; Cohen, G.; Möller, P.; Zwacka, R. M.; *et al.* TRAIL-Induced Apoptosis Is Preferentially Mediated *via* TRAIL Receptor 1 in Pancreatic Carcinoma Cells and Profoundly Enhanced by XIAP Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16* (23), 5734–5749.

¹²⁷ Probst, B. L.; Liu, L.; Ramesh, V.; Li, L.; Sun, H.; Minna, J. D.; Wang, L. Smac Mimetics Increase Cancer Cell Response to Chemotherapeutics in a TNF- α -Dependent Manner. *Cell Death Differ.* **2010**, *17* (10), 1645–1654.

¹²⁸ Chandra, D.; Choy, G.; Daniel, P. T.; Tang, D. G. Bax-Dependent Regulation of Bak by Voltage-Dependent Anion Channel 2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (19), 19051–19061.

Bax, tandis que la surexpression de la protéine Smac favorise la sortie du cytochrome c et le clivage de la caspase-3 en activant la protéine Bax.¹²⁹

Dans le cancer de l'ovaire, pathologie à laquelle notre laboratoire s'intéresse particulièrement, les protéines des familles Bcl-2 et celles de la famille des IAPs jouent donc un rôle majeur dans l'échappement à l'apoptose. L'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et des protéines IAPs représente une stratégie intéressante pour promouvoir l'apoptose.

La stratégie thérapeutique vise à libérer les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, à l'aide de molécules BH3-mimétiques, de façon à favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des facteurs apoptogéniques dans le cytosol, et à promouvoir la libération des caspases séquestrées par les IAPs à l'aide de molécules Smac-mimétiques.

¹²⁹ Hu, W.; Wang, F.; Tang, J.; Liu, X.; Yuan, Z.; Nie, C.; Wei, Y. Proapoptotic Protein Smac Mediates Apoptosis in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells When Treated with the Anti-Tumor Agent AT101. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (1), 68–80.

CHAPITRE 2

Les interactions protéine-protéine et les
perturbateurs de l'apoptose

1. Comment perturber l'apoptose ?

L'une des stratégies pour rétablir l'apoptose dans les cellules cancéreuses consiste à cibler, à l'aide de petites molécules synthétiques, les protéines régulatrices de l'apoptose. Nous nous sommes intéressés aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) et aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, surexprimés dans différents cancers, dont le cancer de l'ovaire. En particulier, nous cherchons à perturber l'activité anti-apoptotique de la protéine XIAP à l'aide de structures mimes de la protéine Smac (son inhibiteur naturel), mais également à perturber l'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L de la famille Bcl-2 à l'aide de structures mimes des protéines BH3-only (leurs partenaires pro-apoptotiques naturels). Cette stratégie prévoit donc de perturber les interactions que ces protéines engagent avec leurs partenaires biologiques. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs équipes de recherche, universitaires et industrielles, se sont intéressées aux interactions protéine-protéine (inhibition ou stabilisation). Elles représentent une classe émergente de cibles thérapeutiques pour le développement d'agents sélectifs, dans la découverte de médicaments.¹³⁰

2. Les interactions protéine-protéine

L'ensemble des interactions biologiques forme un vaste réseau hautement connecté, appelé «interactome» (Figure 24), se référant à un réseau d'interactions de type physiques et fonctionnelles. Les interactions physiques impliquent un contact physique réel entre les biomolécules participantes, par exemple des protéines qui s'assemblent dans un complexe ou une liaison récepteur-ligand. Les interactions fonctionnelles, quant à elles, peuvent se référer à tous types de relations biologiques (hors contact physique).¹³¹

¹³⁰ Zinzalla, G.; Thurston, D. E. Targeting Protein-Protein Interactions for Therapeutic Intervention: A Challenge for the Future. *Future Med. Chem.* **2009**, *1* (1), 65–93.

¹³¹ Caldera, M.; Buphamalai, P.; Mueller, F.; Menche, J. Interactome-Based Approaches to Human Disease. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **2017**, *3*, 88–94.

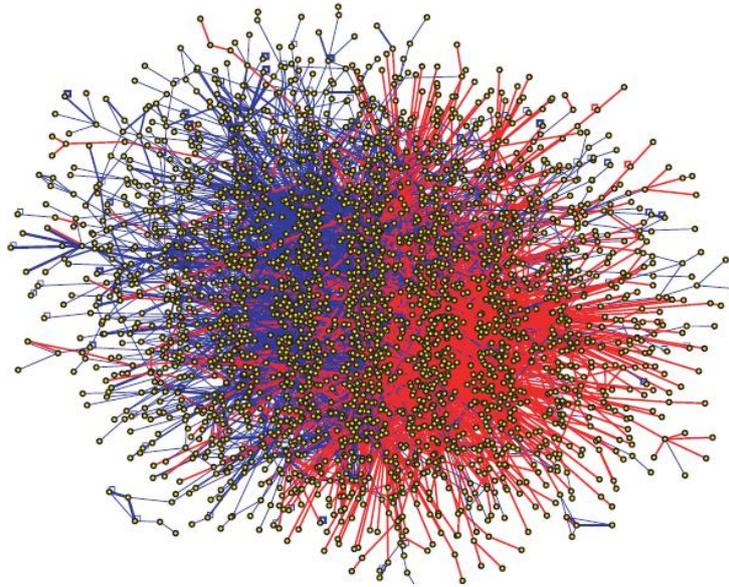


Figure 24. Cartographie des interactions protéine-protéine binaires humaines.

Les points jaunes représentent les protéines et les lignes bleues et rouges les interactions.¹³²

Les interactions protéine-protéine (IPPs) régulent de nombreuses fonctions cellulaires ; elles peuvent se faire entre protéines identiques pour former des homo-oligomères, ou entre protéines différentes pour former des hétéro-oligomères ; elles sont aussi dites obligatoires (liaisons fortes et durables) et non-obligatoires (liaisons faibles et transitoires).¹³³ Ces interactions sont régies par des liaisons hydrophobes, des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques et des liaisons de van der Waals entre les deux surfaces protéiques.

❖ La notion de « *hot spot* »

Au sein des sites de liaison protéine-protéine, appelés interfaces, les résidus d'acides aminés sont des éléments clés pour la reconnaissance, l'interaction et l'affinité des protéines en jeu.¹³⁴ Ces résidus ne contribuent pas de manière égale à l'énergie de liaison.

¹³² Rual, J.-F.; Venkatesan, K.; Hao, T.; Hirozane-Kishikawa, T.; Dricot, A.; Li, N.; Berriz, G. F.; Gibbons, F. D.; Dreze, M.; Ayivi-Guedehoussou, N.; *et al.* Towards a Proteome-Scale Map of the Human Protein-protein Interaction Network. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1173–1178.

¹³³ Jones, S.; Thornton, J. M. Principles of Protein-Protein Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93* (1), 13–20.

¹³⁴ Cukuroglu, E.; Engin, H. B.; Gursoy, A.; Keskin, O. Hot Spots in Protein-protein Interfaces: Towards Drug Discovery. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2014**, *116* (2), 165–173.

Il existe des résidus critiques, appelés « *hot spots* », qui contribuent majoritairement à l'énergie de liaison (Figure 25).¹³⁵

Les *hot spots* peuvent être mis en évidence par différentes méthodes : le *scanning* alanine,^{135b} qui étudie l'effet de la mutation séquentielle d'acides aminés en alanine (ou de Ala en Gly) sur l'affinité des protéines partenaires ; la résonance magnétique nucléaire (RMN),¹³⁶ qui étudie les changements de déplacement chimique des spectres RMN des deux partenaires, les temps de relaxation ou les effets nucléaires Overhauser (*nuclear overhauser effects*, NOEs) ; la cristallographie par diffraction des rayons-X,¹³⁷ qui permet de déterminer la structure du complexe d'interaction ; ou plus récemment, au travers de travaux de chémoinformatique (technique de *docking*),¹³⁸ qui donnent une prédiction de la structure du complexe en utilisant des méthodes de calcul.

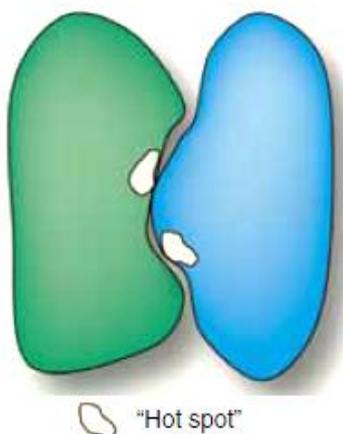


Figure 25. Représentation d'une IPP.

En vert : protéine 1, en bleu: protéine 2 ; en blanc : *hot spots*.¹³⁰

Ces résidus, favorisés énergétiquement, sont également les résidus où des petites molécules (en particulier des candidats médicaments) se lient préférentiellement.¹³⁹ Ces petites molécules inhibitrices d'IPP se lient au niveau de la surface d'interaction de protéines partenaires, au niveau des *hot spots*, empêchant ainsi la formation du complexe

¹³⁵ a) Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280* (1), 1–9 ; b) Clackson, T.; Wells, J. A. A Hot Spot of Binding Energy in a Hormone-Receptor Interface. *Science* **1995**, *267* (5196), 383–386.

¹³⁶ Merz K. M.; Ringe D.; Reynolds C. H. *Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches*. Cambridge University Press **2010**, 978-0-521-88723-6.

¹³⁷ Davies, T. G.; Tickle, I. J. Fragment Screening Using X-Ray Crystallography. *Top Curr. Chem.* **2012**, *317*, 33–59.

¹³⁸ Turnbull, A.; Boyd, S.; Walse, B. Fragment-Based Drug Discovery and Protein-Protein Interactions. *Res. Rep. Biochem.* **2014**, *4*, 13–26.

¹³⁹ Arkin, M. R.; Wells, J. A. Small-Molecule Inhibitors of Protein–protein Interactions: Progressing towards the Dream. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (4), 301–317.

protéine-protéine (inhibition orthostérique) ;¹⁴⁰ elles peuvent aussi se fixer aux protéines sur des sites spécifiques, autres que les *hot spots* (inhibition allostérique), et cela entraîne un changement de conformation de la protéine la rendant incapable de se fixer à son partenaire (Figure 26).¹³⁰

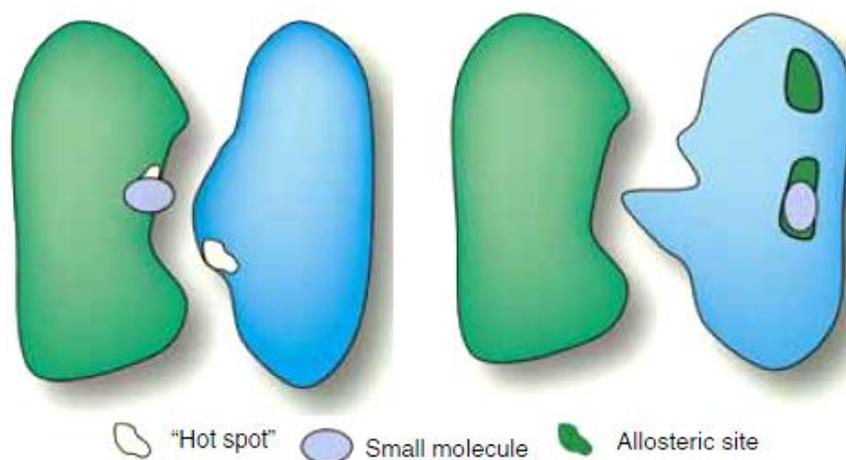


Figure 26. Représentation des inhibiteurs d'une IPP.

Inhibiteur orthostérique (gauche) ; inhibiteur allostérique (droite).¹³⁰

L'identification des *hot spots* est donc cruciale pour la conception de molécules d'intérêt thérapeutique. Ces molécules miment les structures secondaires des protéines, en interagissant avec les *hot spots* des protéines cibles, elle entraînent les mêmes effets que lors d'une liaison avec le ligand naturel.¹⁴¹

Dans le cancer de l'ovaire, de nombreuses IPPs sont impliquées dans le processus d'échappement à l'apoptose : le dérèglement des interactions entre les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, dû à la surexpression des membres anti-apoptotiques, ainsi que la séquestration des caspases due à la surexpression des protéines IAPs, font de ces protéines des cibles intéressantes pour le développement de molécules d'intérêt thérapeutique. Pour rétablir l'apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes, utiliser de petites molécules, mimes de BH3-only ou de Smac, pour inhiber ces interactions semble être une stratégie pertinente.

Cependant, le développement de molécules pouvant accéder aux *hot spots* sur la surface des protéines globulaires (tels que XIAP, Mcl-1 et Bcl-x_L) représente un défi. En effet, par

¹⁴⁰ Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. Targeting Protein-Protein Interaction by Small Molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54* (1), 435–456.

¹⁴¹ Gopalakrishnan, R.; Frolov, A. I.; Knerr, L.; Drury, W. J.; Valeur, E. Therapeutic Potential of Foldamers: From Chemical Biology Tools To Drug Candidates? *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (21), 9599–9621.

comparaison avec des cibles « classiques » (enzyme, récepteur), les interfaces de liaison sont plus petites en volume, plus nombreuses sur une même protéine et plus étendues.¹⁴² La conception rationnelle de tels perturbateurs d'IPPs utilise des outils précis et la caractérisation des interactions cible-ligand fait appel à des techniques spécifiques.

2. 1. Détection et caractérisation des IPPs : application à la conception de perturbateurs.

Aujourd'hui de nombreuses méthodes de détection et de caractérisation des IPPs sont disponibles et leur niveau d'observation se place à l'échelle atomique, moléculaire, en complexe et cellulaire.¹⁴³

Chacune de ces méthodes peut être utilisée à plusieurs étapes de la conception de perturbateurs (criblage, conception rationnelle, caractérisation), et une combinaison de plusieurs de ces techniques est souvent utilisée afin d'éliminer des faux-positifs et de confirmer les interactions.¹⁴³

Nous allons présenter dans ce manuscrit quelques unes des méthodes utilisées pour la conception de perturbateurs d'IPPs, en choisissant de n'évoquer que les méthodes les plus couramment rencontrées dans la bibliographie.

- Les techniques utilisées pour le criblage à haut débit

Le criblage à haut débit (HTS, *High-Troughput Screening*) est la seule stratégie exploitable quand les données structurales ne sont pas suffisantes pour envisager une approche rationnelle *in silico*.¹³⁰ L'HTS peut se faire à l'aide de plusieurs techniques, qui doivent être rapides et peu onéreuses. Parmi ces techniques, on retrouve celles faisant appel à la **fluorescence** :¹⁴⁴ le test d'anisotropie (ou polarisation) de fluorescence (*fluorescence polarization assay*, FPA) permet de mesurer la dépolarisation de la fluorescence liée à la liaison du perturbateur à la protéine et d'obtenir des valeurs de concentration à laquelle le

¹⁴² Scott, 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.

¹⁴³ Xenarios, I.; Eisenberg, D. Protein Interaction Databases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12* (4), 334–339.

¹⁴⁴ Hafner, M.; Vianini, E.; Albertoni, B.; Marchetti, L.; Grüne, I.; Gloeckner, C.; Famulok, M. Displacement of Protein-Bound Aptamers with Small Molecules Screened by Fluorescence Polarization. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (4), 579–587.

perturbateur est capable d'inhiber 50 % de la liaison entre la protéine et son partenaire naturel (CI_{50}). Cette technique basée sur la fluorescence, plutôt sensible et peu coûteuse, permet d'étudier les IPPs en solution, en absence de contraintes chimiques ou physiques.

D'autres techniques faisant appel à la **fluorescence**, bien plus coûteuses et sensibles que la FPA, sont également utilisées en *screening*. Il s'agit de la méthode de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), et de la méthode de transfert d'énergie entre molécules bioluminescentes (*bioluminescence resonance energy transfer*, BRET), qui permettent d'évaluer en temps réel l'affinité du perturbateur pour la protéine, et de calculer la constante de dissociation à l'équilibre K_d entre la protéine et le ligand, les constantes cinétiques (k_{on} et k_{off}) liées à l'association/dissociation du ligand à la protéine, et la constante d'inhibition K_i pour le ligand testé.

Parmi les techniques utilisées pour l'HTS on retrouve également une technique faisant appel à la **calorimétrie** : la titration calorimétrique isotherme (*isothermal titration calorimetry*, ITC), qui permet de mesurer la chaleur associée à la liaison du perturbateur à la protéine, et de calculer les constantes cinétiques (k_{on} , k_{off}) et la constante de dissociation à l'équilibre K_d .¹⁴⁵

Une dernière technique d'analyse utilisée dans l'HTS est la **résonance plasmonique de surface** (*surface plasmon resonance*, SPR), qui permet de mesurer la variation de la masse associée à la liaison du perturbateur à la protéine, permettant d'évaluer en temps réel l'affinité du perturbateur pour la protéine, et de mesurer les constantes k_{on} , k_{off} et K_d .¹⁴⁶

Les techniques d'ITC et de SPR, ainsi que le FRET et le BRET, bien que très sensibles, sont onéreuses et nécessitent un savoir-faire particulier pour l'interprétation des données, souvent complexes.

¹⁴⁵ Damian, L. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Protein-Ligand Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1008*, 103–118.

¹⁴⁶ Neumann, T.; Junker, H.-D.; Schmidt, K.; Sekul, R. SPR-Based Fragment Screening: Advantages and Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7* (16), 1630–1642.

▪ Les techniques d'analyse structurale

Les conditions spécifiques à certaines méthodes peuvent promouvoir des interactions qui n'existent pas *in vivo*. Une vérification de l'affinité des partenaires identifiés est donc nécessaire à travers l'utilisation d'analyses structurales comme la cristallographie ou la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

La **cristallographie** par diffraction des rayons-X permet de déterminer la structure du complexe protéine-ligand (partenaire naturel ou perturbateur) et de déterminer les *hot spots* responsables de l'interaction.

La **RMN** fournit des informations sur la localisation et la caractérisation des sites d'interactions du ligand dans la protéine.

Les méthodes d'analyse RMN utilisées pour la détermination des IPPs peuvent être divisées en deux catégories :¹⁴⁷ *ligand-based* et *protein-based*. Dans l'approche *ligand-based*, des expériences de RMN unidimensionnelles : hydrogène (¹H) ou fluor (¹⁹F) sont utilisées ; une mesure rapide et sensible est possible avec de faibles concentrations de protéine (5 à 50 μM). Dans l'approche *protein-based*, des expériences de RMN bidimensionnelles hétéronucléaires ¹H-¹⁵N et ¹H-¹³C sont utilisées (protéines marquées à l'¹⁵N ou au ¹³C). Le site de liaison du ligand dans la protéine cible est identifié par le changement du déplacement chimique et par l'élargissement du signal, induit par la liaison du ligand.

La **RMN** permet donc d'étudier les IPPs en solution et de déterminer les *hot spots* responsables de l'interaction ligand-protéine ; elle permet d'obtenir des données relatives à l'affinité du ligand pour une protéine, notamment la constante de dissociation à l'équilibre K_d .

Les méthodes utilisées pour la détection de perturbateurs d'IPP en *drug discovery* sont également adoptées pour la caractérisation des IPPs. Elles permettent d'obtenir des données relatives à l'affinité du ligand pour une protéine : la constante de dissociation à l'équilibre K_d entre la protéine et le ligand, les constantes cinétiques (k_{on} et k_{off}) liées à

¹⁴⁷ Sugiki, T.; Furuuta, K.; Fujiwara, T.; Kojima, C. Current NMR Techniques for Structure-Based Drug Discovery. *Molecules* **2018**, *23* (1), 148.

l'association/dissociation du ligand à la protéine, et la constante d'inhibition K_i pour le ligand testé. Les principales techniques de caractérisation des IPPs ici présentées, sont résumées dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Les principales techniques de détection et caractérisation des IPPs.

Méthode	Détermination	Données Obtenues	Avantages	Inconvénients
FPA	Affinité	K_d K_i CI_{50}	Haut débit Peu coûteux Pas d'immobilisation	Marquage fluorescent Uniquement données d'affinité
ITC	Affinité Cinétique Thermodynamique	K_d k_{on}, k_{off} $\Delta S, \Delta H$	Compatible avec solvants organiques Données cinétiques, thermodynamiques	Analyse complexe des résultats
SPR	Affinité Cinétique Spécificité	K_d k_{on}, k_{off}	Analyse rapide Faibles quantités Données cinétiques	Coûteux Immobilisation d'un des deux partenaires
RMN	Affinité Structure	K_d	Analyse en solution Obtention de la structure tridimensionnelle du site d'interaction et détermination des hot spots	Solubilité des ligands Conditions d'analyse (pH, T, solvant)
RX	Structure	Coordonnées 3D du complexe à l'échelle atomique	Très précise Obtention de la structure tridimensionnelle du site d'interaction et détermination des hot spots	Cristaux Quantité importante de protéines

▪ **La chémoinformatique pour la conception rationnelle de perturbateurs d'IPP**

L'approche chémoinformatique se base sur les données cristallographiques et RMN.

Dans une approche par **Structure-Based Drug Design** (SBDD), la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine, par ces outils d'analyse, permet de rationaliser la conception de médicaments par l'identification du site actif, et le développement d'une librairie de molécules pertinentes.¹⁴⁸

¹⁴⁸ Congreve, M.; Murray, C. W.; Blundell, T. L. Keynote Review: Structural Biology and Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (13), 895–907.

L'approche par **Fragment-Based Drug Design (FBDD)**¹⁴⁹ se base sur le criblage d'une vaste librairie de molécules possédant un faible poids moléculaire, appelées fragments.

Des expériences RMN ¹H, dont l'expérience STD (*saturation transfer difference*), sont utilisées comme méthodes de criblage : ici plusieurs fragments sont mis en compétition pour se lier à la protéine étudiée.¹⁵⁰ Les fragments possèdent une faible affinité pour la cible ; leur optimisation est ensuite guidée par les données cristallographiques et RMN, permettant d'améliorer cette affinité et d'obtenir des perturbateurs d'IPPs.

- **La conception rationnelle de peptidomimétiques perturbateurs d'IPPs**

Au cours des trois dernières décennies, les progrès de la communauté scientifique dans les techniques de cristallographie RX et de RMN ont permis la découverte et la caractérisation d'un nombre important de peptides biologiquement actifs.

Un composé peptidomimétique s'inspire d'un peptide natif : il possède des similarités avec la molécule peptidique, mais il possède des caractéristiques structurales propres différentes. Ceci permet ainsi aux composés peptidomimétiques d'être généralement plus sélectifs et efficaces que les peptides natifs, d'entraîner moins d'effets secondaires et de présenter une meilleure biodisponibilité orale.¹⁵¹ De nombreux peptidomimétiques font partie d'une classe de composés synthétiques capables d'adopter une conformation spatiale bien définie, comme celle des structures secondaires des protéines. Ces composés sont nommés « foldamères ».

¹⁴⁹ a) Hajduk, 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 ; b) Erlanson, 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 ; c) Davis, B. J.; Roughley, S. D. Fragment-Based Lead Discovery. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2017**, *50*, 371–439.

¹⁵⁰ a) Hajduk, P. J.; Burns, D. J. Integration of NMR and High-Throughput Screening. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2002**, *5* (8), 613–621 ; b) Powers, R.; Mercier, K. A.; Copeland, J. C. The Application of FAST-NMR for the Identification of Novel Drug Discovery Targets. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (3–4), 172–179.

¹⁵¹ Olson, G. L.; Bolin, D. R.; Bonner, M. P.; Bos, M.; Cook, C. M.; Fry, D. C.; Graves, B. J.; Hatada, M.; Hill, D. E. Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (21), 3039–3049.

3. Les foldamères

3. 1. Définition

Le terme foldamère a été utilisé pour la première fois par Gellman¹⁵² pour définir des polymères ayant tendance à adopter une conformation spécifique et compacte ; cette définition a été reprise par Moore¹⁵³ qui précise qu' "un foldamère est un oligomère qui se replie (*folding*) en solution dans une conformation ordonnée, et dont la structure est stabilisée par de nombreuses interactions non-covalentes entre les unités monomériques non-adjacentes". Ces oligomères synthétiques peuvent être divisés en quatre grandes familles en fonction des facteurs qui dominent le *folding*, c'est-à-dire : les restrictions locales de rotation, les interactions entre des sites distants dans la séquence, la solvation et l'assemblage/hybridation.¹⁵⁴ Cette division n'est pourtant pas exclusive et le *folding* est souvent la conséquence d'une combinaison de ces facteurs.

Par ailleurs d'autres facteurs, tels que les répulsions électrostatiques et stériques, influencent aussi les conformations possibles. Face à cette classification complexe, deux catégories de foldamères ont été définies sur la base de la nature du monomère utilisé pour générer la macromolécule : les foldamères biotiques et abiotiques.

Les foldamères biotiques sont constitués par des monomères synthétiques présentant une analogie structurale avec des monomères d'origine naturelle. On distingue les nucléotidomimétiques, obtenus par modification de nucléotides naturels, et les peptidomimétiques, obtenus par oligomérisation de mimes d'acides aminés. En opposition, les foldamères abiotiques présentent un squelette structural différent de celui des biopolymères et sont, pour beaucoup d'entre eux, constitués d'une séquence de cycles aromatiques.¹⁵⁵

¹⁵² Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (4), 173–180.

¹⁵³ Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (12), 3893–4012.

¹⁵⁴ Hecht, S.; Huc, I. Foldamers: Structure, Properties and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, 229, 978-3-527-31563-5.

¹⁵⁵ Guichard, G.; Huc, I. Synthetic Foldamers. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5933–5941.

Ces deux types de foldamères ont montré une capacité à adopter localement une structure spatiale similaire aux structures secondaires des protéines telles que les feuillets β ou les hélices α .^{152, 155, 156}

Ils présentent des structures attrayantes pour la conception de molécules qui peuvent potentiellement reconnaître les grandes surfaces d'interactions des protéines et agir comme inhibiteurs d'IPPs.

Dans ce manuscrit, nous nous attarderons plus particulièrement sur les foldamères biotiques peptidomimétiques et les foldamères abiotiques aromatiques.

3. 2. Les principales structures secondaires des protéines

Les structures secondaires protéiques les plus répandues sont l'hélice α , les brins β et les feuillets β .

Premièrement, l'hélice α est la structure la plus communément rencontrée dans les protéines.¹⁵⁷ Elle est constituée d'un enchaînement d'acides aminés, qui, dans l'espace, forment une spirale autour d'un axe longitudinal imaginaire en projetant les chaînes latérales des acides aminés vers l'extérieur (Figure 27). Cette structure hélicoïdale est stabilisée par des liaisons hydrogène établies au niveau de la chaîne principale entre l'oxygène du carbonyle d'un résidu i et l'hydrogène porté par l'azote du résidu $i+4$. La chaîne latérale d'un résidu situé à la position i est projetée sur la même face que les chaînes latérales des résidus situés aux positions $i, i+4$ (ou $i+3$), $i+7, i+11$.¹⁵⁸

¹⁵⁶ a) Boersma, 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 ; b) Martinek, T. A.; Fülöp, F. Peptidic Foldamers: Ramping up Diversity. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (2), 687–702.

¹⁵⁷ Pace, C. N.; Scholtz, J. M. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophys. J.* **1998**, *75* (1), 422–427.

¹⁵⁸ a) Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Helix-Mediated Protein-protein Interactions as Targets for Intervention Using Foldamers. *Amino Acids* **2011**, *41* (3), 743–754 ; b) Che, Y.; Brooks, B. R.; Marshall, G. R. Development of Small Molecules Designed to Modulate Protein-Protein Interactions. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20* (2), 109–130.

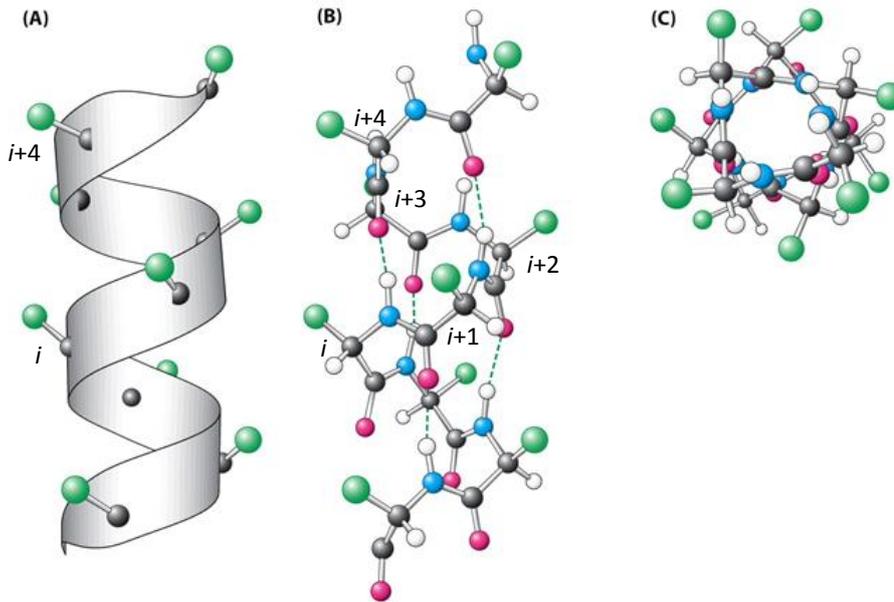


Figure 27. Structure d'une hélice α .

(A) Structure en ruban ; (B) mise en évidence des liaisons hydrogène entre les résidus (vue de face) et (C) vue de dessus.¹⁵⁹

Deuxièmement, un brin β est défini comme une séquence de quatre aminoacides, avec une conformation spécifique où la distance entre le $C_{\alpha i}$ et le $C_{\alpha i+3}$ est $\leq 7 \text{ \AA}$,¹⁶⁰ et le carbonyle du résidu $C_{\alpha i}$ forme une liaison hydrogène avec l'azote du résidu $C_{\alpha i+3}$, en formant un cycle à dix membres (Figure 28).

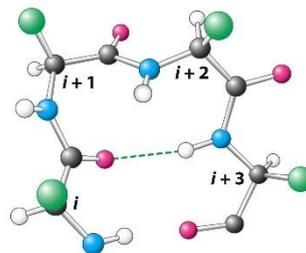


Figure 28. Structure d'un brin β .¹⁵⁹

Enfin, le feuillet β est la deuxième structure secondaire protéique la plus rencontrée. Les feuillets β sont constitués de brins β reliés latéralement par des liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle d'un résidu $C_{\alpha i}$, dans un brin, et l'hydrogène porté par l'azote d'un résidu $C_{\alpha j \pm 1}$, dans le brin adjacent, formant un plan plissé. Les brins du feuillet peuvent adopter deux orientations différentes : parallèle et antiparallèle (Figure 29).

¹⁵⁹ Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 5th ed.; W H Freeman, **2002**.

¹⁶⁰ a) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Beta-Turns in Proteins. *J. Mol. Biol.* **1977**, *115* (2), 135–175 ; b) Ball, J. B.; Hughes, R. A.; Alewood, P. F.; Andrews, P. R. β -Turn Topography. *Tetrahedron* **1993**, *49* (17), 3467–3478.

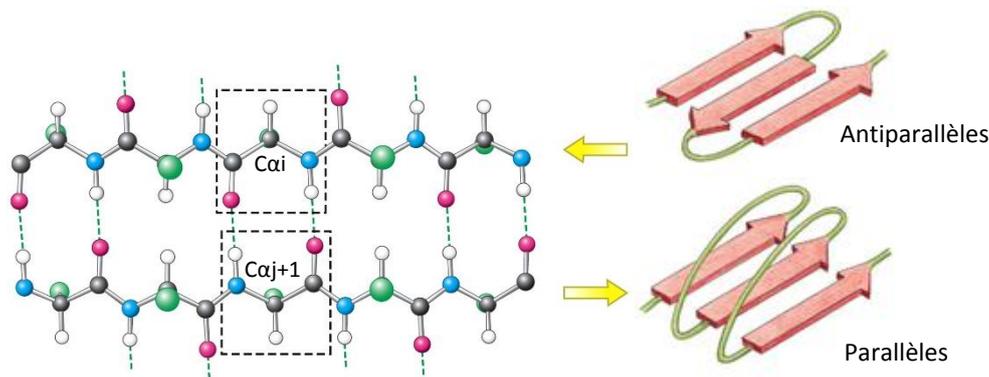


Figure 29. Structure d'un feuillet β .

Antiparallèle (à gauche) et exemplification des structures antiparallèles et parallèles (à droite).¹⁵⁹

3. 3. Les foldamères peptidomimétiques

Les foldamères peptidomimétiques sont obtenus par oligomérisation de monomères synthétiques, mimes d'acides aminés. Ils ont des caractéristiques générales analogues aux polypeptides naturels, tels que l'amphiphilie, et ils constituent une classe de composés pharmacologiques importants, car ils sont conçus en partant de structures peptidiques bioactives.

L'utilisation de peptides bioactifs naturels comme médicaments est peu efficace : ils présentent une stabilité limitée en présence de protéases, une faible perméabilité intermembranaire (due aux poids moléculaires élevés et à leurs charges à pH physiologique) et une flexibilité conformationnelle élevée, responsable d'effets secondaires dus aux interactions hors cible. L'intérêt des peptidomimétiques réside dans la possibilité d'améliorer la stabilité métabolique des peptides bioactifs naturels et ainsi échapper à l'action des peptidases. La principale caractéristique des peptidomimétiques est la présence de ponts amides qui relient les monomères. Ils contribuent à la conformation spatiale spécifique de la molécule en établissant un motif régulier de liaisons hydrogène intramoléculaires, typique des structures secondaires des protéines.

Les monomères synthétiques, utilisés pour obtenir des foldamères peptidomimétiques, peuvent présenter des modifications structurales au niveau des chaînes latérales des acides aminés naturels ou des contraintes structurales qui limitent la liberté conformationnelle de la molécule. L'approche la plus utilisée pour le développement de peptidomimétiques consiste à modifier le squelette peptidique naturel en introduisant des

unités supplémentaires ou en remplaçant les groupements amides avec des groupements isostériques.¹⁶¹

Parmi les peptidomimétiques, on retrouve les peptoïdes (ou peptides poly-*N*-substitués), les β -peptides, les α/β -peptides, et les peptides à conformation contrainte de façon covalente.¹⁵⁵

3. 3. 1. Les peptoïdes

Contrairement aux peptides, les chaînes latérales des peptoïdes sont directement liées aux atomes d'azote des fonctions amides plutôt qu'au carbone- α ($C\alpha$) (Figure 30). La conséquence conformationnelle de cette différence structurale est que les peptoïdes sont capables d'adopter des conformations *trans* et *cis* des ponts amides. De plus, la structure glycine poly-*N*-substituée des peptoïdes (Figure 30, gauche) empêche à la fois la chiralité du squelette et la formation de liaisons hydrogène. L'incorporation périodique de volumineuses chaînes latérales α -chirales permet à ces composés d'adopter des structures secondaires hélicoïdales (Figure 30, droite), en raison des répulsions électrostatiques et stériques entre le squelette et les chaînes latérales.¹⁶²

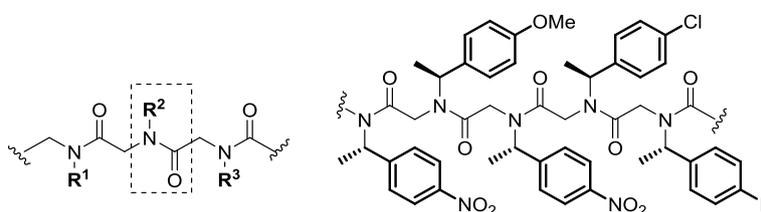


Figure 30. Les peptoïdes.

Structure générale d'un peptoïde (à gauche) et exemple de monomère, avec un carbone- α chiral dans la chaîne latérale, capable d'adopter une conformation hélicoïdale (à droite).¹⁶³

¹⁶¹ Soth, M. J.; Nowick, J. S. Unnatural Oligomers and Unnatural Oligomer Libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1* (1), 120–129.

¹⁶² a) Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Peptoid Oligomers with Alpha-Chiral, Aromatic Side Chains: Sequence Requirements for the Formation of Stable Peptoid Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (28), 6778–6784 ; b) Wu, C. W.; Kirshenbaum, K.; Sanborn, T. J.; Patch, J. A.; Huang, K.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Structural and Spectroscopic Studies of Peptoid Oligomers with Alpha-Chiral Aliphatic Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (44), 13525–13530 ; c) Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E. Chiral *N*-Substituted Glycines Can Form Stable Helical Conformations. *Fold Des.* **1997**, *2* (6), 369–375 ; d) Sanborn, T. J.; Wu, C. W.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Extreme Stability of Helices Formed by Water-Soluble Poly-*N*-Substituted Glycines (Polypeptoids) with Alpha-Chiral Side Chains. *Biopolymers* **2002**, *63* (1), 12–20.

¹⁶³ Trabocchi, A.; Guarna, A. *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry: The Art of Transforming Peptides in Drugs*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2014**.

3. 3. 2. Les β -peptides

Les β -peptides sont constitués entièrement de β -aminoacides. Comme les α -aminoacides, ils présentent une forte similarité structurale avec les α -peptides naturels, mais ils possèdent un atome de carbone supplémentaire dans le squelette.¹⁶⁴ Les β -peptides peuvent avoir des chaînes latérales sur le C α (β 2), sur le C β (β 3), ou bien sur les deux atomes. Plusieurs β 3-, β 2- et β 2,3-aminoacides ont été utilisés pour obtenir des foldamères, y compris des dérivés cycliques (Figure 31).

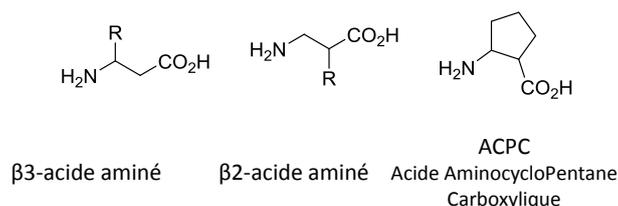


Figure 31. Exemples de structure générale de monomères linéaires et cycliques utilisés pour les β -peptides.¹⁶³

Les β -peptides sont capables de former des structures secondaires très stables avec seulement quatre à six résidus, par rapport à environ quinze résidus dans les peptides naturels.¹⁶⁵ Les β -peptides peuvent adopter de nombreuses structures secondaires telles que les feuillets- β et les hélices-8, -12, -14 ;^{166, 152} ils sont plus stables vis-à-vis des protéases comparés aux α -peptides naturels correspondants¹⁶⁷ et la plupart d'entre eux adoptent une conformation hélicoïdale. Les β -peptides sont capables de présenter des chaînes latérales disposées le long d'une face, de manière similaire aux hélices- α : elles sont projetées l'une au-dessus de l'autre dans l'hélice-14, tandis qu'elles sont légèrement décalées dans le cas des hélices- α (Figure 32).^{158a}

¹⁶⁴ a) Wu, Y.-D.; Wang, D.-P. Theoretical Studies of β -Peptide Models. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (51), 13485–13493 ; b) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (51), 13071–13072.

¹⁶⁵ Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. Self-Assembling Cyclic β 3-Peptide Nanotubes as Artificial Transmembrane Ion Channels. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (4), 651–656.

¹⁶⁶ Seebach, D.; Matthews, J. L. β -Peptides: A Surprise at Every Turn. *Chem. Commun.* **1997**, 0 (21), 2015–2022.

¹⁶⁷ Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain β -Peptides. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79* (8), 2043–2066.

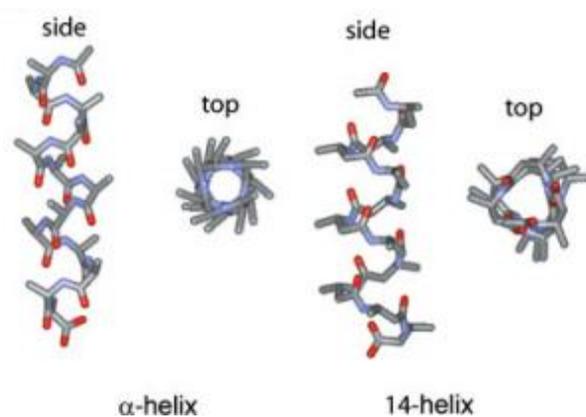


Figure 32. Comparaison des structures des hélices- α et hélice-14.^{158a}

Les chaînes latérales sont projetées l'une au-dessus de l'autre dans l'hélice-14 (droite) et légèrement décalées dans l'hélices- α (gauche).

La disposition différente par rapport à une hélice- α , des chaînes latérales des hélices des β -peptides peut influencer leur activité en raison d'une superposition imparfaite des chaînes latérales avec les *hot spots* des protéines cibles.¹⁶⁸ Pour résoudre cette problématique, l'alternance d' α -aminoacides naturels et de leurs analogues β permet de modifier la séquence de formation de l'hélice et conduit à l'obtention d'un peptide α/β qui conserve son aptitude à adopter une structure α -hélicoïdale.¹⁶⁹

3. 3. 3. Les brins β peptidomimétiques

Les brins β jouent un rôle crucial dans plusieurs systèmes de reconnaissance biologique.^{170, 171} Les approches les plus communes pour obtenir des peptidomimétiques des brins β se basent sur l'utilisation de monomères possédant des structures mimes de proline.¹⁶³ L'introduction de ces monomères en position $i+1$ ou $i+2$ (Figure 33) apporte une contrainte conformationnelle à la structure peptidique, et permet l'introduction de δ -aminoacides, comme isostères dipeptidiques, pour remplacer les fragments $i+1$ et $i+2$

¹⁶⁸ Sadowsky, J. D.; Fairlie, W. D.; Hadley, E. B.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S.; Huang, D. C. S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. (α/β)-Peptide Antagonists of BH3 Domain/Bcl-x_L Recognition: Toward General Strategies for Foldamer-Based Inhibition of Protein-Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (1), 139–154.

¹⁶⁹ Horne, W. S.; Boersma, M. D.; Windsor, M. A.; Gellman, S. H. Sequence-Based Design of α/β -Peptide Foldamers That Mimic BH3 Domains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (15), 2853–2856.

¹⁷⁰ a) Souers, A. J.; Ellman, J. A. β -Turn Mimetic Library Synthesis: Scaffolds and Applications. *Tetrahedron* **2001**, *57* (35), 7431–7448 ; b) Eguchi, M.; Kahn, M. Design, Synthesis, and Application of Peptide Secondary Structure Mimetics. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2* (5), 447–462 ; c) Kee, K. S.; Jois, S. D. S. Design of Beta-Turn Based Therapeutic Agents. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9* (15), 1209–1224.

¹⁷¹ a) Genin, M. J.; Johnson, R. L. Design, Synthesis, and Conformational Analysis of a Novel Spiro-Bicyclic System as a Type II Beta-Turn Peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (23), 8778–8783 ; b) Diaz, H.; Espina, J. R.; Kelly, J. W. A Dibenzofuran-Based Amino Acid Designed to Nucleate Antiparallel β -Sheet Structure: Evidence for Intramolecular Hydrogen-Bond Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (21), 8316–8318.

dans une structure contrainte bicyclique (Figure 33). L'introduction de ces contraintes conformationnelles améliore la stabilité métabolique des composés naturels.

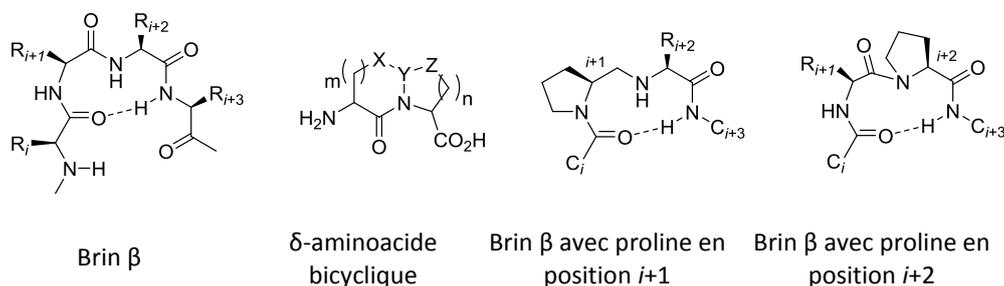


Figure 33. Structure générale des brins β , δ -aminoacides bicycliques, brins β avec proline en position $i+1$ et $i+2$.¹⁶³

L'approche la plus courante pour remplacer la séquence dipeptidique centrale des brins β consiste à utiliser deux mimes de proline condensés dans une structure bicyclique avec un pont lactame : de type azabicyclo[x.3.0]alcane (Figure 34).

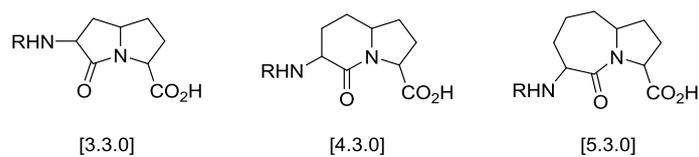


Figure 34. Exemples de structure type azabicyclo[x.3.0]alcane des mimes de brins β .^{170a}

3. 4. Les foldamères abiotiques aromatiques

Les foldamères abiotiques miment les structures secondaires des protéines en adoptant des conformations qui leur permettent de projeter des substituants à l'image de la distribution des chaînes latérales des protéines.¹⁵⁵ Nous allons présenter les exemples de foldamères abiotiques aromatiques qui ont conduit le CERMN à initier les travaux de synthèse des oligopyridines.

Le squelette polyaromatique de ces composés lui permet de projeter des substituants dans les positions clés (responsables des IPPs) des chaînes latérales des résidus en position i , $i+3$ et/ou $i+4$ et $i+7$, situées sur une face de l'hélice α .^{130, 172}

¹⁷² Fairlie, D. P.; West, M. L.; Wong, A. K. Towards Protein Surface Mimetics. *Curr. Med. Chem.* **1998**, 5 (1), 29–62.

3. 4. 1. Les terphényles d'Hamilton

La première structure polyaromatique mime de l'hélice α a été découverte par Hamilton et ses collaborateurs.¹⁷³ Ils décrivent un squelette 3,2',2''-terphényle trisubstitué (Figure 35) qui adopte une conformation capable de mimer la surface d'une hélice α dans laquelle les substituants, alkyles ou aryles sur les positions *ortho* des cycles aromatiques, miment la distribution des chaînes latérales des résidus en position *i*, *i*+3 (ou *i*+4) et *i*+7. Ces structures représentent un modèle attrayant pour la conception de protéomimétiques (composés qui imitent la structure et la fonction de la surface des protéines)¹⁷⁴ en raison de leur simplicité de synthèse.

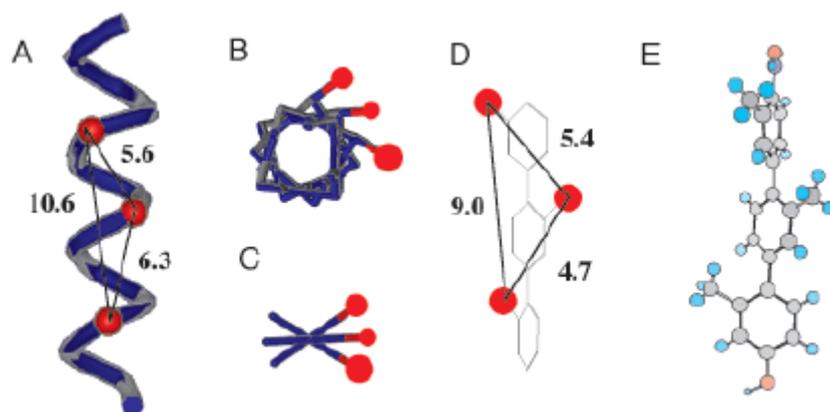


Figure 35. Les terphényles d'Hamilton.

A) Mise en évidence des chaînes latérales (en rouge) des résidus *i*, *i*+3 et *i*+7 d'une hélice α : B) vue de côté ; C) vue de dessus. D) Représentation schématique d'un dérivé 3,2',2''-terphényle trisubstitué ; E) Structure cristallographique du dérivé 3,2',2''-triméthyl-4-nitro-4''-hydroxy-terphényle.¹⁷³

Il a été démontré que des dérivés appartenant à cette famille sont capables d'inhiber plusieurs IPPs^{173, 175} parmi lesquelles l'interaction Bak/Bcl-x_L,¹⁷⁶ qui a lieu *via* le domaine hélicoïdal BH3.

¹⁷³ Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Hamilton, A. D. Toward Proteomimetics: Terphenyl Derivatives as Structural and Functional Mimics of Extended Regions of an α -Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (22), 5382–5383.

¹⁷⁴ Fletcher, S.; Hamilton, A. D. Protein Surface Recognition and Proteomimetics: Mimics of Protein Surface Structure and Function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (6), 632–638.

¹⁷⁵ Ernst, J. T.; Kutzki, O.; Debnath, A. K.; Jiang, S.; Lu, H.; Hamilton, A. D. Design of a Protein Surface Antagonist Based on α -Helix Mimicry: Inhibition of Gp41 Assembly and Viral Fusion. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (2), 278–281.

¹⁷⁶ Yin, H.; Lee, G.; Sedey, K. A.; Kutzki, O.; Park, H. S.; Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Wang, H.-G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Terphenyl-Based Bak BH3 α -Helical Proteomimetics as Low-Molecular-Weight Antagonists of Bcl-XL. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10191–10196.

Cependant le squelette terphényle n'est pas rigide et peut adopter indifféremment un pas à droite ou à gauche ; parmi 16 conformères, seuls 2 peuvent mimer l'hélice α capable d'interagir avec la protéine Bcl-x_L. Devant les limites de ce squelette en tant que mimes d'hélice α , d'autres squelettes ont été évalués afin de contrôler l'hélicité.^{130, 158a, 173, 177}

3. 4. 2. Les oligoamides

Une famille importante de protéomimétiques est celle des oligoamides aromatiques. Ces structures sont particulièrement attrayantes en tant que foldamères parce qu'elles présentent des motifs de pliage (*folding*) prévisibles, contrôlés en grande partie par la conformation privilégiée de la liaison NHCO-aryle et des interactions *ortho* adjacentes.¹⁷⁸

En effet, la rotation autour de la liaison NHCO-aryle est limitée par une liaison hydrogène entre le proton amide et un accepteur de liaison hydrogène en position *ortho* sur le groupe aryle (Figure 36).

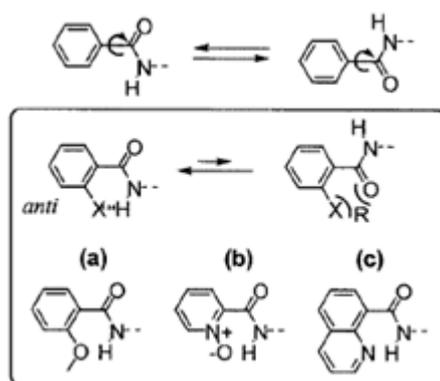


Figure 36. Exemples de conformations privilégiées de la liaison NHCO-aryle et des interactions *ortho* adjacentes retrouvées dans la structure d'amides aromatiques.

(R = répulsions électrostatiques).¹⁷⁸

Hamilton et ses collaborateurs ont décrit plusieurs types d'oligoamides aromatiques.^{175, 179}

¹⁷⁷ a) Davis, J. M.; Tsou, L. K.; Hamilton, A. D. Synthetic Non-Peptide Mimetics of α -Helices. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (2), 326–334 ; b) Ruan, F.; Chen, Y.; Hopkins, P. B. Metal Ion-Enhanced Helicity in Synthetic Peptides Containing Unnatural, Metal-Ligating Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112 (25), 9403–9404 ; c) Letai, A.; Bassik, M. C.; Walensky, L. D.; Sorcinelli, M. D.; Weiler, S.; Korsmeyer, S. J. Distinct BH3 Domains Either Sensitize or Activate Mitochondrial Apoptosis, Serving as Prototype Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* **2002**, 2 (3), 183–192 ; d) Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. Synthetic Mimetics of Protein Secondary Structure Domains. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, 368 (1914), 989–1008 ; e) Yin, H.; Hamilton, A. D. Strategies for Targeting Protein-Protein Interactions with Synthetic Agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44 (27), 4130–4163.

¹⁷⁸ Huc, I. Aromatic Oligoamide Foldamers. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, (1), 17–29.

¹⁷⁹ a) Yin, H.; Lee, G.-I.; Sedey, K. A.; Rodriguez, J. M.; Wang, H.-G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Terephthalamide Derivatives as Mimetics of Helical Peptides: Disruption of the Bcl-x(L)/Bak Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (15), 5463–5468 ; b) Plante, J. P.; Burnley, T.; Malkova, B.; Webb, M. E.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Oligobenzamide Proteomimetic Inhibitors of the P53-HDM2 Protein-Protein Interaction. *Chem. Commun. (Camb.)* **2009**, 34, 5091–5093.

Les composés à squelette trispyridylamide (Figure 37A) présentent une conformation presque planaire induite par des liaisons hydrogène entre le proton de l'amide et les doublets non liants des atomes d'oxygène et d'azote des substituants *ortho* alcoxy et des pyridines. Dans cette conformation, les trois chaînes latérales (R^1 , R^2 et R^3) sont projetées sur la même face de la molécule, et dans la même orientation que les résidus i , $i+4$ et $i+7$ d'une hélice α . Certains de ces composés ont montré une capacité à inhiber l'interaction Bak/Bcl- x_L .¹⁷⁵

Bien que la rigidité structurale soit nécessaire pour mimer une hélice α , un certain degré de flexibilité peut aider à maximiser les interactions avec la protéine cible.¹³⁷ À ce titre, plusieurs groupes de recherche ont conçu des oligobenzamides^{176, 180} basés sur la structure pyridylcarboxamide décrite initialement par l'équipe d'Hamilton. Dans ces composés, les pyridines sont remplacées par des phényles (Figure 37B) : cette modification permet la suppression d'une liaison hydrogène et une plus grande flexibilité structurale.

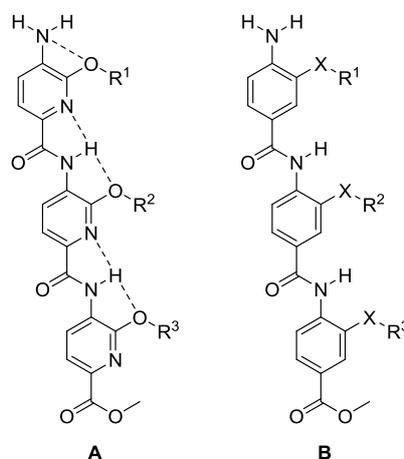


Figure 37. Structures générales d'exemples d'oligoamides aromatiques.

De type pyridylcarboxamide décrites par Hamilton *et coll.* (A) et de type benzénique (B ; dans la structure $X = C, O$ ou S).¹⁸¹

¹⁸⁰ Yin, H.; Frederick, K. K.; Liu, D.; Wand, A. J.; Degrado, W. F. Arylamide Derivatives as Peptidomimetic Inhibitors of Calmodulin. *Org. Lett.* **2006**, *8* (2), 223–225.

¹⁸¹ Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α -Helix-Mediated Protein-Protein Interactions Using Designed Molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 161–173.

3. 4. 3. Les oligopyridines

Hamilton et ses collaborateurs ont conçu des oligopyridines issues du squelette 3,2',2''-terphényle, dans lequel les phényles sont remplacés par des pyridines (Figure 38).¹⁸² Cette modification impose une rigidité structurale limitant les variations d'orientation des chaînes latérales. La torsion entre deux cycles aromatiques adjacents est influencée par deux facteurs compétitifs. Premièrement, les interactions π entre les cycles aromatiques adjacents, et deuxièmement la répulsion stérique entre les hydrogènes et les substituants volumineux en position *ortho*. Le premier facteur favorise un arrangement coplanaire, alors que le deuxième facteur force la molécule à être non plane. L'équilibre entre ces deux facteurs donne à la molécule son caractère hélicoïdal.

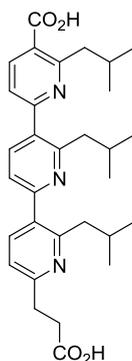


Figure 38. Structure du dérivé terpyridine décrit par Hamilton *et coll.*¹⁸²

3. 4. 4. Les foldamères du CERMN

Pour la plupart, les voies de synthèse des protéomimétiques restent longues et difficiles ; par exemple la synthèse des terpyridines proposée par l'équipe d'Hamilton nécessite quinze étapes.¹⁸² Inspiré par ces travaux, notre laboratoire s'est intéressé en particulier à la synthèse de foldamères abiotiques constitués d'un enchaînement de cycles aromatiques, avec le développement d'une nouvelle voie d'accès appelée « *garlanding* ». ¹⁸³

¹⁸² Davis, J. M.; Truong, A.; Hamilton, A. D. Synthesis of a 2,3';6',3''-Terpyridine Scaffold as an Alpha-Helix Mimetic. *Org. Lett.* **2005**, 7 (24), 5405–5408.

¹⁸³ a) Voisin-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 ; b) Voisin-Chiret, A. S.; Muraglia, M.; Burzicki, G.; Perato, S.; Corbo, F.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Franchini, C.; Rault, S. Synthesis of New Phenylpyridyl Scaffolds Using the Garlanding Approach. *Tetrahedron* **2010**, 66 (40), 8000–8005.

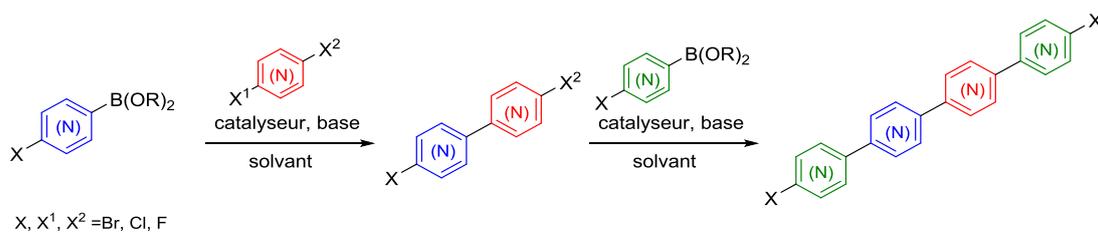


Schéma 2. Le concept de garlanding.^{183b}

Cette stratégie permet de synthétiser de longues chaînes linéaires poly(hétéro)aromatiques par la mise en œuvre d'une succession de réactions de couplage carbone-carbone (C-C) pallado-catalysés de type Suzuki-Miyaura (S-M).

Les couplages itératifs mettent en présence une espèce boronique et un composé dihalogéné : en conditions stœchiométriques, le premier couplage conduit à une espèce halogénée précise qui peut ensuite être engagée dans une deuxième réaction de couplage de type S-M en présence d'une deuxième espèce boronique (Schéma 2).

La régiosélectivité de la réaction de couplage S-M peut être contrôlée en tenant compte de plusieurs paramètres importants :

- Le nombre et la nature des atomes d'halogènes présents sur la pyridine, et leur réactivité dans les couplages de type S-M: I > Br > Cl > F (réactivité décroissante).
- La position des atomes d'halogènes sur le cycle pyridinique, sachant que les positions α et γ sont généralement plus réactives (plus électrophiles) que la position β dans ce type de couplages.

Depuis plus de dix ans, l'équipe de recherche dirigée par le Pr Sylvain Rault, puis le Pr Anne Sophie Voisin-Chiret, s'intéresse à la conception et à la synthèse de structures poly(hétéro)aromatiques mimes d'hélice α .

En 2003, les travaux fondateurs d'Alexandre Bouillon ont défini les possibilités du *garlanding* pour la synthèse d'oligopyridines halogénées.^{183a} Depuis, ce concept a été exploité pour la synthèse d'oligopyridines (dans les travaux de thèse de Grégory Burzicki, 2010),¹⁸⁴ puis pour la synthèse d'oligothiénylpyridines (dans les travaux de thèse de

¹⁸⁴ Burzicki, G. Synthèse de nouvelles oligopyridines potentielles mimes d'hélice alpha et perturbatrices des interactions protéine-protéine. Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie, 2010.

Marcella De Giorgi, 2012)¹⁸⁵ et enfin pour la synthèse d'oligophénylpyridines (dans les travaux de thèse de Serge Perato, 2012).¹⁸⁶ Ces structures ont été proposées comme mimes d'hélices α , et certaines se sont montrées capables de mimer la distribution des chaînes latérales sur une face de l'hélice α ;¹⁸⁷ de plus, certaines oligothiénylpyridines ont la capacité de mimer des brins β (travaux de thèse de Marie Jouanne, 2015).¹⁸⁸

➤ Les oligopyridines

Une étude de faisabilité du concept de *garlanding* a permis l'obtention d'une chimiothèque de 60 nouveaux composés à squelette oligopyridine. Cette méthode de synthèse efficace a permis d'obtenir des structures bis-, ter-, quater-, quinque- et sexi-pyridines, inspirées par les terpyridines décrites par Hamilton et ses collaborateurs¹⁸² (obtenues en trois étapes selon l'approche du *garlanding*).¹⁸⁴

Burzicki *et al.* ont montré, à travers des études de modélisation moléculaire, de RMN et de cristallographie par diffraction des rayons-X, que certaines oligopyridines, diversement substituées, étaient capables de projeter des substituants dans une orientation similaire aux chaînes latérales d'une hélice α . Parmi ces foldamères, la quaterpyridine présentée ci-dessous (Figure 39A), portant deux groupements méthyles en position *méta* sur les deux pyridines centrales, projette ses substituants méthyles dans les positions *i+4* et *i+7* à la manière d'une hélice α (Figure 39C).¹⁸⁹ Les angles de torsion préférentiels entre les deux cycles aromatiques substitués, ont été prédits entre 30 ° et 60 °, avec une petite barrière

¹⁸⁵ De Giorgi, M. Design and synthesis of novel thienylpyridyl oligomers as alpha helix mimetics with protein-protein interaction disrupting activity and possible biological applications. Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie en cotutelle avec l'Université de Bari (Italie), **2012**.

¹⁸⁶ a) Perato, S. Synthèses et études structurales de nouvelles oligophénylpyridines comme mimes d'hélice α . Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie, **2012** ; b) Perato, S.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Legay, R.; Oulyadi, H.; Rault, S. Synthesis of New Linear Poly(Phenylpyridyl) Chains. *Tetrahedron* **2012**, *68* (7), 1910–1917 ; c) Perato, S.; Fogha, J.; Sebban, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Oulyadi, H.; Rault, S. Conformation Control of Abiotic α -Helical Foldamers. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (10), 2671–2680.

¹⁸⁷ Voisin-Chiret, A. S.; Burzicki, G.; Perato, S.; De Giorgi, M.; Franchini, C.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Rault, S. Aromatic Garlands, as New Foldamers, to Mimic Protein Secondary Structure. *Tetrahedron* **2012**, *68* (23), 4381–4389.

¹⁸⁸ a) Jouanne, M. Conception et Synthèse de Foldamères à visée Thérapeutique. Doctorat de l'Université de Caen Normandie, **2015**. b) Jouanne, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Legay, R.; Coufourier, S.; Rault, S.; Sopková-de Oliveira Santos, J. S. O. β -Strand Mimicry: Exploring Oligothiénylpyridine Foldamers. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *34*, 5686–5696.

¹⁸⁹ a) Burzicki, G.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Rault, S. Synthesis of Dihalo Bi- and Terpyridines by Regioselective Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron* **2009**, *65* (27), 5413-5417; b) Burzicki, G.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopková de Oliveira Santos, J.; Rault, S. Synthesis of New [2,3':6',3''] Terpyridines Using Iterative Cross-Coupling Reactions. *Synthesis* **2010**, *16*, 2804-2810; c) Sopková 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 characterisations of oligopyridyl foldamers, alpha helix mimetics. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (2), 429-439.

énergétique (3 kcal/mol), qui peut être comparée à l'angle de torsion entre les chaînes latérales des résidus $i+4$ et $i+7$ d'une hélice α polyalanine (60 °).

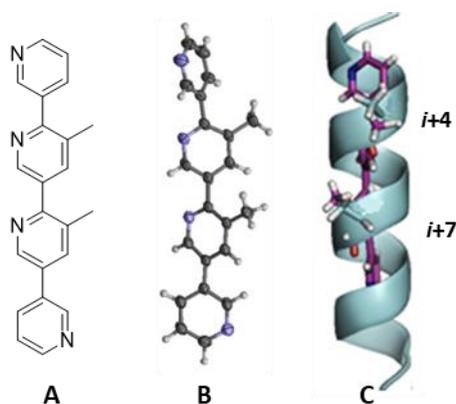


Figure 39. Quaterpyridine diméthylée mime d'hélice α .

A) Structure plane ; B) structure cristallographique ; C) superposition de la structure cristallographique avec une hélice α .¹⁹⁰

La possibilité d'obtenir des structures mimes d'hélice α en utilisant une méthode efficace telle que le *garlanding* a permis l'obtention d'une chimiothèque comptant actuellement plus de 200 composés poly(hétéro)aromatiques. Ces composés ont fait, et font encore l'objet, d'études dans le cadre de la conception de perturbateurs d'IPPs ciblant les protéines des voies de signalisation de l'apoptose.¹⁹¹

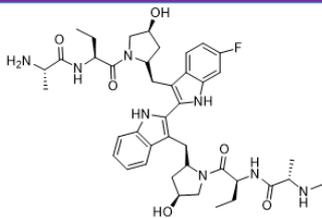
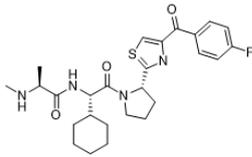
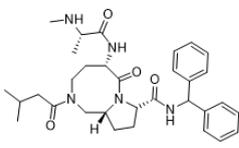
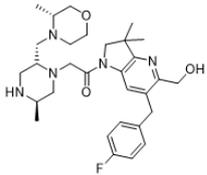
¹⁹⁰ Sopková-de Oliveira Santos, J.; Voisin-Chiret, A. S.; Burzicki, G.; Sebaoun, L.; Sebban, M.; Lohier, J.-F.; Legay, R.; Oulyadi, H.; Bureau, R.; Rault, S. Structural Characterizations of Oligopyridyl Foldamers, α -Helix Mimetics. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (2), 429–439.

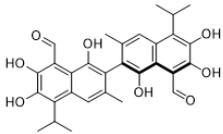
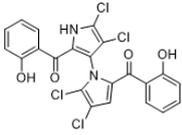
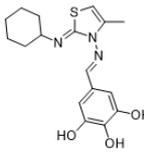
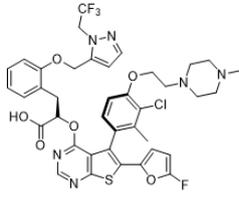
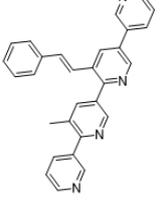
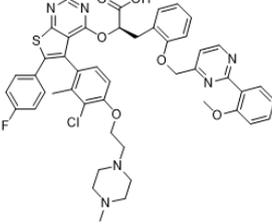
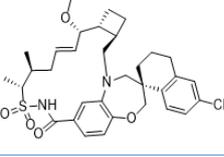
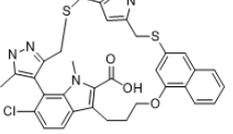
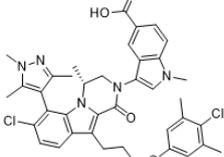
¹⁹¹ De Giorgi, M.; Voisin-Chiret, A. S.; Rault, S. Targeting the BH3 Domain of Bcl-2 Family Proteins. A Brief History from Natural Products to Foldamers as Promising Cancer Therapeutic Avenues. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (24), 2964–2978.

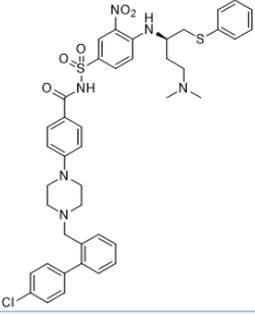
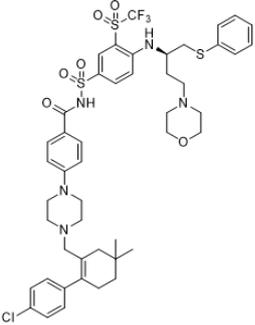
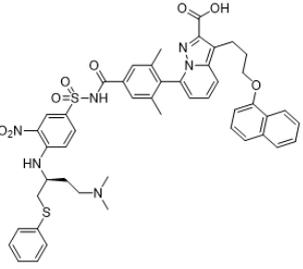
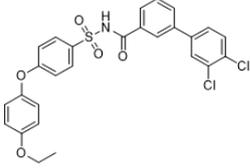
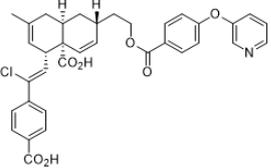
4. Contexte de la découverte de quelques perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliqués dans l'apoptose

Nous allons à présent concentrer notre intérêt sur les perturbateurs d'IPPs impliquées dans l'apoptose, concernant plus particulièrement nos protéines cibles (Mcl-1, Bcl-x_L et XIAP). Plusieurs exemples tirés de la littérature seront présentés dans le *tableau 2*. Les démarches scientifiques qui ont mené à la découverte du Debio1143 (inhibiteur de XIAP), de l'ABT-737 (inhibiteur de Bcl-x_L), du pyridoclax et de S65845 (inhibiteurs de Mcl-1), et enfin de trois molécules duales (inhibiteurs de Mcl-1 et Bcl-x_L) seront détaillées.

Tableau 2. Exemples de perturbateurs d'IPPs impliquées dans l'apoptose, retrouvés dans la littérature.

Protéines cibles	Nom	Structure	Affinité	Stade	Ref.
XIAP	Birinapant		$K_d = 45 \text{ nM}$ (FPA)	Clinique I/II	TetraLogic®
	LCL-161		/	Clinique II	Novartis®
	Debio1143		$K_i = 66,4 \text{ nM}$ (FPA)	Clinique II	Wang <i>et coll.</i>
	ASTX660		$CE_{50} = 5,1 \text{ nmol/L}$	Clinique I/II	Astex®

Protéines cibles	Nom	Structure	Affinité	Stade	Ref.
Mcl-1	AT-101		$K_i = 180$ nM (FPA)	arrêté	Wang <i>et al.</i>
	Maritoclax		$Cl_{50} = 10,1$ μ M (ELISA)	arrêté	Doi <i>et al.</i>
	MIM1		$Cl_{50} = 4,8$ μ M (FPA)	arrêté	Cohen <i>et al.</i>
	S63845		$K_i < 1,2$ nM (FPA)	préclinique	Servier®
	Pyridoclax		$K_D = 25$ nM (SPR)	préclinique	C.E.R.M.N.
	MIK665		/	Clinique I	Novartis® Servier®
	AMG-176		$K_i = 50$ pM (FPA)	Clinique I	Amgen®
	AZD5991		$K_i = 0,13$ nM (FPA)	Clinique I	AstraZeneca®
	VU661013		$K_i = 97 \pm 30$ pM (TR-FRET)	préclinique	Savona <i>et coll.</i>

Protéines cibles	Nom	Structure	Affinité	Stade	Ref.
Bcl-x _L	ABT-737		K _i = < 1 nM (FRET)	Clinique II	Abbott®
	ABT-263		K _i = 48 nM (FRET)	Clinique II	Abbott®
Mcl-1/Bcl-x _L	Tanaka et al.		K _i = 88 nM/3, 7 nM (TR-FRET)	arrêté	Tanaka et al.
	Rega et al.		K _i = 140 nM/86 nM (FPA)	arrêté	Rega et al.
	Roussi et coll.		K _i = 106 nM/153 nM (FPA)	arrêté	Roussi et coll.

4. 1. Debio1143 : inhibiteur de XIAP

L'interaction de la protéine Smac avec XIAP permet de lever l'inhibition des caspases et rétablir l'apoptose.^{192, 104b} Les mimes de la protéine Smac retrouvés dans la littérature sont généralement inspirés de la séquence peptidique AVPI, et on distingue des mimes peptidiques¹⁹² et peptidomimétiques.^{193, 194} On retrouve également des structures abiotiques non inspirées par la structure du térapeptide AVPI.¹⁹⁵

Le composé AT-406 également appelé SM-406 ou Debio1143, conçu par l'équipe de Wang à l'Université de Michigan (USA), est un composé peptidomimétique monovalent, mime de la protéine Smac. Il est actuellement évalué dans un essai clinique de phase II pour le traitement de différents cancers (dont le cancer de l'ovaire, des trompes de Fallope, de l'endomètre, et de la tête et du cou) en association avec d'autres molécules anticancéreuses et de la radiothérapie.¹⁹⁶

La découverte du Debio1143 est issue d'une étude de *Structure-Based Drug Design*. En 2000, une importante étude menée par Fesik et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence les interactions clés impliquées dans le complexe XIAP-BIR3/AVPI. La structure RMN du complexe a mis en évidence l'importance des interactions des résidus d'alanine (A1) et proline (P3) avec le domaine BIR3, ainsi que l'interaction hydrophobe de la chaîne latérale du résidu d'isoleucine (I4) avec une poche du domaine BIR3 (Figure 40).^{115a}

¹⁹² Oost, T. K.; Sun, C.; Armstrong, R. C.; Al-Assaad, A.-S.; Betz, S. F.; Deckwerth, T. L.; Ding, H.; Elmore, S. W.; Meadows, R. P.; Olejniczak, E. T.; *et al.* Discovery of Potent Antagonists of the Antiapoptotic Protein XIAP for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (18), 4417–4426.

¹⁹³ Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Xu, L.; Tomita, Y.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Wang, S. Structure-Based Design, Synthesis, and Evaluation of Conformationally Constrained Mimetics of the Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase That Target the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein/Caspase-9 Interaction Site. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (17), 4147–4150.

¹⁹⁴ a) Cai, Q.; Sun, H.; Peng, Y.; Lu, J.; Nikolovska-Coleska, Z.; McEachern, D.; Liu, L.; Qiu, S.; Yang, C.-Y.; Miller, R.; *et al.* A Potent and Orally Active Antagonist (SM-406/AT-406) of Multiple Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) in Clinical Development for Cancer Treatment. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2714–2726 ; b) Condon, S. M.; Mitsuuchi, Y.; Deng, Y.; LaPorte, M. G.; Rippin, S. R.; Haimowitz, T.; Alexander, M. D.; Kumar, P. T.; Hendi, M. S.; Lee, Y.-H.; *et al.* Birinapant, a Smac-Mimetic with Improved Tolerability for the Treatment of Solid Tumors and Hematological Malignancies. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (9), 3666–3677.

¹⁹⁵ a) Chessari, G.; Buck, I. M.; Day, J. E. H.; Day, P. J.; Iqbal, A.; Johnson, C. N.; Lewis, E. J.; Martins, V.; Miller, D.; Reader, M.; *et al.* Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins: Discovery of a Non-Alanine Lead Series with Dual Activity Against cIAP1 and XIAP. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6574–6588 ; b) Tamanini, E.; Buck, I. M.; Chessari, G.; Chiarparin, E.; Day, J. E. H.; Frederickson, M.; Griffiths-Jones, C. M.; Hearn, K.; Heightman, T. D.; Iqbal, A.; *et al.* Discovery of a Potent Nonpeptidomimetic, Small-Molecule Antagonist of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (11), 4611–4625. c) Ward, G. A.; Lewis, E. J.; Ahn, J. S.; Johnson, C. N.; Lyons, J. F.; Martins, V.; Munck, J. M.; Rich, S. J.; Smyth, T.; Thompson, N. T.; *et al.* ASTX660, a Novel Non-Peptidomimetic Antagonist of cIAP1/2 and XIAP, Potently Induces TNF- α Dependent Apoptosis in Cancer Cell Lines and Inhibits Tumor Growth. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17* (7), 1381–1391.

¹⁹⁶ <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02022098>, page consultée le 20/05/2018

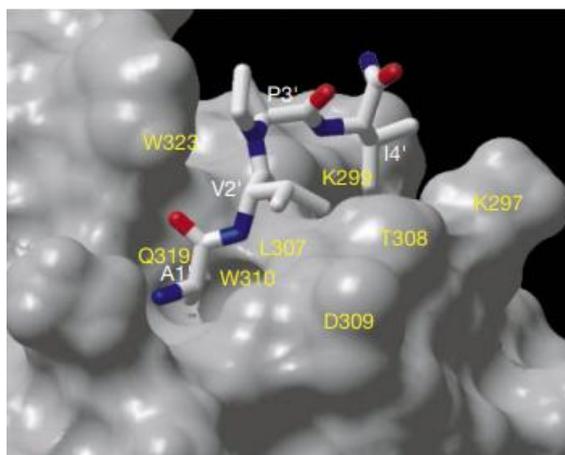


Figure 40. Représentation de la surface d'interaction du complexe XIAP-BIR3/AVPI.^{115a}

La mise en évidence de ces interactions a servi de point de départ à différents groupes de recherche pour concevoir des structures peptidomimétiques du térapeptide AVPI de la protéine Smac.

Les travaux de Fesik et ses collaborateurs, suggèrent que le carbonyle du résidu I4 de la protéine Smac n'est pas engagé dans des interactions spécifiques avec XIAP-BIR3.¹¹⁵ De plus, le remplacement de ce résidu par des groupements hydrophobes, tels que la benzylamine, améliore l'affinité du composé pour le domaine BIR3 de la protéine XIAP. Ces observations ont conduit Wang et ses collaborateurs à synthétiser le composé W01 (Figure 41B) qui présente une affinité pour le domaine BIR3 de la protéine XIAP de 0,29 μM (calculée par FPA), deux fois supérieure à celle du peptide AVPI naturel ($K_i = 0,58 \mu\text{M}$).¹⁹³

La stabilité *in vivo*, la perméabilité cellulaire et la biodisponibilité de ces composés peptidomimétiques, issus de la structure du térapeptide AVPI, peuvent être améliorés par l'introduction de contraintes conformationnelles. La cyclisation de la chaîne latérale du résidu V2 avec le cycle du résidu P3 permet la formation d'un bicyclic (type azabicyclo[4.3.0]alcane). Le groupe de recherche de Wang a mis en évidence, au travers d'études de modélisation moléculaire, dont les résultats ont été confirmés par FPA, que la stéréochimie du bicyclic formé était discriminante pour l'activité du composé.¹⁹³ En effet, le composé W02 (Figure 41C), présentant une configuration *R* du carbone en jonction de cycles (C6, en figure 40), présente un K_i de 4,47 μM tandis que son isomère *S* (le composé W03 en figure 41D) présente un $K_i > 100 \mu\text{M}$.¹⁹³

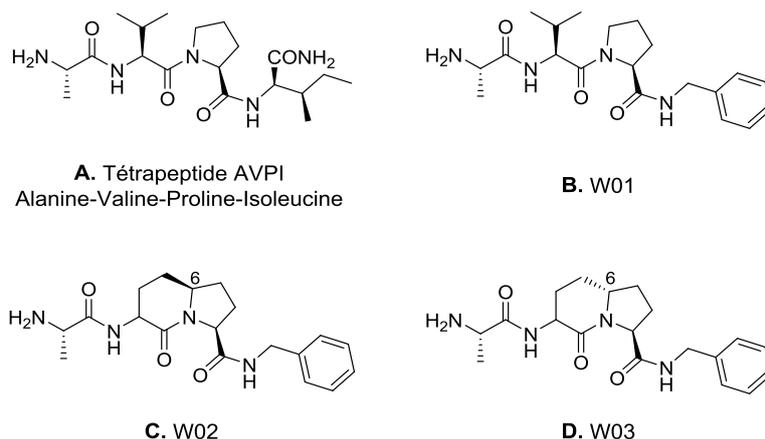


Figure 41. Structures de mimes de Smac conçus par Wang et al.¹⁹⁷

A) Structure du tétrapeptide AVPI. B) Structure du composé W01, obtenu par remplacement du résidu I4 par la benzylamine. C) Structure du composé W02, mime bicyclique contraint du tétrapeptide AVPI avec configuration *R* de C6. D) Structure du composé W03, mime bicyclique contraint du tétrapeptide AVPI avec configuration *S* de C6.

La structure *in silico* du complexe XIAP-BIR3/W02 (Figure 42A), montre que le groupement méthyle du résidu A1 et le groupement benzyle terminal se lient au domaine BIR3 en se plaçant dans des poches hydrophobes, conférant au complexe une importante stabilité.¹¹⁵

Cependant la structure azabicyclo[4.3.0]alcane du composé W02 ne se superpose pas parfaitement avec le tétrapeptide AVPI dans le complexe avec XIAP-BIR3 ; l'introduction d'un atome de carbone supplémentaire, conduit à une structure de type azabicyclo[5.3.0]alcane qui permet d'obtenir le composé W04 (Figure 42B) capable de mimer parfaitement *in silico* les interactions du tétrapeptide AVPI avec XIAP-BIR3 et possédant un K_i de 150 nM (calculé par FPA).¹⁹⁷

¹⁹⁷ Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Xu, L.; Liu, M.; Tomita, Y.; Pan, H.; Yoshioka, Y.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; et al. Structure-Based Design of Potent, Conformationally Constrained Smac Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (51), 16686–16687.

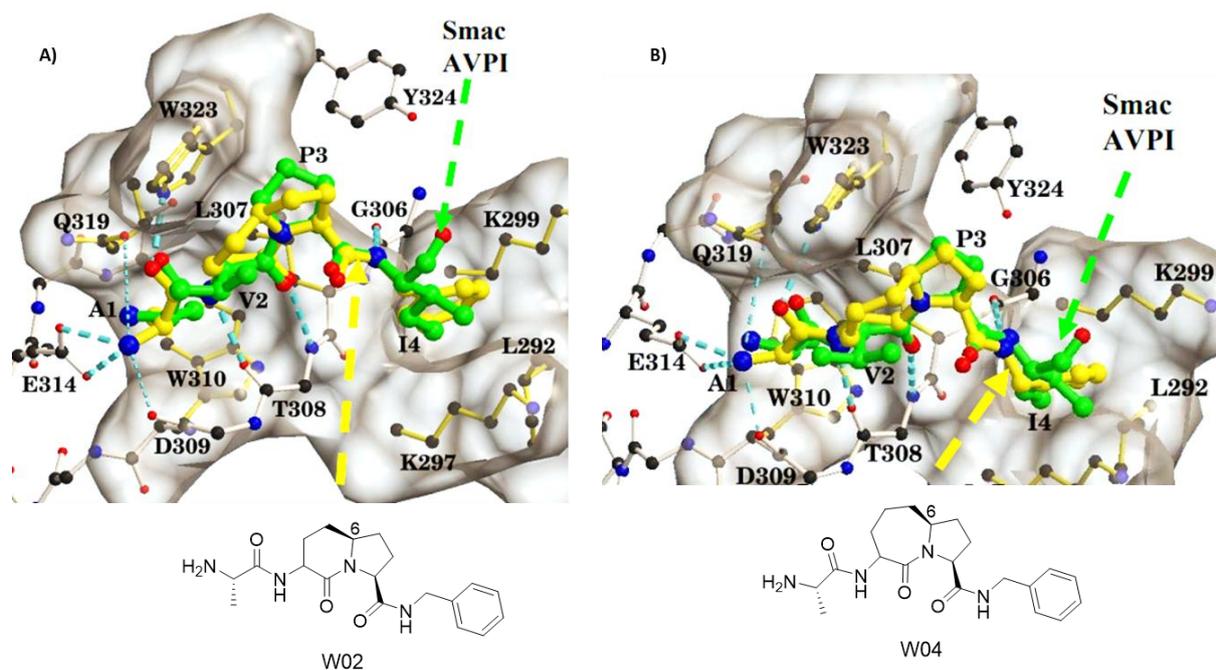


Figure 42. Complexes de XIAP-BIR3 avec W02 et W04 et AVPI.

A) Superposition des complexes d'interaction du térapeptide AVPI et du composé W02 avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP. B) Superposition des complexes d'interaction du térapeptide AVPI et composé W04 avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP. En vert : la structure cristallographique de AVPI ; en jaune : la structure *in silico* de W02 ou W04, les structures des composés sont présentées.¹⁹⁷

Des modifications structurales du composé W04, réalisées sur la base des relations structure-activité (RSA) obtenues pour le composé W02, ont permis d'obtenir le composé W05 (Figure 43A) se liant à XIAP-BIR3 avec un K_i de 25 nM.¹⁹⁷ Cependant, ce composé présente une mauvaise pénétration cellulaire, probablement liée à la présence dans sa structure d'une fonction amine primaire chargée positivement à pH physiologique. Le remplacement de cette amine primaire par une fonction amine secondaire *N*-méthylée a permis d'obtenir le composé W06 (Figure 43B) se liant à XIAP-BIR3 avec un K_i de 61 nM ; l'introduction d'un atome de carbone supplémentaire a abouti à l'obtention d'une structure de type azabicyclo[6.3.0]alcane (composé W07 en figure 43C) se liant à XIAP-BIR3 avec un K_i de 26 nM.¹⁹⁸

¹⁹⁸ Sun, H.; Stuckey, J. A.; Nikolovska-Coleska, Z.; Qin, D.; Meagher, J. L.; Qiu, S.; Lu, J.; Yang, C.-Y.; Saito, N. G.; Wang, S. Structure-Based Design, Synthesis, Evaluation, and Crystallographic Studies of Conformationally Constrained Smac Mimetics as Inhibitors of the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7169–7180.

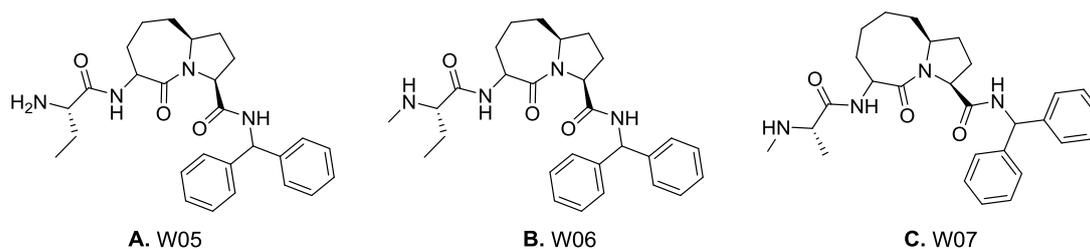


Figure 43. Structures de mimes contraints de Smac conçus par Wang et coll.¹⁹⁷

Des modifications du cycle à 8 membres (par introduction d'hétéroatomes) ont été envisagées pour améliorer la biodisponibilité par voie orale et les paramètres pharmacocinétiques du composé W07. Ces modifications ont permis la découverte du Debio1143 (Figure 44).

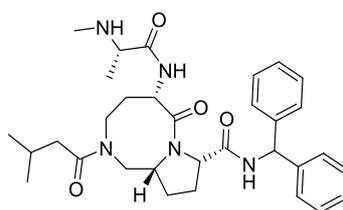


Figure 44. Structure du Debio1143.

Ce composé se lie aux domaines BIR3 de XIAP et cIAP1/2 avec des K_i respectifs de 66,4 nM, 1,9 nM et 5,1 nM (tandis que le térapeptide AVPI se lie avec ces trois domaines avec des K_i respectifs de 3,6 μ M, 184 nM et 316 nM). Le Debio1143 permet de rétablir l'apoptose caspase-9 dépendante à une concentration de 1 μ M (*cell-free functional assay*) ; il inhibe la croissance des cellules cancéreuses ovariennes (dans la lignée cellulaire SKOV3) avec une CI_{50} de 142 nM. De plus il présente un excellent profil pharmacocinétique et une bonne biodisponibilité par voie orale.^{194a}

Le Debio1143 a validé les essais cliniques de phase I/II menés dans le cadre du traitement des cancers de l'ovaire, et il est, depuis juin 2016, en phase II d'évaluation clinique, où il est évalué dans le traitement du cancer de l'ovaire épithélial récidivant, en association avec le paclitaxel et le carboplatine.¹⁹⁹

¹⁹⁹ a) Thibault, B.; Genre, L.; Broca, C.; Barbier, M.; Zanna, C.; Vuagniaux, G.; Delord, J.-P.; Couderc, B. Abstract 2700: The IAP Inhibitor Debio 1143 Reverses Carboplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells by Inducing Both Apoptosis and Necroptosis. *Cancer Res.* **2015**, 75 (15 Supplement), 2700; b) Rechavi-Robinson, D.; Wiedemann, N.; Schusterbauer, C.; Rigotti, S.; Brichory, F.; Vuagniaux, G. Chemosensitization to Carboplatin and Paclitaxel by IAP Inhibitor Debio 1143 in Ovarian Cancer Cell Lines: Signature Identification for Potential Patient Stratification. *Eur. J. Cancer* **2016**, 69, S134 ; c) Brunckhorst, M. K.; Lerner, D.; Wang, S.; Yu, Q. AT-406, an Orally Active Antagonist of Multiple Inhibitor of Apoptosis Proteins, Inhibits Progression of Human Ovarian Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, 13 (9), 804–811.

4. 2. ABT-737 : inhibiteur de Bcl-x_L

Parmi les inhibiteurs des IPPs entre les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, présents dans la littérature, on retrouve l'ABT-737. Cette molécule inhibe l'activité anti-apoptotique de la protéine Bcl-x_L, et elle est actuellement utilisée en clinique pour le traitement de leucémies, de lymphomes et de différentes tumeurs solides.

Les *hot spots* de la protéine Bcl-x_L ont été identifiés par *scanning* alanine du complexe de la protéine avec le peptide Bak.⁵⁶ Cela a permis d'identifier les résidus nécessaires à l'IPP : des mutations des quatre résidus hydrophobes h1-h4 (Val⁷⁴, Leu⁷⁸, Ile⁸¹ et Ile⁸⁵) sur l'hélice α du peptide Bak, situés dans les poches hydrophobes (p1-p4) de la protéine Bcl-x_L, réduisent l'affinité du complexe. En particulier, les mutations des résidus h2 et h4 et du résidu Asp⁸³, qui forment un pont salin avec le résidu Arg¹³⁹ de la protéine Bcl-x_L, affectent fortement l'affinité du complexe (Figure 45).

Bak peptide	K _D (μ M)	Fold-loss
GQVGRQLAIIIGDDINR	0.3	-
GQ A GRQLAIIIGDDINR	15.0	50
GQVGRQ A AIIGDDINR	270.0	900
GQVGRQLAI A GDDINR	17.0	57
GQVGRQLAIIIG A DINR	41.0	137
GQVGRQLAIIIGDD A NR	93.0	310
h1 h2 h3 h4		
74 78 81 83 85		

Figure 45. *Scanning* alanine du peptide Bak lié à la protéine Bcl-x_L.²⁰⁰

Le *screening* RMN de plus de 10 000 fragments (MM \approx 210 g/mol) a permis d'identifier des fragments *hits* (1 et 2 en figure 45) capables d'interagir avec les principaux *hot spots* de la protéine Bcl-x_L, à savoir les poches p2 et p4 et le résidu Arg¹³⁹.²⁰¹ Les efforts dans la recherche d'un *linker* entre les différents fragments ont mis en évidence une contrainte structurale (imposée par le résidu Phe⁹⁷ dans la poche p4 de la protéine Bcl-x_L) responsable d'une faible activité des composés obtenus. Pour surmonter cette contrainte, des modifications à partir du fragment 1 visant à substituer l'acide benzoïque par des

²⁰⁰ Wendt, M. D. The Discovery of Navitoclax, a Bcl-2 Family Inhibitor. In Protein-Protein Interactions; Wendt, M. D., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2012**; Vol. 8, pp 231–258.

²⁰¹ Oltersdorf, 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.; *et al.* An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Induces Regression of Solid Tumours. *Nature* **2005**, *435* (7042), 677–681.

groupements isostères ont été réalisées. Le dérivé acylsulfonamide obtenu a ainsi présenté une affinité de liaison pour la protéine proche de celle du fragment 1 ; la flexibilité apportée par ce groupement permet de surmonter la contrainte imposée par le résidu Phe⁹⁷, ce qui rend l'interaction possible avec la poche P4. Des modifications réalisées de ce composé ont permis l'obtention du composé *lead* 3 (Figure 46).²⁰²

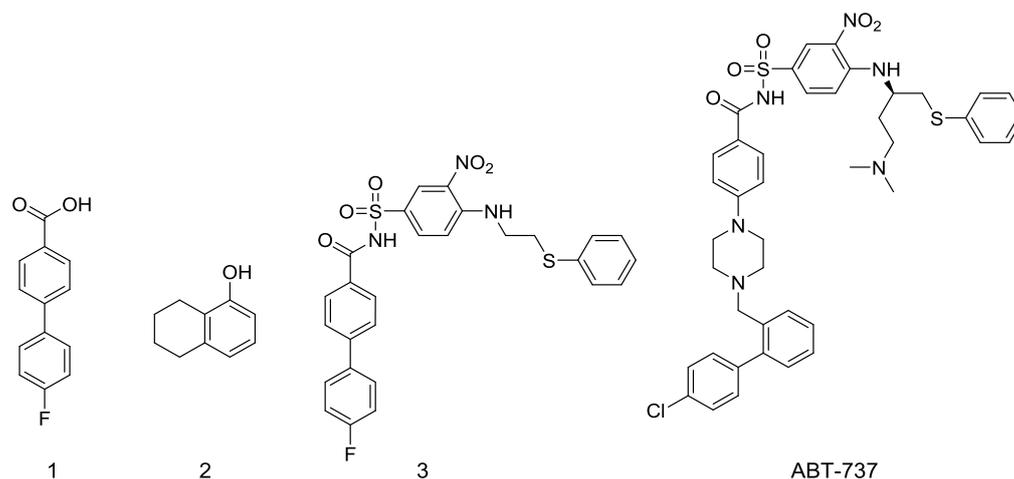


Figure 46. Structures des fragments hits (1 et 2), du composé *lead* (3) et de l'ABT-737.²⁰⁰

Le composé *lead* 3 présentait une bonne constante d'affinité pour la protéine Bcl-x_L (K_i = 63 nM, FPA). Cependant en présence de 1 % d'albumine sérique humaine (HSA, *human serum albumin*) cette affinité était perdue au profit de la liaison du *lead* 3 à l'albumine.²⁰³ Ceci se traduit par une réduction de l'interaction du *lead* avec la protéine Bcl-x_L. Des modifications de la structure du *lead* ont été effectuées pour supprimer son affinité pour l'albumine humaine, telles que l'introduction de groupements polaires²⁰⁴ et la modification du biphényle terminal. Ces modifications ont permis d'accéder à la structure de l'ABT-737. Les études cristallographiques et par RMN du complexe Bcl-x_L/ABT-737 ont mis en évidence l'interaction des groupements chlorobiphényle et thiophényle de la molécule avec, respectivement, les poches p2 et p4 de la protéine Bcl-x_L. Cependant, la molécule n'interagit pas avec la poche p1 et l'Arg¹³⁹ de la protéine (Figure 47B), bien qu'elle soit

²⁰² Wendt, M. D.; Shen, W.; Kunzer, A.; McClellan, W. J.; Bruncko, M.; Oost, T. K.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Zhang, H.; Nimmer, P. M.; *et al.* Discovery and Structure–Activity Relationship of Antagonists of B-Cell Lymphoma 2 Family Proteins with Chemopotentiation Activity in Vitro and in Vivo. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (3), 1165–1181.

²⁰³ a) Mao, 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 ; b) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. Crystal Structure of Human Serum Albumin Complexed with Fatty Acid Reveals an Asymmetric Distribution of Binding Sites. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (9), 827–835.

²⁰⁴ Hajduk, P. J.; Mendoza, R.; Petros, A. M.; Huth, J. R.; Bures, M.; Fesik, S. W.; Martin, Y. C. Ligand Binding to Domain-3 of Human Serum Albumin: A Chemometric Analysis. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2003**, *17* (2–4), 93–102.

capable de former un pont hydrogène avec le résidu Gly¹³⁸.²⁰⁵ L'ABT-737 est donc un mime fonctionnel et non structural du domaine BH3 du peptide Bax (Figure 47).

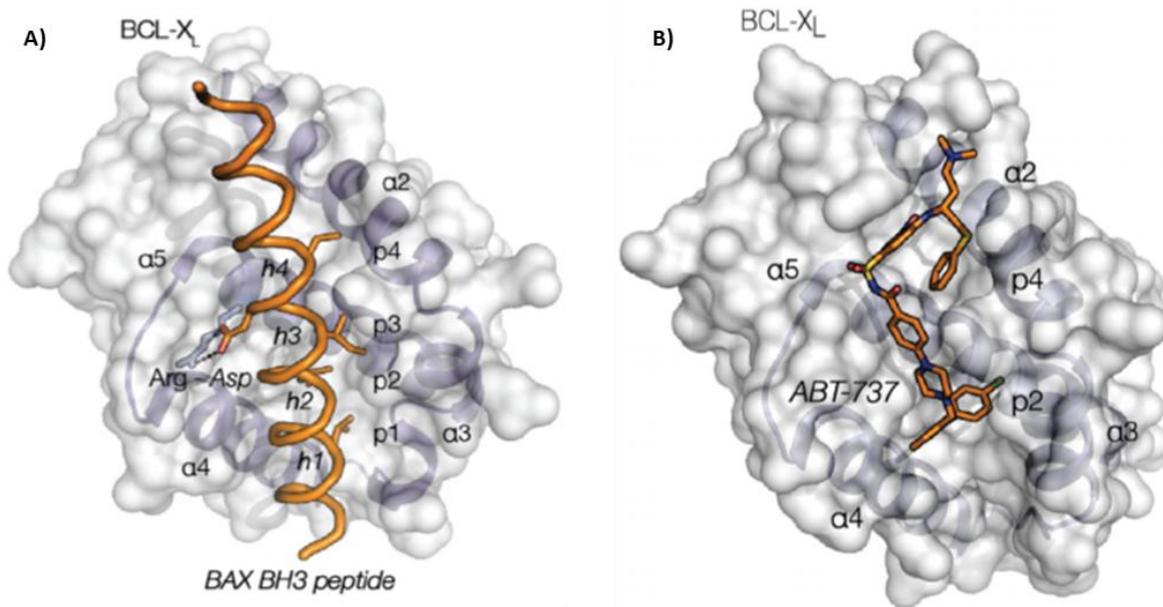


Figure 47. Structure RMN du complexe A) Bcl-x_L/BH3-Bax et B) Bcl-x_L/ABT-737.

L'ABT-737 n'interagit pas avec la poche p1 et l'Arg¹³⁹.⁵⁴

Des modifications de la structure de l'ABT-737 ont été effectuées pour améliorer sa solubilité dans l'eau en vue d'une administration par voie orale. Ces modifications ont permis d'obtenir l'ABT-236, ou navitoclax (Figure 48A).

Cette molécule présente une faible vitesse d'absorption, une meilleure distribution dans les tissus, une meilleure stabilité métabolique et une plus faible charge à pH physiologique. Le navitoclax présente la même sélectivité et activité inhibitrice que l'ABT-737 envers les protéines Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w, avec un $K_i \approx 80$ pM (obtenu par FRET, *Fluorescence resonance energy transfer*) calculé pour les trois protéines.²⁰⁶ Le navitoclax s'est révélé prometteur dans le traitement de plusieurs cancers, dont les cancers de l'ovaire.²⁰⁷ Malheureusement les fortes doses de navitoclax utilisées ont entraîné une

²⁰⁵ Lee, 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.

²⁰⁶ a) Park, C.-M.; Bruncko, M.; Adickes, J.; Bauch, J.; Ding, H.; Kunzer, A.; Marsh, K. C.; Nimmer, P.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; et al. Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (21), 6902–6915; b) Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; et al. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **2008**, *68* (9), 3421–3428.

²⁰⁷ Wong, M.; Tan, N.; Zha, J.; Peale, F. V.; Yue, P.; Fairbrother, W. J.; Belmont, L. D. Navitoclax (ABT-263) Reduces Bcl-x(L)-Mediated Chemoresistance in Ovarian Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (4), 1026–1035.

thrombocytopénie transitoire chez les patients, due à l'inhibition de la protéine Bcl-x_L dans les plaquettes vieillissantes, ce qui limite son utilisation.

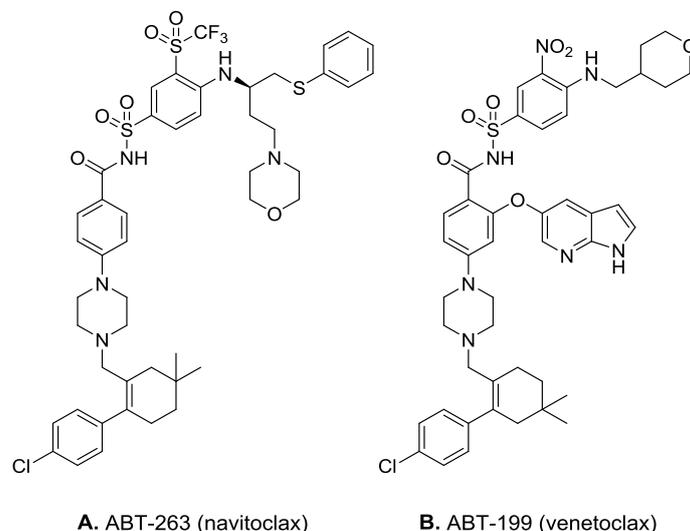


Figure 48. ABT-236 (A) ; et l'ABT-199 (B).

Pour surmonter cet effet secondaire, les laboratoires AbbVie® ont développé une nouvelle molécule à partir de la structure du navitoclax, l'ABT-199 ou venetoclax (Figure 48B).²⁰⁸ Cette molécule se lie fortement à la protéine Bcl-2 ($K_i < 0,01$ nM) et plus modérément aux protéines Bcl-x_L ($K_i = 48$ nM) et Bcl-w ($K_i = 245$ nM). Elle est actuellement utilisée en clinique, sous autorisation temporaire d'utilisation, dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.²⁰⁸ Cependant, certains cancers ne peuvent pas être traités par ces composés en monothérapie. Plusieurs études ont montré que la régulation à la hausse de la protéine Mcl-1 est un facteur clé dans le développement de la résistance à l'ABT-737, ABT-263 et l'ABT-199 dans plusieurs types de tumeurs, et que l'inhibition concomitante de Bcl-x_L et Mcl-1 conduit à l'apoptose massive des cellules cancéreuses ovariennes en absence de cisplatine.⁹¹ D'où la nécessité de développer des inhibiteurs de Mcl-1.

4. 3. Inhibiteurs de Mcl-1

La protéine Mcl-1 est surexprimée dans une grande variété de cancers humains, ce qui souligne son rôle central dans la cancérogenèse et son importance en tant que cible thérapeutique.⁷⁸

²⁰⁸ Souers, A. J.; Levenson, J. D.; Boghaert, E. R.; Ackler, S. L.; Catron, N. D.; Chen, J.; Dayton, B. D.; Ding, H.; Enschede, S. H.; Fairbrother, W. J.; *et al.* ABT-199, a Potent and Selective Bcl-2 Inhibitor, Achieves Antitumor Activity While Sparing Platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19* (2), 202–208.

Comme les autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, la protéine Mcl-1 interagit avec l'hélice α du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bim, Bid, Puma et Noxa).

Une analyse cristallographique comparative des cavités hydrophobes des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L a mis en évidence d'importantes différences structurales qui impactent la flexibilité des deux cavités (détaillé au paragraphe 2. 2. 2. du chapitre 1). La cavité hydrophobe de la protéine Bcl-x_L est extrêmement flexible et permet des interactions avec divers ligands, tandis que la cavité hydrophobe de la protéine Mcl-1 est plus rigide.²⁰⁹ Ceci a un fort impact sur le développement d'inhibiteurs sélectifs de Mcl-1 et peut expliquer les difficultés rencontrées par la communauté scientifique à obtenir de tels inhibiteurs. Les composés décrits dans la littérature en tant qu'inhibiteurs sélectifs de la protéine Mcl-1 sont nombreux :^{210, 142, 211} avec des structures chimiques très hétérogènes (composés d'origine naturelle et synthétiques). Cependant, à ce jour, seul 2 molécules (pyridoclax et S63845) sont entrées en phase préclinique, et 3 molécules en phase I d'essais cliniques (MIK665, AMG-176 et AZD5991).

Très récemment Savona et collaborateurs²¹² ont décrit une nouvelle molécule, VU661013, comme un nouvel inhibiteur puissant et sélectif de la protéine Mcl-1. Cette molécule perturbe le complexe Bim/Mcl-1 et, en association au venetoclax (inhibiteur sélectif de Bcl-2), conduit à l'apoptose les cellules de leucémie myéloïde aiguë résistantes au venetoclax.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux composés S63845 et Pyridoclax : en effet, ces deux inhibiteurs de Mcl-1 ont été utilisés comme référence à la fois dans

²⁰⁹ Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Yang, H.; Sleebs, 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. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (44), 30508–30517.

²¹⁰ Belmar, J.; Fesik, S. W. Small Molecule Mcl-1 Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *145*, 76–84.

²¹¹ a) Yap, J. L.; Chen, L.; Lanning, M. E.; Fletcher, S. Expanding the Cancer Arsenal with Targeted Therapies: Disarmament of the Antiapoptotic Bcl-2 Proteins by Small Molecules: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 821–838 ; b) Levenson, J. D.; Zhang, H.; Chen, J.; Tahir, S. K.; Phillips, D. C.; Xue, J.; Nimmer, P.; Jin, S.; Smith, M.; Xiao, Y.; et al. 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*, e1590.

²¹² Ramsey, 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.; et al. A Novel Mcl-1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* **2018**, CD-18-0140.

notre démarche conceptuelle de nouvelles molécules à dualité d'action, et également dans le cadre de l'évaluation de l'activité pro-apoptotique des molécules considérées.

4. 3. 1. S63845

Le composé S63845 est une des deux molécules incluses à ce jour dans un programme d'essai préclinique. Il a été décrit en 2016 par les laboratoires Servier® (Figure 49) comme un inhibiteur puissant et sélectif de la protéine Mcl-1.²¹³

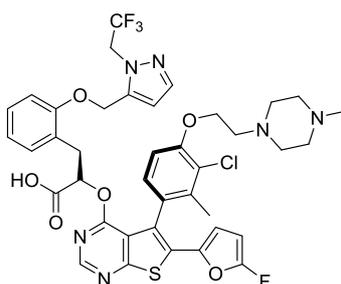


Figure 49. Structure du composé S63845.

La découverte de ce composé fait appel à des approches de *fragment-based* et *structure-based drug design* : l'affinité pour la protéine Mcl-1 d'une librairie de fragments a tout d'abord été évaluée par analyse RMN, selon une approche de *fragment-based drug design* (FBDD). Ensuite, les fragments les plus pertinents ont été liés et modulés, selon une approche de *structure-based drug design* (SBDD), guidée par les données structurales de la protéine.

La structure co-cristalline du complexe S63845/Mcl-1 (Figure 50) montre que le groupement carboxylate de la molécule forme une interaction forte avec l'Arg²⁶³, le noyau aromatique est ancré en profondeur dans la poche hydrophobe P2, tandis que le fragment trifluorométhyle terminal se lie dans la petite poche hydrophobe P4.

²¹³ Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Chanrion, M.; Kelly, G. L.; Gong, J.-N.; Moujalled, D. M.; *et al.* The Mcl-1 Inhibitor S63845 Is Tolerable and Effective in Diverse Cancer Models. *Nature* **2016**, 538 (7626), 477–482.

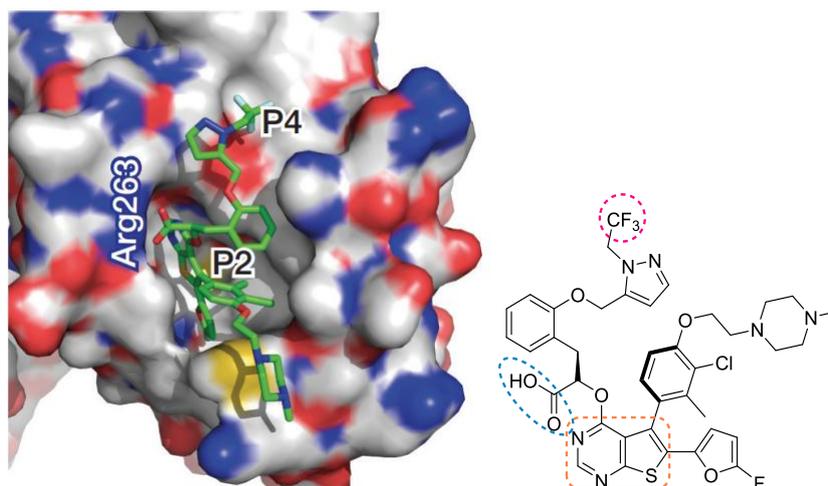


Figure 50. Structure co-cristalline du complexe S63845/Mcl-1.

Le groupement carboxylate (bleu), le noyau aromatique (orange) et le fragment trifluorométhyle (rose) sont mis en évidence.²¹³

Le composé S63845 se lie à la protéine Mcl-1 humaine avec un K_D de 0,19 nM (évalué par SPR) ; il induit de façon puissante la mort des cellules du myélome multiple dépendantes de la protéine Mcl-1 pour leur survie, tandis qu'il impacte peu les cellules dépendantes des protéines Bcl-2 et Bcl-x_L.

De plus, cette molécule perturbe l'interaction des protéines Bak et Bax avec Mcl-1, alors qu'il n'a aucun impact sur l'interaction de ces protéines pro-apoptotiques avec les protéines

Bcl-2 et Bcl-x_L.

En effet, le composé S63845 induit la mort des cellules cancéreuses par activation de la voie apoptotique Bax/Bak-dépendante *via* une inhibition directe et sélective de la protéine Mcl-1 : il induit rapidement la libération du cytochrome *c* par les mitochondries, évènement caractéristique de l'apoptose. De plus, les tests effectués sur des cellules du myélome multiple qui n'expriment pas les protéines Bax et Bak ont montré que ces cellules n'étaient pas sensibles au composé.

L'activité anticancéreuse de S63845 a été testée sur 25 lignées cancéreuses différentes, et 17 de ces lignées cellulaires, dont les cellules cancéreuses ovariennes, se sont avérées très sensibles au traitement par S63845 ($CI_{50} < 0,1 \mu M$).²¹³

Bien que le composé S63845 soit inefficace en monothérapie dans de nombreuses tumeurs solides, des études combinatoires *in vivo*, avec de nombreuses thérapies ciblées, ont montré que le S63845 présente une activité anticancéreuse améliorée s'il est utilisé en plurithérapie, notamment avec des inhibiteurs de kinases,^{213, 214} ainsi qu'avec l'ABT-199 (Vénétoclax, inhibiteur de Bcl-2).²¹⁵

4. 3. 2. Pyridoclax

Plusieurs études ont montré que la surexpression de la protéine Mcl-1 est un facteur clé dans le développement de résistances à l'ABT-737 et à l'ABT-263.²¹⁶ L'activité de ces composés est étroitement liée à la concentration de la protéine Mcl-1. Notre laboratoire, en collaboration avec l'axe BioTICLA de l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE, a précédemment démontré que Bcl-x_L et Mcl-1 coopèrent pour protéger les cellules tumorales contre l'apoptose, et que leur inhibition concomitante entraîne une apoptose massive même en absence de chimiothérapie, alors que la régulation négative de la protéine Bcl-x_L seule ou de la protéine Mcl-1 seule est inefficace.⁹¹ Dans ce contexte, l'équipe du Dr Laurent Poulain de l'Unité ANTICIPE a également montré que la régulation ou l'inactivation de la protéine

Mcl-1 était nécessaire pour sensibiliser les cellules cancéreuses de l'ovaire aux molécules BH3-mimétiques ciblant la protéine Bcl-x_L, telles que l'ABT-737.²¹⁷

Les foldamères du CERMN, de structure oligopyridine et oligophénylpyridine, se sont montrés capables de mimer la distribution des chaînes latérales sur une face d'une hélice α : ils représentent donc des structures appropriées en tant que BH3-mimétiques, pour le

²¹⁴ Merino, D.; Whittle, J. R.; Vaillant, F.; Serrano, A.; Gong, J.-N.; Giner, G.; Maragno, A. L.; Chanrion, M.; Schneider, E.; Pal, B.; *et al.* Synergistic Action of the Mcl-1 Inhibitor S63845 with Current Therapies in Preclinical Models of Triple-Negative and HER2-Amplified Breast Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9* (401).

²¹⁵ Li, Z.; He, S.; Look, A. T. The Mcl-1-Specific Inhibitor S63845 Acts Synergistically with Venetoclax/ABT-199 to Induce Apoptosis in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Leukemia* **2018**.

²¹⁶ a) Konopleva, M.; Contractor, R.; Tsao, T.; Samudio, I.; Ruvolo, P. P.; Kitada, S.; Deng, X.; Zhai, D.; Shi, Y.-X.; Sneed, T.; *et al.* Mechanisms of Apoptosis Sensitivity and Resistance to the BH3 Mimetic ABT-737 in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **2006**, *10* (5), 375–388 ; b) van Delft, M. F.; Wei, A. H.; Mason, K. D.; Vandenberg, C. J.; Chen, L.; Czabotar, P. E.; Willis, S. N.; Scott, C. L.; Day, C. L.; Cory, S.; *et al.* The BH3 Mimetic ABT-737 Targets Selective Bcl-2 Proteins and Efficiently Induces Apoptosis *via* Bak/Bax If Mcl-1 Is Neutralized. *Cancer Cell* **2006**, *10* (5), 389–399 ; c) Tahir, S. K.; Yang, X.; Anderson, M. G.; Morgan-Lappe, S. E.; Sarthy, A. V.; Chen, J.; Warner, R. B.; Ng, S.-C.; Fesik, S. W.; Elmore, S. W.; *et al.* Influence of Bcl-2 Family Members on the Cellular Response of Small-Cell Lung Cancer Cell Lines to ABT-737. *Cancer Res.* **2007**, *67* (3), 1176–1183.

²¹⁷ Simonin, K.; N'Diaye, M.; Lheureux, S.; Loussouarn, C.; Dutoit, S.; Briand, M.; Giffard, F.; Brotin, E.; Blanc-Fournier, C.; Poulain, L. Platinum Compounds Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737 by Modulation of the Mcl-1/Noxa Axis. *Apoptosis* **2013**, *18* (4), 492–508.

développement d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.¹⁸⁷ Un *screening in cellulo* (effectué par BRET) d'une chimiotèque de 60 foldamères a permis d'évaluer la capacité de ces composés à se lier à la protéine Mcl-1, par compétition avec la protéine pro-apoptotique Bim.²¹⁸ Une première étude réalisée à partir d'une banque de 18 composés a permis d'établir les premières relations structure-activité (RSA). En s'inspirant de la structure de la protéine Noxa, inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1 (Figure 51A), la quaterpyridine diméthylée initiale (Figure 51B) a été modulée en substituant l'un des groupements méthyles par un groupement styryle, afin de mimer la chaîne latérale du résidu phénylalanine porté par la protéine BH3-only Noxa en position *i*+7.

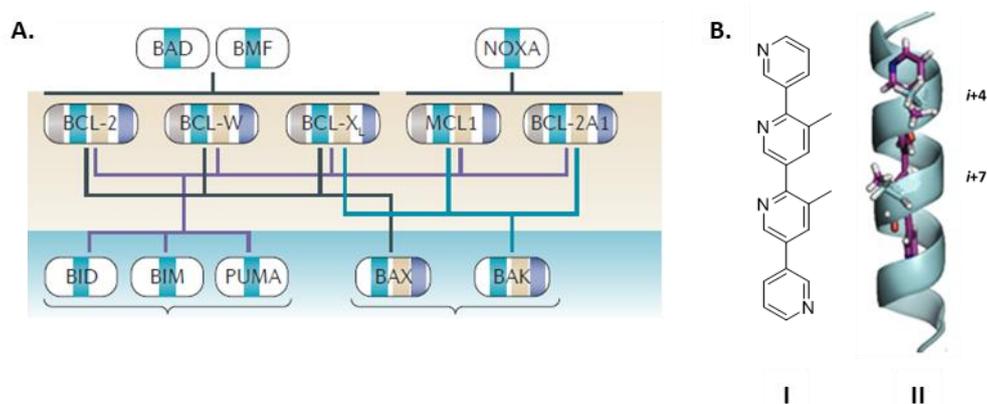


Figure 51. (A) Interactions validées entre les membres de la famille Bcl-2 (représentées par des lignes de connexion). Noxa inhibiteur sélectif de Mcl-1.⁶⁶ (B) Quaterpyridine diméthylée mime d'hélice α . I) Structure plane ; II) superposition de la structure cristallographique avec une hélice α .^{189c}

La molécule obtenue, appelée pyridoclax (Figure 52A), conserve les mêmes valeurs préférentielles des angles de torsion entre les cycles substitués adjacents, que ceux trouvés pour la quaterpyridine diméthylée ($\approx 60^\circ$).²¹⁸

Des études *in silico* du complexe pyridoclax/Mcl-1 ont suggéré que le pyridoclax pouvait adopter deux modes de fixation principales possibles (Figure 52B) : dans les deux modes, le groupement styryle de la molécule se lie dans la poche P2 de la protéine Mcl-1 et, dans cette poche, il établit des interactions π avec la Phe²²⁸ et l'His²²⁴, ainsi qu'une interaction hydrophobe avec la Met²³¹. Selon les différents modes de fixation proposés, le groupement méthyle de la molécule peut être projeté vers la poche P3 de la protéine, ou

²¹⁸ Gloaguen, C.; Voisin-Chiret, A. S.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Fogha, J.; Gautier, F.; De Giorgi, M.; Burzicki, G.; Perato, S.; Pétigny-Lechartier, C.; Simonin-Le Jeune, K.; *et al.* 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.

exposé vers le solvant. Les pyridines terminales, quant à elles, peuvent se trouver proches de l'Arg²⁶³ ou de la Lys²³⁴ : la molécule peut donc projeter indépendamment l'une ou l'autre pyridine terminale vers l'Arg²⁶³ (ou la Lys²³⁴).

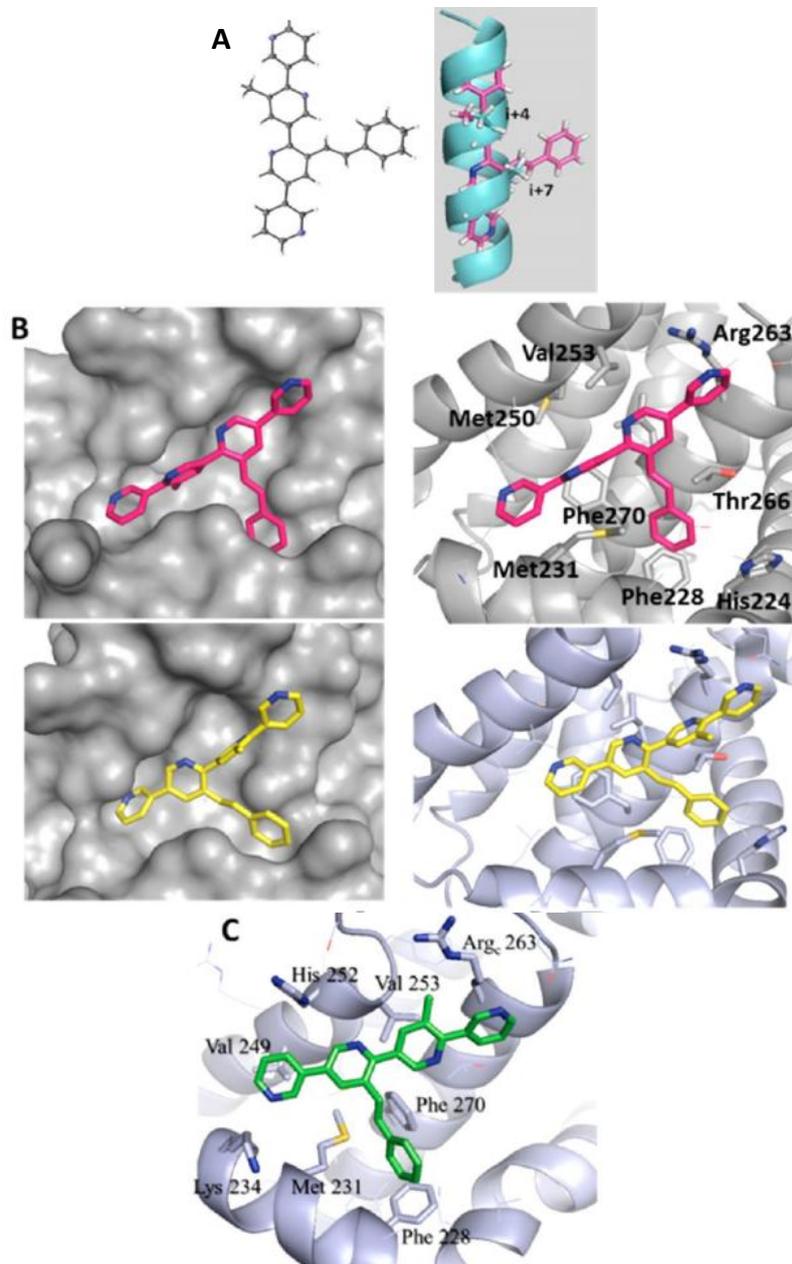


Figure 52. Le pyridoclast.

(A) Structure cristallographique du pyridoclast (à gauche) et sa superposition avec une hélice α (droite). (B) Complexes pyridoclast/hMcl-1 obtenus pour les deux modes de fixation de la molécule. En rose : la pyridine terminale interagit avec l'Arg²⁶³, le méthyle est projeté dans une poche ; en jaune : la molécule est inversée, et l'autre pyridine terminale interagit avec l'Arg²⁶³, le méthyle est exposé vers le solvant. (C) Complexe pyridoclast/hMcl-1 issu d'études dynamiques.²¹⁸

Des simulations de dynamique moléculaire ($t = 20$ ns) ont permis de privilégier l'une des deux orientations de la molécule : le pyridoclax interagit avec la poche P2 de la protéine grâce au groupement styryle, rapproché de la Lys²³⁴, le groupement méthyle est exposé vers le solvant (Figure 52C).

La sélectivité de la molécule pour la protéine Mcl-1 a pu être confirmée à l'aide de tests utilisant la technique de SPR. Ces tests ont permis de déterminer une constante d'affinité du pyridoclax pour la protéine Mcl-1 de l'ordre du nM ($K_D = 25$ nM), tandis qu'aucune affinité n'a pu être déterminée pour la protéine Bcl-x_L. De plus, il a été montré que le pyridoclax rompt le complexe Mcl-1/Bim à 10 μ M, avec un effet dose-dépendant qui est maximisé à 25 μ M. Enfin, des études *in cellulo* (cellules du carcinome ovarien, IGROV1-R10 et SKOV3) ont montré que le pyridoclax utilisé en agent seul n'est pas capable d'induire la mort cellulaire (Figure 53, courbes bleue), tandis que lorsqu'il est combiné à des thérapies ciblant la protéine Bcl-x_L (siXL1 ou l'ABT-737) l'apoptose est massive (Figure 53, courbes rose).

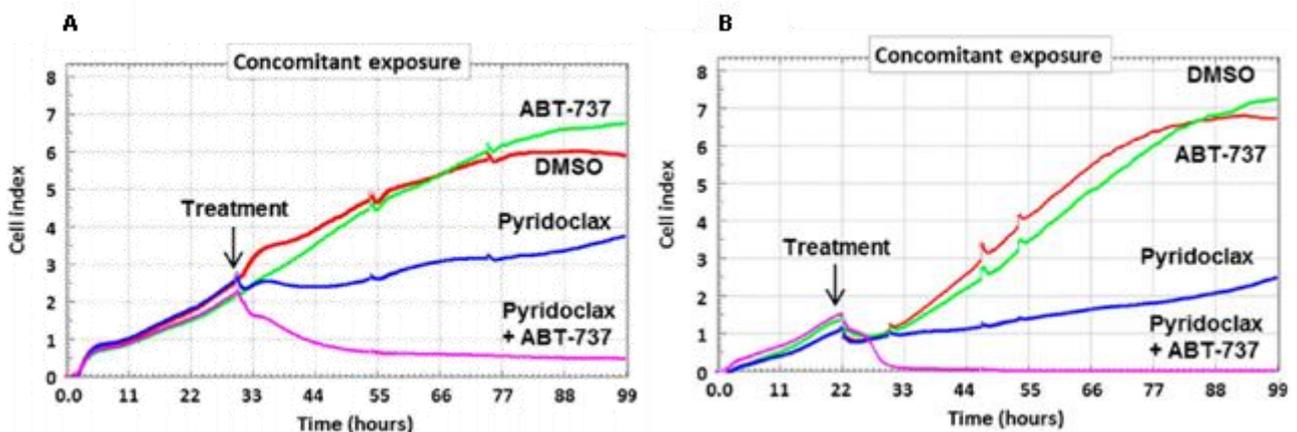


Figure 53. Activité cellulaire en temps réel évaluée par impédancemétrie (technologie xCELLigence).

Effet de la combinaison du pyridoclax avec l'ABT-737 sur des cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes IGROV1-R10 (A) et SKOV3 (B). Les cellules sont exposées à 25 μ M de pyridoclax et 5 μ M d'ABT-737. Le pyridoclax (courbes bleues) et l'ABT-737 (courbes vertes) utilisés seuls ne causent pas la mort des cellules, tandis que le traitement concomitant (courbes roses) entraîne rapidement les cellules vers l'apoptose.²¹⁸

Des études précliniques du pyridoclastax sont actuellement en cours, afin de déterminer ses paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques.

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

Aujourd'hui, un intérêt particulier est porté à la conception d'inhibiteurs à dualité d'action (également appelés « inhibiteurs duals »), à savoir une seule molécule capable de se lier à deux cibles d'intérêt thérapeutique, et donc, dans le cadre de nos travaux, capable d'induire l'apoptose sans nécessité d'administrer une combinaison d'agents thérapeutiques. La conception d'un inhibiteur à dualité d'action peut se faire de deux façons : par conception *de novo* d'une nouvelle molécule capable d'inhiber les deux cibles ; ou par construction d'une molécule hybride, dans laquelle 2 molécules distinctes, capables séparément d'interagir avec les cibles visées, sont liées entre elles.

Ainsi plusieurs équipes ont cherché à concevoir des inhibiteurs duals des protéines Bcl-x_L et Mcl-1.

Ainsi, par exemple, Tanaka *et al.* ont développé des molécules hybrides conçues à partir d'un inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1 proposé par les laboratoires Abbott® (USA),²¹⁹ et de l'ABT-737/ABT-263. La démarche appliquée pour obtenir ces molécules est développée ci-dessous :

- Conception de l'inhibiteur de Mcl-1

À partir de la structure indolique de l'inhibiteur de Mcl-1 des laboratoires Abbott® (Schéma 3, gauche), le groupe de Tanaka a conçu des analogues de type pyrazol[1,5- α]pyridine. En particulier, un dérivé présentant un cycle naphthalène et un acide carboxylique (T01, schéma 3, droite), retenu comme composé de référence, a montré une sélectivité sur Mcl-1 avec une $CI_{50} = 0,54 \mu\text{M}$ pour le complexe avec le peptide Bid, *versus* une $CI_{50} > 30 \mu\text{M}$ pour le complexe Bcl-x_L/Bid (valeurs déterminées par TR-FRET, *time-resolved fluorescence resonance energy transfer*).²²⁰

²¹⁹ Song, T.; Wang, Z.; Zhang, Z. Substituted Indole Mcl-1 Inhibitors: A Patent Evaluation (WO2015148854A1). *Expert Opin Ther Pat.* **2016**, *26* (11), 1227–1238.

²²⁰ Tanaka, Y.; Aikawa, K.; Nishida, G.; Homma, M.; Sogabe, S.; Igaki, S.; Hayano, Y.; Sameshima, T.; Miyahisa, I.; Kawamoto, T.; *et al.* 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.

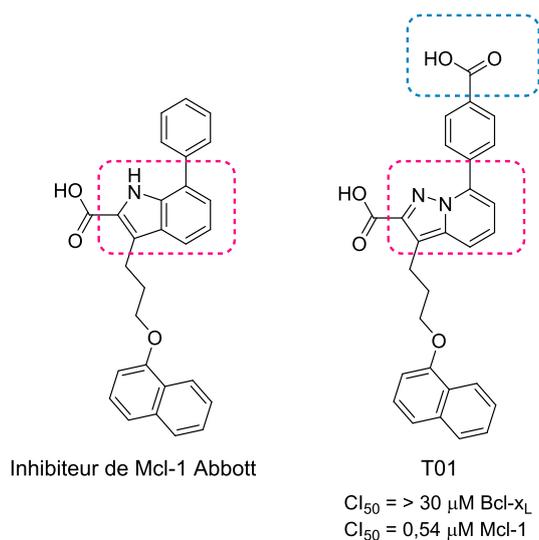


Schéma 3. Inhibiteur de Mcl-1 des laboratoires Abbott® (gauche) et T01 conçu par Tanaka *et al.* (droite).

Les différences structurales sont entourées en pointillés.^{219, 220}

La structure co-cristalline du complexe T01/Mcl-1 a permis de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le composé ; T01 se lie dans la région « ouest » de la cavité de liaison de la protéine : la fonction acide carboxylique sur le cycle pyrazol[1,5- α]pyridine interagit avec l'Arg²⁶³, tandis que la fonction acide benzoïque est exposée vers le solvant (Figure 54).

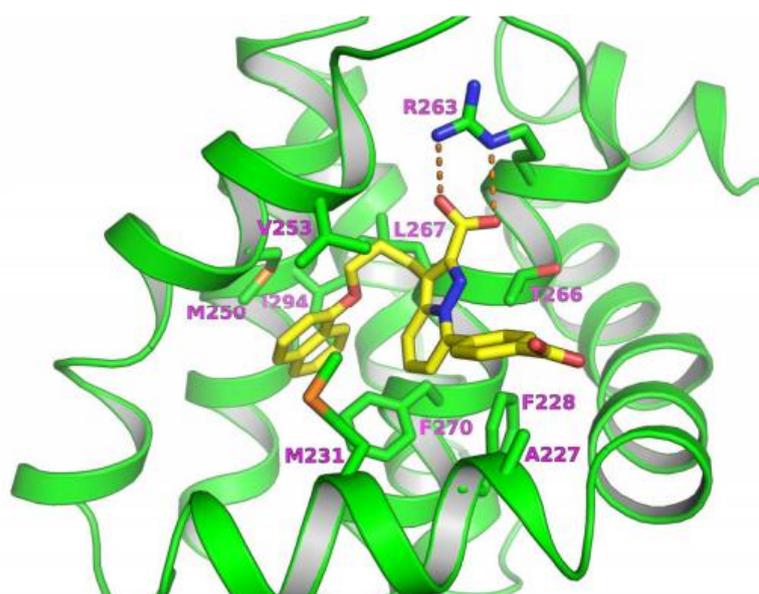


Figure 54. Structure co-cristalline du complexe T01/Mcl-1.²²⁰

- Conception de l'inhibiteur de Bcl-x_L

Afin de déterminer les motifs chimiques clés des composés ABT-737/ABT-263 à conserver et impliqués dans l'interaction avec la protéine Bcl-x_L, Tanaka *et al.*, ont « découpé » la structure de l'ABT-737 en deux parties : une partie W, qui se lie dans la région « ouest » de la cavité de liaison de Bcl-x_L, et une partie E, qui se lie dans la région « est » de la cavité (Figure 55).

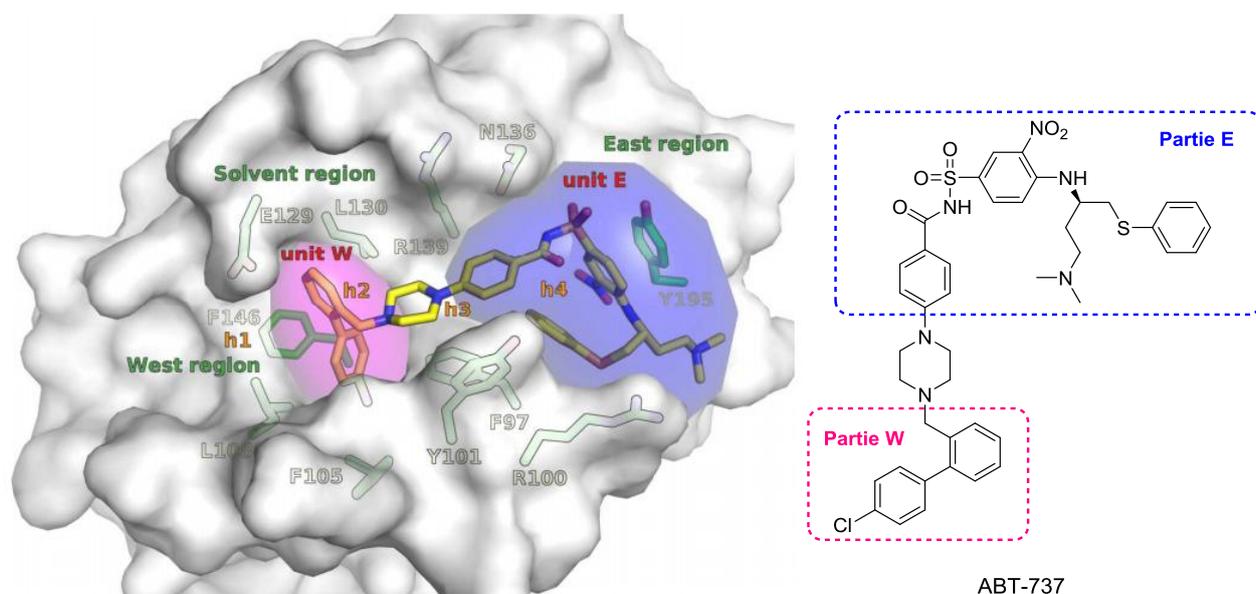


Figure 55. Structure co-cristalline du complexe ABT-737/Bcl-x_L.

Les régions « ouest » (rose) et « est » (bleu) de la cavité de liaison de Bcl-x_L sont présentées.²²⁰

Il a ainsi été montré que la présence de trois cycles aromatiques dans la partie E de l'ABT-737, interagissant entre eux dans une conformation coudée, renforce l'interaction de la molécule avec la protéine.²²¹ L'évaluation de la capacité à inhiber le complexe Bcl-x_L/Bid d'une banque de molécules conçues par l'équipe, dérivées de la partie E et de la partie W de l'ABT-263, a ensuite confirmé que la partie E affecte le plus l'inhibition de l'interaction protéine-protéine. Le dérivé T02, issu de ces travaux de pharmacomodulation, présente une Cl₅₀ = 150 nM (Schéma 4).

²²¹ a) Park, C.-M.; Oie, T.; Petros, A. M.; Zhang, H.; Nimmer, P. M.; Henry, R. F.; Elmore, S. W. Design, Synthesis, and Computational Studies of Inhibitors of Bcl-x_L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 16206–16212 ; b) Bruncko, M.; Oost, T. K.; Belli, B. A.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Kunzer, A.; Martineau, D.; McClellan, W. J.; Mitten, M.; Ng, S.-C.; *et al.* Studies Leading to Potent, Dual Inhibitors of Bcl-2 and Bcl-x_L. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (4), 641–662.

- L'hybridation

Afin de relier les deux molécules pour former un inhibiteur dual, Tanaka *et al.* ont ensuite connecté les deux structures à l'aide de différents *linkers*, en insérant le *linker* sur les motifs exposés au solvant, non impliqués dans l'interaction avec les protéines cibles (Schéma 4).

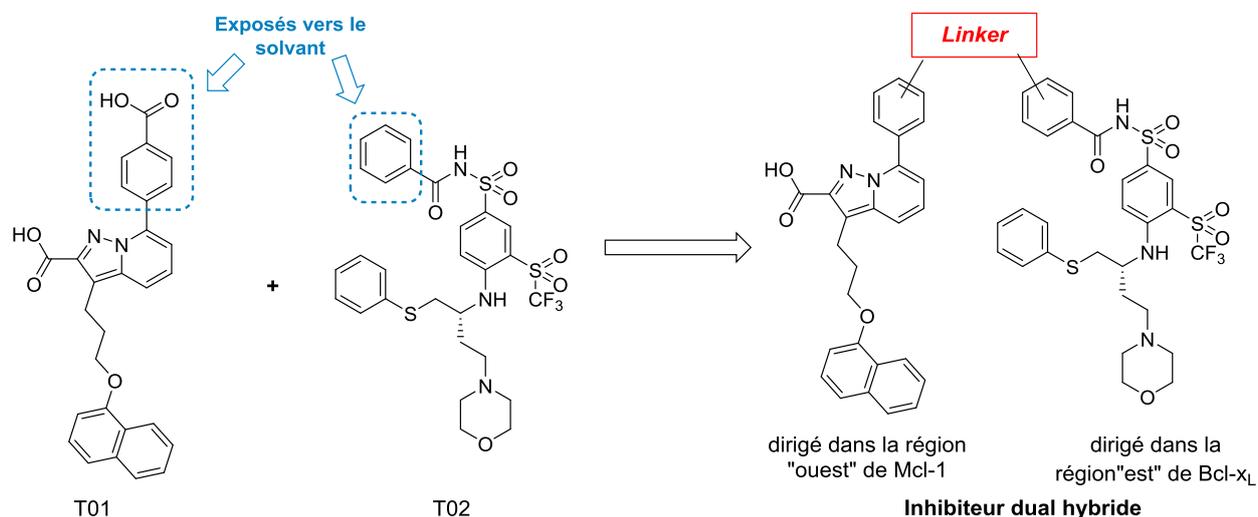


Schéma 4. Stratégie d'hybridation utilisée par Tanaka *et al.* pour concevoir des inhibiteurs duals

Mcl-1/Bcl-x_L.²²⁰

Parmi les composés obtenus, le composé T03 (Schéma 5) s'est révélé capable d'inhiber les complexes Mcl-1/Bid et Bcl-x_L/Bid avec des CI₅₀ respectives de 61 nM et 4,4 nM.

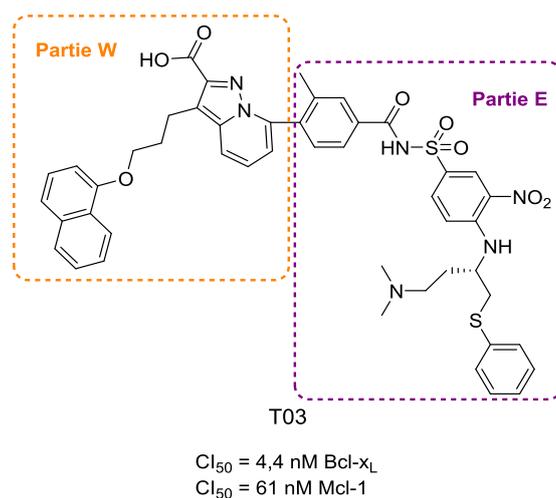


Schéma 5. Inhibiteur dual hybride conçu par Tanaka *et al.* Partie W (orange) ; partie E (violet).²²⁰

Les structures co-cristallines du composé T03 avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L ont mis en évidence que :

- l'interaction avec Mcl-1 se fait par la partie W de la molécule, qui interagit avec la région « ouest » de la cavité de liaison de la protéine. La partie E de la molécule est exposée vers le solvant.
- l'interaction avec Bcl-x_L se fait d'une part grâce à la partie E de la molécule, adoptant une conformation coudée, comme dans l'ABT-737, en interaction avec la région « est » de la cavité de liaison de la protéine ; et d'autre part, par la partie W de la molécule qui interagit avec la région « ouest » de la cavité de liaison de Bcl-x_L, en particulier grâce à la fonction acide carboxylique qui interagit avec l'Arg¹³⁹ (Figure 56).

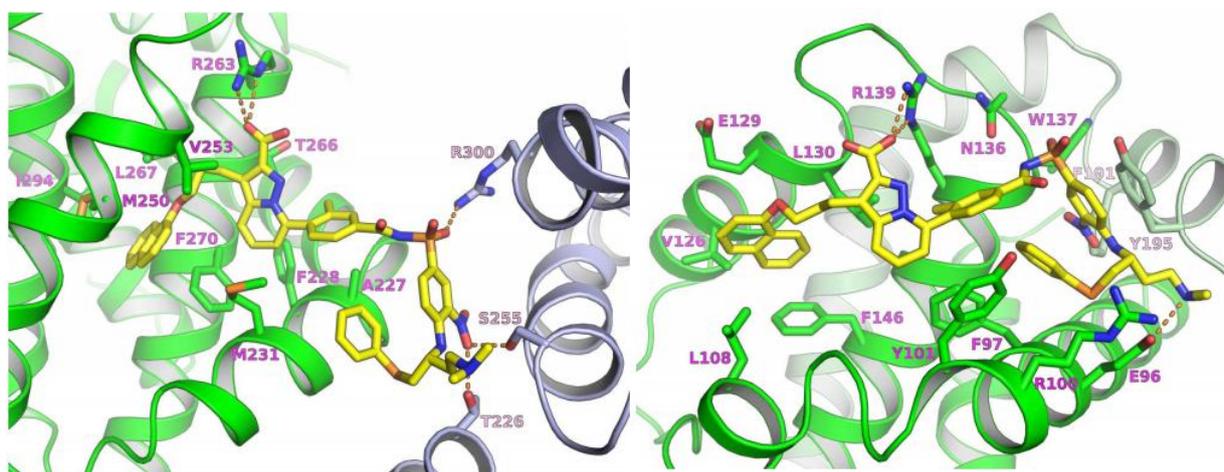


Figure 56. Structures co-cristallines du composé T03 avec les protéines Mcl-1 (gauche) et Bcl-x_L (droite).²²⁰

L'activité inhibitrice du composé T03 a été améliorée en synthétisant le composé T04, possédant comme *linker* un cycle diméthyl phényle, et capable d'inhiber les complexes Mcl-1/Bid et Bcl-x_L/Bid avec des Cl₅₀ respectives de 88 nM et 3,7 nM (Figure 57).

La présence de ce *linker* permet un blocage conformationnel en améliorant la selectivité et l'activité du composé.

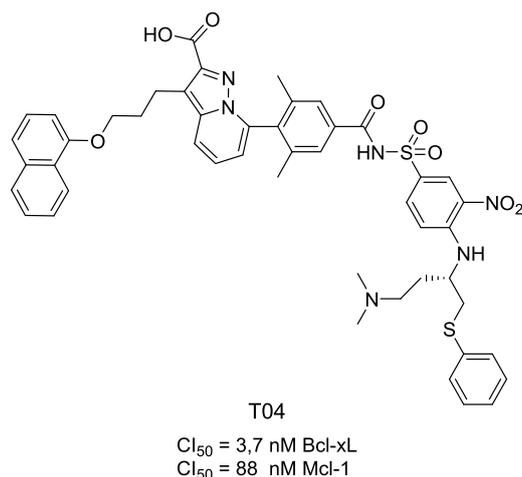


Figure 57. Inhibiteur dual hybride chef de file conçu par Tanaka *et al.*²²⁰

D'autres inhibiteurs à dualité d'action ont également été synthétisés par **Rega *et al.*** Cette équipe a ainsi pu identifier, à l'aide d'une puissante méthode d'analyse RMN (SAR ILOEs, *structure-activity relationships by interligand nuclear Overhauser effects*), une nouvelle classe de composés duals ayant des affinités pour les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 de l'ordre du nM (CI_{50} calculées par FPA).²²²

La méthode RMN utilisée permet de détecter des couples de fragments capables de se lier à la protéine étudiée simultanément. Ces couples de fragments peuvent ensuite être liés de façon covalente pour obtenir des composés ayant une affinité améliorée pour la protéine.

Initialement, une chimiothèque de 500 fragments a été analysée par RMN en présence de Bcl-x_L. La capacité à inhiber le complexe Bcl-x_L/Bak des fragments issus du criblage a ensuite été évaluée par RMN, et les fragments les plus intéressants ont ensuite été fusionnés pour obtenir de nouveaux composés. Les fragments R01 et R02 (Figure 58), possédant des valeurs de K_D respectives de 691 μM et 378 μM (déterminées par RMN en présence du complexe Bcl-x_L/Bak), ont été liés *in silico* à l'aide de différents *linkers*. Les composés obtenus en utilisant une fonction acyl sulfonamide comme *linker* (inspirée par l'ABT-737 et ses analogues), présentaient des valeurs de CI_{50} (FPA) dans l'ordre du μM pour l'inhibition du complexe Bcl-x_L/Bak. Ces composés ont été évalués quant à leur affinité pour Mcl-1, et de façon opportune, ils ont révélé une capacité non négligeable à inhiber le

²²² Rega, 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.

complexe

Mcl-1/Bak. La modulation de la structure des fragments R01 et R02 a permis d'obtenir le composé R03, composé *lead* présentant des valeurs de CI_{50} respectives pour Bcl-x_L et Mcl-1 de 16,7 μ M et 43,2 μ M (Figure 58).

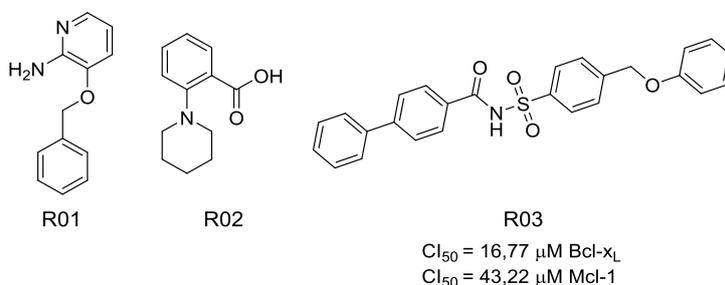


Figure 58. Fragments R01 et R02 déterminés par analyses RMN et composé R03 issu d'études *in silico* par fusion des deux fragments.²²²

Les complexes *in silico* du composé R03 avec les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L (Figures 59) ont suggéré que l'introduction d'un substituant sur le cycle benzénique terminal du fragment diphenyle pouvait permettre des interactions supplémentaires à la fois avec la poche P1 de la protéine Bcl-x_L et avec la poche P2 de la protéine Mcl-1. En effet, l'affinité du composé R03 pour Bcl-x_L et Mcl-1 peut être progressivement augmentée en introduisant des substituants volumineux sur le cycle benzénique terminal du fragment diphenyle.

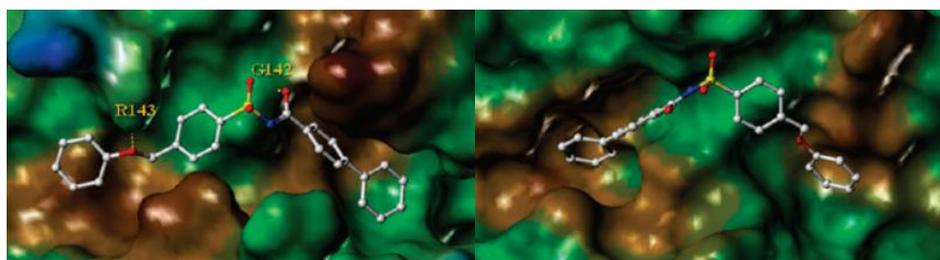


Figure 59. Complexes *in silico* du composé R03 avec les protéines Bcl-x_L (gauche) et Mcl-1 (droite).²²²

L'optimisation du *lead* R03 par l'introduction de substituants volumineux sur le cycle benzénique terminal du fragment diphenyle (composé R04, figure 60) et par la modification du motif 4-phénoxyéthylbenzène (composé R05, figure 60) a permis la conception d'une molécule ayant des valeurs de CI_{50} respectives de 86 nM et 140 nM pour les complexes Bcl-x_L/Bak et Mcl-1/Bak (composé R06, figure 60).

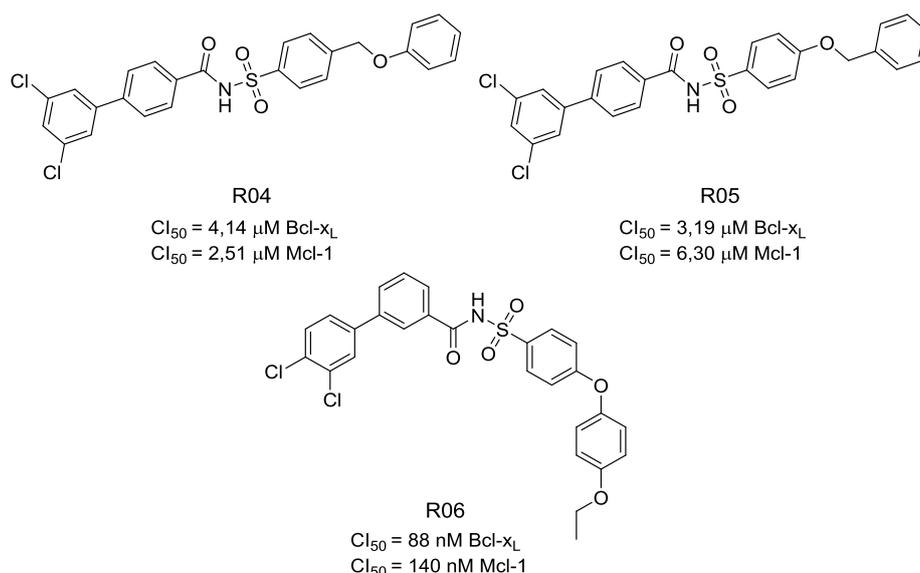


Figure 60. Inhibiteurs duals conçus par Rega *et al.*²²²

Par ailleurs, une troisième équipe, celle de **Roussi et collaborateurs**, a découvert en 2008 une nouvelle molécule d'origine naturelle, nommée Meiogynine A, qui s'est avérée être un inhibiteur naturel de l'interaction Bcl-x_L/Bak (Figure 61).

Initialement, la capacité inhibitrice de la Meiogynine A et de 5 dérivés synthétiques, des complexes des protéines Bcl-x_L/Bak et Mcl-1/Bid a été évaluée par FPA. En parallèle, la cytotoxicité de ces composés a également été évaluée. La Meiogynine A présente des valeurs de K_i respectifs pour Bcl-x_L et Mcl-1 de 8,3 μM et 5,2 μM (calculées par FPA) ; l'un de ses dérivés synthétiques, le composé F01 (Figure 61) a montré des valeurs de K_i respectifs pour Bcl-x_L et Mcl-1 de 4,6 μM et 9,1 μM . Les études de cytotoxicité, conduites sur trois différentes lignées cellulaires de lymphome, ont montré un Cl_{50} de $\approx 8 \mu\text{M}$ pour le composé F01 ; des études supplémentaires ont ensuite confirmé la capacité du composé à induire l'apoptose caspases-dépendante.²²³

²²³ Desrat, S.; Pujals, A.; Colas, C.; Dardenne, J.; Gény, C.; Favre, L.; Dumontet, V.; Iorga, B. I.; Litaudon, M.; Raphaël, M.; *et al.* Pro-Apoptotic MeioGynin A Derivatives That Target Bcl-x_L and Mcl-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (21), 5086–5088.

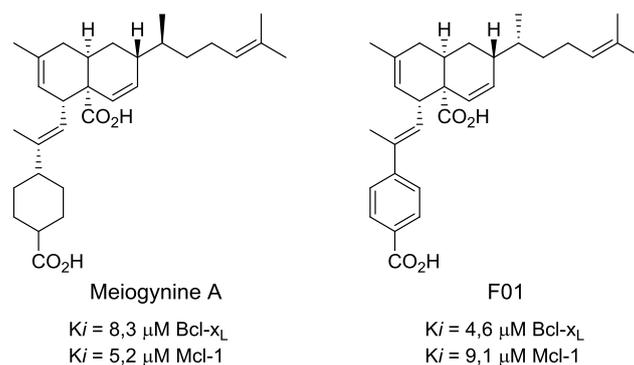


Figure 61. Meiogynine A et son dérivé synthétique F01.²²³

Suite à ces résultats, le groupe de Roussi et collaborateurs a conçu une nouvelle famille d'analogues de la Meiogynine A, obtenus par condensation de trois éléments (Figure 62) : un triène (rose), un diénophile (bleu) et divers partenaires aromatiques (orange). Parmi les composés obtenus, le composé représenté dans la *figure 62* présente une activité 50 fois supérieure au produit naturel, avec des valeurs de K_i respectives pour Bcl-x_L et Mcl-1 de 153 nM et 106 nM.²²⁴

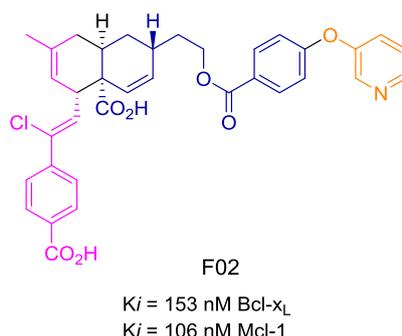


Figure 62. Inhibiteur dual conçu par Roussi *et coll.*

Obtenu par condensation d'un triène (rose), d'un diénophile (bleu) et d'un partenaire aromatique (orange).²²⁴

Ces travaux ont mis en évidence que la présence d'une fonction ester et d'un cycle pyridinique terminal semble être nécessaire pour l'interaction de la molécule avec les deux protéines cibles. Le complexe *in silico* F02/Bcl-x_L est stabilisé par des interactions polaires : entre l'atome d'azote du cycle pyridinique de la molécule et le résidu Tyr¹⁹⁵ de la protéine, mais également entre l'atome d'oxygène de la fonction ester du composé et le résidu Arg¹⁰⁰ de la protéine (Figure 63).

²²⁴ Desrat, S.; Remeur, C.; Gény, C.; Rivière, G.; Colas, C.; Dumontet, V.; Birlirakis, N.; Iorga, B. I.; Roussi, F. From Meiogynin A to the Synthesis of Dual Inhibitors of Bcl-x_L and Mcl-1 Anti-Apoptotic Proteins. *Chem. Comm.* **2014**, 50 (62), 8593–8596.

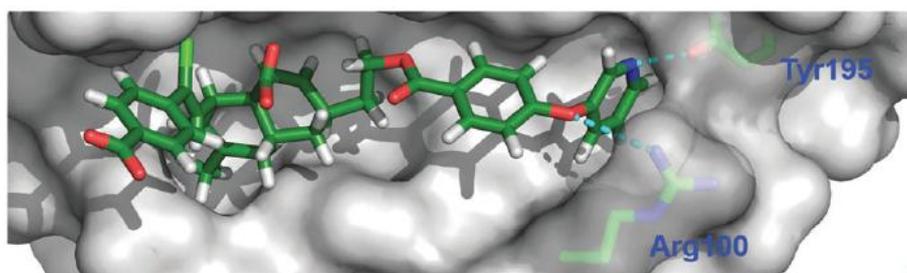


Figure 63. Complexe F02/Bcl-x_L in silico.²²⁴

L'introduction d'une chaîne aromatique latérale (Meiogynine A *versus* F02) induit une amélioration significative de l'activité des composés sur les protéines Bcl-x_L et Mcl-1.

Cependant, en conditions physiologiques, le composé F02 subit une hydrolyse de la fonction ester par les estérases cellulaires, en donnant un composé inactif. Pour tenter d'améliorer la stabilité du composé, cette fonction ester a donc été remplacée par des fonctions carbamate, amide, dicarboxyamide et triazole, mais avec peu de succès, amenant à des composés moins actifs sur les cibles étudiées (activités duales très réduites comparées à celles du composé F02, Figure 64), voire inactifs, ou avec des profils de pan-Bcl-2 inhibiteurs (composés actifs sur Mcl-1, Bcl-x_L et Bcl-2).²²⁵

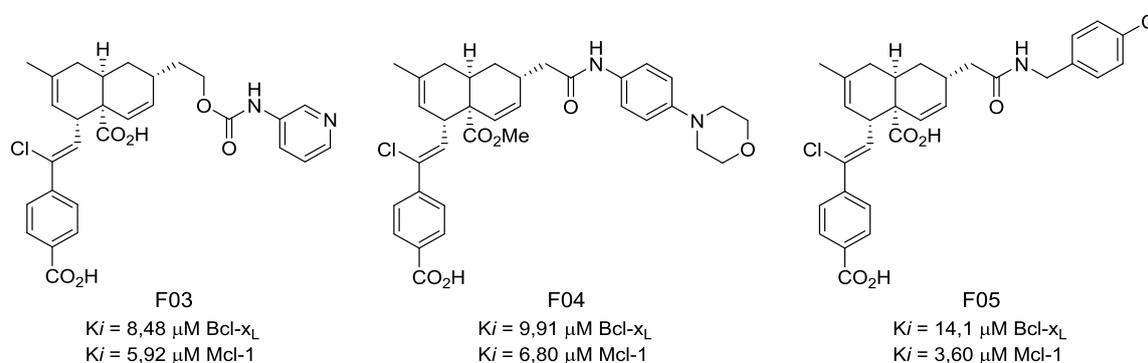


Figure 64. Analogues carbamate (F03), amide (F04), dicarboxyamide (F05) du composé F02.²²⁵

Bien que les inhibiteurs duaux Bcl-x_L/Mcl-1 décrits dans ce paragraphe présentent des activités intéressantes sur les protéines cibles, à ce jour, aucune molécule conçue comme inhibiteur dual Bcl-x_L/Mcl-1 ne fait l'objet d'un essai clinique.²²⁶

²²⁵ Abou Samra, A.; Robert, A.; Gov, C.; Favre, L.; Eloy, L.; Jacquet, E.; Bignon, J.; Wiels, J.; Desrat, S.; Roussi, F. Dual Inhibitors of the Pro-Survival Proteins Bcl-2 and Mcl-1 Derived from Natural Compound Meiogynin A. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 26–38.

²²⁶ Ashkenazi, A.; Fairbrother, W. J.; Levenson, J. D.; Souers, A. J. From Basic Apoptosis Discoveries to Advanced Selective Bcl-2 Family Inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (4), 273–284.

CHAPITRE 3

La naissance du projet de recherche et ses objectifs

1. Les travaux antérieurs

Initialement, ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux publiés en 2015 par notre laboratoire²¹⁸ qui mettent en évidence la possibilité d'utiliser les oligopyridines en tant que mimes du domaine BH3 des protéines BH3-only (pro-apoptotiques) de la famille Bcl-2, pour concevoir des inhibiteurs de la protéine Mcl-1 utilisables dans le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants, en combinaison avec des thérapies ciblant la protéine Bcl-x_L. Après la découverte d'un *lead*, le « pyridoclax », les travaux de thèse menés par Serge Perato et les travaux postdoctoraux menés par le Dr Marcella De Giorgi, portant sur la synthèse d'analogues du pyridoclax, ont pu mettre en évidence certains requis structuraux nécessaires à l'activité du composé, et ont permis d'établir les premières relations structure-activité.

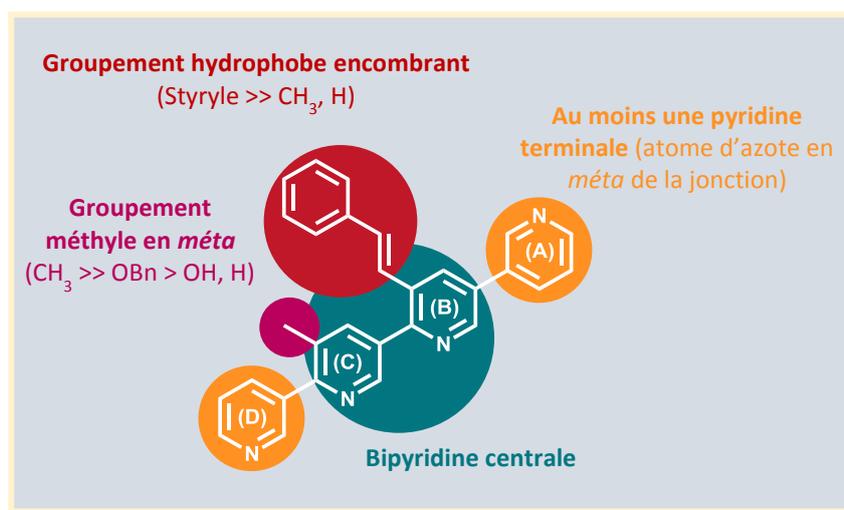


Figure 65. Requis structuraux du pyridoclax nécessaires à l'activité pro-apoptotique.

- La présence du groupement styryle en position *méta* du cycle B (Figure 65) semble être cruciale pour l'activité pro-apoptotique : lorsque le groupement styryle est remplacé par un atome d'hydrogène ou un groupement méthyle, l'activité pro-apoptotique est perdue.
- Le groupement méthyle en position *méta* du cycle C (Figure 65) semble aussi être important pour l'activité pro-apoptotique : lorsqu'il est remplacé par un groupement plus encombrant tel qu'un groupement hydroxyle ou une fonction éther, l'activité est réduite ; en absence de substituant l'activité est perdue.

- La présence des pyridines terminales (cycles A et D en figure 65) influence aussi l'activité du composé. En effet, la présence d'au moins un des deux cycles azotés est nécessaire à l'activité pro-apoptotique (probablement en lien avec une interaction entre l'atome d'azote et le résidu Arg²⁶³ de la protéine, interaction suggérée aussi par des études *in silico* du pyridoclast dans la protéine Mcl-1 en figure 52B). La modification de la position de l'atome d'azote sur les pyridines terminales (azote en position *mé*ta ou en *para* de la liaison de jonction), ou encore la modification des cycles azotés (pyrimidine, triazole ou pyrazole) réduisent ou n'impactent pas l'activité du composé.

D'une part, il a été montré récemment par Brotin *et al.* que l'inhibition concomitante des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 conduit à une apoptose massive des cellules cancéreuses ovariennes, même en absence de cisplatine.⁹¹ A partir de ces travaux, le développement d'inhibiteurs à dualité d'action agissant sur les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 nous permettrait d'avoir un moyen efficace de traiter les cancers de l'ovaire fortement réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle, sans nécessité d'administrer une combinaison d'agents thérapeutiques.⁹¹

Ainsi, en conservant les requis structuraux du pyridoclast, essentiels à l'activité inhibitrice de Mcl-1, est-il possible d'atteindre une activité inhibitrice de la protéine Bcl-x_L par pharmacomodulations du pyridoclast ?

D'autre part, la famille des protéines Bcl-2 n'est pas la seule à jouer un rôle crucial dans l'apoptose. La famille des protéines IAPs intervient aussi dans l'échappement à l'apoptose des cellules cancéreuses. L'intérêt de concevoir des inhibiteurs de ces protéines anti-apoptotiques est également démontré.²²⁷ Dans ce contexte, une mobilité doctorale, financée par le Cancéropôle Nord-Ouest, m'a été accordée et a permis la mise en place d'une collaboration avec le groupe de recherche du Pr William D. Lubell au sein du département de chimie de l'Université de Montréal au Canada. Les recherches du Pr Lubell portent sur le développement de méthodes efficaces pour la synthèse de nouvelles structures peptidomimétiques de type azabicyclo[x.y.0]alcane, largement retrouvées dans

²²⁷ Fulda, S. Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (22), 5030–5036.

les mimes du térapeptide AVPI de la protéine Smac,^{193, 197, 228} et en particulier dans la structure du Debio1143 (inhibiteur des protéines IAPs, figure 44). Afin d'enrichir l'espace chimique de mon projet de thèse, j'ai réalisé une partie de mes travaux (8 mois) au sein de cette équipe dont le but était d'obtenir de nouvelles molécules pro-apoptotiques, en synthétisant des molécules peptidomimétiques du térapeptide AVPI.

2. Les objectifs

Mes objectifs de thèse peuvent être divisés en deux chapitres.

Le premier chapitre est centré sur le développement d'inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Sur la base des RSA établies par les travaux antérieurs de modulation de la structure du pyridoclastax, et en supposant que l'inhibition de la protéine Bcl-x_L peut également être acquise à l'aide de foldamères BH3-mimétiques, de nouvelles modulations du pyridoclastax (Figure 66) ont été envisagées dans le but d'obtenir des molécules à dualité d'action. Elles concernent essentiellement deux motifs de la structure du pyridoclastax :

- Le groupement hydrophobe styryle ;
- Les pyridines terminales.

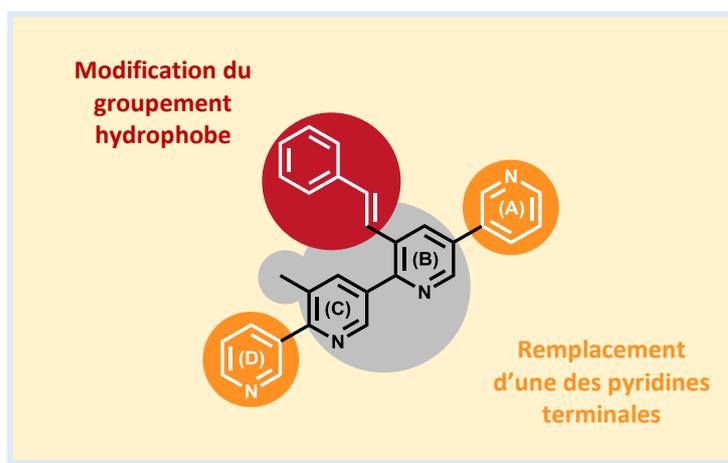


Figure 66. Modulations du pyridoclastax envisagées à partir des premières RSA.

²²⁸ a) Cossu, F.; Mastrangelo, E.; Milani, M.; Sorrentino, G.; Lecis, D.; Delia, D.; Manzoni, L.; Seneci, P.; Scolastico, C.; Bolognesi, M. Designing Smac-Mimetics as Antagonists of XIAP, CIAP1, and CIAP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *378* (2), 162–167 ; b) Mastrangelo, E.; Cossu, F.; Milani, M.; Sorrentino, G.; Lecis, D.; Delia, D.; Manzoni, L.; Drago, C.; Seneci, P.; Scolastico, C.; *et al.* Targeting the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein through 4-Substituted Azabicyclo[5.3.0]Alkane Smac Mimetics. Structure, Activity, and Recognition Principles. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384* (3), 673–689.

Des simulations de dynamique moléculaire (à $t = 100$ ns) du complexe pyridoclax/Mcl-1 ont montré que la molécule peut se retourner dans la protéine et interagir avec l'Arg²⁶³ par le cycle pyridinique (A) ou (D) (travaux menés par le Pr Jana Sopková-de Oliveira Santos et le Dr Bogdan Marekha, non publiés). Nous avons donc envisagé deux séries de composés : une série de composés appelée « série *up* », obtenue par remplacement de la pyridine (A), et une série de composés appelée « série *down* », obtenue par remplacement de la pyridine (D).

Les modulations, proposées par des études de modélisation moléculaire, sont destinées à la fois à améliorer l'activité des molécules vis-à-vis de la protéine Mcl-1, et à induire une activité vis-à-vis de la protéine Bcl-x_L.

Pour chaque modulation du pyridoclax envisagée, nous présenterons la démarche conceptuelle proposée, la démarche synthétique adoptée, et nous discuterons les résultats biologiques obtenus afin d'établir de nouvelles RSA.

Dans la section « Préambule » de ce manuscrit sont présentées :

- **la nomenclature** adoptée afin de faciliter la lecture ; la nomenclature I.U.P.A.C. sera conservée dans la partie expérimentale.
- **la numérotation** des composés décrits.
- **l'évaluation biologique** des composés, réalisée par l'équipe du Dr Laurent Poulain de l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE du Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse de Caen. Le principe de la technologie xCELLigence utilisée sera présentée ; le déroulement des tests sera détaillé ; et la synthèse des résultats, présentée dans le manuscrit sous forme de graphique, sera expliquée.

Dans la section « Annexe A » de ce manuscrit sont présentés **les résultats biologiques** bruts, fournis par le Dr Emilie Brotin (Unité Inserm U1086 ANTICIPE).

Le deuxième chapitre s'intéresse au développement de mimes du térapeptide AVPI de la protéine Smac. En utilisant les méthodes mises en place par le groupe du Pr Lubell pour la synthèse de structures de type azabicyclo[x.y.0]alcane, et en se basant sur les travaux menés par Wang et ses collaborateurs,^{193, 197, 198, 229} de nouvelles molécules peptidomimétiques, mimes du térapeptide AVPI, ont été conçues (Figure 67).

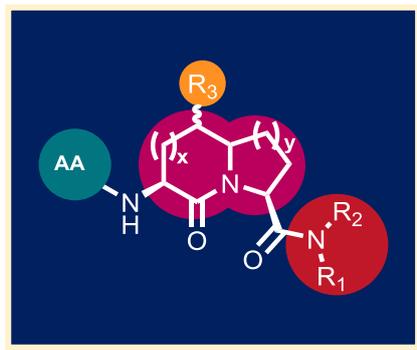


Figure 67. Structure générale des mimes de Smac développés.

Dans la structure : AA = acide aminé ; R = groupement fonctionnel.

L'objectif commun de ce projet de thèse est de pouvoir disposer de molécules potentiellement actives dans l'une ou l'autre voie de signalisation cellulaire (régulée par la famille IAP ou par la famille Bcl-2), utilisables dans des stratégies de traitements en plurithérapie. Promouvoir l'apoptose par inhibition de protéines anti-apoptotiques, en mimant les partenaires pro-apoptotiques, constitue une approche pertinente. De plus, la pertinence de cette stratégie est renforcée par les travaux de Hu et ses collaborateurs qui ont montré que la libération de la protéine Smac dans le cytosol induit l'activation de la protéine Bax (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2), notamment dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine.¹²⁹

Dans la section « Annexe B » de ce manuscrit est présenté **le test de screening FPA**, mise en place par le Dr Marie Jouanne du CERMN. Le déroulement du test sera détaillé.

²²⁹ Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Lu, J.; Qiu, S.; Yang, C.-Y.; Gao, W.; Meagher, J.; Stuckey, J.; Wang, S. Design, Synthesis, and Evaluation of a Potent, Cell-Permeable, Conformationally Constrained Second Mitochondria Derived Activator of Caspase (Smac) Mimetic. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7916–7920.

CHAPITRE 4

Les travaux personnels

Préambule

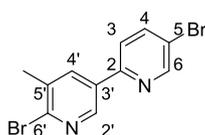
A. Nomenclature

La nomenclature des molécules décrites dans ce travail est celle recommandée par l'*International Union of Pure and Applied Chemistry* (I.U.P.A.C).

Concernant les cycles pyridiniques, les numérotations et dénominations suivantes sont utilisées :

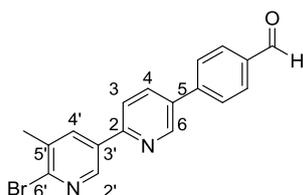


Concernant les bi-, ter-, quaterpyridines, la numérotation est imposée en fonction de la liaison de jonction quelle que soit la nature des substituants, par exemple :

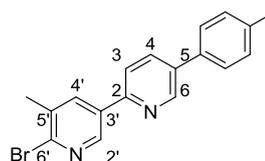


5,6'-dibromo-5'-méthyl-2,3'-bipyridine

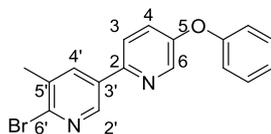
Concernant les oligophénylpyridines, la nomenclature est différente. En effet, les cycles benzéniques sont considérés comme des substituants des cycles pyridiniques, à moins qu'ils ne portent une fonction prioritaire, par exemple :



4-(6'-bromo-5'-méthyl-[2,3'-bipyridin]-5-yl)benzaldehyde



6'-bromo-5'-méthyl-5-(p-tolyl)-2,3'-bipyridine



6'-bromo-5'-méthyl-5-phenoxy-2,3'-bipyridine

Cette nomenclature devient rapidement assez complexe. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé, afin de faciliter la lecture, de définir une nomenclature simplifiée pour nos structures. La nomenclature I.U.P.A.C. a été conservée dans la partie expérimentale.

Les oligopyridines seront nommées en fonction du nombre de cycles composant la chaîne, soit : bi-, ter- ou quaterpyridine, avec un enchaînement 2-3' comme reporté au-dessous.

B. Numérotation

Nous avons choisi de différencier la numérotation des intermédiaires réactionnels et des molécules finales entrées en chimiothèque et évaluées par impédancemétrie ou par FPA.

Ainsi, les **intermédiaires réactionnels** sont numérotés avec les chiffres arabes 1, 2, 3, etc.

Les **molécules finales**, décrites dans le manuscrit, entrées en chimiothèque sont nommées MR35000 à MR35062. Pour faciliter la lecture des travaux personnels, nous avons choisi de simplifier la numérotation : MR35000 devient M00 (à MR35062 = M62).

C. Évaluation biologique

C. 1. La technologie xCELLigence

L'évaluation biologique est réalisée par l'équipe du Dr 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 qui permet de suivre l'activité cellulaire en temps réel et en continu, sans marquage préalable, permettant de caractériser avec une grande précision aussi bien les événements précoces que tardifs de la réponse cellulaire.

Ces tests de *screening* ont été effectués sur une lignée cellulaire du cancer de l'ovaire chimiorésistant (IGROV1-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. Le pyridoclast montrant une activité maximale à une concentration de 25 μM, les composés ont donc été testés initialement à cette concentration.

C. 2. Mise en œuvre de l'évaluation de l'activité cellulaire

a. L'activité des composés sur Mcl-1 est étudiée :

- soit en supprimant l'expression de la protéine Bcl-x_L dans la lignée cellulaire, au moyen d'une transfection avec le siXL1 (siRNA Bcl-x_L).

- soit en inhibant la protéine Bcl-x_L exprimée dans la lignée cellulaire, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique issu de la littérature commercialement disponible, l'ABT-737.

b. Inversement, l'activité des composés sur Bcl-x_L est étudiée :

- soit en supprimant l'expression de la protéine Mcl-1 dans la lignée cellulaire, au moyen d'une transfection avec le siRNA Mcl-1.

- soit en inhibant la protéine Mcl-1 exprimée dans la lignée cellulaire, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique issu de la littérature commercialement disponible, le S63845.

c. Lorsque les siRNA sont utilisés, l'effet propre de la transfection est contrôlé par un témoin, le siRNA CTRL.

Ensuite, l'évaluation des composés en tant qu'« agent seul » permet d'étudier leur caractère dual (inhibition des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L). Si le traitement à une concentration fixée de composé seul est suffisant pour entraîner la mort des cellules, ce composé peut alors être soit un inhibiteur dual, soit présenter une toxicité cellulaire différente de celle recherchée.

Les composés présentant une forte toxicité à 25 µM ont été testés à des concentrations plus faibles (10 et/ou 1 µM) de manière à déterminer la concentration optimale pour conserver une activité pro-apoptotique. A ce stade de *screening*, il n'est pas possible de définir formellement si le composé présente une toxicité cellulaire différente de celle recherchée.

Enfin, une condition témoin est réalisée pour s'assurer que le solvant utilisé pour solubiliser les composés (DMSO) n'a pas d'effet toxique sur les cellules.

Les composés obtenus ont été évalués en utilisant deux différents types de test (en présence des siRNA ou des inhibiteurs de la littérature), que nous allons présenter ci-dessous :

- **En présence des siRNA**, le test dirigé contre Mcl-1 et Bcl-x_L se déroule de la façon suivante :

Les cellules cancéreuses sont cultivées pendant 24 h, elles sont ensuite transfectées avec les siRNA (t = 24 h) et incubées 48 h (ce qui permet l'inhibition optimale de l'expression de la protéine ciblée par le siRNA utilisé) avant d'ajouter la molécule **M** (t = 72 h).

Pour illustrer ce test, nous présentons l'exemple du pyridoclax (Figure 68). Les résultats présentés ont été fournis par le Dr Emilie Brotin (Unité Inserm U1086 ANTICIPE) : ici, l'index cellulaire (I) est représenté sous forme de courbes en fonction du temps (t = 0-96 h), ou sous forme d'un histogramme à t = 96 h (24 h après l'ajout de la molécule **M**, où l'activité de la molécule est optimale).

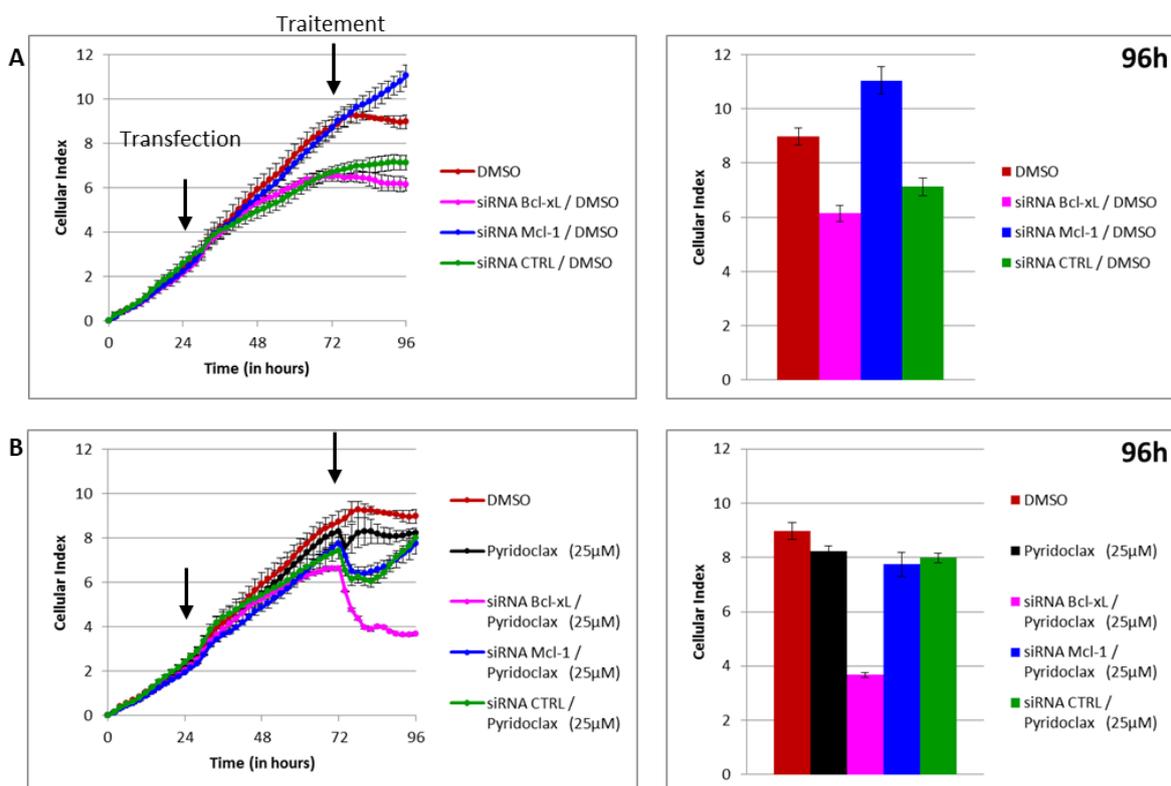


Figure 68. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie en présence des siRNA. Relatives aux témoins (A) et au traitement à 25 µM de pyridoclax (B).

La *figure 68 (A)* regroupe les différents témoins : courbe rouge, DMSO ; courbe magenta, transfection avec siRNA Bcl-x_L ; courbe bleue, transfection avec siRNA Mcl-1 ; courbe verte, transfection avec siRNA contrôle.

La *figure 68 (B)* regroupe les résultats obtenus pour le Pyridoclax à 25 µM : la courbe noire représente l'effet du pyridoclax en agent seul, elle est superposable à la courbe du DMSO, ce qui veut dire que le pyridoclax n'est pas toxique seul ; la courbe magenta permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Mcl-1 (en présence du siRNA dirigé contre Bcl-x_L), l'ajout

de pyridoclastax fait diminuer l'index cellulaire, il a donc potentiellement une activité inhibitrice de Mcl-1; la courbe bleue permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Bcl-x_L (en présence du siRNA dirigé contre Mcl-1), elle est superposable à la courbe verte du siRNA contrôle, ce qui suggère que le pyridoclastax n'a pas d'activité inhibitrice de Bcl-x_L.

Après l'ajout du composé (à t = 72 h), plus la valeur de l'index cellulaire diminue, plus le nombre de cellules cancéreuses est faible, et donc plus l'activité pro-apoptotique de la molécule est importante. Le pyridoclastax est donc un potentiel inhibiteur sélectif de Mcl-1. Ceci a été vérifié par des analyses complémentaires permettant d'étudier l'interaction directe de la molécule avec la protéine cible (SPR).²¹⁸

La comparaison des histogrammes en *figure 68* montre que l'ajout de pyridoclastax sensibilise les cellules cancéreuses uniquement si elles ont été transfectées avec le siRNA Bcl-x_L (chute de l'index cellulaire en magenta en *fig. B* par rapport au témoin en *fig. A*) : l'inhibition de Mcl-1 et Bcl-x_L est donc nécessaire pour observer la mort des cellules cancéreuses de cette lignée cellulaire.

- **En présence d'inhibiteurs synthétiques de Mcl-1 et Bcl-x_L**, le test se déroule de la manière suivante :

Les cellules cancéreuses sont cultivées pendant 24 h, puis les inhibiteurs sont ajoutés (à t = 24 h). L'ABT-737 à une concentration de 5 μM, le S63845 à une concentration de 1 μM, et la molécule étudiée **M** à une concentration de 1 μM, 10 μM ou 25 μM.

Pour illustrer les résultats obtenus par la mise en œuvre de ce test, nous présentons d'abord ceux obtenus pour les inhibiteurs de la littérature et l'action de leur combinaison sur les cellules cancéreuses (Figure 69).

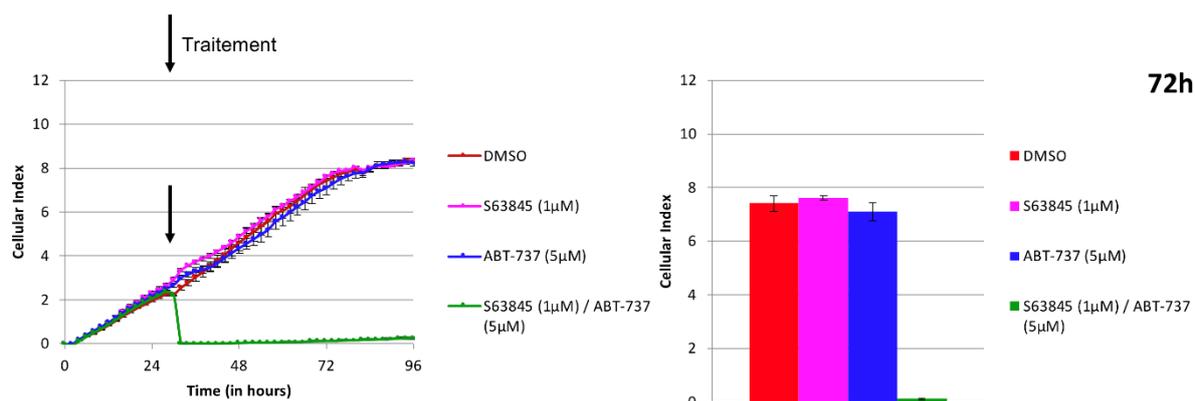


Figure 69. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie en présence de S63845 et d'ABT-737.

En *figure 69*, la courbe rouge correspond au DMSO, la courbe magenta à l'ajout de la molécule S63845, et la courbe bleue à l'ajout de l'ABT-737. À la concentration utilisée, les deux composés ne possèdent pas de toxicité propre, leurs courbes sont superposables à celle du témoin. Par contre, la combinaison des deux agents pharmacologiques (courbe ou histogramme vert) entraîne une mort cellulaire rapide et massive des cellules cancéreuses. Dans ce cas, les histogrammes sont obtenus à partir des valeurs d'index cellulaire à $t = 72$ h (activité optimale des composés).

En *figure 70*, sont présentés les résultats obtenus pour une de nos molécules **M**, la molécule **MR35033** (M33 dans le texte). Ici, la courbe rouge correspond au DMSO, la courbe verte représente l'effet du composé en agent seul, la courbe violette permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Mcl-1 (car Bcl- x_L est inhibée par l'ABT-737), la courbe orange permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Bcl- x_L (car Mcl-1 est inhibée par S63845). Ce composé présente une forte cytotoxicité comme agent seul à 25 μ M (chute de la courbe verte après l'ajout), il sera donc testé à une concentration de 10 μ M.

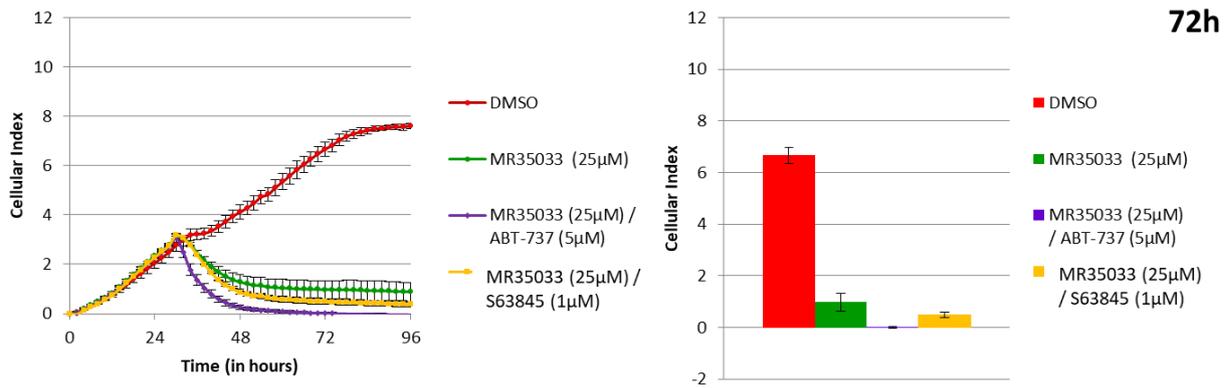


Figure 70. Résultats de l'évaluation biologique par impédancemétrie (en présence des inhibiteurs de la littérature) du composé **M33** à 25 μM.

En effet, il existe cinq « profils » de courbe différents pour les composés en agent seul (Figure 71).

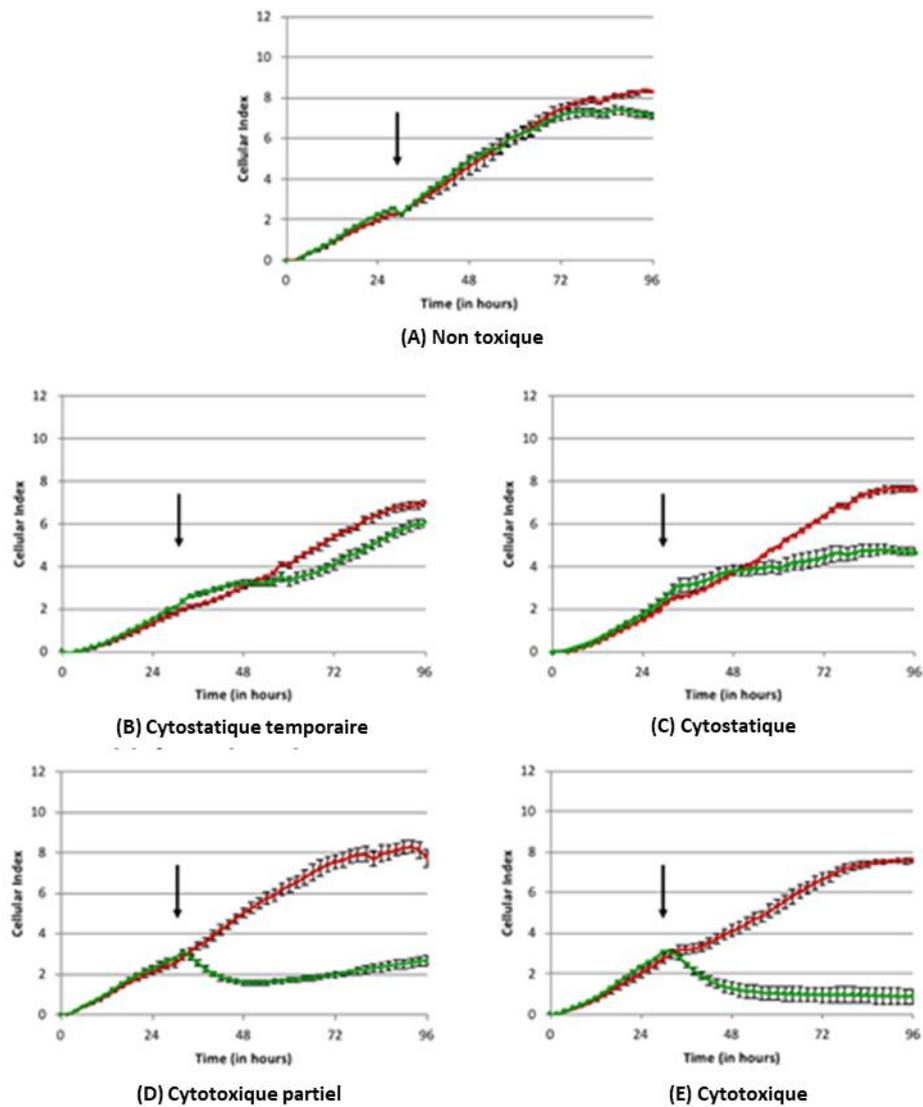


Figure 71. Profils d'activité pro-apoptotique.

Profils types des courbes obtenues pour les différents composés en agent seul (en vert) comparés à la courbe témoin du DMSO (en rouge).

En *figure 71*, dans le graphique (A), le profil d'une molécule non toxique est représenté : la courbe se superpose à celle du témoin ; dans les graphiques (B) et (C), on observe le profil de deux molécules cytostatiques : à l'ajout de la molécule, l'index cellulaire stagne et reprend ensuite dans le cas « temporaire » ou continue de stagner dans le cas « cytostatique » ; enfin, dans les graphiques (D) et (E), on observe le profil de deux molécules cytotoxiques : à l'ajout de la molécule, l'effet sur l'index cellulaire diminue et reprend ensuite dans le cas « partiel » ou continue de baisser dans le cas « cytotoxique ». Une molécule à dualité d'action possédera le profil du graphique (E).

Deux tableaux récapitulatifs sont fournis sous forme de fiche cartonnée en pièce détachée de la thèse : les molécules obtenues ont été classées selon les cinq différents profils de courbe en *figure 71*. Un premier tableau classe le profil des activités des molécules testées sur la protéine Mcl-1, en présence d'un inhibiteur de Bcl-x_L ; un deuxième tableau classe le profil des activités des molécules testées sur la protéine Bcl-x_L, en présence d'un inhibiteur de Mcl-1. Les résultats de ce *screening* nous ont permis d'orienter le choix des pharmacomodulations à considérer et d'enrichir les RSA.

C. 3. Synthèse des résultats

Nous avons également fait le choix de représenter les résultats biologiques sous forme de graphique (Figure 72). Par ce graphique, nous voulons permettre au lecteur d'avoir une vision directe et résumée de l'ensemble des molécules étudiées, afin de les comparer plus aisément.

Par la suite, les résultats biologiques seront présentés sous forme de graphique : en abscisse est représentée l'index cellulaire en présence d'un inhibiteur de Bcl-x_L (qui nous permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Mcl-1) et en ordonnée l'index cellulaire en présence d'un inhibiteur de Mcl-1 (qui nous permet d'évaluer l'activité inhibitrice de Bcl-x_L), plus le point est proche de 0, plus la molécule est active (Figure 72).

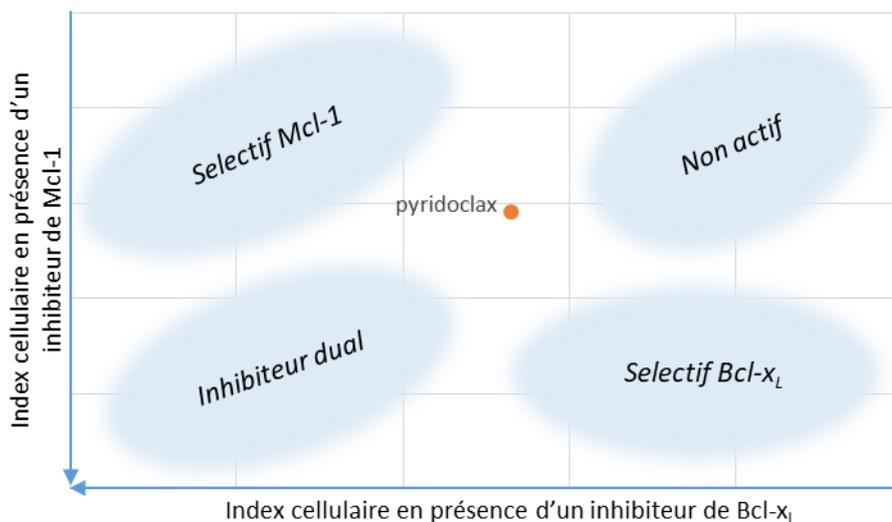


Figure 72. Graphique de synthèse des résultats biologiques obtenus pour le pyridoclax à 25 µM (en présence de siRNA).

En fonction des valeurs trouvées pour le pyridoclax, nous avons défini dans la *figure 72* différentes zones, correspondants : inhibiteur dual, sélectif de Mcl-1, sélectif de Bcl-x_L et non actif.

Chaque point du graphique correspond à une molécule **M**, les coordonnées de chaque point sont calculées de la façon suivante :

- pour les tests conduits en présence de siRNA, en abscisse est reportée la valeur (à t = 96 h) de l'index cellulaire pour la molécule **M** en présence de siRNA Bcl-x_L ($I_{M/siRNA\ Bcl-xL}$), divisée par la valeur de l'index cellulaire relative à siRNA Bcl-x_L en présence de DMSO dans le témoin (à t = 96 h) ($I_{siRNA\ Bcl-xL/DMSO}$) ; en ordonnée est reportée la valeur (à t = 96 h) de l'index cellulaire pour la molécule **M** en présence de siRNA Mcl-1 ($I_{M/siRNA\ Mcl-1}$), divisée par la valeur de l'index cellulaire relative à siRNA Mcl-1 en présence de DMSO dans le témoin (à t = 96 h) ($I_{siRNA\ Mcl-1/DMSO}$).

- lorsque l'expérience est réalisée en présence d'un inhibiteur synthétique, en abscisse est reportée la valeur (à t = 72 h) de l'index cellulaire pour la molécule évaluée en présence d'ABT-737 ($I_{M/ABT-737}$), divisée par la valeur de l'index cellulaire (à t = 72 h) relative à l'ABT-737 dans le témoin ($I_{ABT-737}$) ; en ordonnée est reportée la valeur (à t = 72 h) de l'index cellulaire correspondant à la molécule évaluée en présence de S63845 ($I_{M/S63845}$),

divisée par la valeur de l'index cellulaire (à t = 72 h) relative à S63845 dans le témoin (I_{S63845}).

$$\frac{I_{M/siRNA\ Mcl-1}}{I_{siRNA\ Mcl-1/DMSO}} \text{ vs. } \frac{I_{M/siRNA\ Bcl-xL}}{I_{siRNA\ Bcl-xL/DMSO}} \quad \text{ou} \quad \frac{I_{M/S63845}}{I_{S63845}} \text{ vs. } \frac{I_{M/ABT-737}}{I_{ABT-737}}$$

Les premiers tests de criblage ont été effectués en utilisant les siRNA ; puis pour s'affranchir de l'effet de la transfection, les résultats ont été confirmés en présence des agents pharmacologiques (ABT-737 et S63845). La pertinence des résultats obtenus en présence des agents pharmacologiques nous a conduit à ne plus utiliser les siRNA au profit des molécules ABT-737 et S63845.

1. Conception rationnelle d'inhibiteurs des protéines

Mcl-1 et Bcl-x_L

De nouvelles modulations de la structure du pyridoclax ont été envisagées à la fois pour améliorer l'activité vis-à-vis de la protéine Mcl-1, et également pour induire une activité vis-à-vis de la protéine Bcl-x_L (Figure 73). Les deux protéines cibles présentent des différences structurales qui se répercutent sur leur interaction avec les différents inhibiteurs. En effet, les inhibiteurs de la protéine Bcl-x_L (exemples : ABT-737, ABT-263) se lient à la protéine dans les poches hydrophobes P2 et P4, très flexibles ; le pyridoclax se lie quant à lui à la protéine Mcl-1, essentiellement par l'interaction hydrophobe du groupement styryle dans la poche P2, très rigide.

Premièrement, les modulations du pyridoclax par remplacement des pyridines terminales ont été envisagées afin d'induire une interaction de nos composés avec la protéine Bcl-x_L. En particulier, l'introduction d'éléments de flexibilité au bout de la chaîne terpyridine pourrait favoriser des interactions avec la poche P4 de la protéine Bcl-x_L. De la même façon, l'introduction de fonctions polaires pourrait permettre une interaction avec le résidu arginine (Arg¹³⁹) de la protéine Bcl-x_L, mais également avec celui présent sur la protéine Mcl-1 (Arg²⁶³), et améliorerait ainsi l'affinité pour les deux cibles.

Deuxièmement, les modulations par remplacement du groupement styryle ont été envisagées afin d'améliorer l'affinité pour la protéine Mcl-1 et d'établir de nouvelles RSA relatives à l'influence de la taille du groupement hydrophobe, ainsi que de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale.

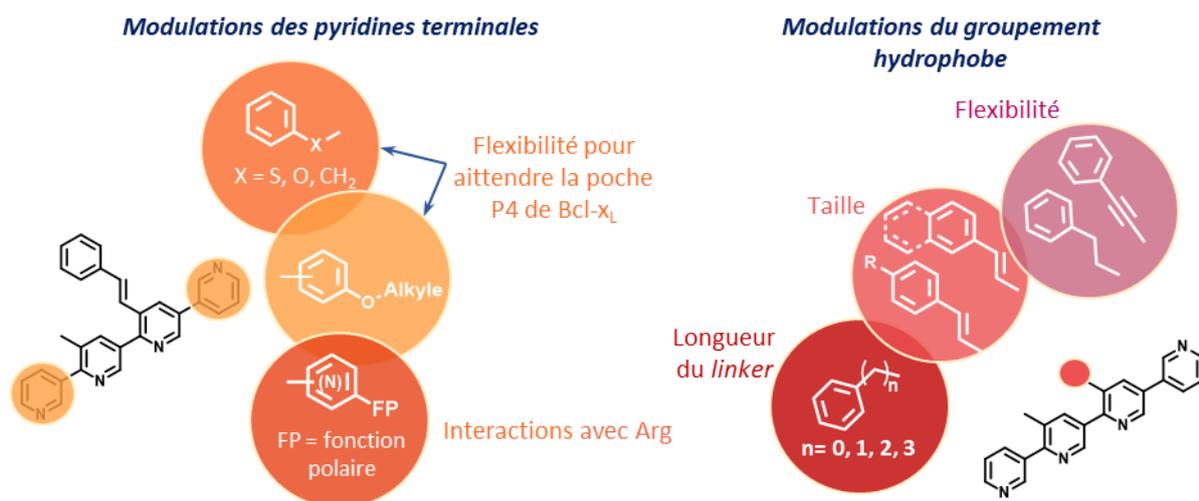


Figure 73. Modulations du pyridoclast envisagées.

Par remplacement des pyridines terminales (gauche) ; par remplacement du groupement styryle (droite).

1. 1. Modifications des pyridines terminales

La synthèse des analogues du pyridoclast obtenus par modification d'une des pyridines terminales utilise le concept du *garlanding*. Au moyen de cette méthodologie, nous avons pu mettre au point deux voies de synthèse, ayant un intermédiaire commun **3**, permettant d'aboutir à deux intermédiaires clés **6** et **10** qui permettent, grâce à la présence d'un atome de brome, l'introduction de nouveaux groupements lors d'une dernière étape (Schéma 6).

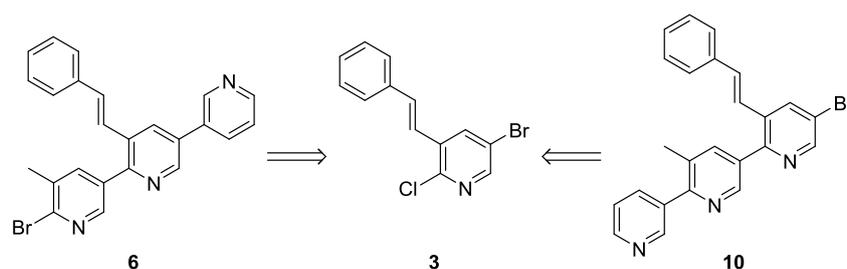


Schéma 6. Intermédiaires clés **6** et **10** obtenus à partir de l'intermédiaire commun **3**.

Ces modifications concernent la pyridine (A) et la pyridine (D) du squelette quaterpyridine du pyridoclast, qui seront appelées respectivement pyridine « *up* » et pyridine « *down* » (Figure 74). Nous allons par la suite nous référer à ces modifications en les appelant « modifications en série *up* » et « modifications en série *down* ». Pour ce faire, nous avons donc distingué la voie de synthèse *down*, qui amène à l'intermédiaire clé **6** ; et la voie de synthèse *up*, qui amène à l'intermédiaire clé **10**.

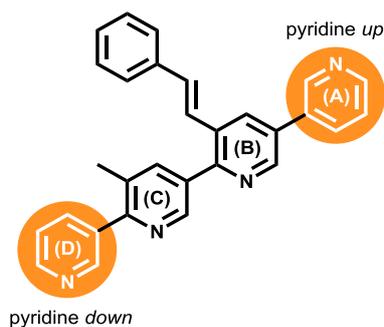
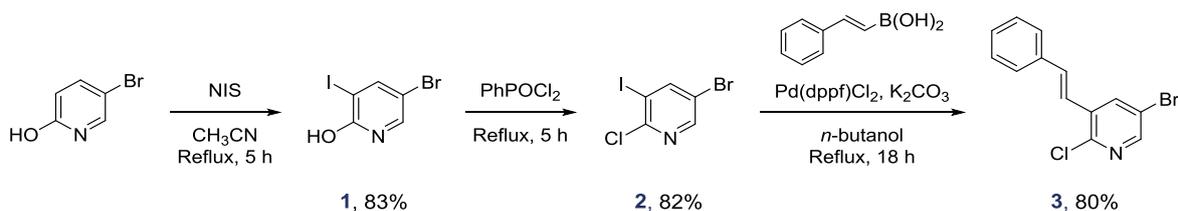


Figure 74. Pyridines up (A) et down (D) du pyridoclox.

Ces deux intermédiaires ont été obtenus à partir du composé **3**, la (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine. Cet intermédiaire **3** est obtenu en trois étapes à partir de la 5-bromo-2-hydroxypyridine commerciale. Après iodation suivie d'une chlorodéshydroxylation,²¹⁸ le composé **2** trihalogéné est obtenu puis engagé dans un couplage de type Suzuki-Miyaura (S-M) en présence de l'acide *trans*-2-phénylvinylboronique. La sélectivité de ce couplage sur l'atome d'iode permet d'obtenir le composé **3** attendu avec un rendement de 80 % (Schéma 7).



Réactifs : NIS (1,1 éq.) ; PhPOCl₂ (23 éq.) ; acide boronique (1,5 éq.), catalyseur (0,5 mol%), base (2,0 éq.)

Schéma 7. Synthèse de l'intermédiaire **3** à partir de la 5-bromo-2-hydroxypyridine.

Ensuite, les deux voies de synthèse *up* et *down* sont distinguées grâce à la nature de l'halogène en position 2 : sur le composé **3**, l'atome de chlore peut être remplacé par un atome d'iode *via* une réaction d'échange halogène/halogène^{183a} amenant à l'obtention du composé **7** (Schéma 8).

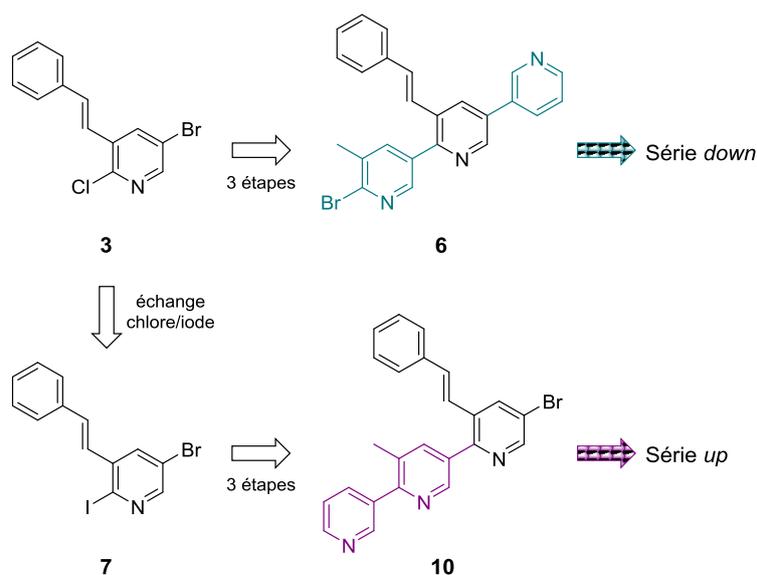
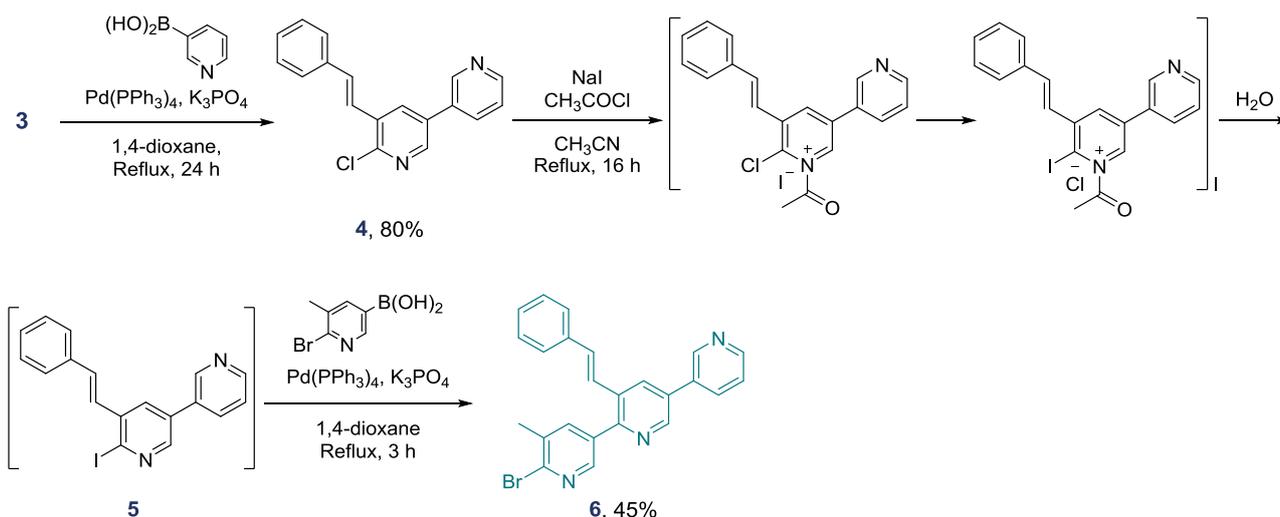


Schéma 8. Distinction des voies de synthèse up et down grâce à la nature de l'halogène en position 2 sur le composé **3** et **7**.

➤ Voie de synthèse **down** :

Le couplage de type S-M de l'acide pyridin-3-ylboronique avec l'intermédiaire **3** a lieu sélectivement sur l'atome de brome. Ceci nous permet d'obtenir le composé **4** avec un rendement de 80 %. L'atome de chlore est ensuite échangé avec un atome d'iode dans les conditions décrites par Corcoran *et al.*²³⁰ en présence de chlorure d'acétyle et d'iodure de sodium permettant d'obtenir le composé **5**. Cette molécule est ensuite engagée dans une réaction de couplage de type S-M avec l'acide 6-bromo-5-méthylpyridin-3-ylboronique pour conduire au composé **6**, intermédiaire clé de la voie de synthèse **down**, avec un rendement de 45 % (Schéma 8A).

²³⁰ Corcoran, R. C.; Bang, S. H. Iodopyridines from Bromo- and Chloropyridines. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (47), 6757–6758.



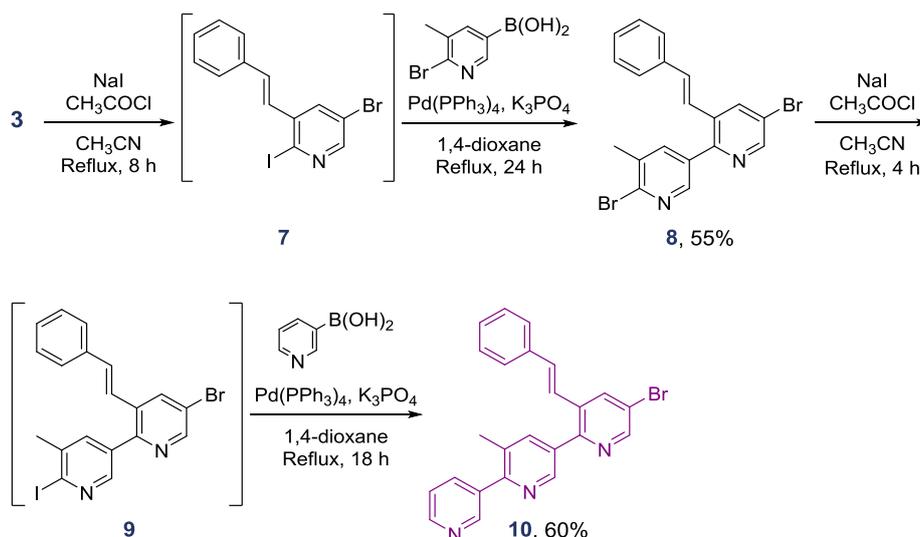
Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.) ; NaI (2,5 éq.), CH₃COCl (1,5 éq.)

Schéma 8A. Synthèse de l'intermédiaire clé **6** à partir du composé **3**.

➤ Voie de synthèse *up* :

À partir du composé **3**, une réaction d'échange halogène/halogène permet de substituer sélectivement l'atome de chlore en α de l'atome d'azote de la pyridine par un atome d'iode, et d'obtenir le dérivé **7**, qui est ensuite engagé dans une réaction de type S-M avec l'acide 6-bromo-5-méthylpyridin-3-ylboronique. La réaction a lieu sélectivement sur l'atome d'iode pour donner le composé **8** avec un rendement de 55%. Une réaction d'échange brome/iode sur ce dernier amène ensuite à l'obtention du composé **9**, qui, en présence de l'acide pyridin-3-ylboronique, donne l'intermédiaire bromé clé **10** de la voie de synthèse *up*, avec un rendement de 60 % (Schéma 8B).

À partir de ces intermédiaires clés **6** et **10**, les premiers analogues du pyridoclast ont pu être obtenus *via* des réactions de substitution nucléophile ou des réactions de couplage de type Negishi, S-M ou Ullman.



Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.) ; NaI (2,5 éq.), CH₃COCl (1,5 éq.)

Schéma 8B. Synthèse de l'intermédiaire clé **10** à partir de l'intermédiaire **3**.

1. 1. 1. Introduction d'éléments de flexibilité

▪ Conception

Premièrement, nous avons envisagé l'introduction d'un pont thioéther, éther ou méthylène, entre le squelette terpyridine du pyridoclax et un cycle aromatique terminal (phényle). Un pont de type méthylène permet d'apporter une grande flexibilité par la présence d'un atome de carbone sp³, permettant une libre rotation du cycle benzénique introduit. Concernant les ponts éther et thioéther la libre rotation de l'élément introduit est moindre : en effet, la délocalisation des électrons non liants sur le squelette polyaromatique diminue la flexibilité de l'élément introduit.

Deuxièmement, l'introduction de chaînes *O*-alkylées terminales a été envisagée, afin de favoriser des interactions hydrophobes supplémentaires.

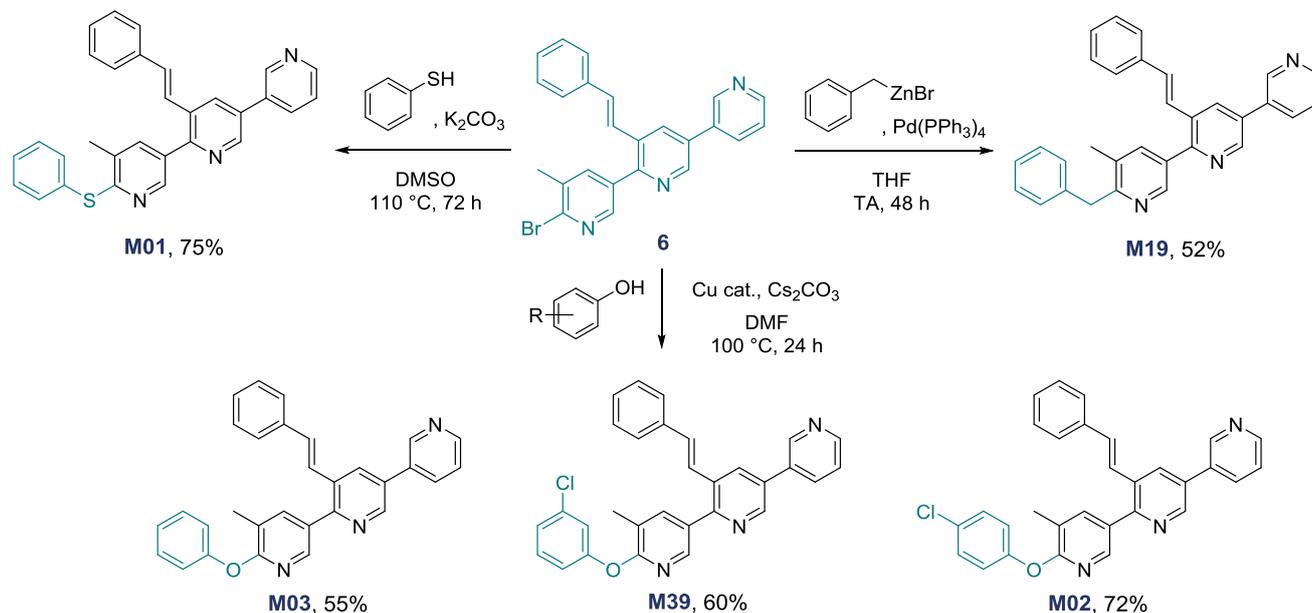
Ces modulations ont été effectuées en série *up* et *down*.

▪ Synthèse

➤ Introduction d'un pont flexible

Les modifications en **série down** ont été effectuées à partir de l'intermédiaire **6**. Ce composé est engagé dans des réactions de couplages métallo-catalysés et des réactions de substitution nucléophile aromatique (S_NAr), impliquant l'atome de brome en position 6 du

cycle pyridinique (Schéma 9). Le caractère électrophile de cette position permet de réaliser les modifications souhaitées avec de bons rendements.



Réactifs : PhSH (1,0 éq.), K₂CO₃ (2,0 éq.) ; BzZnBr (1,0 éq.), Pd(PPh₃)₄ (10 mol%) ; PhOH (1,0 éq.), Cu (10 mol%), Cs₂CO₃ (3,0 éq.).

Schéma 9. Modifications en série *down*.

Introduction d'un groupement thiophénoxy (**M01**), trois groupements phénoxy (**M03**, **M39** et **M02**) ou un groupement benzyle (**M19**).

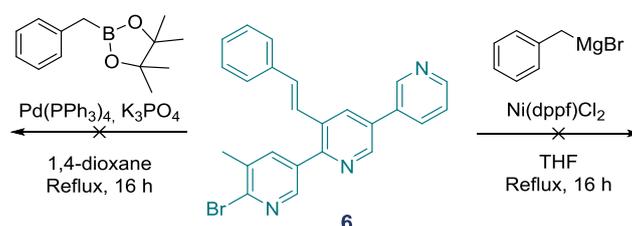
En présence de thiophénol et d'une base faible,²³¹ une réaction de S_NAr permet d'obtenir le composé **M01** avec un rendement de 75 %. Afin d'introduire un pont éther, nous avons envisagé de la même manière, d'utiliser une réaction de S_NAr en présence de différents phénols et d'une base forte, telle que NaH, mais sans succès (produit de départ récupéré). Cet échec, est probablement lié à un manque de réactivité du phénolate formé, pas assez nucléophile. L'utilisation d'un catalyseur semble donc nécessaire pour introduire un pont éther. L'intermédiaire **6** a donc été engagé dans des réactions de couplage C-O catalysées au cuivre, de type Ullman, en présence de différents phénols.²³² Les composés **M02**, **M03** et **M39** ont ainsi été obtenus avec des rendements compris entre 55 % et 72 %.

Pour introduire un pont méthylène terminal plusieurs conditions de réaction ont été évaluées. Initialement, l'intermédiaire **6** a été engagé dans une réaction de couplage de

²³¹ García-Rubia, A.; Fernández-Ibáñez, M. Á.; Gómez Arrayás, R.; Carretero, J. C. 2-Pyridyl Sulfoxide: A Versatile and Removable Directing Group for the PdII-Catalyzed Direct C-H Olefination of Arenes. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (13), 3567–3570.

²³² Kuska, M. S.; Majdi Yazdi, M.; Witham, A. A.; Dahlmann, H. A.; Sturla, S. J.; Wetmore, S. D.; Manderville, R. A. Influence of Chlorine Substitution on the Hydrolytic Stability of Biaryl Ether Nucleoside Adducts Produced by Phenolic Toxins. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (14), 7176–7185.

type S-M. Malheureusement aucune trace du composé souhaité n'a été observée dans ces conditions, ce qui est probablement lié à une faible réactivité de l'espèce boronique benzylique utilisée dans l'étape de transmétallation du cycle catalytique. Suite à cet échec, des conditions de couplage de type Kumada catalysé au nickel, en présence d'un organomagnésien, ont également été testées mais aucune conversion n'a été observée (Schéma 10), cette fois-ci probablement à cause d'une non-insertion du nickel dans la liaison C-Br. Dans les deux cas, seul le produit de départ est récupéré à l'issue de la réaction.



Réactifs : ester boronique (1,1 éq.), base (2,5 éq.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%) ; BzMgBr (1,5 éq.), Ni(dppf)Cl₂ (8 mol%).

Schéma 10. Essais réalisés pour introduire un groupement benzyle terminal.

Finalement, le composé attendu **M19** a pu être préparé dans les conditions de couplage pallado-catalysé de type Negishi en présence de bromure de benzylzinc(II) et palladium tetrakis,²³³ avec un rendement de 52 % (Schéma 9). Dans cette réaction, l'atome d'azote du cycle pyridinique favorise la coordination et l'insertion du palladium, et le composé zincique favorise l'étape de transmétallation du cycle catalytique.

Les mêmes modifications ont été appliquées en **série up** (Schéma 11). À partir de l'intermédiaire **10** possédant un atome de brome en position 3 du cycle pyridinique (B). La plus grande nucléophilie de cette position, comparée à la position 2 en série *down*, rend ces modifications plus difficiles à effectuer.

Devant ces difficultés réactionnelles, plusieurs conditions ont été évaluées (Tableau 3).

²³³ Yamashita, S.; Kurono, N.; Senboku, H.; Tokuda, M.; Orito, K. Synthesis of Phenanthro[9,10-b]Indolizidin-9-ones, Phenanthro[9,10-b]Quinolizidin-9-one, and Related Benzolactams by Pd(OAc)₂-Catalyzed Direct Aromatic Carbonylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009 (8), 1173–1180.

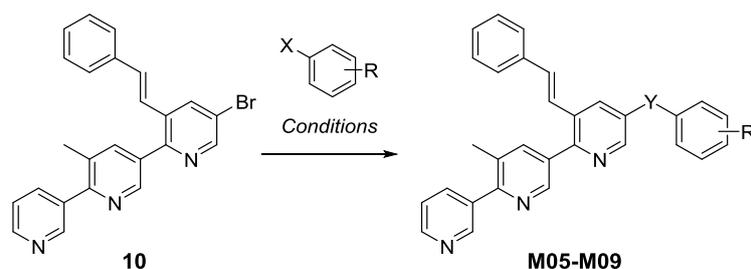


Tableau 3. Conditions de réaction utilisées pour l'introduction en série *up* d'un pont flexible thioéther (1-2), méthylène (3) et éther (4-10).

	R	X	Y	Catalyseur	Base/ Ligand	Solvant	T (°C)	Temps	Conv. (%) (LC-MS)	Rdt (%)	M
1	H	SH	S	/	K ₂ CO ₃	DMSO	110	72 h	50		M05
2	H	SH	S	CuBr ₂	Cs ₂ CO ₃	DMSO	110	48 h	80	77	
3	H	CH ₂ ZnBr	CH ₂	Pd(PPh ₃) ₄		THF	25	48 h	80	44	M06
4	H	OH	O	/	NaH	DMF	130	24 h	/		
5	H	OH	O	Cu	Cs ₂ CO ₃	DMF	MW 165	1 h 30	80	10	
6	H	OH	O	Cu	Cs ₂ CO ₃	DMF	MW 150 - 180	15-30 min	< 50		M07
7	H	OH	O	CuI	Cs ₂ CO ₃ / L- Proline	DMF	60	24 h	dehalogé nation		
8	4-Cl	OH	O	Cu	Cs ₂ CO ₃	DMF	130	5 h	10		
9	4-Cl	OH	O	Cu	Cs ₂ CO ₃	NMP	MW 180	30 min	10		M09
10	4-Cl	OH	O	Cu	Cs ₂ CO ₃	DMF	MW 165	1 h 30	80	5	

Réactifs : thiophénol (1,0 éq.), BzZnBr (1,0 éq.), phénol (1,0 éq.), catalyseur (10 mol%), base (2,0–3,0 éq.).

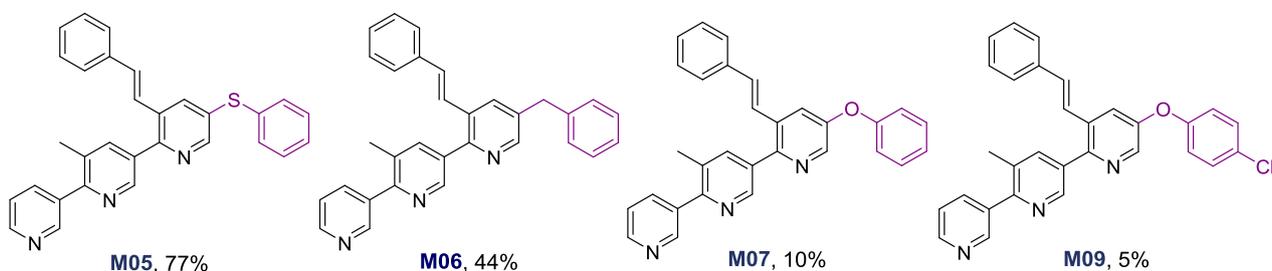


Schéma 11. Modifications effectuées en série *up*.

Introduction d'un groupement thiophényle (**M05**), un groupement benzyle (**M06**) et deux groupements phénoxy (**M07** et **M09**).

Premièrement, à partir de l'intermédiaire **10**, un couplage C-S de type Ullman a permis l'introduction d'un pont thioéther²³⁴ donnant ainsi le composé **M05** avec un rendement de 77 %. En absence de catalyseur, on observe une conversion de 50 % (évaluée par LC-MS) (tableau 3, *entrées 1 et 2*).

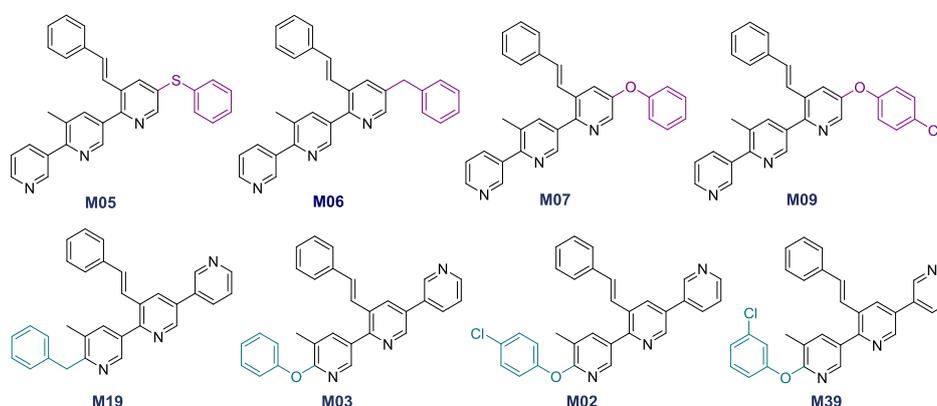
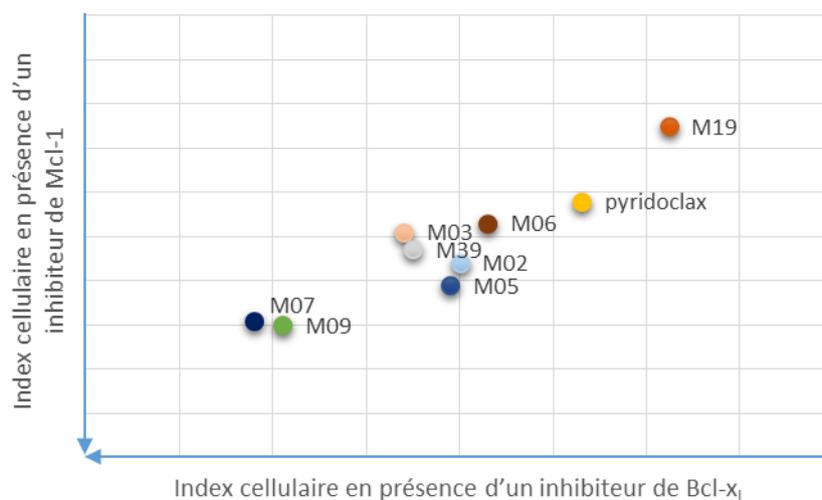
Deuxièmement, l'introduction d'un pont méthylène a été réalisée à l'aide d'un couplage pallado-catalysé de type Negishi en présence de bromure de benzylzinc(II), et a permis d'obtenir le composé souhaité **M06** avec un rendement de 44 % (tableau 3, *entrée 3*).

Enfin, l'introduction d'un pont éther dans cette série a nécessité plus d'efforts (tableau 3, *entrée 4-10*). En effet, l'intermédiaire **10** présente une faible réactivité dans le couplage de type Ullman en présence de phénols. Des faibles taux de conversions ont été observés pour des temps de réaction compris entre 15 min et 5 h (tableau 3, *entrées 6, 8-9*), tandis qu'un temps de réaction de 24 h entraîne la déshalogénéation du composé **10** (tableau 3, *entrée 7*). Sous irradiations micro-ondes, une température supérieure à 150 °C est nécessaire pour observer la formation du produit souhaité, toujours en mélange avec le produit secondaire déshalogéné (tableau 3, *entrées 5 et 10*). Néanmoins, sous applications micro-ondes, les composés **M07** et **M09** ont tout de même pu être isolés avec des rendements respectifs de 10 % et 5 % (produit de déshalogénéation majoritaire).

▪ Discussion des résultats biologiques

Selon les premiers résultats biologiques obtenus (Graphique 1), la plupart des modifications structurales effectuées à partir du pyridoclax permet d'abaisser l'index cellulaire et d'améliorer l'activité inhibitrice de la protéine Mcl-1, et ce de façon plus importante quand la modification concerne la position *up*. Ceci est en accord avec les études de dynamiques moléculaires effectuées sur le complexe pyridoclax/Mcl-1, dans lesquelles il a été montré que la pyridine *down* interagit avec le résidu Arg²⁶³ pour stabiliser le complexe.²¹⁸

²³⁴ Guzaev, A. P. Reactivity of 3H-1,2,4-Dithiazole-3-Thiones and 3H-1,2-Dithiole-3-Thiones as Sulfurizing Agents for Oligonucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52 (3), 434–437.



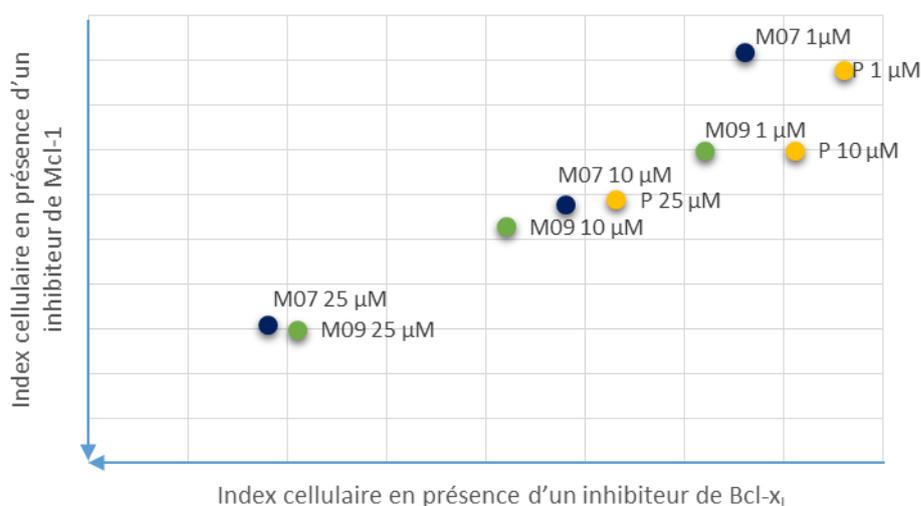
Graphique 1. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence des siRNA, 24 h après traitement à 25 μM de pyridoclast ou de ses analogues issus de modifications en position *down* (**M02**, **M03**, **M19**, **M39**) et en position *up* (**M05**, **M06**, **M07**, **M09**).

De la comparaison des résultats obtenus pour les molécules **M19** et **M06** (présence d'un pont méthylène dans les molécules en série *up* et *down*) avec ceux obtenus pour les molécules **M03**, **M07**, **M09**, **M39**, **M02** et **M05** (comportant respectivement un hétéroatome *O* ou *S* en série *up* et *down*), il semble que la présence d'un hétéroatome soit nécessaire pour avoir une activité inhibitrice de Mcl-1 et Bcl- x_L . L'introduction de groupements flexibles peut,

- d'une part, favoriser de nouvelles interactions (hydrophobes, ou polaires dans le cas des hétéroatomes) avec les poches P1, P3 et P4 sur la surface de liaison de la protéine Mcl-1,
- et d'autre part, permettre des interactions avec les poches P2 ou P4 sur la surface de liaison de la protéine Bcl- x_L .

Plus particulièrement, les composés **M07** et **M09**, portant respectivement des groupements phénoxy et 4-chlorophénoxy en position *up*, présentent une bonne activité inhibitrice des deux cibles à 25 μM (Graphique 1), en accord avec le profil d'activité « cytotoxique partiel » reportés sur la fiche cartonnée. Dans ce cas, l'évaluation biologique de ces deux composés a été réalisée à 10 μM et 1 μM : à 10 μM , pour ces deux composés, l'activité inhibitrice de Mcl-1 est comparable à celle du pyridoclox à 25 μM (Graphique 2) et ils présentent une activité inhibitrice de Bcl-x_L intéressante.



Graphique 2. Effet dose-dépendant.

Composés **M07** (bleu), **M09** (vert) et le pyridoclox (**P**, jaune) aux concentrations de 1 μM , 10 μM et 25 μM .

Les composés **M02**, **M03** et **M39**, portant respectivement des groupements 4-chlorophénoxy, phénoxy et 3-chlorophénoxy en position *down*, montrent une plus faible activité que les composés **M07** et **M09** sur la protéine Bcl-x_L (Graphique 1), ce qui suggère que les modifications structurales dans cette position sont défavorables à l'interaction avec la protéine Bcl-x_L.

➤ Introduction de chaînes *O*-alkylées

▪ Conception

Face aux résultats biologiques encourageants obtenus pour les composés portant un groupement *O*-phényl en position *up*, nous avons choisi de poursuivre nos investigations autour de molécules possédant un atome d'oxygène et d'introduire des chaînes linéaires *O*-alkylées comme éléments de flexibilité.

Des études de modélisation moléculaire ont suggéré que l'introduction de chaînes *O*-alkylées pouvait améliorer l'interaction de nos composés avec la protéine Mcl-1, en permettant des interactions supplémentaires avec la poche P4 de la protéine (Figure 75).

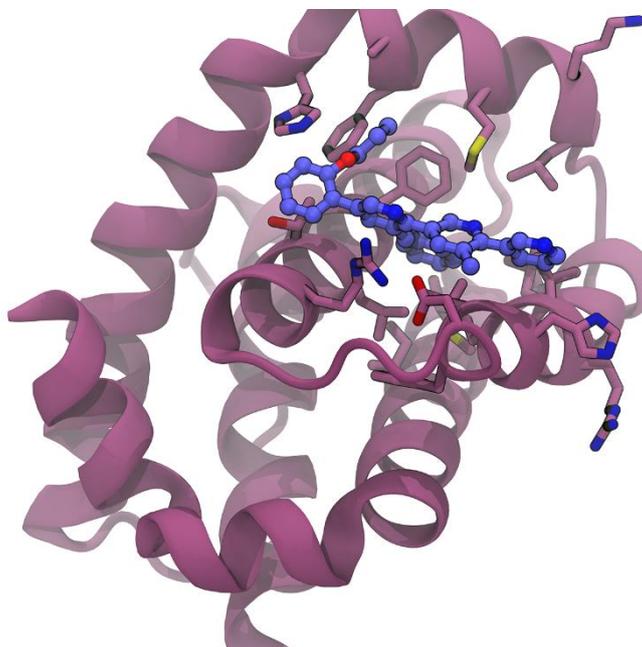
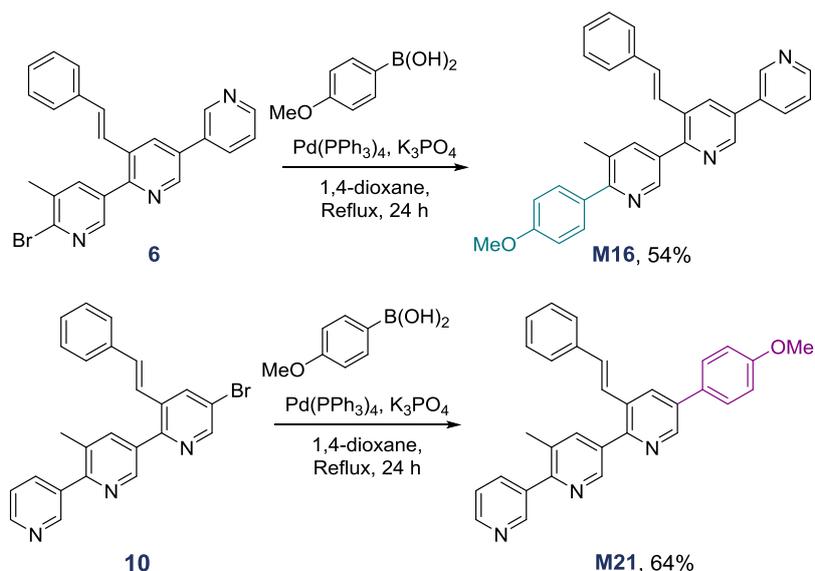


Figure 75. Complexe in silico M25/Mcl-1. La chaîne *O*-alkylée de la molécule est dirigée vers la poche P4 de la protéine.

L'introduction de chaînes *O*-alkylées peut également favoriser des interactions hydrophobes avec la protéine Bcl-x_L, ainsi qu'une interaction polaire entre l'atome d'oxygène et l'arginine impliquée dans les IPPs avec les protéines pro-apoptotiques endogènes. Les premières modulations ont donc été effectuées en série *up*, puis elles ont été réalisées en série *down* afin d'établir de nouvelles RSA.

▪ Synthèse

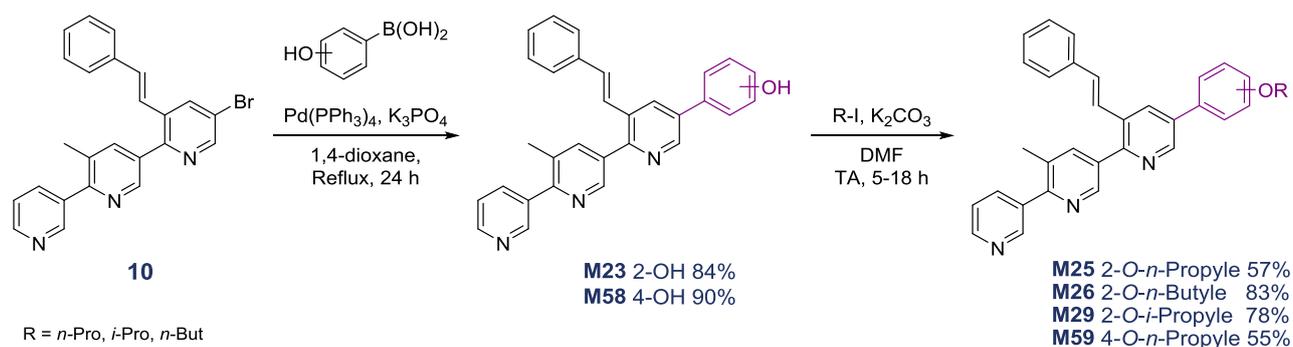
Les composés **M16** et **M21**, portant un groupement 4-méthoxyphényl en série *up* et *down*, ont été obtenus par couplage de type S-M à partir des intermédiaires clés **6** et **10** et l'acide 4-méthoxyphénylboronique (Schéma 12).



Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.)

Schéma 12. Voies de synthèse des composés **M16** et **M21** à partir des intermédiaires **6** et **10**.

L'introduction de chaînes *O*-alkylées plus longues a été réalisée à partir d'analogues du pyridoclast portant un cycle phénol terminal. Ces analogues phénoliques sont obtenus à partir des intermédiaires clés (composés **6** et **10**). La voie de synthèse choisie permet d'introduire différents groupements lors d'une dernière étape de substitution nucléophile de type 2 (S_N2), en présence de différents iodures d'alkyles disponibles au laboratoire (Schéma 13).



R = *n*-Pro, *i*-Pro, *n*-But

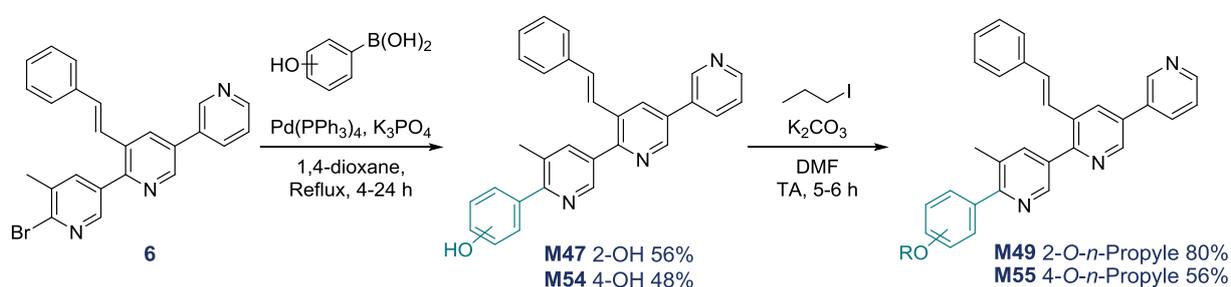
Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.) ; R-I (2,0 éq.), base (4,0 éq.)

Schéma 13. Voie de synthèse utilisée pour l'introduction d'une chaîne *O*-alkylée terminale à partir de l'intermédiaire **10**.

En **série up**, le couplage de type S-M de l'intermédiaire **10** avec les acides 2- ou 4-(hydroxyphényl)boroniques permet d'obtenir les composés **M23** et **M58** avec de très bons rendements (84 % et 90 %, respectivement). Le composé **M23** a ensuite été engagé dans une réaction de S_N2 avec le 1-iodopropane, le 2-iodopropane et le 1-iodobutane pour

donner respectivement les composés **M25**, **M29** et **M26** avec des rendements compris entre 57 % et 83 %. Le produit **M59** a quant à lui été obtenu avec un rendement de 55 % à partir du composé **M58** en présence de 1-iodopropane.

Ensuite, des modifications similaires ont été appliquées en série down à partir de l'intermédiaire **6**. Les composés **M47** et **M54** ont ainsi été préparés par couplage de type S-M avec les acides 2- ou 4-(hydroxyphényl)boroniques. Ces composés ont ensuite été alkylés en présence de 1-iodopropane pour obtenir respectivement les composés **M49** et **M55** avec des rendements de 80% et 56% (Schéma 14).



Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.) ; R-I (2,0 éq.), base (4,0 éq.)

Schéma 14. Voie de synthèse utilisée pour l'introduction d'une chaîne *O*-alkylée terminale à partir de l'intermédiaire **6**.

▪ Discussion des résultats biologiques

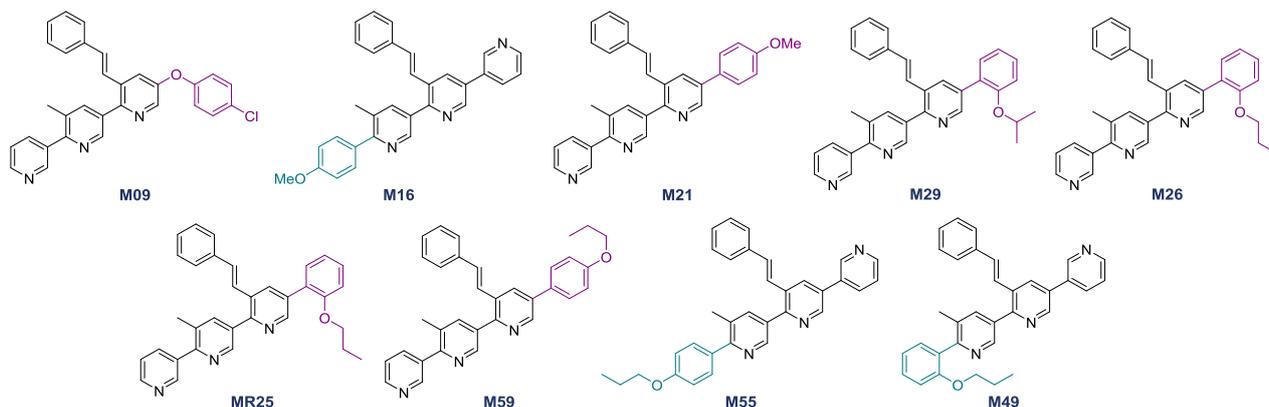
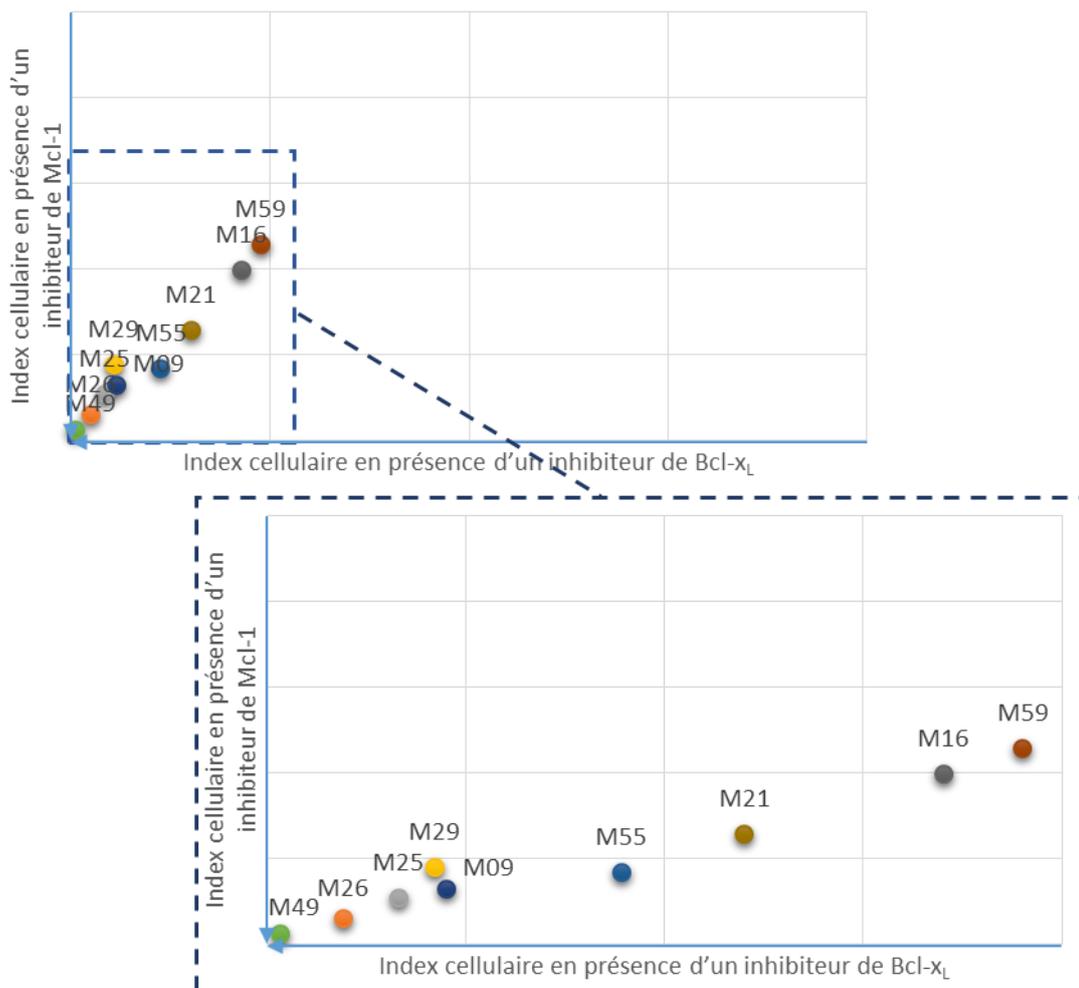
Les résultats biologiques obtenus pour ces composés seront comparés à ceux obtenus pour le composé **M09**, première molécule comportant un pont éther obtenue, considérée comme molécule de référence.

En **série up** (molécules **M21**, **M25**, **M26**, **M29**, **M59**), le remplacement d'un groupement *O*-phényle (molécule **M09**) par un groupement *O*-alkyle permet d'améliorer l'activité pro-apoptotique des composés, mais seulement si la chaîne *O*-alkylée se trouve en position 2 du cycle aromatique terminal.

En effet, les composés **M25** et **M29**, portant respectivement des groupements 2-propoxyphényle et 2-isopropoxyphényle, présentent des activités sur les protéines cibles comparables au composé **M09**. En particulier le composé **M26**, portant un groupement 2-butoxyphényle, présente une meilleure activité inhibitrice des protéines cibles que le composé **M09**. En revanche, les composés **M59** et **M21**, portant respectivement un groupement 4-propoxyphényle et 4-méthoxyphényle, présentent une activité très réduite comparée à celle du composé **M09** (Graphique 3).

En **série down**, de la même façon, la longueur et la position de la chaîne *O*-alkylée sur le cycle aromatique terminal influencent les activités des composés (molécules **M16**, **M49**, **M55**).

Les composés **M16** et **M55**, portant la chaîne *O*-alkylée (*O*-méthyle ou *O*-propyle, respectivement) en position 4 du cycle aromatique terminal, présentent une activité moindre sur les deux protéines cibles comparée à celle du composé **M09** (Graphique 3). En revanche, le composé **M49**, portant un groupement 2-propoxyphényle, possède une activité nettement améliorée sur les deux protéines cibles comparée à celle du composé **M09**.

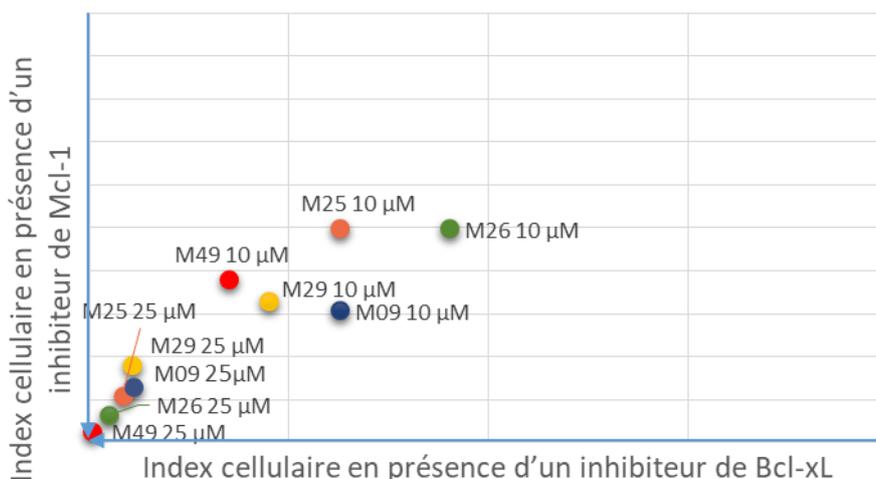


Graphique 3. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence d'ABT-737 et de S63845, 48 h après traitement à 25 μ M des composés portant un groupement *O*-phényle (**M09**) ou *O*-alkyle : **M21**, **M25**, **M26**, **M29** et **M59** en série *up* ; **M16**, **M49** et **M55** en série *down*.

En conclusion, la présence d'une chaîne *O*-alkyle (C_3 - C_4) en position 2 du cycle aromatique terminal semble donc permettre des fortes interactions avec les protéines cibles, et ce quelle que soit la série (*up* ou *down*).

Parmi les composés obtenus suite à l'introduction d'un groupement flexible (ponts flexibles et chaînes *O*-alkylées), le composé **M49** est celui qui présente le meilleur profil d'inhibiteur dual. Son analogue en série *up*, le composé **M25**, ainsi que le composé **M26**, présentent également une très bonne activité inhibitrice sur les deux protéines cibles. De plus, l'évaluation biologique effectuée pour les composés plus intéressants (**M49**, **M26**, **M25** et **M29**) à 10 μM montre que l'activité est dose-dépendante, permettant d'avancer l'hypothèse que ces composés ne sont pas toxiques (Graphique 4).



Graphique 4. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence d'ABT-737 et de S63845, 48 h après traitement à 10 μM et 25 μM des composés portant un groupement *O*-phényle (**M09**) ou *O*-alkyle : **M25**, **M26** et **M29** en série *up* ; **M49** en série *down*.

1. 1. 2. Introduction de fonctions polaires

▪ Conception

Nous avons envisagé l'introduction de fonctions polaires sur nos structures (de type hydroxyle, acide carboxylique, amide, nitrile, cétone, aldéhyde et sulfonamide), pour favoriser l'interaction de nos composés avec l'arginine des protéines cibles, impliquée dans les IPPs avec les membres pro-apoptotiques endogènes (Arg¹³⁹ de la protéine Bcl-x_L et Arg²⁶³ de la protéine Mcl-1).

Les modifications en série *up* ont été suggérées par des études de modélisation moléculaire afin d'améliorer l'activité inhibitrice de la protéine Mcl-1. Les premières modulations ont donc été effectuées en série *up*, puis elles ont été réalisées en série *down* afin d'établir de nouvelles RSA.

▪ Synthèse

Pour ce faire, des réactions de couplage de type S-M ont été mises en œuvre à partir des intermédiaires clés **6** et **10** et de différentes espèces boroniques portant diverses fonctions polaires (FP) (Tableaux 4 et 5).

En série up, l'intermédiaire **10** a ainsi été engagé dans des réactions de type S-M avec différentes espèces boroniques, et les composés attendus (**M04**, **M24**, **M31**, **M33**, **M34**, **M35**, **M37**, **M40**, **M50**) ont été obtenus avec des rendements variables compris entre 17 % et 80 % (Tableau 4).

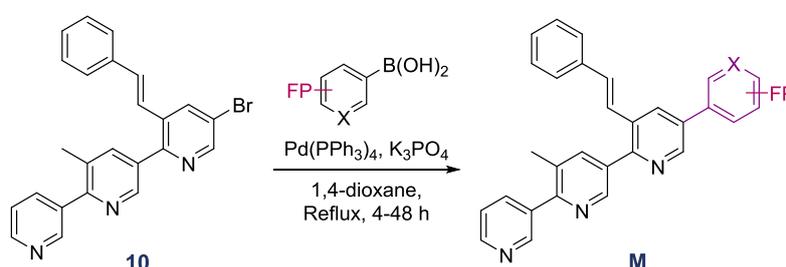


Tableau 4. Composés obtenus en série *up* par couplage de type S-M à partir de l'intermédiaire **10** et de différentes espèces boroniques portant des fonctions polaires (FP).

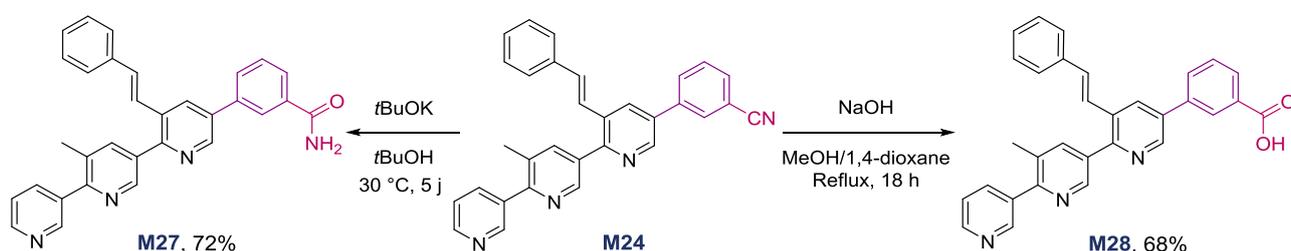
entrée	X	FP	M	Rdt (%)
1	C	3-CN	24	60
2	C	2-CN	35	17
3	N	5-CN	37	46
4	N	6-CN	40	20
5	C	4-CHO	04	52
6	C	2-CHO	33	80
7	C	2-COMe	34	65
8	C	4-COMe	50	30
9	C	2-SO ₂ NMe ₂	31	39

Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.)

Pour les composés portant une fonction nitrile (**M24**, **M35**, **M37**, **M40**), les faibles rendements peuvent s'expliquer par la tendance de ce groupement à s'hydrolyser en fonction amide ; de plus, le caractère pauvre en électrons des acides 6-cyanopyridin-3-yl et 5-cyanopyridin-3-ylboroniques défavorise la réaction de couplage.

Ainsi, par exemple, la réaction de couplage entre l'intermédiaire **10** et l'acide 2-cyanophénylboronique conduit majoritairement au composé amide **M36**, avec un rendement de 50 %, tandis que le composé cyané **M35** est isolé avec un rendement de 17 %.

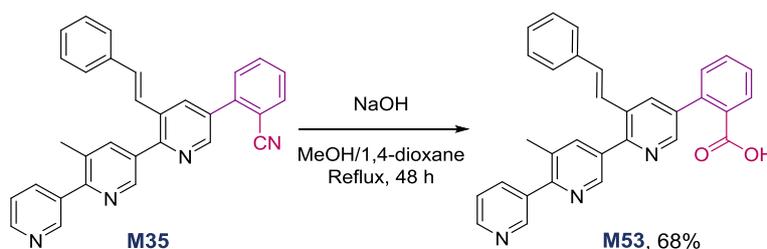
À partir du composé cyané **M24**, les composés **M27** et **M28** ont été obtenus par l'hydrolyse basique de la fonction nitrile. L'utilisation de deux bases différentes, *t*BuOK ou NaOH, permet d'isoler soit l'amide **M27** correspondant avec un rendement de 72 %, soit l'acide carboxylique **M28** avec un rendement de 68 % (Schéma 15).



Réactifs : *t*BuOK (3,0 éq.), NaOH (4,0 éq.)

Schéma 15. Conditions d'hydrolyse basique de la fonction nitrile utilisées.

En utilisant les mêmes conditions de réaction, le composé **M35** est converti en acide carboxylique correspondant (composé **M53**) avec un rendement de 68 % (Schéma 16).



Réactifs : NaOH (4,0 éq.)

Schéma 16. Conditions d'hydrolyse basique de la fonction nitrile utilisées.

En **série down**, l'intermédiaire **6** a été engagé dans des réactions de type S-M en présence de différents acides boroniques tels que l'acide 4-formylphénylboronique, l'acide 6-cyanopyridin-3-ylboronique, l'acide 3-cyanophénylboronique et l'acide 2-acétylphénylboronique, pour donner respectivement les composés **M00**, **M41**, **M43** et **M45** avec des rendements respectifs de 47 %, 15 %, 57 % et 65 % (Tableau 5). Le caractère pauvre en électron de l'acide 6-cyanopyridin-3-ylboronique, ainsi que l'hydrolyse de la

fonction nitrile en amide correspondant (observé en analyses LC-MS), expliquent le faible rendement obtenu pour la formation du composé **M41** (15 %) (sous-produits non isolés).

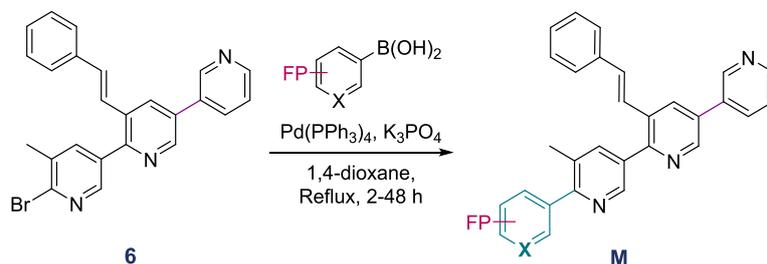
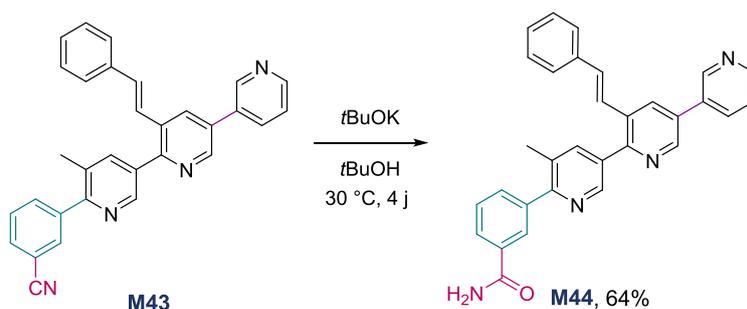


Tableau 5. Composés obtenus en série *down* par couplage type S-M de l'intermédiaire **6** avec différentes espèces boroniques portant des fonctions polaires (FP).

entrée	X	GP	M	Rdt (%)
1	C	4-CHO	00	47
2	N	6-CN	41	15
3	C	3-CN	43	57
4	C	2-COMe	45	65

Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.)

De plus, en utilisant les conditions d'hydrolyse en milieu basique présentées dans le schéma 15, le composé **M43** a été converti en amide correspondant (composé **M44**) avec un rendement de 64 % (Schéma 17).



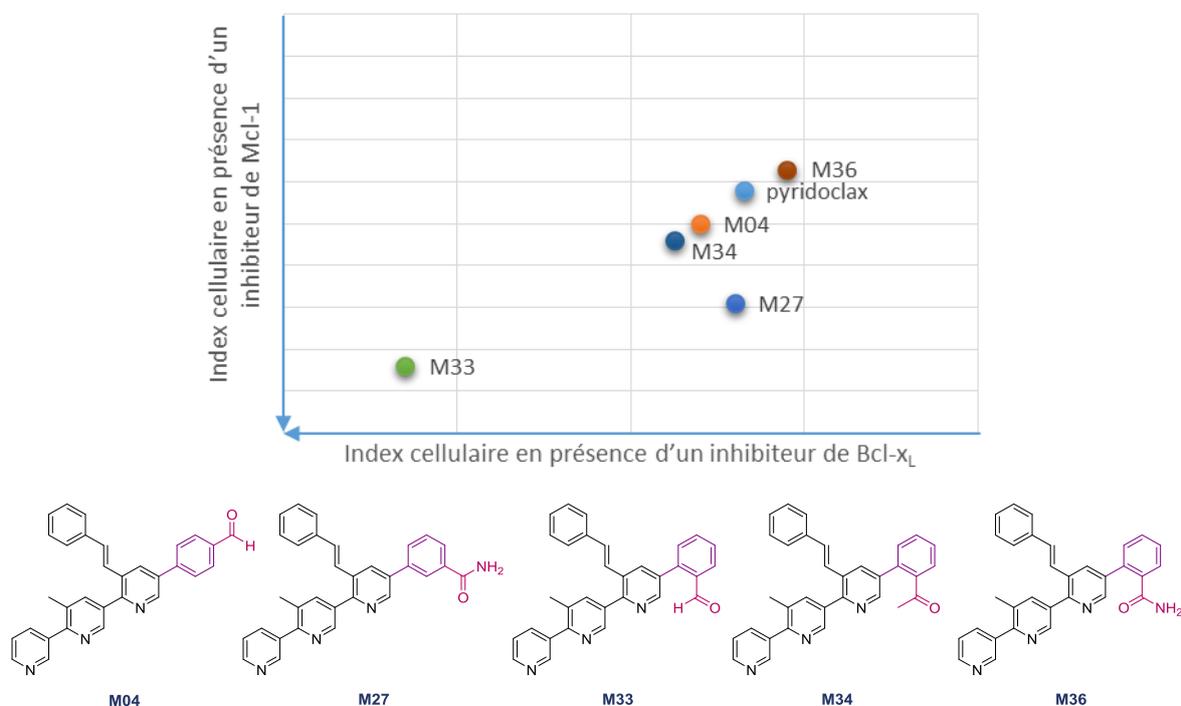
Réactifs : *t*BuOK (3,0 éq.)

Schéma 17. Hydrolyse basique du composé **M43**.

▪ Discussion des résultats biologiques

Tout d'abord, en série up, à une concentration de 25 μ M, la plupart des composés montrent une activité inhibitrice de la protéine Mcl-1 similaire à celle du pyridoclast. L'activité inhibitrice de Bcl-x_L est améliorée par la présence d'une fonction polaire (FP) telles qu'une fonction amide, cétone ou aldéhyde. De plus, la position de la FP sur le cycle

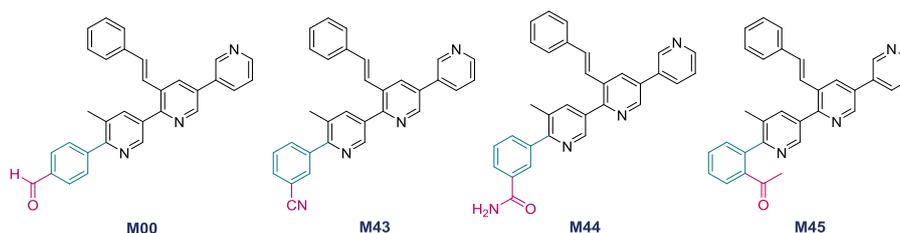
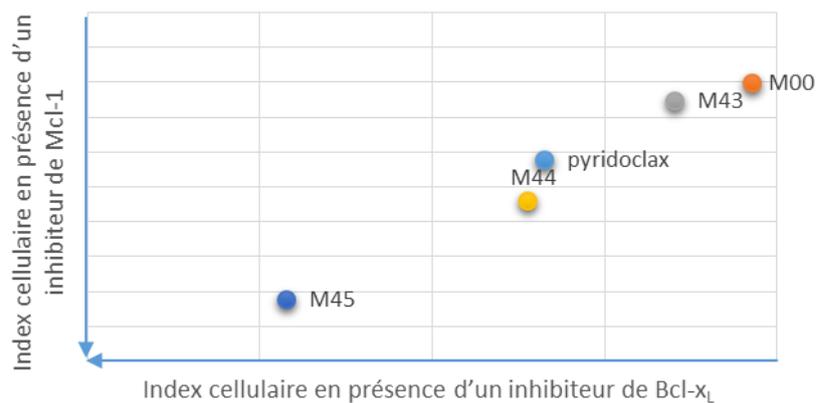
terminal influence l'activité du composé. En effet, les composés **M27** et **M36**, portant tous les deux une fonction amide (respectivement en positions 3 et 2 du cycle benzénique), présentent des activités différentes sur la protéine Bcl-x_L: le composé **M27** portant la fonction amide en position 3 présente une meilleure activité (Graphique 5) sur Bcl-x_L que le composé **M36**. Dans le cas des composés substitués par une fonction cétone (**M34** et **M50**), la meilleure activité inhibitrice de Mcl-1 et Bcl-x_L est observée lorsque la fonction se trouve en position 2 du cycle benzénique (**M34 graph. 5**). Enfin, la présence en position 2 d'une fonction aldéhyde permet d'obtenir un composé avec une forte activité inhibitrice des deux protéines cibles (**M33 graph. 5**).



Graphique 5. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence des siRNA, 24 h après traitement à 25 μ M de pyridoclast ou de ses analogues portant une FP en série *up*.

Ensuite, la même évaluation a été réalisée en **série down** à 25 μ M. En accord avec les résultats obtenus en série *up*, la présence d'une fonction amide en position 3 du cycle benzénique (composé **M44**), tout comme celle d'une fonction cétone en position 2 (composé **M45**), confère aux composés **M44** et **M45** une meilleure activité inhibitrice de la protéine Bcl-x_L (Graphique 6).



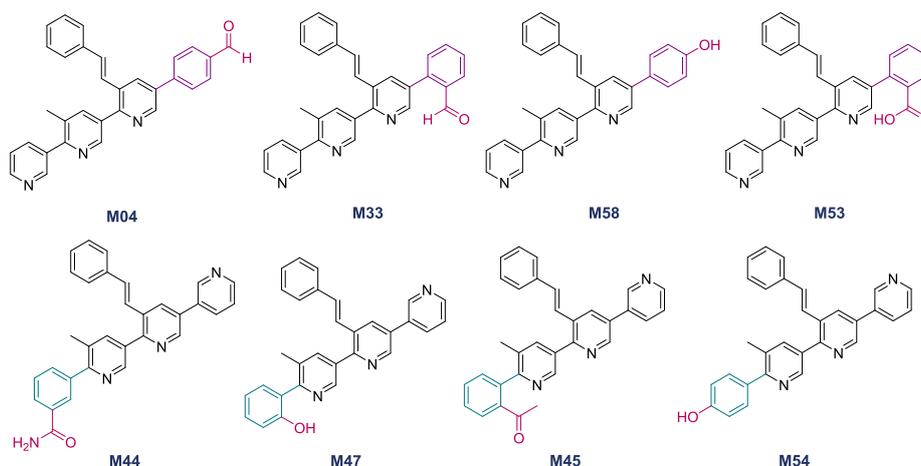
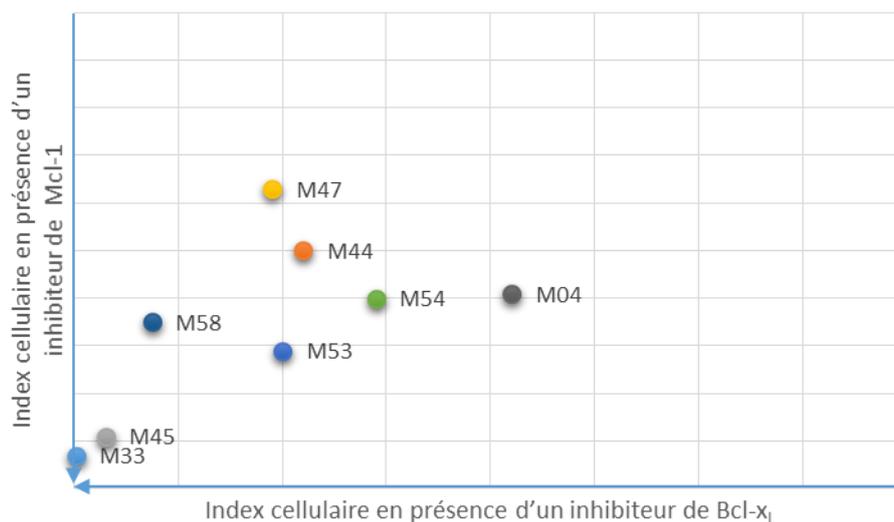
Graphique 6. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence des siRNA, 24 h après traitement à 25 μ M de pyridoclax ou de ses analogues portant une FP en série *down*.

En conclusion, l'introduction de certaines fonctions (cétone et amide) permet donc d'acquérir une activité inhibitrice de la protéine Bcl-x_L, probablement grâce à la formation d'interactions entre ces fonctions et le résidu Arg¹³⁹ de la protéine, et ce quelle que soit la série (*up* ou *down*). Ceci est probablement lié à une libre rotation des molécules dans les poches de liaison des protéines cibles, leur permettant d'établir les interactions nécessaires pour stabiliser les complexes. Cependant, la position de la FP sur le cycle aromatique terminal semble influencer l'activité des composés : ceci est probablement dû au fait que certaines positions sont plus accessibles pour l'interaction avec la protéine.

À partir des données issues de l'évaluation biologique effectuée en présence des siRNA, les composés les plus intéressants (**M04**, **M34**, **M33**, **M44**, **M45**, **M47**) ont été évalués en présence d'ABT-737 et de S63845 (Graphique 7). Les résultats obtenus avec ce test sont concordants avec les résultats montrés précédemment : les composés **M33** et **M45** présentent la meilleure activité inhibitrice des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L et des profils d'inhibiteurs duals, en accord avec les profils des activités reportés sur la fiche cartonnée.

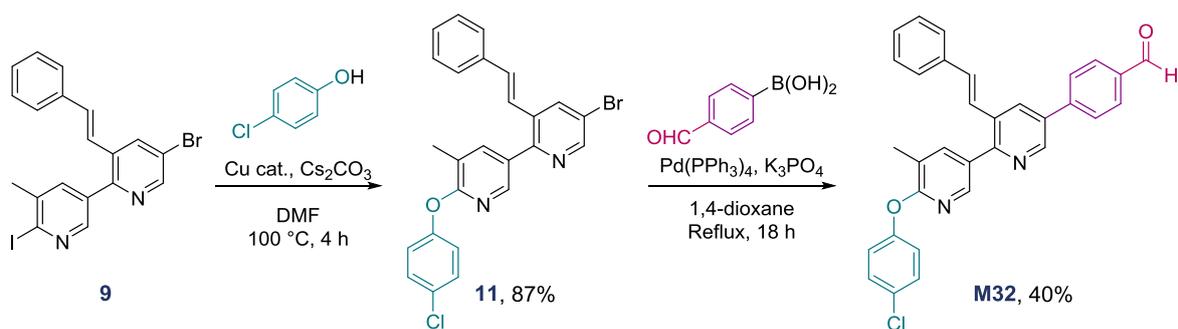
De plus, la molécule **M58** (évaluée uniquement dans ces conditions expérimentales), présentant une fonction hydroxyle en position 4 du cycle benzénique en série *up*, montre une plus grande activité inhibitrice de la protéine Mcl-1 comparée à son analogue en série *down* **M54**.



Graphique 7. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence d'ABT-737 et de S63845, 48 h après traitement à 25 μ M de composés portant une FP en série *down* (**M45**, **M54**, **M47**, **M44**) et en série *up* (**M04**, **M33**, **M53**, **M58**).

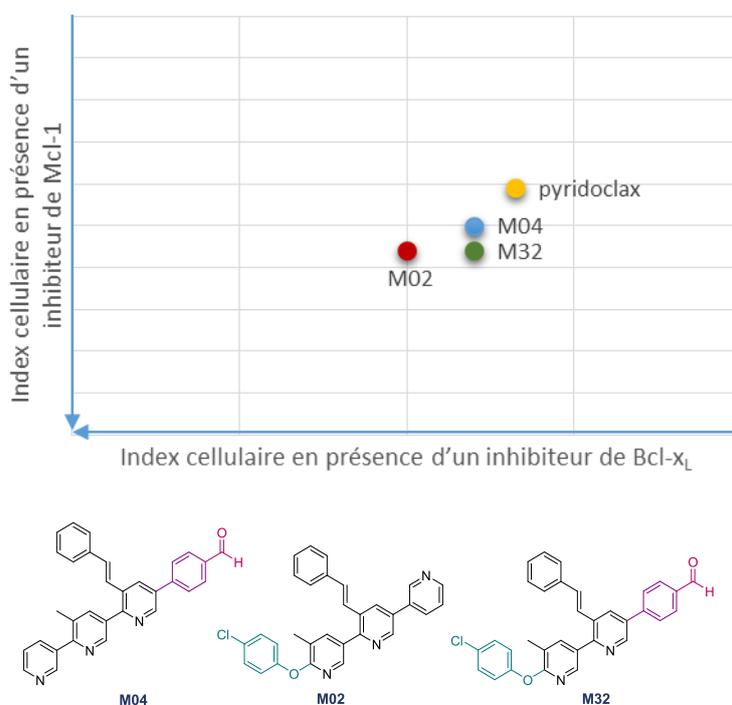
À partir des données issues de l'évaluation biologique des composés **M02** et **M04**, nous avons envisagé la synthèse d'un composé portant les deux modifications (4-benzaldéhyde en position *up* et 4-chlorophénoxy en position *down*), en partant du composé **9**, (Schéma 18).



Réactifs : phénol (1,0 éq.), Cu (10 mol%), Cs₂CO₃ (3,0 éq.) ; acide boronique (1,1 éq.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%), K₃PO₄ (2,5 éq.)

Schéma 18. Voie de synthèse du composé **M32** à partir de l'intermédiaire **9** iodé.

L'évaluation biologique du dérivé **M32** montre que ce dernier n'est pas meilleur que les composés **M02** et **M04** (Graphique 8). Ces résultats sont en accord avec les données issues d'études de modélisation moléculaire précédemment menées au laboratoire, selon lesquelles le remplacement des deux pyridines terminales par des cycles benzéniques conduit à une perte d'activité inhibitrice de la protéine Mcl-1 ;²¹⁸ ces résultats confirment l'importance des interactions induites par l'atome d'azote d'une des deux pyridines avec la protéine Mcl-1.



Graphique 8. Synthèse des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

En présence des siRNA, 24 h après traitement à 25 µM de pyridoclast ou de ses analogues **M02**, **M04** et

M32.

1. 2. Modifications du groupement hydrophobe

Les modulations concernant le groupement styryle, présent sur la structure du pyridoclax, ont été envisagées afin d'améliorer l'activité du composé sur la protéine Mcl-1 et d'établir de nouvelles RSA relatives à l'influence d'une part de la taille du groupement hydrophobe, et d'autre part de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale.

En particulier, en augmentant la taille du groupement hydrophobe il est possible d'augmenter l'interaction avec la poche P2 de la protéine Mcl-1 (Figure 76).

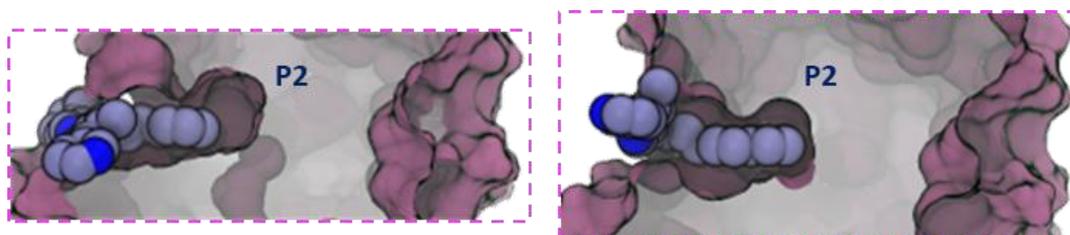


Figure 76. Zoom sur la poche P2 de Mcl-1.

Interaction avec le pyridoclax (gauche) et un analogue présentant un groupement 2-vinylnaphtalène (**M11**).

Par ailleurs, en faisant varier la longueur et la flexibilité de la chaîne latérale, nous pourrions vérifier l'importance de la géométrie imposée par la double liaison du groupement styryle dans l'interaction protéine-molécule.

1. 2. 1. Influence de la taille du groupement hydrophobe

Afin d'étudier l'influence de la taille du groupement, nous avons cherché à introduire différents analogues du groupement styryle sur la quaterpyridine. Plusieurs voies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir un intermédiaire clé permettant de réaliser les modifications en dernière étape (Schéma 19). En effet, un intermédiaire halogéné (composé **18**) permettrait de modifier le groupement styryle *via* des réactions de couplage C-C de type Heck, en présence de diverses oléfines aromatiques terminales.

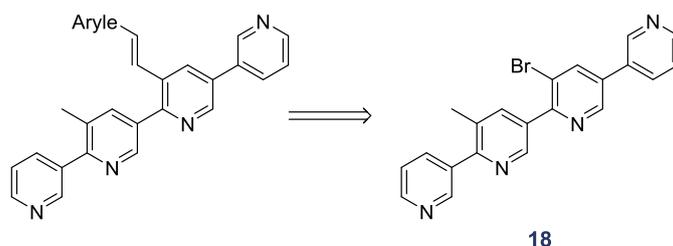


Schéma 19. Rétro-synthèse envisagée, permettant la modification du groupement styryle en dernière étape, à partir de l'intermédiaire clé halogéné **18**.

En *schéma 20* est représentée la voie de rétro-synthèse envisagée pour l'obtention de l'intermédiaire halogéné **18**. Cette voie de synthèse prévoit des réactions de couplage de type S-M et des réactions d'échange halogène-halogène itératives, elle fait appel au concept de *garlanding* : le nombre, la nature ($I > Br > Cl > F$) et la position ($\alpha, \gamma > \beta$) des atomes d'halogènes sur le cycle pyridinique influencent la régiosélectivité des couplages de

S-M.

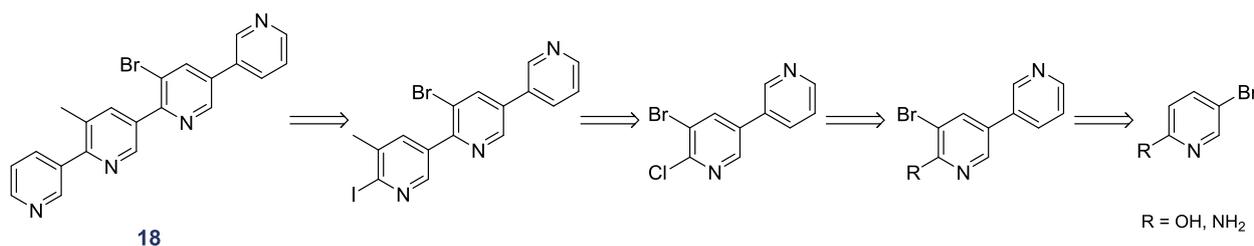
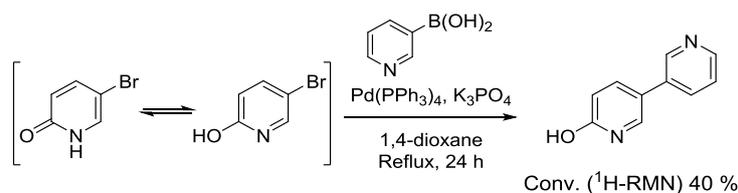


Schéma 20. Rétro-synthèse envisagée pour l'obtention de l'intermédiaire clé **18**.

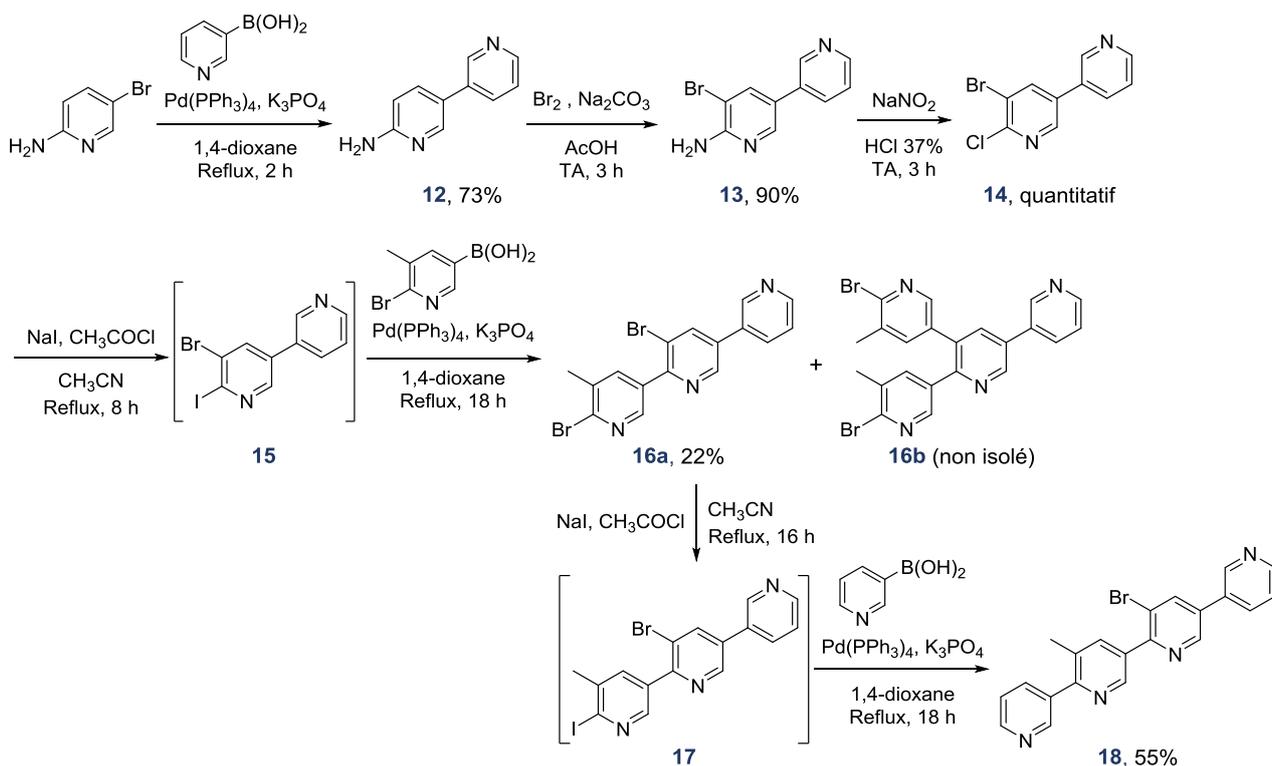
Tout d'abord, la préparation de cet intermédiaire clé a été envisagée à partir de la 5-bromo-2-hydroxypyridine commerciale. Cependant, cette dernière s'est révélée être peu réactive dans les conditions de couplage de type S-M testées avec l'acide pyridin-3-ylboronique. En effet, seule 40% de conversion (déterminée par $^1\text{H-RMN}$) a été observée après 24 h de réaction, probablement dû à une plus grande stabilité de la forme mésomère cétonique de la 5-bromo-2-hydroxypyridine dans l'équilibre céto-énolique (Schéma 21) qui rend l'atome de carbone de la liaison C-Br moins électrophile défavorisant l'insertion du palladium.



Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.)

Schéma 21. Conditions utilisées pour le couplage de type S-M entre la 5-bromo-2-hydroxypyridine et l'acide pyridin-3-ylboronique.

Nous avons donc envisagé une autre voie de synthèse, en engageant la 5-bromo-2-aminopyridine commerciale avec l'acide pyridin-3-ylboronique dans un couplage de type S-M. Ceci a permis d'obtenir la bipyridine **12** avec un rendement de 73 % (Schéma 22). Cette bipyridine subit ensuite une bromation régiosélective en position *ortho* du groupement amino, dirigée par ce dernier, puis une chlorodésamination permettant d'obtenir le composé **14** avec un rendement quantitatif. Un échange chlore-iode permet ensuite d'obtenir le composé **15**, qui est ensuite couplé avec l'acide 6-bromo-5-méthylpyridin-3-ylboronique dans les conditions de couplage de S-M, classiquement utilisées dans ces travaux. Ce couplage permet d'obtenir le composé souhaité **16a**, isolé avec un rendement de 22 %, et le produit **16b** (non isolé), issu du double couplage (sur l'atome de brome et sur l'atome d'iode) (Schéma 22). Le composé **16a** subit ensuite un échange brome-iode permettant d'obtenir le composé **17** qui a finalement été engagé dans un couplage de type S-M avec l'acide pyridin-3-ylboronique pour obtenir l'intermédiaire clé **18** halogéné attendu, avec un rendement de 55 % (Schéma 22). Cette dernière réaction présente un taux de conversion de 70 % (évalué par LC-MS), même en excès d'acide pyridin-3-ylboronique (2,5 eq), signifiant que le composé **18** ne subit pas le couplage de S-M sur l'atome de brome dans les conditions expérimentales utilisées.

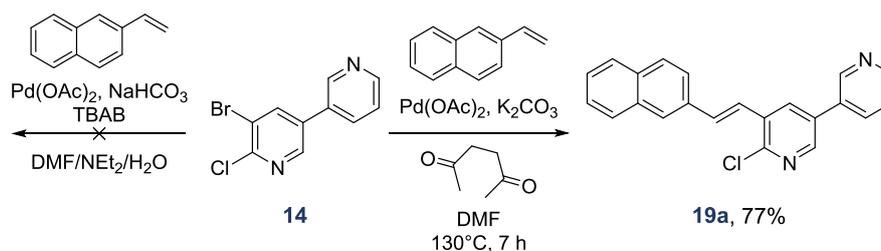


Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), K_3PO_4 (2,5 éq.) ; Br_2 (1,2 éq.), Na_2CO_3 (1,0 éq.) ; $NaNO_2$ (3,0 éq.) ; NaI (2,5 éq.), CH_3COCl (1,5 éq.)

Schéma 22. Voie de synthèse de l'intermédiaires clé bromé **18**.

Nous avons ensuite cherché à optimiser le couplage C-C de type Heck envisagé en utilisant le composé **14** et le 2-vinylnaphtalène (Schéma 23). Deux conditions ont été testées : tout d'abord, en présence de $Pd(OAc)_2$, de bromure de *tert*butylammonium comme agent de transfert de phase, et de $NaHCO_3$ dans un mélange triéthylamine/DMF/eau, aucune conversion n'a été observée ; ensuite, un essai a été tenté en présence d'un ligand bidenté tel que l'acétonylacétone, et de $Pd(OAc)_2$.²³⁵ Ces conditions réactionnelles ont permis d'isoler le composé **19a** avec un rendement de 77 %.

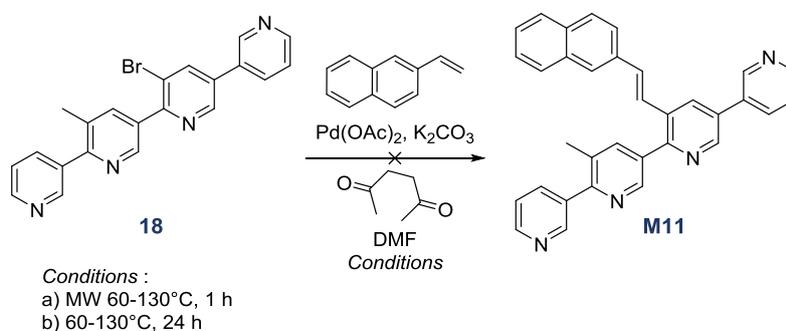
²³⁵ Cui, X.; Li, J.; Liu, L.; Guo, Q. X. 1,3-Dicarbonyl Compounds as Phosphine-Free Ligands for Pd-Catalyzed Heck and Suzuki Reactions. *Chinese Chem. Lett.* **2007**, *18* (6), 625–628.



Réactifs : Aryle-CH=CH₂ (1,0-1,25 éq.), catalyseur (10-20 mol%), base (2,0-3,0 éq.), ligand (0,2-0,5 éq.)

Schéma 23. Conditions de réaction de couplage de type Heck entre le composé **14** et le 2-vinylnaphtalène.

Malheureusement, l'application de ces conditions optimisées s'est révélée inefficace en utilisant le composé **18**. En présence de 2-vinylnaphtalène, des traces du produit attendu ont été observées en chauffage classique (conditions *b* en schéma 24) ; sous irradiations micro-ondes, le composé **18** subit la déshalogénéation dès 60°C.



Réactifs : Aryle-CH=CH₂ (1,25 éq.), catalyseur (10 mol%), base (2,0 éq.), ligand (0,2 éq.)

Schéma 24. Conditions testées pour le couplage de type Heck entre le composé **18** et le 2-vinylnaphtalène.

Face à ces échecs et étant donné le faible rendement obtenu lors de la formation du composé **16a** (Schéma 22), nous avons décidé de mettre en place une voie de synthèse alternative, à partir du composé **14** (Schéma 25).

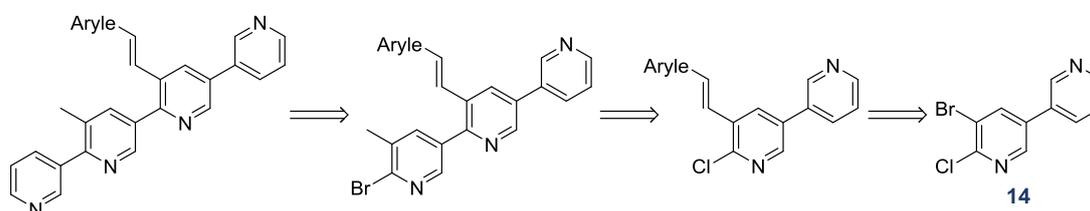
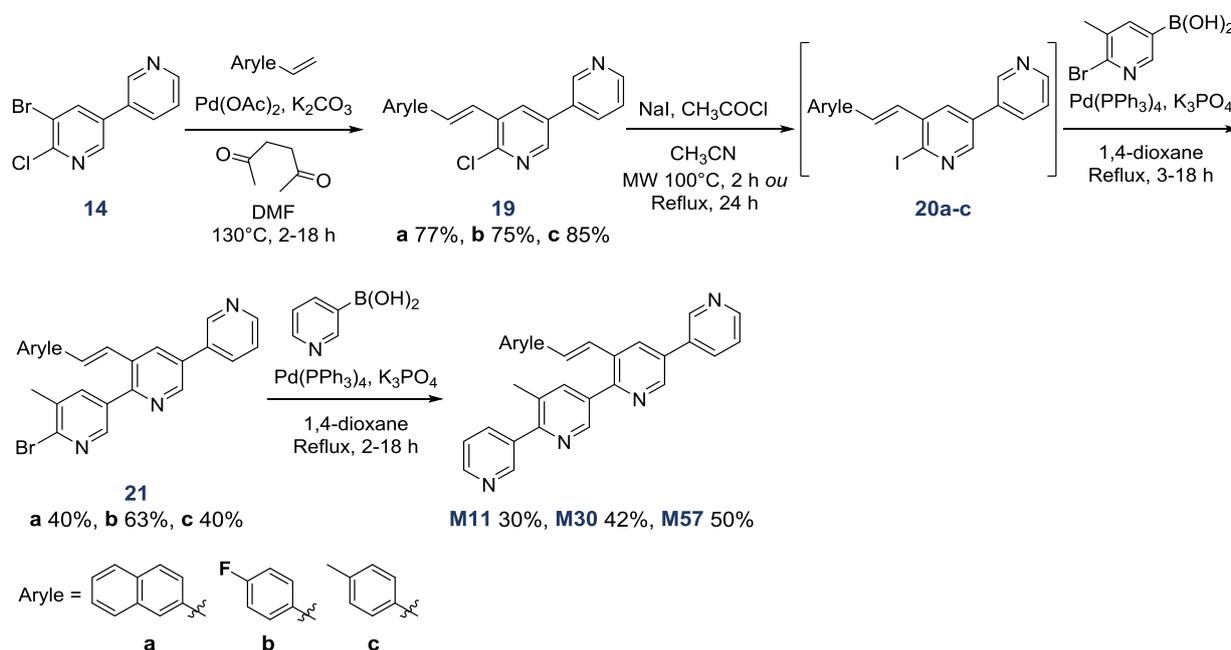


Schéma 25. Retro-synthèse envisagée à partir du composé **14**.

Cette nouvelle voie de synthèse a permis d'obtenir trois premiers analogues du pyridoclastax issus de modifications du groupement styryle.

Les conditions de couplage pallado-catalysées de type Heck²³⁵ qui ont permis d'isoler le composé **19a** (Schéma 26) ont ainsi été appliquées à la préparation des composés **19b** et

19c, isolés avec des rendements respectifs de 75 % et 85 %. Les composés **19a-c** ont ensuite été engagés dans une réaction d'échange chlore-iode pour donner respectivement les composés **20a**, **20b** et **20c**. En présence de l'acide 6-bromo-5-méthylpyridin-3-ylboronique, les composés **20a-c** réagissent ensuite dans une réaction de type S-M pour donner les composés **21a-c** avec des rendements respectifs de 40 %, 63 % et 40 %. Finalement, un dernier couplage de type S-M entre les composés **21a-c** et l'acide pyridin-3-ylboronique permet d'obtenir les composés **M11**, **M30** et **M57** avec des rendements de 30 %, 42 % et 50 % (Schéma 26).



Réactifs : Aryle-CH=CH₂ (1,25 éq.), Pd(OAc)₂ (10 mol%), K₂CO₃ (2,0 éq.), ligand (0,2 éq.) ; NaI (2,5-10 éq.), CH₃COCl (1,5-2,5 éq.) ; acide boronique (1,1 éq.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%), K₃PO₄ (2,5 éq.)

Schéma 26. Voie de synthèse des composés **M11**, **M30** et **M57** à partir du composé **14**.

1. 2. 2. Influence de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale

Afin d'évaluer l'influence de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe, nous avons envisagé d'une part l'introduction de chaînes allyliques, énoliques ou thioénoliques, et d'autre part la diminution et l'allongement de la chaîne carbonée entre la pyridine (B) et le cycle aromatique (Figure 77).

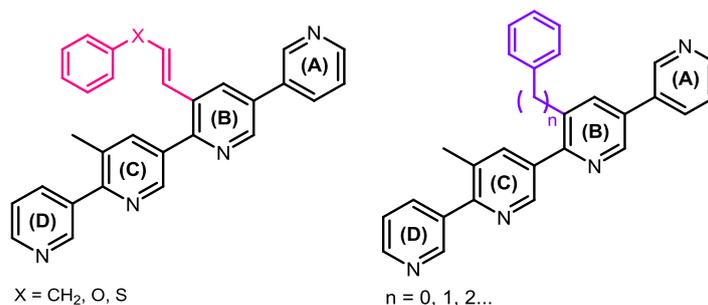


Figure 77. Modifications envisagées de la longueur et de la flexibilité de la chaîne latérale du pyridoclast.

Pour l'introduction de chaînes allyliques, les conditions de réaction utilisées dans le couplage de type Heck en *schéma 26* entre le composé **14** et les différents oléfines aromatiques terminales, ont été appliquées en présence d'espèces allyliques terminales. Malheureusement, aucune conversion n'a été observée dans ces conditions.

Des nouvelles approches synthétiques ont donc été envisagées à partir du composé **14** afin d'introduire des chaînes allyliques, énoles et thioénoles. La nouvelle voie de synthèse prévoit l'obtention d'un intermédiaire clé (encadré en schéma 27) capable de réagir dans une réaction de S_N2 ou dans un couplage de type Ullmann, permettant l'introduction de différents groupements hydrophobes.

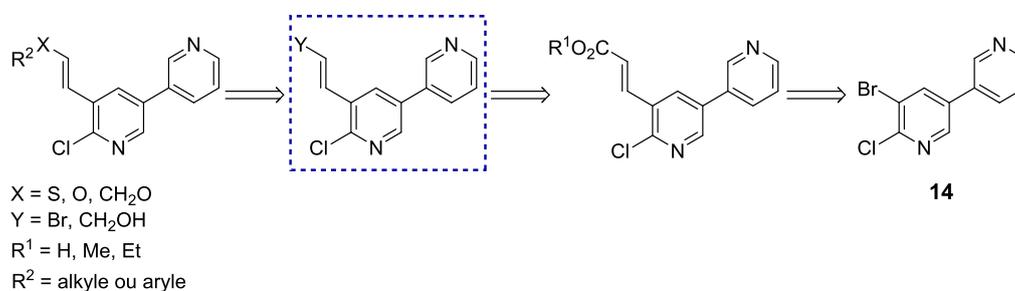
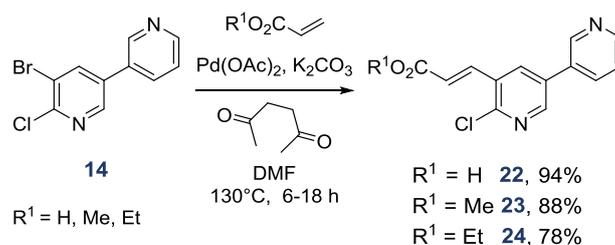


Schéma 27. Rétro-synthèse envisagée à partir du composé **14** pour la modification de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe.

Pour ce faire, le composé **14** a été initialement engagé dans une réaction de type Heck en présence de différents composés α,β -insaturés tels que l'acide acrylique, l'acrylate de méthyle et l'acrylate d'éthyle. Les produits issus de ces couplages (**22-24** en schéma 28), ont été obtenus avec de très bons rendements de 94 %, 88 % et 78 %, respectivement.

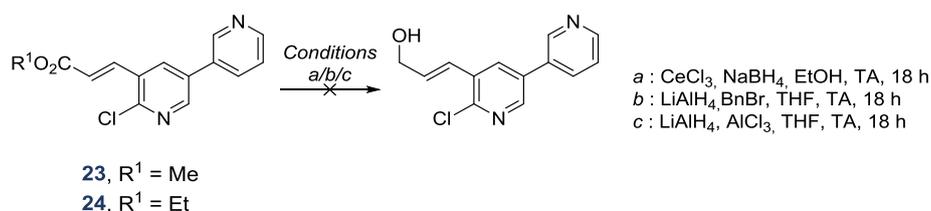


Réactifs : R¹O₂C-CH=CH₂ (1,25 éq.), catalyseur (10 mol%), base (2,0 éq.), ligand (0,2 éq.)

Schéma 28. Réaction de couplage de type Heck permettant la synthèse des composés **22**, **23** et **24** à partir du composé **14**.

Afin d'obtenir l'intermédiaire clé, permettant l'introduction de différents groupements hydrophobes, la synthèse de différentes espèces réactives a été envisagée à partir d'acides ou d'esters carboxyliques α,β -insaturés.

Premièrement, en s'inspirant de conditions décrites dans la littérature²³⁶ (Schéma 29, conditions a, b et c), montrant la préparation d'alcools allyliques à partir d'esters carboxyliques α,β -insaturés, différents essais ont été réalisés à partir des composés **23** et **24** en utilisant des agents de réduction tels que NaBH₄ et LiAlH₄ (Schéma 29). Cependant, ces conditions de réaction ne permettent pas d'isoler le composé attendu, en raison de la réduction non souhaitée de la double liaison (observée par analyse ¹H-RMN du brut réactionnel).



Réactifs : (a) CeCl₃ (0,15 éq.), NaBH₄ (2,0 éq.) ; (b) LiAlH₄ (1,5 éq.), BnBr (1,5 éq.) ; (c) LiAlH₄ (3,0 éq.), AlCl₃ (1,0 éq.) ;

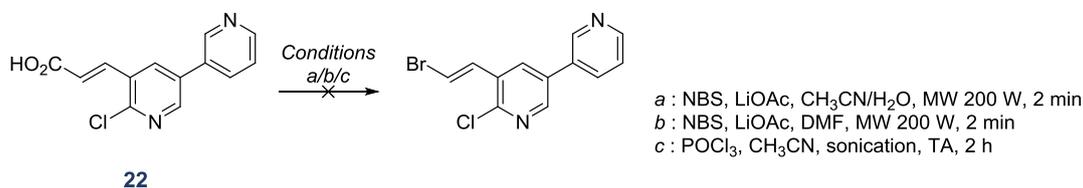
Schéma 29. Conditions de réaction testées pour la réduction des composés **23** et **24** en alcools allyliques.

Deuxièmement, nous avons envisagé l'introduction d'une fonction bromoalcène. En se basant sur des travaux reportés dans la littérature^{237, 238} concernant la bromation

²³⁶ a) Wang, X.; Li, X.; Xue, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y. A Novel and Efficient Procedure for the Preparation of Allylic Alcohols from α,β -Unsaturated Carboxylic Esters Using LiAlH₄/BnCl. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (4), 413–415 ; b) Xu, Y.; Wei, Y. CeCl₃-Catalyzed Reduction of Methyl Esters of Carboxylic Acids to Corresponding Alcohols with Sodium Borohydride. *Synth. Commun.* **2010**, 40, 3423–3429.

²³⁷ a) Mao, J.; Bao, W. Palladium(0)-Catalyzed Methylene-cyclopropanation of Norbornenes with Vinyl Bromides. *Org. Lett.* **2014**, 16 (10), 2646–2649 ; b) Kumar, M. S.; Rajanna, K. C.; Venkanna, P.; Venkateswarlu, M.; Sudhakar Chary, V. Ultrasonically Assisted Decarboxylative Bromination of α,β -Unsaturated Carboxylic Acids Under Vilsmeier-Haack Conditions. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* **2015**, 46 (5), 642–646.

décarboxylante (Schéma 30, conditions a, b et c), plusieurs conditions de réaction ont été évaluées, à partir du composé **22** (Schéma 30). Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis la formation du composé souhaité (des produits de dégradations sont observés par analyse $^1\text{H-RMN}$).

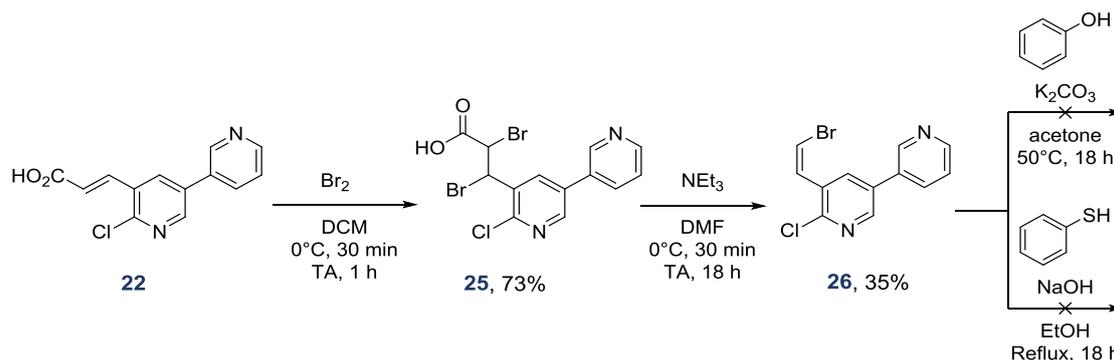


22

Réactifs : NBS (1,25 éq.), LiOAc (0,2 éq.), POCl₃ (1,15 éq.)

Schéma 30. Conditions de réaction testées pour la bromation décarboxylante du composé **22**.

Finalemment, une troisième voie alternative a été testée. Les conditions de réaction retenues font intervenir une réaction d'halogénéation entre le composé **22** et du brome moléculaire, permettant la formation du composé dibromé **25** avec un rendement de 73 % ; ce composé subit ensuite une décarboxylation, suivie d'une élimination en présence de triéthylamine, pour donner le composé attendu **26** avec un rendement de 35 % (Schéma 31). Ensuite, la fonctionnalisation du bromoalcène **26** a été évaluée. Le composé a été engagé dans des réactions de substitution nucléophile en présence de phénol ou de thiophénol ; cependant, malgré l'utilisation d'une base (faible ou forte), aucune conversion n'a été observée (Schéma 31) et la matière première est récupérée.

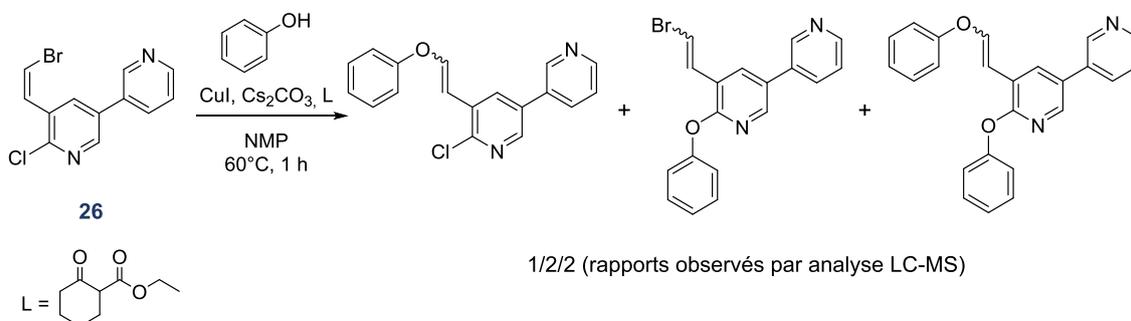


Réactifs : Br₂ (1,2 éq.), NEt₃ (2,0 éq.), PhOH (1,2 éq.), PhSH (1,2 éq.), base (3,0 éq.)

Schéma 31. Conditions de réaction utilisées pour la préparation du bromoalcène **26** à partir de l'acide carboxylique α,β -insaturé **22** et conditions de réaction testées pour la substitution nucléophile sur la fonction bromoalcène du composé **26**.

²³⁸ a) Kuang, C.; Yang, Q.; Senboku, H.; Tokuda, M. Stereoselective Synthesis of (E)- β -Arylvinyl Bromides by Microwave-Induced Hunsdiecker-Type Reaction. *Synthesis* **2005**, 8, 1319–1325 ; b) Kuang, C.; Senboku, H.; Tokuda, M. Convenient and Stereoselective Synthesis of (Z)-1-Bromo-1-Alkenes by Microwave-Induced Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (23), 3893–3896.

Le produit attendu a pu être identifié par la mise en œuvre d'une réaction catalysée au cuivre de type Ullman²³⁹ à partir du composé **26** en présence de phénol. Malheureusement, le mélange de produits de couplage obtenu (observés par analyse LC-MS) n'a pas pu être séparé (Schéma 32).



Réactifs : PhOH (1,2 éq.), CuI (15 mol%), base (2,0 éq.), ligand (0,3 éq.)

Schéma 32. Conditions de réaction testées pour le couplage de type Ullmann sur la fonction bromoalcène du composé **26**.

Afin d'éviter la formation des sous-produits observés lors du couplage de type Ullmann, des réactions de couplage de type S-M ont été mises en œuvre pour étudier la préparation de la quaterpyridine suivante, portant un groupement bromoalcène (Schéma 33).

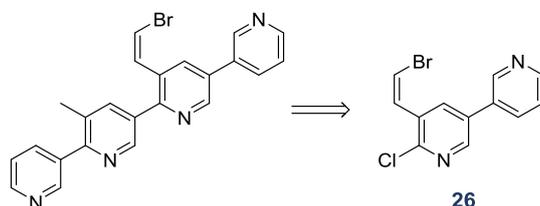
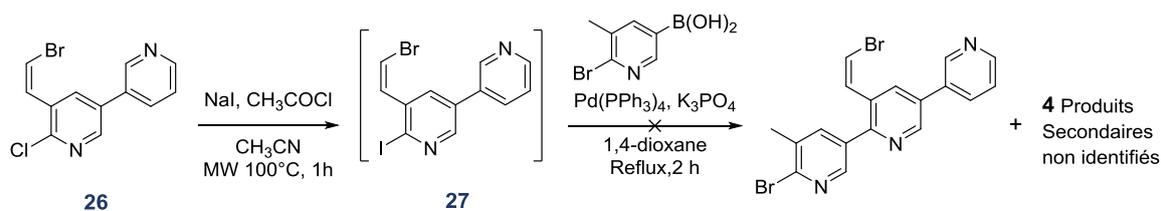


Schéma 33. Retro-synthèse envisagée à partir du composé **26** pour la modification de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe.

Pour ce faire, le composé **27** a été obtenu à partir du composé **26** via une réaction d'échange chlore-iode. Le composé **27** a ensuite été engagé dans une réaction de type S-M pour donner un mélange de produits issus de couplages sur les différents atomes d'halogène (analyse ¹H-RMN) (Schéma 34).

²³⁹ Bao, W.; Liu, Y.; Lv, X. Mild Copper(I) Iodide/ β -Keto Ester Catalyzed Coupling Reactions of Styryl Bromides with Phenols, Thiophenols, and Imidazoles. *Synthesis* **2008**, *2008* (12), 1911–1917.

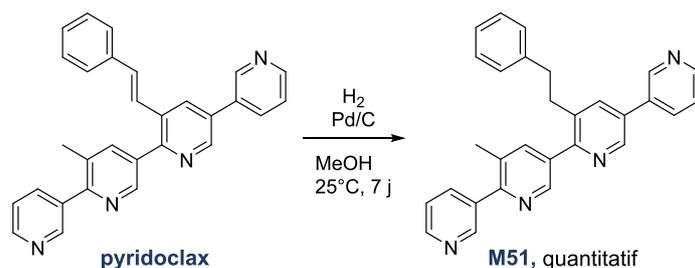


Réactifs : NaI (10 éq.), CH₃COCl (2,5 éq.), acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5 mol%), base (2,5 éq.)

Schéma 34. Voie de synthèse testée pour un couplage de type S-M sur l'atome d'iode du composé **27**.

La poursuite de ces travaux est actuellement en cours par le Dr Damien Hédou, recruté au CERMN dans le cadre d'un stage post doctoral. La démarche retenue vise à tenter de concevoir un intermédiaire clé de synthèse permettant d'introduire différents groupements hydrophobes en dernière étape (composé **36**).

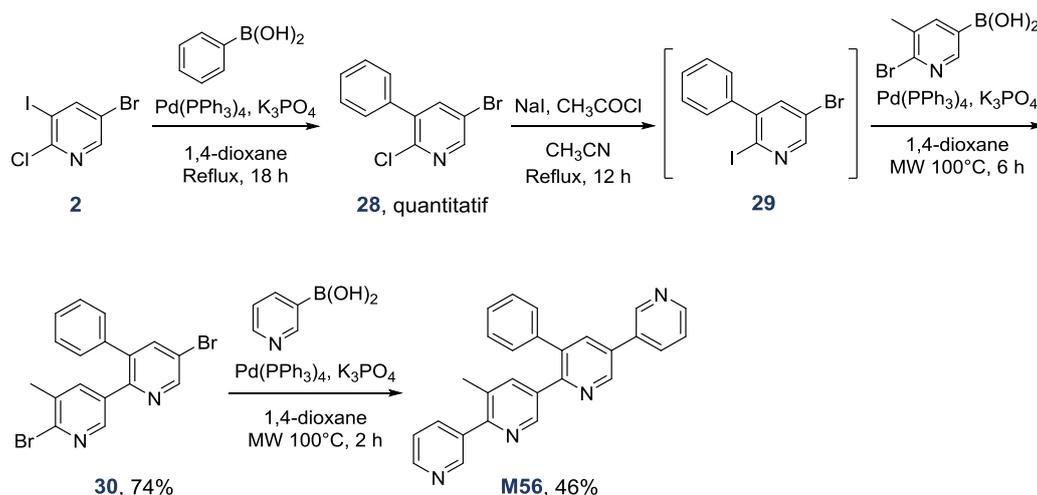
Parallèlement, afin d'évaluer l'effet de la flexibilité de la chaîne latérale portant le groupement hydrophobe, nous avons envisagé la réduction de la double liaison vinylique présente dans la structure du pyridoclast. À partir du pyridoclast, cette réduction a été réalisée avec un rendement quantitatif *via* une réaction d'hydrogénation pallado-catalysée, permettant d'isoler le composé **M51** (Schéma 35).



Réactifs : Pd/C (10 %mol)

Schéma 35. Conditions d'hydrogénation utilisées pour la réduction de la double liaison du pyridoclox.

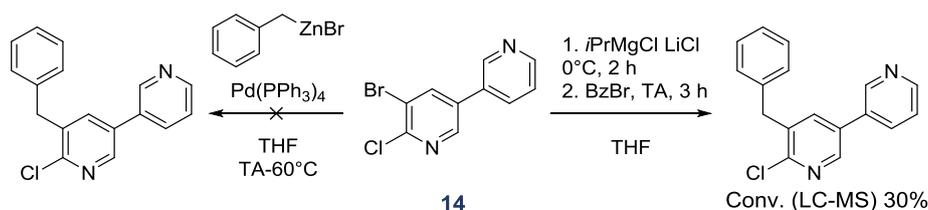
Nous avons également envisagé de réduire la longueur de la chaîne latérale portant le groupement styryle, en synthétisant le composé **M56** (présentant un groupement phényle directement lié au squelette quaterpyridine). En utilisant la méthode de *garlanding* décrite précédemment, le composé **M56** a été obtenu à partir du composé **2** trihalogéné en 4 étapes avec un rendement global de 24 % (Schéma 36).



Réactifs : acide boronique (1,1 éq.), catalyseur (5-10 mol%), base (2,5-5,0 éq.) ; NaI (2,5 éq.), CH₃COCl (1,5 éq.)

Schéma 36. Voie de synthèse du composé **M56**.

Enfin, pour introduire une chaîne benzyle à la place du groupement styryle, plusieurs voies de synthèse ont été étudiées. À partir du composé **14** nous avons envisagé l'introduction d'un groupement benzyle *via* une réaction de type Negishi en présence de bromure de benzylzinc(II), ou une réaction de type S_N2, en utilisant le magnésien issu du composé **14** et le bromure de benzyle (Schéma 37).

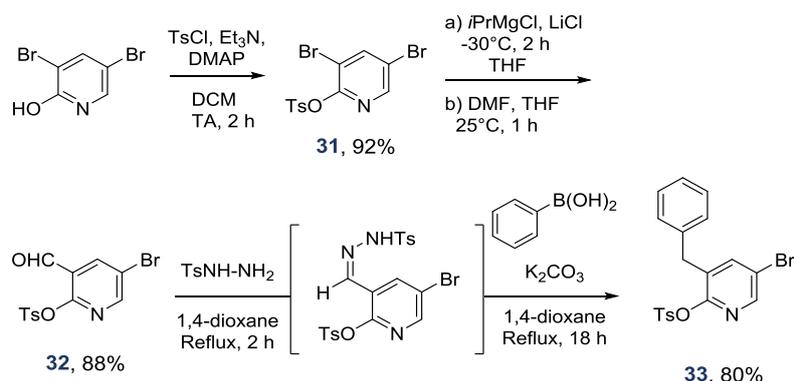


Réactifs : BzZnBr (1,1 éq.), catalyseur (10 mol%) ; *i*PrMgCl LiCl (1,2 éq.), BzBr (1,2 éq.)

Schéma 37. Conditions utilisées à partir du composé **14** pour introduire un groupement benzyle.

Finalement, le composé souhaité a pu être observé en formant le magnésien du composé **14** en présence de *i*PrMgCl LiCl, qui réagit ensuite avec le bromure de benzyle *via* une réaction de substitution nucléophile S_N2 avec une conversion de seulement 30 % à $t = 2$ h (évaluée par analyse LC-MS).

Face à ces difficultés, une nouvelle stratégie inspirée de la littérature a consisté à convertir un aldéhyde en groupement benzyle *via* une réaction one-pot de couplage réductif entre l'acide phénylboronique et un intermédiaire tosylhydrazone (Schéma 38).²⁴⁰



Réactifs : TsCl (1,2 éq.), NEt_3 (2,0 éq.), DMAP (10 mol%) ; *i*PrMgCl LiCl (1,2 éq.), DMF (2,0 éq.) ; tosylhydrazine (1,5 éq.), acide boronique (1,5 éq.), K_2CO_3 (2,0 éq.)

Schéma 38. Voie de synthèse du composé **32** pour l'introduction d'un groupement latéral benzyle.

Pour ce faire, l'aldéhyde **32** a été préparé en 2 étapes à partir de la 3,5-dibromo-2-hydroxypyridine commerciale. Une première étape consiste en une *O*-tosylation en présence de chlorure de tosyloxy et de triéthylamine pour donner le composé **31**. Une deuxième étape de formylation de ce dernier a été réalisée par réaction du composé magnésien correspondant avec le DMF. La régiosélectivité de la réaction de magnésiation

²⁴⁰ a) Barluenga, J.; Tomás-Gamasa, M.; Aznar, F.; Valdés, C. Metal-Free Carbon–Carbon Bond-Forming Reductive Coupling between Boronic Acids and Tosylhydrazones. *Nat. Chem.* **2009**, *1* (6), 494–499 ; b) Shen, X.; Liu, P.; Liu, Y.; Liu, Y.; Dai, B. One-Pot Reductive Coupling Reactions of Acetyl Naphthalene Derivatives, Tosylhydrazide, with Arylboronic Acids. *Tetrahedron* **2017**, *73* (6), 785–793.

en présence de *i*PrMgCl LiCl semble être induite par la présence du groupement tosylo, permettant ainsi l'obtention de l'aldéhyde **32** avec un rendement de 88 %. Enfin, les conditions de couplage réductif ont été appliquées à notre substrat **32** permettant d'obtenir l'intermédiaire tosylhydrazone (non isolé), qui réagit *in situ* en présence de l'acide phenylboronique et de K₂CO₃ pour donner le composé souhaité **33**, avec un rendement de 80 % (Schéma 38). La suite de synthèse, à savoir le couplage chimiosélectif (Br *versus* TsO) est en cours d'optimisation par le Dr Damien Hédou.

Suite à ces travaux préliminaires encourageants, il a été envisagé de préparer un précurseur quaterpyridine portant une fonction aldéhyde (le composé oxo-quaterpyridine **36**) qui pourrait permettre la pharmacomodulation de cette fonction en fin de synthèse, et diversifier le motif hydrophobe du pyridoclox. En effet, la versatilité de la fonction aldéhyde pourrait permettre d'une part la synthèse de l'analogue benzylique du pyridoclox, par réaction de couplage réductif de l'intermédiaire tosylhydrazone et de l'acide phénylboronique (comme décrit en schéma 38), et d'autre part de pallier les difficultés rencontrées lors de ces travaux dans la préparation de la quaterpyridine bromoalcène en schéma 33, par mise en œuvre d'une réaction de Takai, ou encore dans la préparation de quaterpyridines α,β -insaturés par réaction de Wittig-Horner en présence de l'acide acrylique, l'acrylate de méthyle ou l'acrylate d'éthyle (Schéma 39).

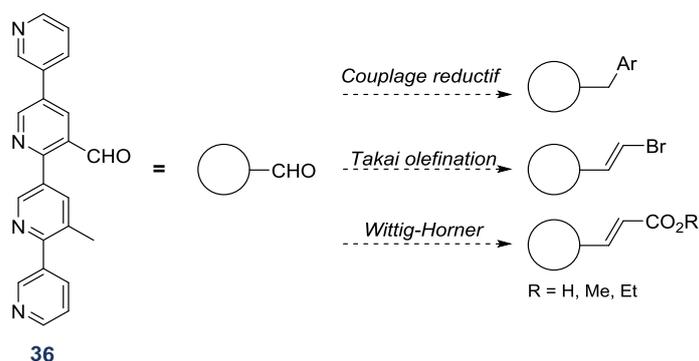
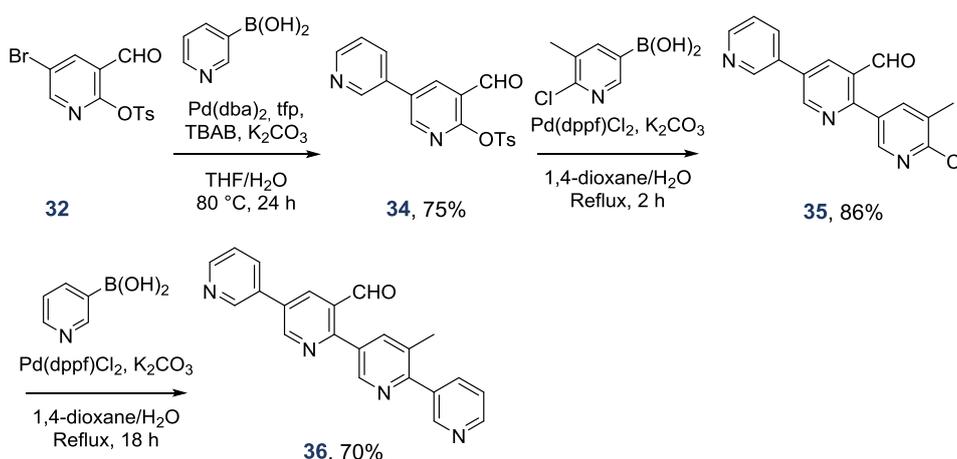


Schéma 39. Exemples de modifications de la fonction aldéhyde du composé **36**.

Nous avons donc réfléchi à une voie de synthèse permettant d'obtenir le précurseur oxo-quaterpyridine **36** en 3 étapes à partir du composé **32**. Cette voie d'accès est basée sur l'utilisation de couplages de type S-M chimiosélectifs (Schéma 40). Une première réaction

de S-M en présence de Pd(dba)₂ et trifurylphosphine a lieu sélectivement sur l'atome de brome et permet d'obtenir la bipyridine **34** avec un rendement de 75 %. Un second couplage avec l'acide 6-chloro-5-méthylpyridin-3-ylboronique en présence de Pd(dppf)Cl₂ permet d'obtenir la terpyridine chlorée **35** avec un rendement de 86 %. Enfin, un dernier couplage de S-M avec l'acide pyridin-3-ylboronique fourni la quaterpyridine **36** avec un rendement de 70%. La fonctionnalisation de ce précurseur oxo-quaterpyridine est actuellement à l'étude par le Dr Damien Hédou.



Réactifs : acide boronique (1,1-1,5 éq.), catalyseur (5-10 mol%), tfp (0,1 éq.), base (2,5 éq.)

Schéma 40. Voie de synthèse du précurseur oxo-quaterpyridine **36**.

▪ Discussion des résultats biologiques

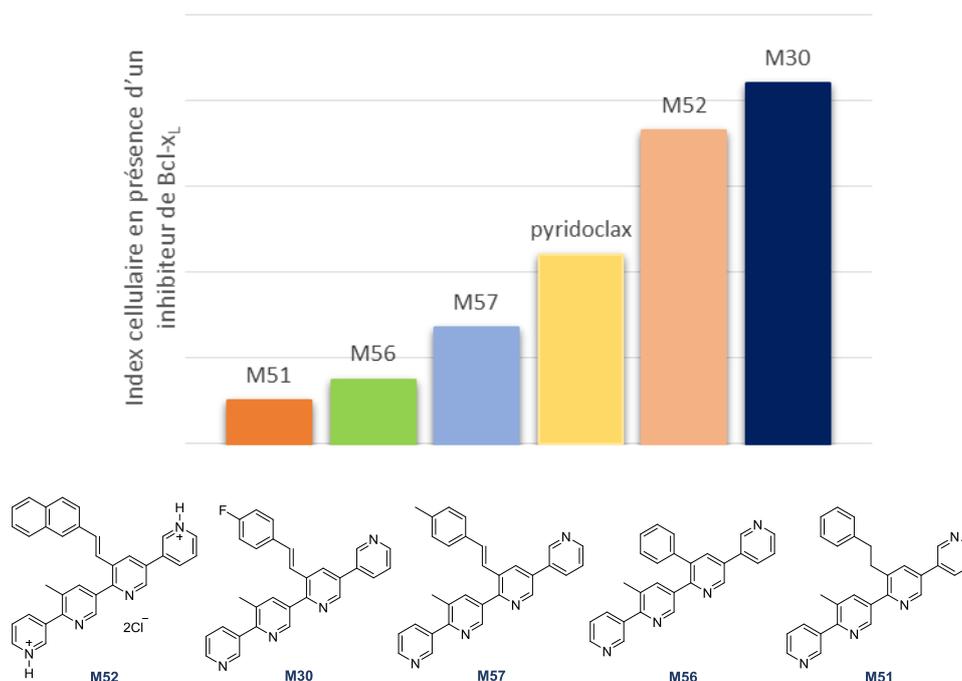
L'activité pro-apoptotique des composés obtenus par modification du groupement styryle du pyridoclastax (**M11**, **M30**, **M51**, **M56** et **M57**) a été évaluée sur la protéine Mcl-1 (à 25 µM). Le composé **M11**, présentant un groupement 2-vinylnaphtyle, a été converti en chlorhydrate **M52** afin d'en améliorer la solubilité dans les conditions d'analyse biologique. En effet il a été démontré que l'activité biologique du pyridoclastax et de son chlorhydrate sont similaires.

L'activité des composés **M30** et **M52** a été évaluée en présence de siRNA-Bcl-x_L, l'activité des composés **M51**, **M56** et **M57** a été évaluée en présence d'ABT-737 (Graphique 9). Pour rappel, l'expression de la protéine Bcl-x_L dans la lignée cellulaire est réprimée au moyen d'une transfection avec le siRNA Bcl-x_L, ou au moyen d'un inhibiteur pharmacologique,

l'ABT-737. Dans l'avancement du projet, nous nous sommes en effet affranchi de la transfection en utilisant un agent pharmacologique.

Les composés issus des modifications de la taille du groupement hydrophobe (**M30**, **M52**, **M57**) présentent une activité variable sur la protéine Mcl-1: l'introduction d'un groupement plus encombrant (composé **M52**) ou d'un isostère de l'atome d'hydrogène (composé **M30**) réduit l'activité, tandis que l'introduction d'un groupement méthyle permet d'obtenir un composé (**M57**) plus actif que le pyridoclast. Il est probable que l'introduction d'un groupement plus petit (exemple du groupement méthyle) permette d'instaurer des interactions supplémentaires dans la poche P2 de la protéine Mcl-1, tandis qu'un groupement plus encombrant (comme un naphthyle) pourrait empêcher les interactions dans cette poche.

Le composé présentant un cycle benzénique directement lié au squelette quaterpyridine (**M56**) possède une très bonne activité inhibitrice de Mcl-1, comparable à celle du pyridoclast. Le composé **M51**, quant à lui, est le composé le plus actif de la série. La plus grande flexibilité de la chaîne latérale permet probablement une meilleure interaction dans la poche P2 de Mcl-1.



Graphique 9. Histogramme des données de croissance cellulaire obtenues par impédancemétrie.

48h après traitement à 25 μ M de pyridoclastax ou de ses analogues **M30**, **M52** (en présence de siRNA-Bcl-x_L) ;
M51, **M56**, **M57** (en présence d'ABT-737).

1. 3. Conclusion et perspectives

L'évaluation biologique des composés obtenus nous a permis d'établir de nouvelles RSA. De plus, certains composés analysés présentent le profil d'un inhibiteur dual des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L, ce qui signifie qu'il est possible d'inhiber la protéine Bcl-x_L à l'aide de foldamères à structure α hélicoïdale.

Les RSA dégagées de cette étude montrent que l'introduction d'un élément de flexibilité (pont flexible ou chaîne O-alkylée) permet d'améliorer l'activité des composés sur la protéine Mcl-1 et d'induire une activité inhibitrice de la protéine Bcl-x_L, et ce quelle que soit la série (*up* ou *down*) (Schéma 41).

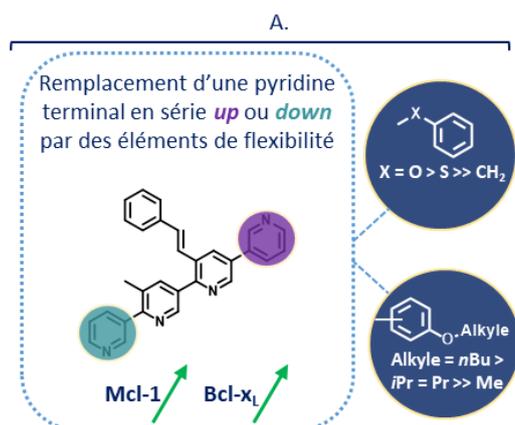


Schéma 41. RSA établies par le remplacement des pyridines terminales avec des éléments de flexibilité.

En série *up* ou *down* ces modifications améliorent l'activité duale sur Mcl-1 et Bcl-x_L.

Plus particulièrement, l'introduction d'un groupement 4-chlorophénoxy (composé **M09**, schéma 42A) en série *up* permet d'obtenir un composé avec une meilleure activité inhibitrice des deux protéines cibles, comparée à celle du composé analogue obtenu en série *down* (**M02**) ; en revanche, l'introduction d'une chaîne O-alkylée (C₃ ou C₄) en position 2 du cycle benzénique terminal permet d'obtenir des composés à dualité d'action en série *up* (composés **M25**, **M26**, **M29** en schéma 42B) et également en série *down* (composé **M49**, schéma 42B).

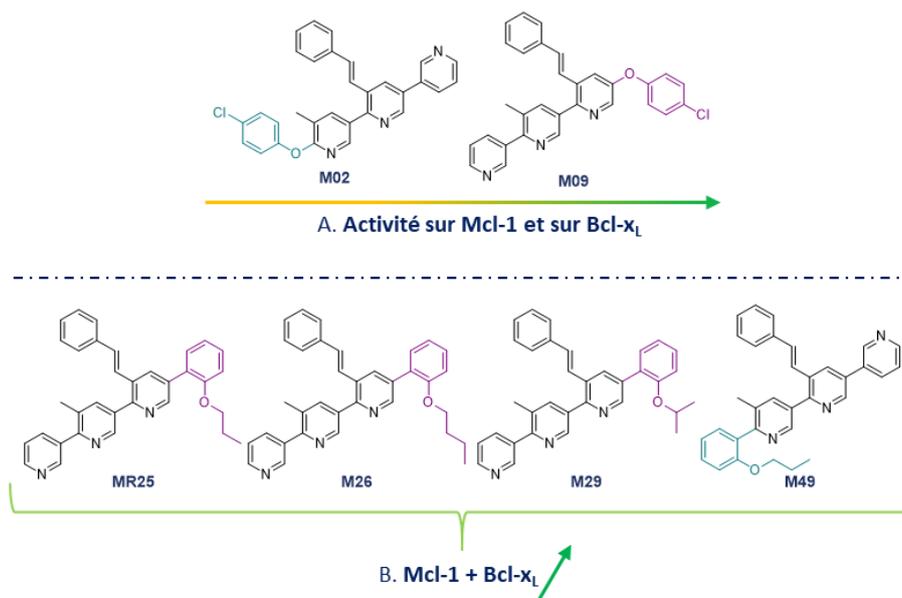


Schéma 42. RSA établies par le remplacement des pyridines terminales avec des éléments de flexibilité.

(A) L'introduction d'un pont éther en série *up* permet une activité plus forte qu'en série *down*.

(B) L'introduction de chaînes *O*-alkylées (C₃ ou C₄) en position 2 du cycle benzénique terminal permet d'obtenir des inhibiteurs duals.

Une meilleure activité est corrélée à une plus forte interaction des composés avec les protéines.

La présence d'un hétéroatome permet d'améliorer l'activité inhibitrice des protéines cibles, probablement grâce à la formation d'interactions polaires supplémentaires avec les acides aminés des *hot spots*. De plus, les RSA établies mettent en évidence que la délocalisation des électrons non liants de l'hétéroatome dans un système polyaromatique conjugué (exemple composé **M09**, schéma 42) peut réduire son caractère polaire et influencer l'activité des composés par rapport aux composés possédant une chaîne *O*-alkylée terminale, conduisant à des molécules plus actives sur les deux protéines.

De plus, nous avons pu remarquer que l'introduction d'une fonction polaire (cétone, aldéhyde, amide, acide carboxylique) sur le cycle aromatique terminal en série *up* permet d'améliorer l'activité inhibitrice de la protéine Bcl-x_L (Schéma 43).

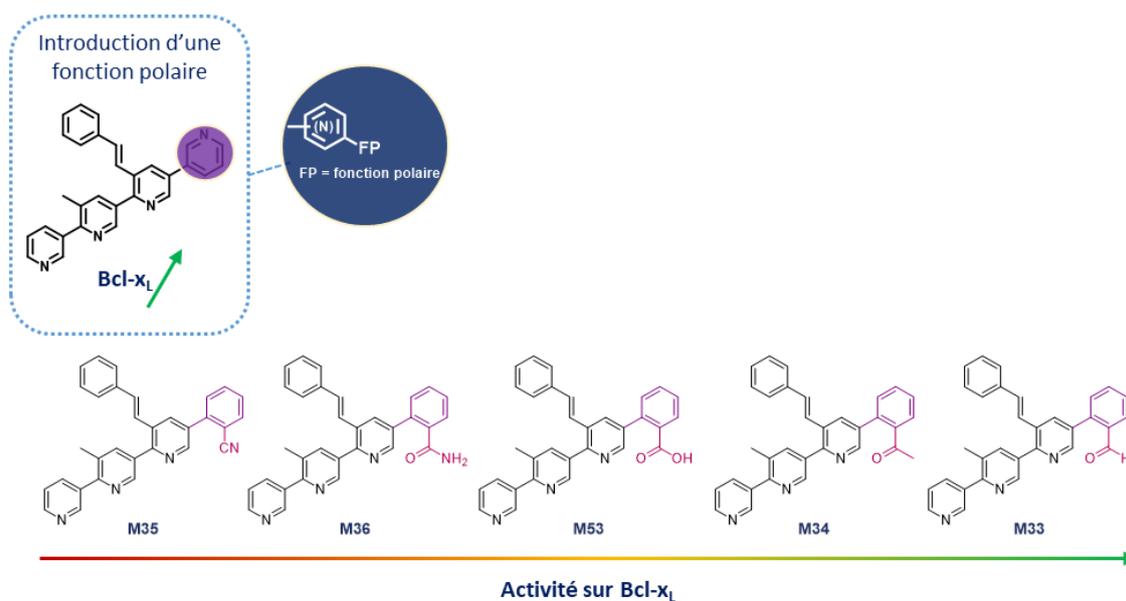


Schéma 43. RSA établies par introduction de groupements polaires en position 2 d'un cycle benzénique terminal en série *up*.

Amélioration de l'activité sur Bcl-x_L (FP = CN (non actif) << amide < acide carboxylique < cétone << aldéhyde).

Ces modifications nous ont permis d'obtenir des composés (**M54**, **M47** et **M58**) sélectifs pour la protéine Mcl-1, avec une activité améliorée comparée à celle du pyridoclastax (Schéma 44).

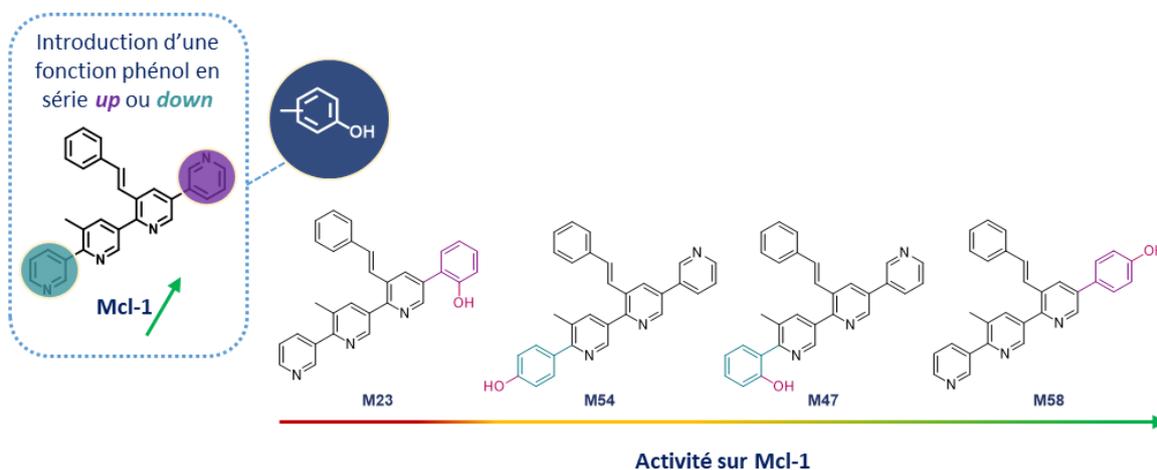


Schéma 44. RSA établies par introduction d'une fonction phénolique terminale en série *up* ou *down*.

Amélioration de l'activité sur Mcl-1 (composé **M23** (non actif) << **M54** < **M47** ≈ **M58**).

Plus particulièrement, l'introduction d'une fonction cétone ou aldéhyde en position 2 du cycle benzénique terminal permet d'obtenir des composés à dualité d'action en série *up* (composé **M33**, schéma 45), et également en série *down* (composé **M45**, schéma 45). Ces

résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour les composés ayant une chaîne *O*-alkylée (C₃ ou C₄) en position 2 du cycle benzénique terminal (**M25**, **M26**, **M29** et **M49**), mettant en évidence que cette position permet de favoriser les interactions protéine-molécule.

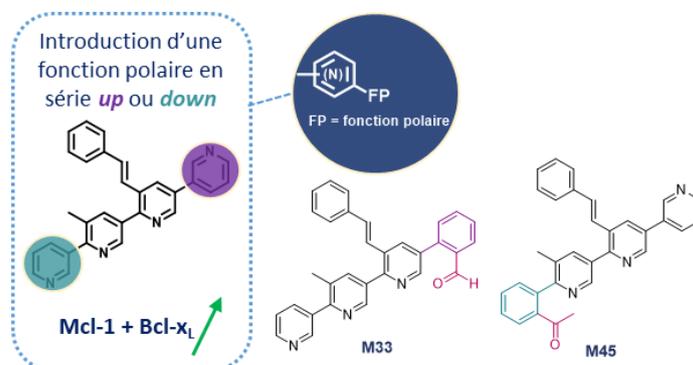


Schéma 45. Inhibiteurs duals obtenus par introduction d'une fonction polaire en position 2 d'un cycle benzénique terminal.

Enfin, le remplacement simultané des deux pyridines terminales du pyridoclastine dans le composé **M32** (schéma 46) ne permet pas d'améliorer l'activité inhibitrice des protéines, (par comparaison aux composés **M02** et **M04** présentant une seule modification).

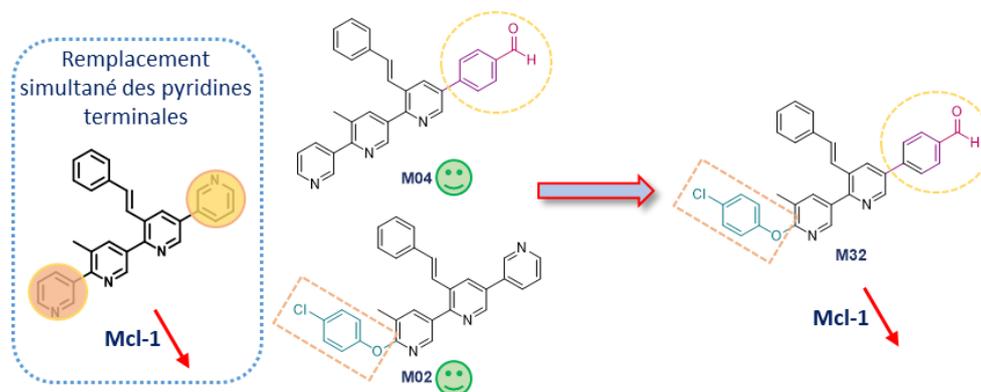


Schéma 46. RSA établies par remplacement simultané des deux pyridines terminales. Perte d'activité sur Mcl-1.

Ceci est en accord avec les études de dynamique moléculaire effectuées sur le complexe pyridoclastine/Mcl-1,²¹⁸ selon lesquelles une des deux pyridines terminales est nécessaire pour engager une interaction polaire avec l'Arg²⁶³ qui stabilise le complexe (Figure 78).

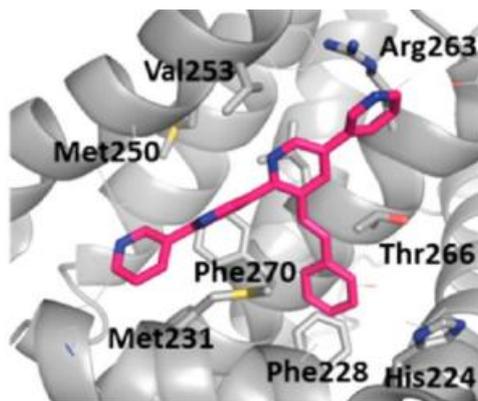


Figure 78. Mode de fixation proposé pour le pyridoclastax dans Mcl-1 : interaction d'une pyridine avec l'Arg²⁶³ 218

Quant aux composés obtenus par modification du groupement styryle, la meilleure activité a été trouvée pour le composé obtenu par réduction de la double liaison vinylique (**M51**, schéma 47), ceci probablement grâce à la meilleure flexibilité de la chaîne latérale qui permet une meilleure interaction dans la poche P2 de Mcl-1.

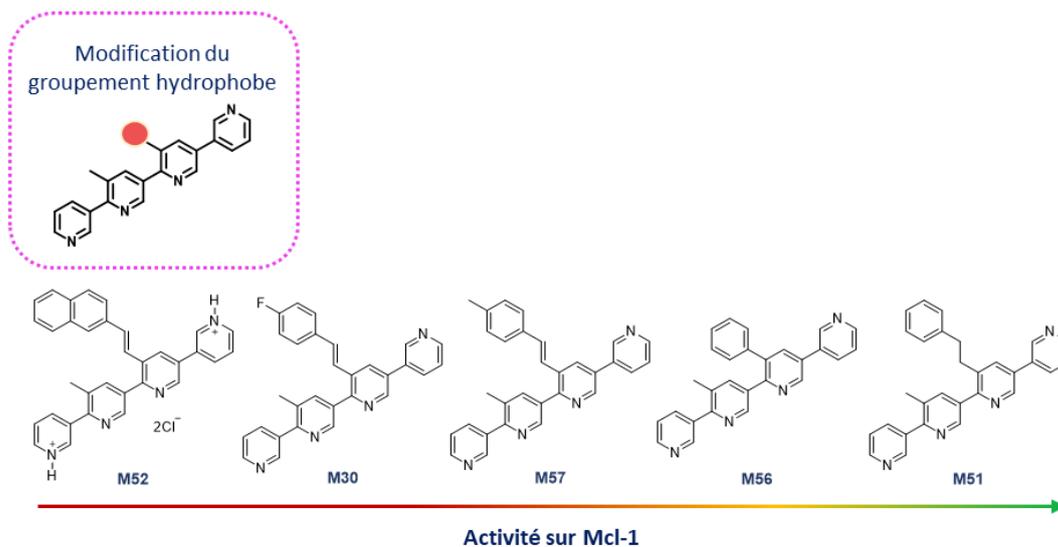


Schéma 47. RSA établies par modification du groupement hydrophobe (GH).

L'évaluation de l'activité pro-apoptotique des molécules synthétisées, par la technologie xCELLigence, nous a permis de valider les hypothèses de *drug design* et d'effectuer les pharmacomodulations conduisant aux molécules les plus actives. L'ensemble des résultats obtenus a permis d'établir les premières relations structure-activité de ces séries.

Cette évaluation biologique est une première étape de *screening* : il conviendra de mettre en place une évaluation complémentaire.

Dans un premier temps, l'étude de l'effet des molécules en agents seuls sur une lignée tumorale ovarienne choisie pour ses caractéristiques de réponse aux agents BH3-mimétiques sera envisagée (IGROV1-R10, SKOV3, A2780). La caractérisation de l'effet des molécules comprend l'étude des morphologies cellulaires et nucléaires, l'étude de la répartition des cellules dans le cycle (cytométrie en flux), la recherche de caractéristiques de l'apoptose (et notamment de la voie mitochondriale) telles que le clivage des caspases-9 et -3 et/ou de l'une de leurs cibles (la PARP), et l'étude d'éventuelles variations d'expression des protéines de la famille Bcl-2 (cibles ou protéines BH3-only antagonistes). Les résultats sur une lignée cellulaire pourront être confirmés par l'utilisation d'autres lignées cellulaires. Ces travaux seront pris en charge dans le cadre d'une collaboration existante entre le CERMN et l'axe BioTICLA de l'Unité Inserm U1086 ANTICIPE.

Dans un second temps, il conviendra d'analyser par des tests d'interactions indirectes (BRET) ou directes (SPR), l'affinité de nos molécules pour les protéines cibles Bcl-x_L et Mcl-1.

Dans le cas où certaines molécules seraient intéressantes, nous engagerons rapidement une évaluation de la toxicité cardiaque par la mise en œuvre d'un test *h*ERG (kit).

2. Conception d'inhibiteurs de membres anti-apoptotiques de la famille des IAP

Le deuxième objectif de ce travail s'intéresse au développement de mimes du térapeptide AVPI de la protéine Smac, inhibiteur biologique de la protéine XIAP (Figure 79). XIAP fait partie de la famille des protéines IAPs, et elle intervient dans l'échappement à l'apoptose des cellules cancéreuses.

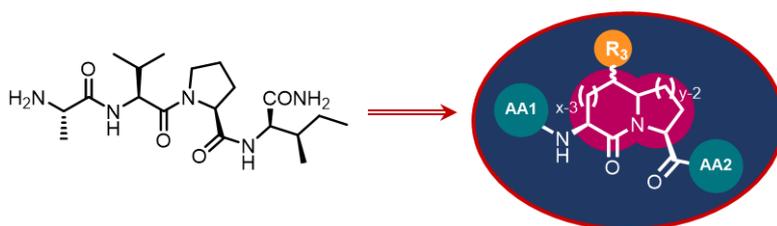
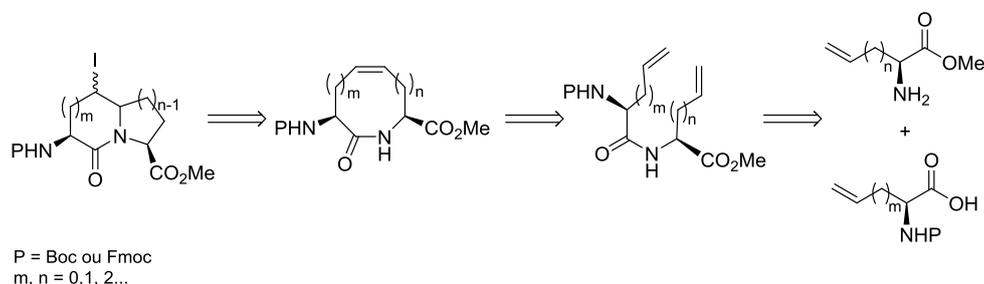


Figure 79. Développement de mimes contraints du térapeptide AVPI (à gauche) de la protéine Smac.

La synthèse de nouvelles molécules peptidomimétiques du térapeptide AVPI de la protéine Smac a été effectuée en utilisant les méthodes de synthèse mises en place par le groupe du Pr Lubell pour la synthèse de structures azabicyclo[x.y.0]alcane.²⁴¹



P = Boc ou Fmoc
m, n = 0, 1, 2...

Schéma 48. Rétrosynthèse envisagée pour la synthèse d'espèces azabicyclo[x.y.0]alcane à partir de deux intermédiaires.

Ces approches prévoient dans un premier temps la synthèse de deux intermédiaires, obtenus à partir d'acides aminés naturels, lesquels sont ensuite engagés dans une réaction de couplage peptidique pour donner une espèce insaturée capable de subir une réaction de fermeture de cycle par métathèse (RCM, *ring closing metathesis*). Le cycle obtenu est

²⁴¹ a) Kaul, R.; Surprenant, S.; Lubell, W. D. Systematic Study of the Synthesis of Macrocylic Dipeptide β -Turn Mimics Possessing 8-, 9-, and 10- Membered Rings by Ring-Closing Metathesis. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (10), 3838–3844 ; b) Godina, T. A.; Lubell, W. D. Mimics of Peptide Turn Backbone and Side-Chain Geometry by a General Approach for Modifying Azabicyclo[5.3.0]Alkanone Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (14), 5846–5849.

ensuite engagé dans une réaction de cyclisation *transannulaire* électrophile qui permet d'obtenir le composé bicyclique de type azabicyclo[x.y.0]alcane (Schéma 48).

En particulier, nous nous sommes intéressés à la synthèse de composés bicycliques de type azabicyclo[5.3.0]décane et azabicyclo[3.4.0]nonane (Schéma 49).

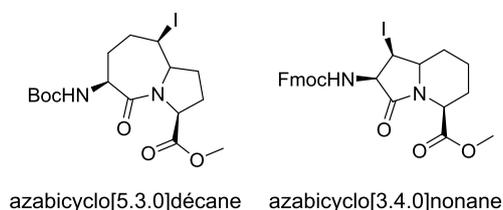


Schéma 49. Structures azabicyclo[5.3.0]décane et azabicyclo[3.4.0]nonane.

2. 1. Synthèse de composés bicycliques de type azabicyclo[5.3.0]décane

En s'inspirant des travaux de Wang et ses collaborateurs¹⁹⁷ (détaillés au paragraphe 4. 1. du chapitre 2) selon lesquels les composés possédant le motif azabicyclo[5.3.0]alcane étaient capables de mimer parfaitement *in silico* les interactions du térapeptide AVPI avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP (Figure 80), nous avons envisagé la synthèse de différents composés peptidomimétiques portant ce motif central.

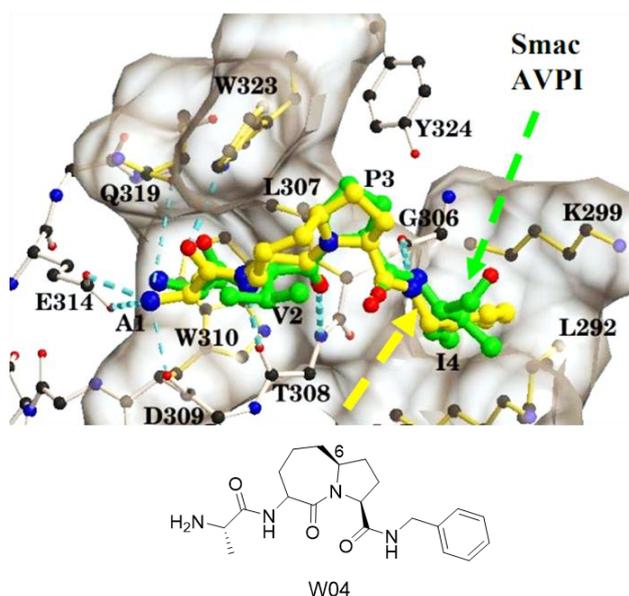


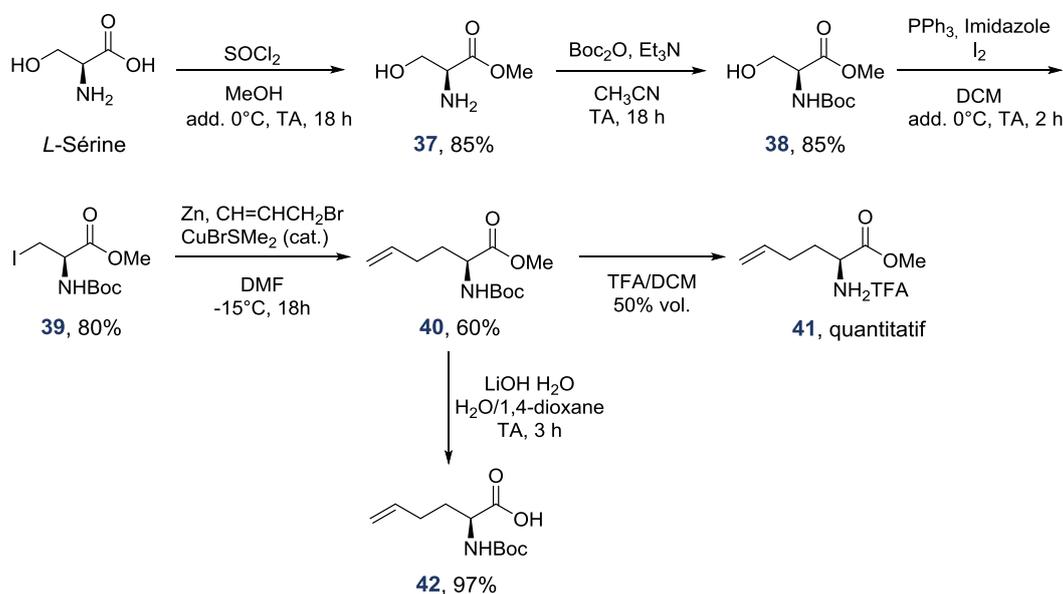
Figure 80. Superposition des complexes d'interaction du térapeptide AVPI et du composé W04 avec le domaine BIR3 de la protéine XIAP.

En vert : la structure cristallographique de AVPI ; en jaune : la structure *in silico* de W04.¹⁹⁸

▪ Synthèse des intermédiaires insaturés à partir de la L-sérine

Pour avoir accès à ces structures, le composé **39** a été obtenu suivant la synthèse décrite par Trost *et al.*:²⁴² l'acide aminé naturel L-sérine a tout d'abord été protégé par estérification en présence de chlorure de thionyle et de méthanol. La fonction amine primaire a également été protégée en *tert*-butylcarbamate correspondant. La fonction alcool de molécule **38** subit ensuite une iodation en présence d'iode moléculaire, de triphénylphosphine et d'imidazole pour donner le composé **39** avec un rendement de 80 %. Cet intermédiaire est ensuite converti en organozincique correspondant puis engagé dans une réaction de couplage de type Negishi catalysée au cuivre, en présence de bromure d'allyle, pour donner le composé **40** avec un rendement de 60 %, selon Atmuri *et al.*^{243a}

Le composé **40** permet ensuite d'obtenir l'intermédiaire **41** (sous forme de sel de trifluoroacétate), par déprotection de la fonction amine d'une part,^{241a} et l'intermédiaire **42**, par saponification de la fonction ester d'autre part^{243a} (Schéma 50).



Réactifs : SOCl_2 (1,0 éq.) ; Boc_2O (1,0 éq.), NEt_3 (3,0 éq.) ; PPh_3 (1,2 éq.), imidazole (1,2 éq.), I_2 (1,2 éq.), Zn (3,0 éq.), CuBrSM_2 (10 mol%), $\text{CH=CHCH}_2\text{Br}$ (1,3 éq.)

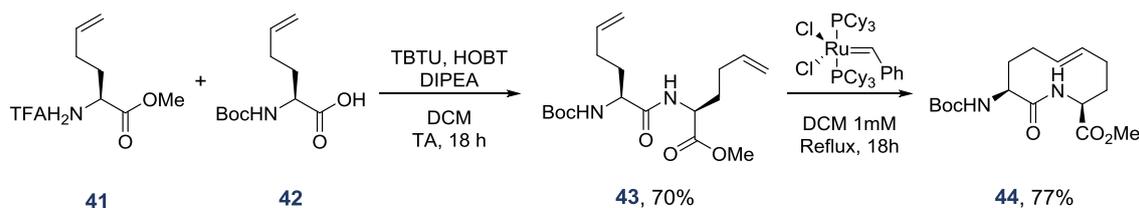
Schéma 50. Voie de synthèse des intermédiaires **41** et **42** à partir de la L-sérine.

²⁴² Trost, B. M.; Rudd, M. T. Chemoselectivity of the Ruthenium-Catalyzed Hydrative Diyne Cyclization: Total Synthesis of (+)-Cylindricine C, D, and E. *Org. Lett.* **2003**, *5* (24), 4599–4602.

²⁴³ a) Atmuri, N. D. P.; Lubell, W. D. Insight into Transannular Cyclization Reactions To Synthesize Azabicyclo[X.Y.Z]Alkanone Amino Acid Derivatives from 8-, 9-, and 10-Membered Macrocyclic Dipeptide Lactams. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (10), 4904–4918 ; b) Atmuri, N. D. P.; Reilly, D. J.; Lubell, W. D. Peptidomimetic Synthesis by Way of Diastereoselective Iodoacetoxylation and Transannular Amidation of 7–9-Membered Lactams. *Org. Lett.* **2017**, *19* (19), 5066–5069.

▪ Fermeture du cycle par métathèse

Les deux intermédiaires ont été ensuite engagés dans une réaction de couplage peptidique pour donner le dipeptide **43** avec un rendement de 70 %, selon une procédure décrite par Godina *et al.*^{241b} Ce composé possède deux insaturations terminales qui permettent, en utilisant le catalyseur de première génération de Grubbs, d'engager une réaction de métathèse et d'obtenir la molécule cyclique insaturée **44** (Schéma 51).

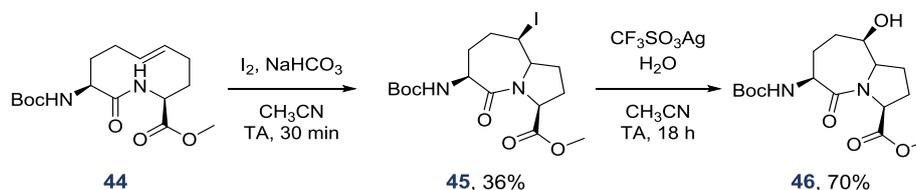


Réactifs : TBTU (1,5 éq.), HOBT (1,5 éq.), DIPEA (3,0 éq.) ; catalyseur (15 mol%)

Schéma 51. Voie de synthèse du composé cyclique à dix membres **44** à partir des intermédiaires **41** et **42**.

▪ Cyclisation *transannulaire* électrophile

Le bicyclic **45** est ensuite obtenu, avec un rendement de 36 %, par une réaction de cyclisation *transannulaire* électrophile en présence d'iode moléculaire et d'un excès de NaHCO₃, ce dernier étant utilisé pour empêcher la déprotection de la fonction amine qui pourrait être causée par la libération de HI durant la réaction. Ensuite, en présence d'un sel d'argent, qui permet l'ionisation de l'atome d'iode et la formation d'un carbocation secondaire, le composé **45** subit une attaque nucléophile par une molécule d'eau pour donner le composé **46** avec un rendement de 70 % (Schéma 52).^{241b}



Réactifs : I₂ (3,0 éq.), base (3,0 éq.) ; H₂O (10 éq.), CF₃SO₃Ag (3,0 éq.)

Schéma 52. Voie de synthèse du composé **46**, à structure 6-iodo-azabicyclo[5.3.0]décane, à partir du composé cyclique à dix membres **44**.

▪ Fonctionnalisation du composé bicyclic

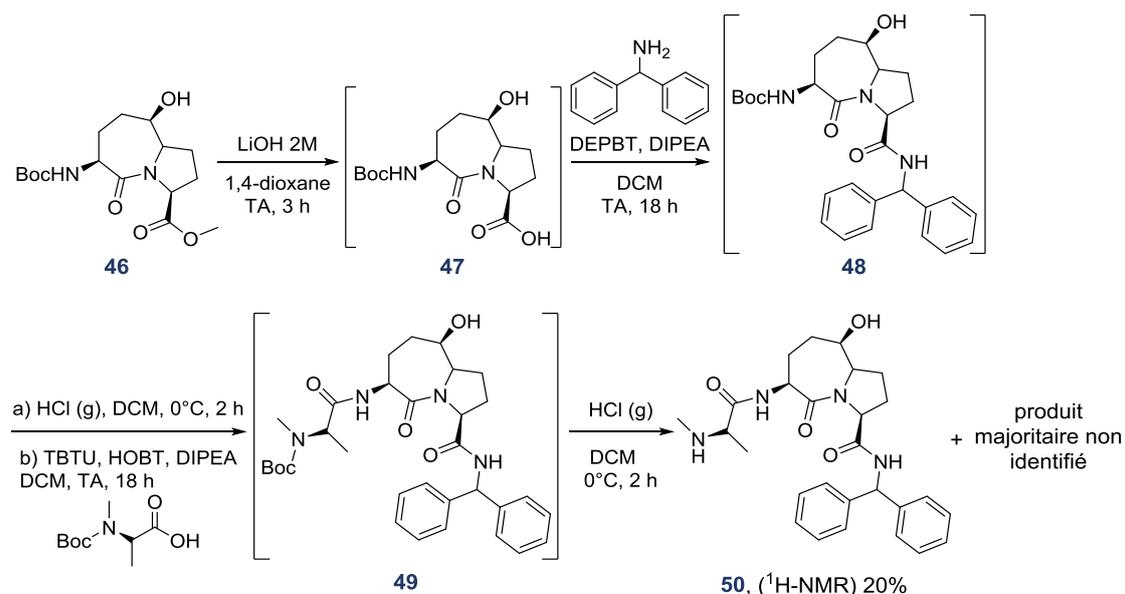
Les précédents travaux de Wang et ses collaborateurs¹⁹⁷ ont inspiré le choix des groupements à insérer par la suite sur ce squelette afin de mimer l'alanine et l'isoleucine présents dans la structure du térapeptide AVPI de Smac. Parmi les analogues d'AVPI

développés par l'équipe de Wang, les molécules obtenues en remplaçant l'alanine par l'acide aminé non naturel *N*-méthyl-*L*-alanine, et en remplaçant l'isoleucine par le groupement diphénylméthylène, se sont montrées les plus prometteuses. Nous avons donc choisi d'introduire ces groupements afin d'obtenir le composé **50** (Schéma 53).

Pour ce faire, grâce à l'expertise de l'équipe du Pr Lubell dans la synthèse peptidique en phase solide et liquide, nous avons choisi d'engager le composé **46** dans une séquence itérative de réactions de déprotection et de couplage peptidique : dans cette procédure, les intermédiaires sont engagés dans l'étape suivante sans purification poussée.

Le composé **46** a d'abord été hydrolysé à l'aide de LiOH (Schéma 53) pour donner le composé **47** engagé ensuite dans une réaction de couplage peptidique avec la *N*-diphénylméthylamine, pour donner le composé **48**. La fonction amine de ce composé est ensuite déprotégée pour pouvoir réagir avec la Boc-*N*-méthyl-*L*-alanine. La déprotection de la fonction amine du composé **49** amène à l'obtention du composé souhaité **50** (Schéma 53). Malheureusement, cette procédure ne s'est pas montrée efficace. En effet, le composé **50** se trouve en mélange avec un composé majoritaire non identifié (analyse ¹H-RMN) probablement issu de l'estérification de la fonction alcool en présence d'un excès d'acide aminé lors de la formation du composé **49**.

À la différence des structures proposées par Wang et ses collaborateurs, les méthodes développées par l'équipe de Lubell permettent l'introduction de divers groupements en position 6 (C5) du bicyclic central [5.3.0]décane (comme la fonction alcool du composé **50**). Afin d'étudier l'influence de la nature de ce groupement sur l'activité pro-apoptotique de la molécule et d'établir des relations structure-activité, nous avons envisagé la synthèse d'analogues de la molécule **50**, portant un atome d'iode, un groupement méthoxy, ou encore un atome d'hydrogène.



Réactifs : amine (1,5 éq.), DEPBT (2,0 éq.), DIPEA (2,0 éq.) ; TBTU (1,2 éq.), HOBT (1,2 éq.), DIPEA (3,0 éq.) acide aminé (1,5 éq.)

Schéma 53. Voie de synthèse envisagée pour le composé **50**, mime abiotique d'AVPI à structure centrale 6-hydroxy-azabicyclo[5.3.0]décane, à partir du composé **46**.

▪ Optimisation et accès à de nouveaux dérivés

Cependant, pour mener à bien cette étude de RSA, la méthode de synthèse doit être optimisée. Afin d'améliorer les rendements, nous avons envisagé une nouvelle approche, mise en place à partir du composé **44**, qui prévoit d'abord les couplages peptidiques de ce composé avec la *N*-diphénylméthylamine et la Boc-*N*-méthyl-*L*-alanine, effectués dans les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse du composé **50**, suivis d'une réaction de cyclisation *transannulaire*.

Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir trois nouveaux composés (**M60**, **M61** et **M62**). De manière générale, la démarche retenue fait intervenir les étapes suivantes :

Tout d'abord, les couplages peptidiques de la *N*-diphénylméthylamine et la Boc-*N*-méthyl-*L*-alanine sur le composé **44** permettent la synthèse d'un mime térapeptidique possédant une structure centrale monocyclique insaturée (composé **M60**, schéma 54) ; ensuite, la cyclisation *transannulaire* du composé **53**, en présence d'iode, permet la synthèse du composé bicyclique **M61**, possédant en position 6 du bicyclic un atome d'iode ; enfin, le composé **54** permet d'obtenir le composé **M62** porteur d'un

groupe méthoxy, à l'aide d'une réaction de substitution nucléophile effectuée dans le méthanol en présence de sel d'argent (Schéma 54).

Cette nouvelle méthode permet la synthèse des composés **M60**, **M61** et **M62** avec des rendements globaux compris entre 9 % et 17 % (calculés à partir du composé **44**).

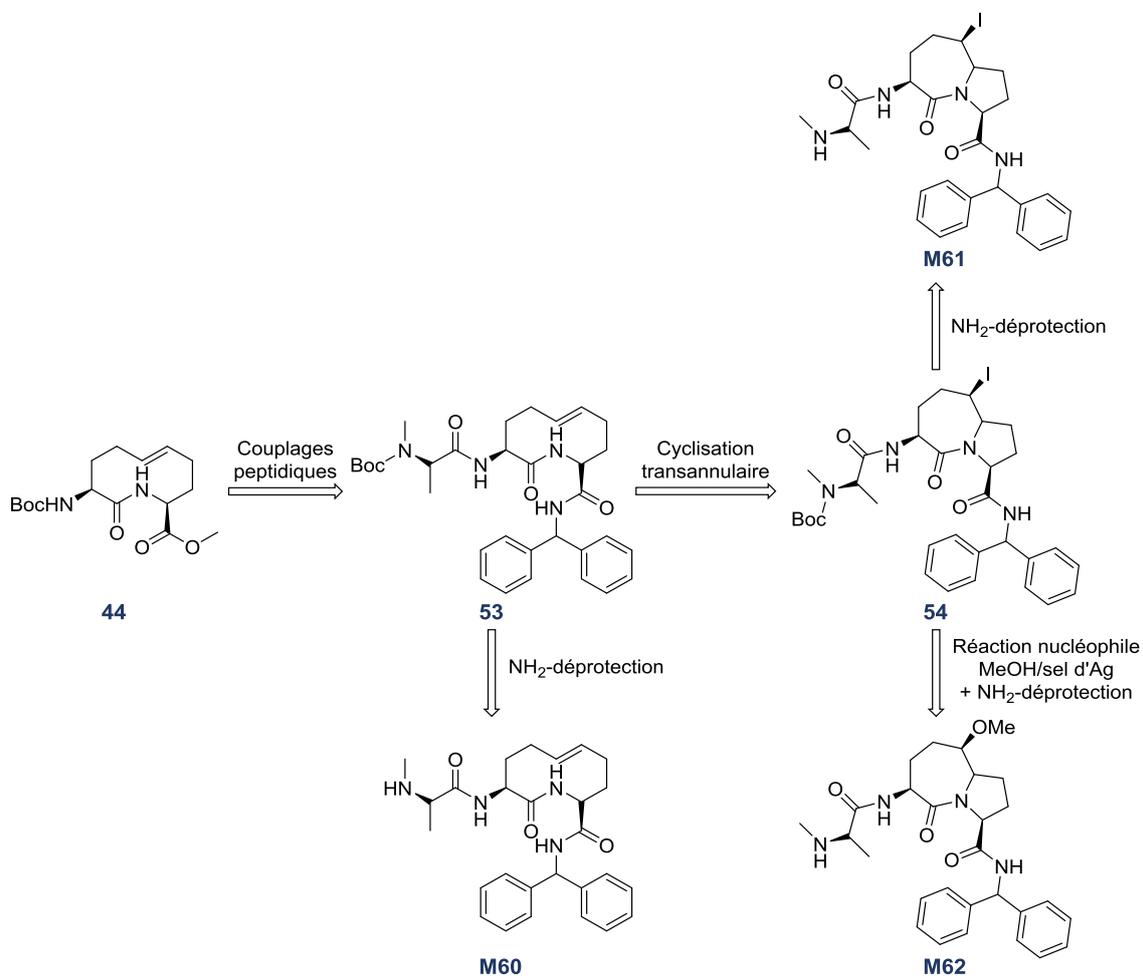
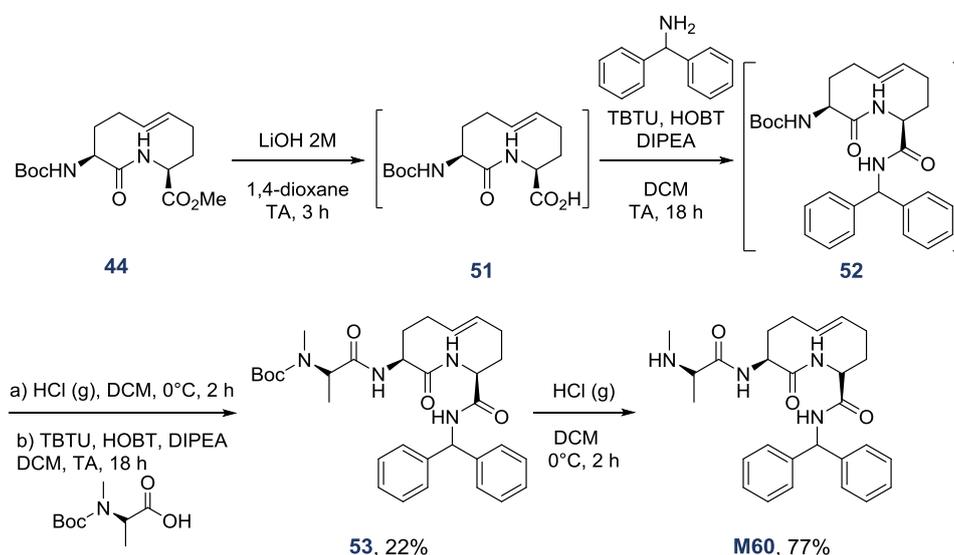


Schéma 54. Étapes clés de la voie de synthèse des composés **54**, **56** et **57** à partir du composé monocyclique insaturé **44**.

Ainsi, premièrement, concernant la synthèse de la molécule M60 :

L'hydrolyse basique du composé **44** permet d'obtenir le composé **51**, qui est ensuite engagé dans une réaction de couplage peptidique avec la *N*-diphénylméthylamine pour donner le composé **52**. Un traitement effectué à l'aide d'acide chlorhydrique permet ensuite d'activer la fonction amine du composé **52**, réagissant ensuite avec la Boc-*N*-méthyl-*L*-alanine dans une réaction de couplage peptidique pour donner le composé **53** avec un rendement de 22 %. La déprotection en milieu acide de la molécule **53** permet d'obtenir le composé **M60**, mime contraint du térapeptide AVPI de la protéine Smac, avec un rendement de 77 % (Schéma 55).

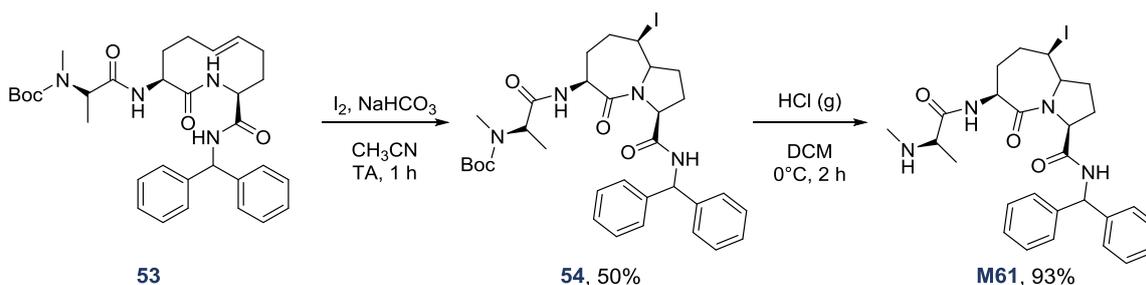


Réactifs : amine (1,5 éq.), TBTU (1,2 éq.), HOBT (1,2 éq.), DIPEA (3,0 éq.), acide aminé (1,5 éq.)

Schéma 55. Voie de synthèse du composé **M60**, mime abiotique d'AVPI à structure cyclique à dix membres, obtenus à partir du composé **44**.

Deuxièmement, concernant la synthèse de la molécule M61 :

Le composé **53** permet ensuite d'obtenir le composé **M61** *via* une réaction de cyclisation *transannulaire* en présence d'iode moléculaire. Cette réaction passe par l'obtention de l'intermédiaire **54**, synthétisé avec un rendement de 50 %. Un traitement avec de l'acide chlorhydrique permet ensuite d'isoler le composé **M61** attendu, avec un rendement de 93 % (Schéma 56).

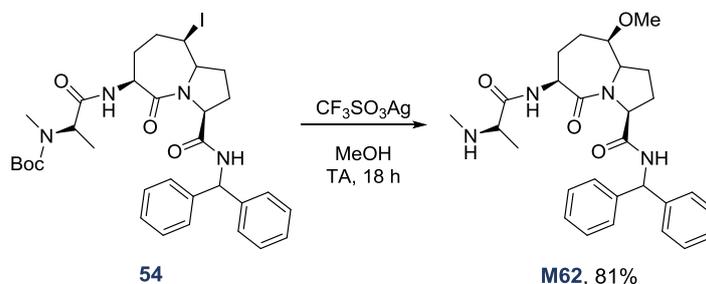


Réactifs : I_2 (3,0 éq.), $NaHCO_3$ (3,0 éq.)

Schéma 56. Voie de synthèse du composé **M61** mime abiotique d'AVPI à structure 6-iodo-azabicyclo[5.3.0]décane à partir du composé **53**.

Troisièmement, concernant la synthèse de la molécule **M62** :

À partir du composé **54**, le composé **M62** a été obtenu *via* une réaction nucléophile en présence d'un sel d'argent et de méthanol, avec un rendement de 81 % (Schéma 57).



Réactifs : CF_3SO_3Ag (3,0 éq.)

Schéma 57. Voie de synthèse du composé **M62** mime abiotique d'AVPI à structure 6-méthoxy-azabicyclo[5.3.0]décane à partir du composé **54**.

Nous avons donc synthétisé 3 nouveaux composés, mimes du térapeptide AVPI de la protéine Smac. Le composé **M60**, possédant un noyau central à dix membres, et les composés **M61** et **M62** possédant un noyau central azabicyclo[5.3.0]décane, substitué en position 6.

Afin d'étudier l'influence de la structure centrale des composés obtenus, nous avons ensuite envisagé la synthèse des analogues correspondants ayant une structure centrale de type azabicyclo[3.4.0]nonane.

2. 2. Synthèse de composés bicycliques de type azabicyclo[3.4.0]nonane

À partir des travaux publiés par Atmuri *et al.*²⁴³ décrivant des méthodes de synthèse pour la préparation de diverses structures bicycliques de type azabicyclo[x.y.0]alcane, nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de bicycles de type azabicyclo[3.4.0]nonane (Figure 81).

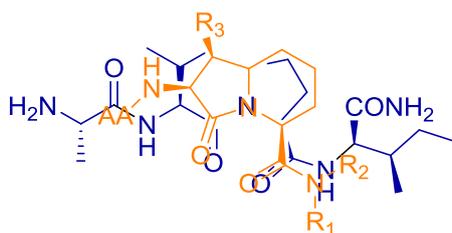


Figure 81. Structure dipeptidique de type azabicyclo[3.4.0]nonane envisagée (orange), superposée au térapeptide AVPI (bleu).

En effet, des composés de ce type n'ont jamais été proposés comme mimes du térapeptide AVPI. Le cycle à cinq membres de la proline dans le térapeptide AVPI est remplacé par un cycle à six membres. Ceci permettra de vérifier les interactions, entre nos composés et le domaine XIAP-BIR3, liées à la présence du cycle. Le redimensionnement du cycle modifie la géométrie de la molécule et la disposition des groupements latéraux dans l'espace, modifiant potentiellement l'interaction du composé avec la protéine cible.

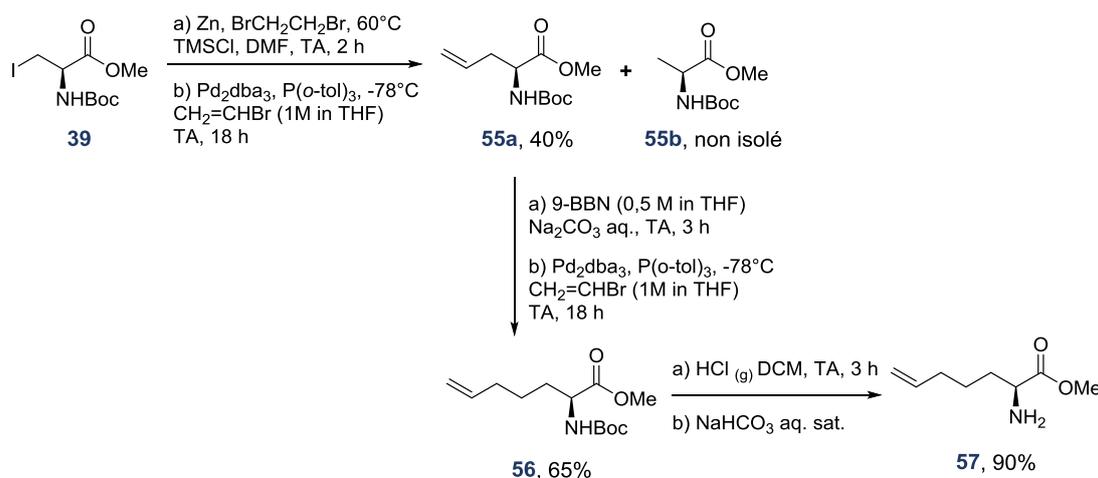
▪ Synthèse des intermédiaires insaturés

Les intermédiaires nécessaires à la synthèse de ces structures sont obtenus à partir des acides aminés naturels : *L*-sérine et *L*-méthionine.

Tout d'abord, concernant la synthèse du premier intermédiaire **57** dérivé de la *L*-sérine : Comme décrit en *schéma 50* (page 204), le composé **39** est obtenu à partir de la *L*-sérine. Dans cette voie de synthèse (décrite par Atmuri *et al.*)^{243a}, le dérivé organozincique correspondant réagit dans une réaction de couplage de type Negishi catalysée au cuivre, en présence de bromure de vinyle, pour donner le composé **55a** avec un rendement de

40 %. Ce faible rendement s'explique par la formation concomitante de *L*-alanine **55b**, par hydrolyse du composé organozincique en présence d'eau atmosphérique (Schéma 58).

Le composé **55a** est ensuite engagé dans une réaction d'hydroboration en présence de 9-borabicyclo(3.3.1)nonane (9-BBN), permettant d'obtenir le borane correspondant, capable de réagir avec le bromure de vinyle dans un couplage de type Suzuki-Miyaura pour donner le composé **56** avec un rendement de 65 %. Ce composé est ensuite déprotégé pour obtenir l'intermédiaire **57**, avec un rendement de 90 % (Schéma 58).



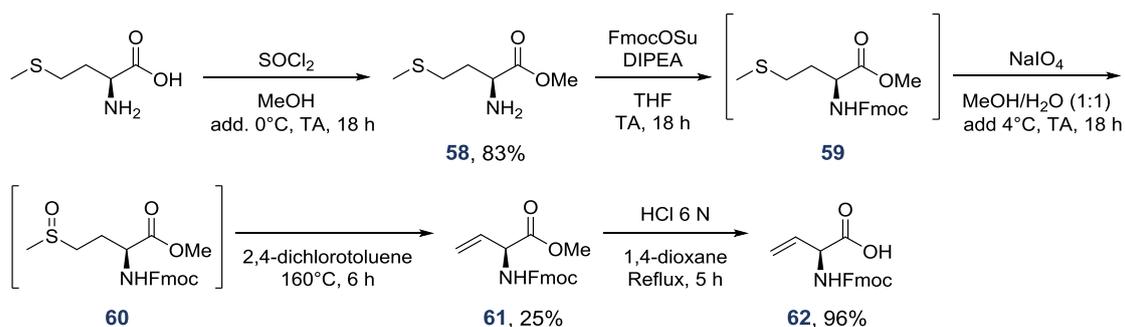
Réactifs : Zn (6,0 éq.), BrCH₂CH₂Br (0,6 éq.), TMSCl (0,2 éq.), Pd₂dba₃ (0.02 éq.), P(o-tol)₃ (0.1 éq.), vinyl bromide (1,4 éq.) ; 9-BBN (2,5 éq.), Na₂CO₃ (3,5 éq.)

Schéma 58. Voie de synthèse de l'intermédiaire **57** à partir du composé **39**.

Ensuite, concernant la synthèse du second intermédiaire **62** dérivé de la *L*-méthionine :

La *L*-méthionine est tout d'abord protégée par estérification, et ensuite par formation d'un carbamate en présence de *N*-(9-fluorénylméthoxycarboxyloxy)succinimide (FmocOsu). Le composé **59** obtenu est ensuite oxydé pour former le composé **60**. Puis cette molécule subit une pyrolyse à 160°C, dans le 2,4-dichlorotoluène, pour former le composé insaturé **61**, isolé avec un rendement de 25 %. L'hydrolyse acide de la fonction ester du composé **61** permet d'obtenir l'intermédiaire **62**, avec un rendement de 96 % (Schéma 59).²⁴⁴

²⁴⁴ a) Sicherl, F.; Cupido, T.; Albericio, F. A Novel Dipeptidomimetic Containing a Cyclic Threonine. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (8), 1266–1268 ; b) Organ, M. G.; Xu, J.; N'Zemba, B. A Modular, General and Enantiospecific Strategy for the Synthesis of CVS 1778 Analogs: Inhibitors of Factor Xa. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (45), 8177–8180.



Réactifs : SOCl_2 (1,0 éq.) ; FmocOSu (1,0 éq.), DIPEA (2,0 éq.) ; NaIO_4 (1,0 éq.)

Schéma 59. Voie de synthèse de l'intermédiaire **62** à partir de la *L*-méthionine.

▪ Fermeture du cycle par métathèse

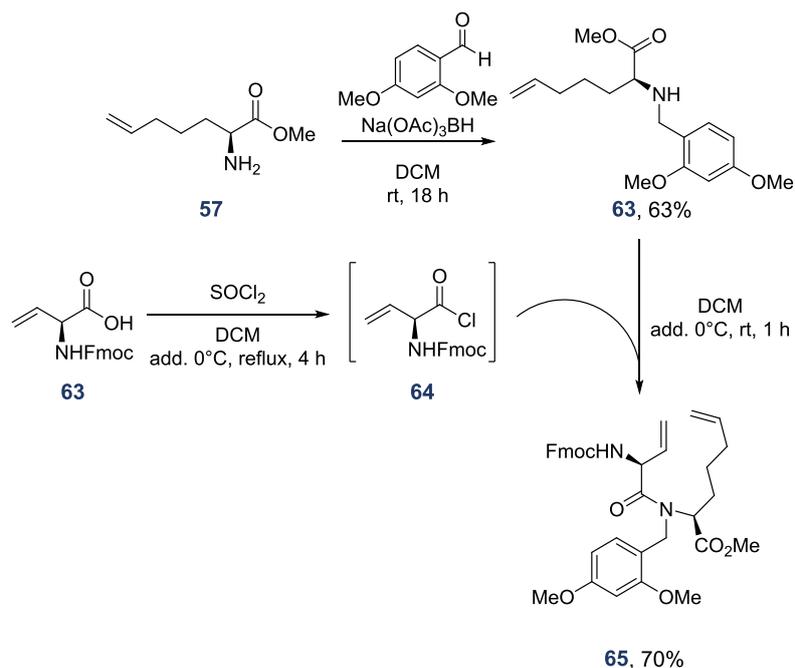
Une fois ces deux intermédiaires obtenus (composés **57** et **62**), les structures dipeptidiques de type azabicyclo[3.4.0]nonane ont pu être synthétisées selon les méthodes de synthèse développées par l'équipe du Pr Lubell.

Pour ce faire, comme décrit par Lubell et ses collaborateurs,^{241a, 243a} le composé **57**, possédant une fonction amine libre, est d'abord engagé dans une réaction avec le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde. L'imine formée dans cette réaction subit une réduction en présence de triacétoxyborohydrure de sodium ($\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$), pour donner le composé **63** (Schéma 60).

La fonction amine secondaire obtenue est ensuite engagée dans une réaction de couplage peptidique avec le composé activé **64**, amenant à l'obtention du composé **65**, possédant une fonction amide tertiaire (Schéma 60).^{243a} À savoir, la barrière énergétique pour l'isomérisation de la liaison amide est plus faible pour les amides tertiaires, par rapport aux amides secondaires : la libre rotation autour de la fonction amide favorise ensuite la géométrie *cis* et facilite la réaction de métathèse du dipeptide formé.²⁴⁵

Finalement, le dipeptide **65** est obtenu avec un rendement de 70 %.

²⁴⁵ a) Creighton, C. J.; Reitz, A. B. Synthesis of an Eight-Membered Cyclic Pseudo-Dipeptide Using Ring Closing Metathesis. *Org. Lett.* **2001**, 3 (6), 893–895 ; b) Creighton, C. J.; Leo, G. C.; Du, Y.; Reitz, A. B. Design, Synthesis, and Conformational Analysis of Eight-Membered Cyclic Peptidomimetics Prepared Using Ring Closing Metathesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12 (16), 4375–4385.



Réactifs : aldéhyde (1,3 éq.), Na(OAc)₃BH (1,5 éq.) ; SOCl₂ (1,0 éq.)

Schéma 60. Voie de synthèse du dipeptide **65**.

Pour la réaction de méta-thèse, plusieurs conditions ont été évaluées pour réduire la formation des produits issus de méta-thèses intermoléculaires. En effet, la formation de ces produits rend la purification du produit attendu délicate. Le *tableau 6*, présenté ci-dessous, regroupe l'ensemble des conditions étudiées.

Premièrement, en utilisant le catalyseur de deuxième génération de Grubbs, la réaction effectuée dans le DCM, ou le chlorobenzène (BzCl) (entrées 1 et 2), amène à la formation de produits issus de méta-thèses intermoléculaires, et ce pour des concentrations en dipeptide de 10 mM et de 1 mM. La dilution du milieu réactionnel (1 mM) conduit à l'absence de réaction.

Deuxièmement, afin d'étudier l'influence du solvant, la réaction a été menée en présence de THF ou de toluène (entrées 3 et 4). Là encore, aucune réaction n'a eu lieu (produit de départ récupéré).

Troisièmement, nous avons tenté un essai en se plaçant à la concentration de 10 mM, dans le 1,2-dichloroéthane (DCE), en utilisant le catalyseur de première génération de Grubbs (entrée 5), mais aucune réaction n'a eu lieu (produit de départ récupéré).

Enfin, en changeant de catalyseur dans les conditions de l'entrée 5, à savoir en utilisant le catalyseur de deuxième génération de Grubbs (entrée 6), le produit de méta-thèse

intramoléculaire a enfin pu être isolé avec un rendement de 40 %, mais la réaction est incomplète, et des produits de métathèse intermoléculaire sont observés. Afin de réduire la réaction intermoléculaire et la charge catalytique, le milieu réactionnel a été dilué (entrée 7 à 11) : ainsi à l'issue de ces travaux d'optimisation, en présence de 25 % de catalyseur introduit en deux temps, dans une solution diluée à 0,5 mM, le composé **66** a pu être isolé avec un rendement de 70 % (Schéma 61).

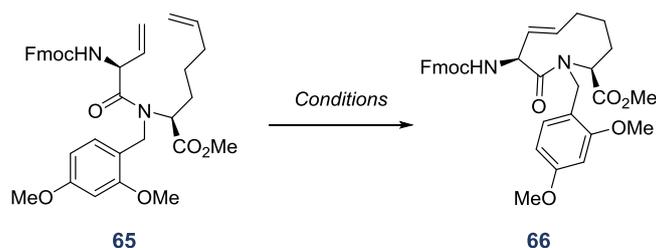
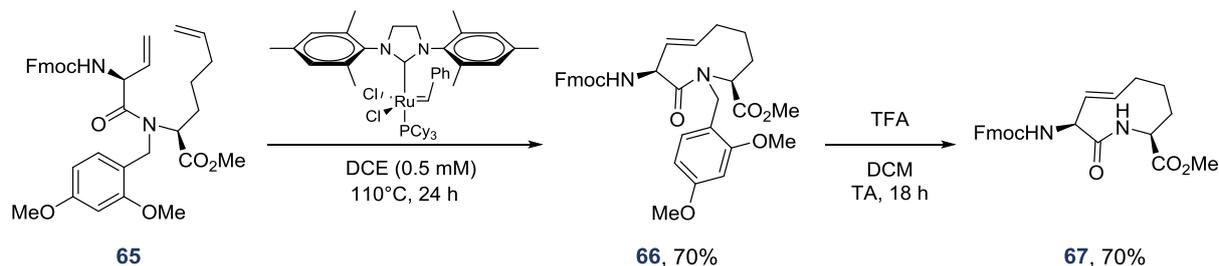


Tableau 6. Optimisation des conditions de métathèse pour la synthèse du dipeptide **66**.

Essai	Solvant	T (°C)	Catalyseur de Grubb (type/% mol)	[68] (mM)	Rdt (%)
1	DCM	50 (Reflux)	2 ^{ème} /20	10	n. d.
2	BnCl	100	2 ^{ème} /20	1	n. d.
3	THF	70 (Reflux)	2 ^{ème} /20	1	n. d.
4	Toluene	110 (Reflux)	2 ^{ème} /20-50	1	n. d.
5	DCE	90 (Reflux)	1 ^{ère} /20	10	n. d.
6	DCE	90 (Reflux)	2 ^{ème} /20	10	40
7	DCE	90 (Reflux)	2 ^{ème} /20	1	n. d.
8	DCE	100	2 ^{ème} /40	1	n. d.
9	DCE	100	2 ^{ème} /20 + 15 (t = 18 h)	1	50
10	DCE	100	2 ^{ème} /15 + 10 (t = 8 h)	1	60
11	DCE	100	2 ^{ème} /15 + 10 (t = 18 h)	0,5	70

La molécule cyclique à neuf membres **66** est ensuite traitée avec l'acide trifluoroacétique pour déprotéger la fonction amide.^{243a} Ceci permet d'obtenir le composé **67** (Schéma 60).



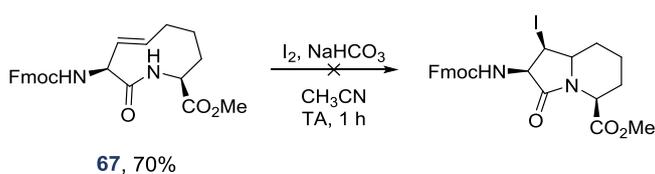
Réactifs : catalyseur (25 mol%)

Schéma 61. Voie de synthèse du composé cyclique à 9 membres **67** à partir du dipeptide **65**.

▪ Cyclisation *transannulaire* électrophile

Avant d'introduire les groupements terminaux remplaçant l'alanine et l'isoleucine du térapeptide AVPI, nous avons étudié la réactivité du composé **67** dans la cyclisation *transannulaire* en présence d'iode moléculaire, et ensuite la possibilité de modifier l'atome d'iode inséré, dans une réaction nucléophile à l'aide de sels d'argent.

Malheureusement, l'application des conditions utilisées pour la formation de l'iodoazabicyclo[5.3.0]décane **54** (Schéma 56) ne permettent pas d'obtenir l'iodoazabicyclo[3.4.0]nonane attendu (Schéma 62). Dans cette réaction, l'utilisation d'iode moléculaire n'est pas suffisante pour la formation de l'espèce iodonium nécessaire pour la coordination de l'atome d'iode.



Réactifs : I₂ (3,0 éq.), NaHCO₃ (3,0 éq.)

Schéma 62. Conditions de cyclisation *transannulaire* testées.

Comme reporté récemment par Atmuri *et al.*,²⁴³ l'iode hypervalent (III) peut activer la double liaison d'analogues du composé **67** à 8 membres (composé **a** en figure 82) permettant la formation d'une espèce iodonium sur la face moins encombrée de la molécule (molécule **b**, figure 82). Cette espèce iodonium subit ensuite une attaque nucléophile intramoléculaire de l'azote amidique, pour former l'intermédiaire bicyclique **c** présenté en figure 82. Le déplacement de l'iode hypervalent formé peut se faire par le

carbamate voisin, *via* la formation d'un intermédiaire oxazole (molécule **d**, figure 82). Ce dernier est ouvert par la suite par l'ion iodure libéré précédemment, conduisant à la formation du composé iodoazabicyclo attendu, avec une rétention de configuration (**e**, figure 82).^{243a}

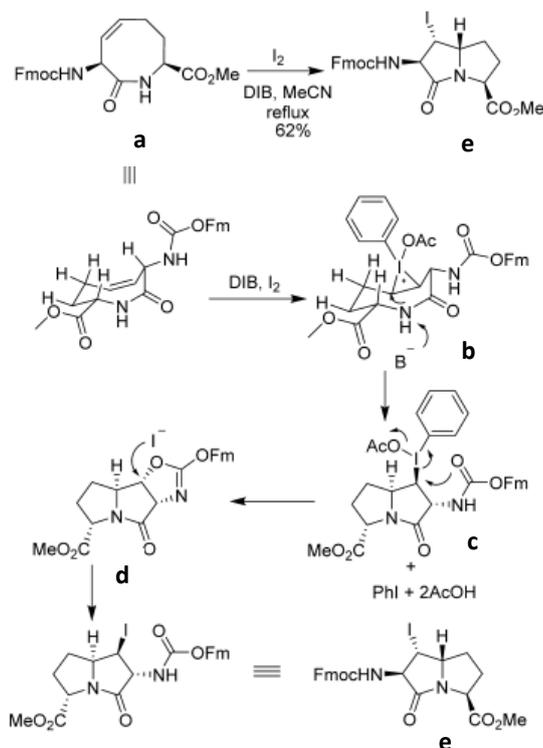
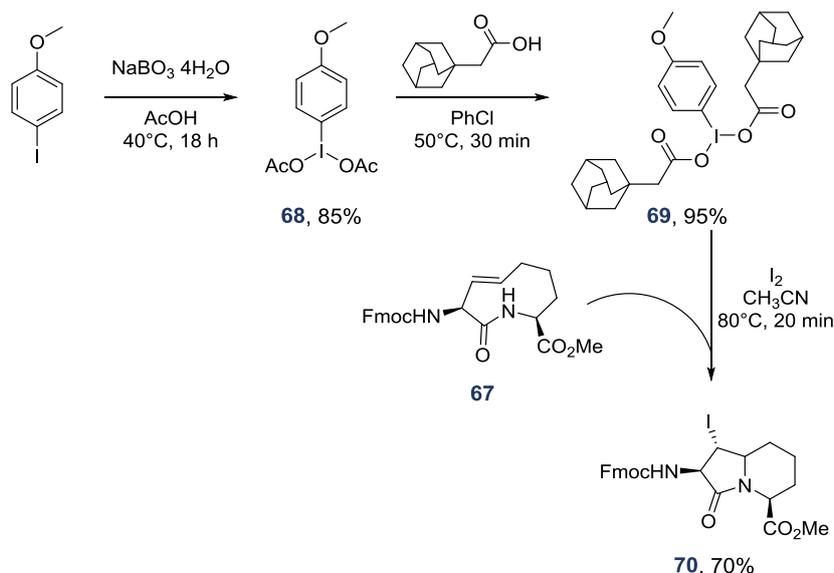


Figure 82. Mécanisme proposé pour la réaction de cyclisation *transannulaire* en présence d'iode hypervalent.^{243a}

Le composé d'iode hypervalent décrit par Atmuri *et al.*^{243b} a été obtenu à partir du 1-iodo-4-méthoxybenzène commercial, qui est d'abord oxydé en présence de perborate de sodium et d'acide acétique, permettant la formation d'une espèce peracétoxy, avec un caractère oxydant fort.²⁴⁶ Le réactif **68** (Schéma 63), est ensuite converti en réactif **69** par substitution du groupement acétate (OAc) en présence de l'acide 1-adamantanecarboxylique.

Le réactif **69** est mis en réaction avec le composé **67**, en présence d'iode moléculaire, pour donner le composé iodoazabicyclo[3.4.0]nonane **70** attendu, avec un rendement de 70 % (Schéma 63).^{243b}

²⁴⁶ McKillop, A.; Sanderson, W. R. Sodium Perborate and Sodium Percarbonate: Cheap, Safe and Versatile Oxidising Agents for Organic Synthesis. *Tetrahedron* **1995**, *51* (22), 6145–6166.

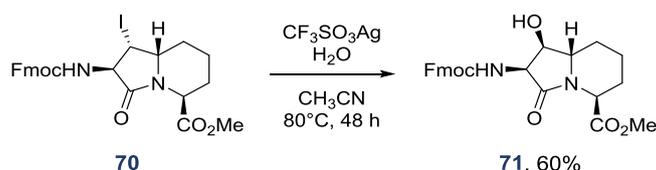


Réactifs : NaBO_3 (10 éq.) ; acide (2,0 éq.), I_2 (6,0 éq.), **69** (3,0 éq.)

Schéma 63. Voie de synthèse du composé **70** à structure 4-iodo-azabicyclo[3.4.0]nonane, à partir du composé cyclique à neuf membres **67**.

■ Fonctionnalisation du composé bicyclique

Comme pour le composé 6-iodo-azabicyclo[5.3.0]décane **M61** (Schéma 57), en présence d'un sel d'argent, le composé **70** réagit dans une réaction nucléophile avec une molécule d'eau pour donner le composé 4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane **71**, avec un rendement de 60 %.



Réactifs : $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Ag}$ (3,0 éq.), H_2O (10 éq.)

Schéma 64. Voie de synthèse du composé **71** à structure 4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane, à partir du composé 4-iodo-azabicyclo[3.4.0]nonane **74**.

■ Accès à de nouveaux dérivés

L'étude de la réaction de Fmoc-déprotection de la fonction amine du composé **71** est actuellement en cours au sein de l'équipe du Pr Lubell. Cette déprotection est nécessaire pour l'introduction du groupement terminal remplaçant l'alanine du térapeptide AVPI. En effet, le composé **71** peut être engagé dans une hydrolyse acide pour donner l'acide carboxylique (Schéma 65), la fonction acide obtenue peut subir une réaction de couplage

peptidique en présence de la *N*-diphénylméthylamine, selon le *schéma 65*. La fonction amine du produit de couplage obtenu doit ensuite être déprotégée en milieu basique pour pouvoir réagir avec la Boc-*N*-méthyl-*L*-alanine et donner le composé attendu, mème du térapeptide AVPI, présentant une structure centrale de type azabicyclo[3.4.0]nonane.

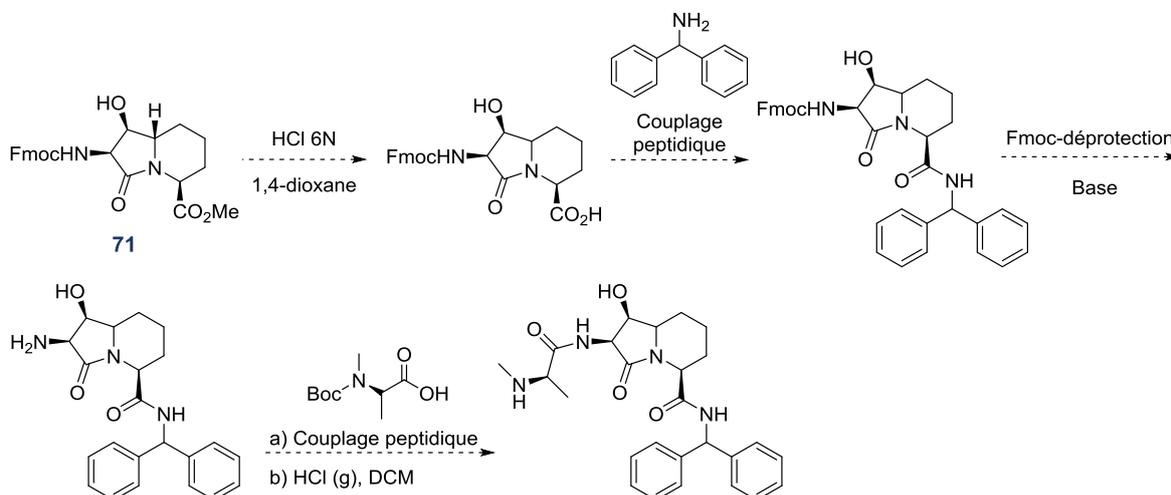


Schéma 65. Voie de synthèse proposée pour le développement d'un mème d'AVPI à structure 4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane.

Une fois les conditions de réaction de la Fmoc-déprotection et de couplages peptidiques optimisées, elles seront appliquées au substrat **67**, selon la voie de synthèse élaborée à partir du composé **44** à dix membres. Ceci permettra d'obtenir les analogues à structure centrale de type azabicyclo[3.4.0]nonane des composés **50**, **M60**, **M61** et **M62** synthétisés précédemment (possédant une structure centrale de type azabicyclo[5.3.0]décane) (Figure 83).

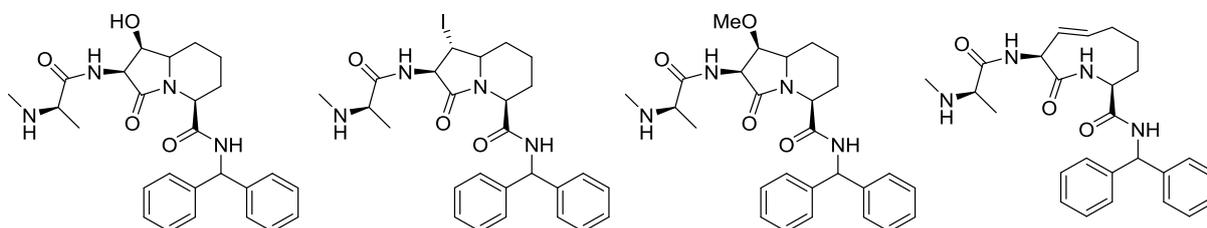


Figure 83. Structures des analogues azabicyclo[3.4.0]nonane des composés **50**, **M61**, **M62** et **M60** de type azabicyclo[5.3.0]décane en cours de synthèse au sein de l'équipe du Pr Lubell.

La synthèse de ces composés nous permettra d'avoir accès à une chimiothèque de 8 composés, mèmes d'AVPI, qui pourront être évalués par nos collaborateurs et qui nous permettront d'établir de nouvelles RSA.

2. 3. Conclusion et perspectives

En utilisant les méthodes élaborées par le groupe du Pr Lubell, nous avons pu synthétiser 3 nouvelles molécules, mimes contraints du térapeptide AVPI de la protéine Smac. Deux de ces molécules possèdent une structure centrale de type azabicyclo[5.3.0]décane (composés **M61** et **M62**), la troisième présente une structure centrale lactamique à dix membres (composé **M60**) (Figure 84).

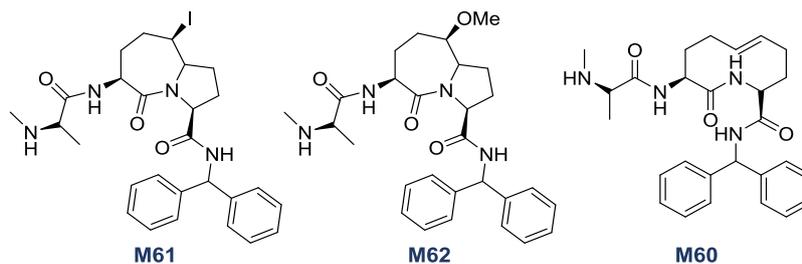


Figure 84. Mimes contraints du térapeptide AVPI obtenus.

En particulier, la mise en place de la nouvelle voie de synthèse, élaborée à partir du composé cyclique à dix membres **44** (décrit dans la littérature^{241b}), a permis d'obtenir ces trois nouveaux composés (**M60**, **M61** et **M62**) avec des rendements globaux compris entre 9 % et 17 % (Schéma 66).

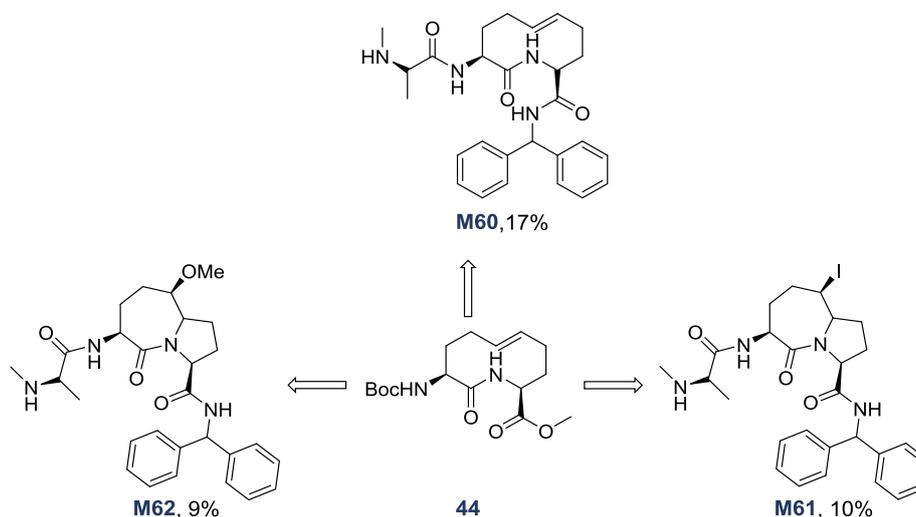


Schéma 66. Mimes d'AVPI obtenus à partir du composé **44**.

Cette voie de synthèse permet d'obtenir plusieurs composés, mimes d'AVPI, en partant d'un composé monocyclique insaturé. En effet, on peut distinguer trois étapes clés de cette voie de synthèse (Schéma 67) :

- l'introduction de divers groupements terminaux remplaçant, ou pas, l'alanine et l'isoleucine du térapeptide AVPI ;
- la réaction de cyclisation *transannulaire* électrophile, pour obtenir le composé bicyclique iodé ;
- l'introduction de divers groupements nucléophiles, à l'aide d'un sel d'argent.

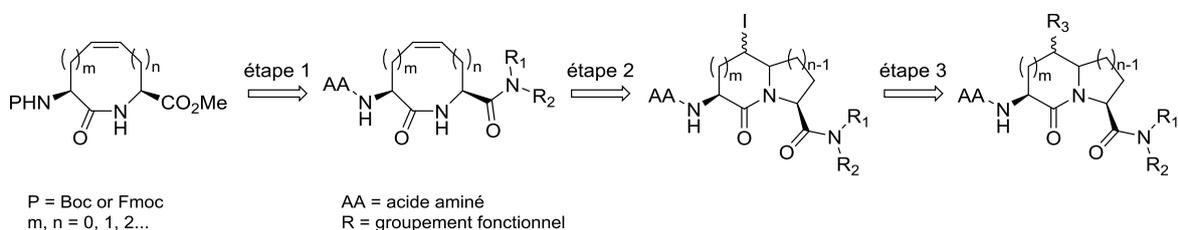


Schéma 67. Étapes clés de la voie de synthèse élaborée pour le développement de mimes d'AVPI à partir d'un composé monocyclique insaturé.

De plus, l'optimisation des conditions de métathèse, effectuée pour la synthèse du composé cyclique à neuf membres **66**, à partir du composé **65**, ainsi que la mise en place de la réaction nucléophile en présence de sel d'argent, qui a conduit au composé **71** (4-hydroxy-azabicyclo[3.4.0]nonane), permettront d'exploiter cette nouvelle voie de synthèse pour la conception de composés à structure azabicyclo[3.4.0]nonane (Schéma 68).

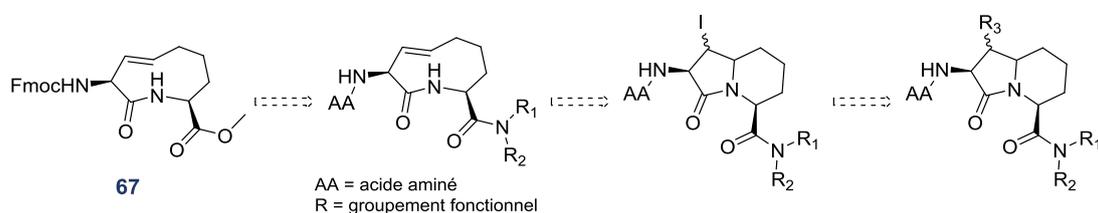


Schéma 68. Application de la voie de synthèse élaborée au composé **70** pour le développement de mimes d'AVPI à structure centrale azabicyclo[3.4.0]nonane.

D'une part, l'évaluation biologique sur des modèles cellulaires des composés obtenus est à présent en cours d'étude grâce à une collaboration avec le groupe du Pr Nils Metzler-Nolte

à l'Université de Ruhr à Bochum, en Allemagne. D'autre part, l'affinité de ces composés pour le domaine XIAP-BIR3 a été évaluée par FPA (test présenté en annexe B), au sein de notre équipe, par le Dr Marie Jouanne, permettant la mise en place d'une collaboration entre le CERMN et l'équipe du Pr Lubell à l'Université de Montréal.

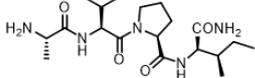
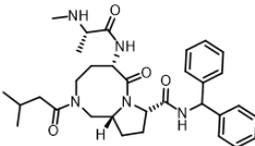
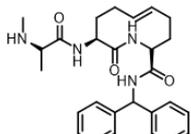
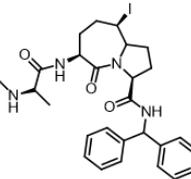
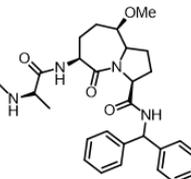
- **Discussion des résultats issus du test FPA**

Ce test a permis d'évaluer la capacité de nos composés à inhiber l'interaction entre le domaine XIAP-BIR3 et le peptide fluorescent choisi.

À la concentration de $2,0 \cdot 10^{-4}$ M, le composé **M61** inhibe moins de 50 % de la liaison, ainsi pour cette molécule, la CI_{50} n'a pas pu être calculée, nous avons donc indiqué le pourcentage d'inhibition ($\%_{inhib}$). Pour les composés **M60** et **M62**, des valeurs de CI_{50} ont pu être calculées : 75 μ M et 85 μ M, respectivement (Tableau 7). Afin d'améliorer l'affinité envers le domaine XIAP-BIR3, des pharmacomodulations de ces composés par remplacement des groupements latéraux, ainsi que l'étude de l'influence de la taille du macrocycle, permettront d'établir des nouvelles RSA.

Tableau 7. Résultats des tests FPA.

Structures des composés évalués par FPA et valeurs d'inhibition (CI_{50} ou $\%_{inhib}$.) calculées.

Molécule	Structure	CI ₅₀ (μM) ou % _{inhib.} (%)
AVPI		2,3 μM
Debio1143		0,083 ± 0,005 μM
M60		75 ± 14 μM
M61		49 ± 10 % à 2,0 10 ⁻⁴ M
M62		85 ± 19 μM

3. Conclusion et perspectives

Dans l'intérêt de développer de nouvelles molécules avec un potentiel thérapeutique dans le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants, nous avons centré nos recherches sur la conception et la synthèse de perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliquées dans le processus d'apoptose, avec un intérêt particulier pour les protéines « régulatrices d'apoptose » des familles Bcl-2 et IAPs.

Afin de rétablir l'équilibre apoptotique et promouvoir l'apoptose des cellules cancéreuses, nous avons concentré nos efforts dans le développement de molécules potentiellement inhibitrices de protéines Mcl-1, Bcl-x_L et XIAP. Ces protéines sont surexprimées dans les cancers de l'ovaire chimiorésistants et cette surexpression est responsable du développement de la résistance à l'apoptose et aux agents thérapeutiques conventionnels.

En particulier, il a été montré que les protéines Mcl-1 et Bcl-x_L coopèrent pour échapper à l'apoptose, et que leur inhibition concomitante entraîne une apoptose massive des cellules cancéreuses. Nous nous sommes donc intéressés au développement d'inhibiteurs duals de ces deux membres anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2.

L'inhibition de la protéine XIAP, quant à elle, permet de libérer les caspases et promeut l'apoptose de deux façons : par activation des caspases libérées et par activation de Bid (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la sortie de la protéine Smac dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, Smac peut donc inhiber la protéine XIAP.

Guidés par des études de *drug design*, les pharmacomodulations de la structure du pyridoclastax ont permis de synthétiser 60 molécules, dont certaines présentent des activités inhibitrices des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Ces activités inhibitrices, évaluées par impédancemétrie, seront confirmées par des analyses complémentaires permettant d'étudier l'interaction directe de nos molécules avec les protéines cibles.

A court terme, la conception d'inhibiteurs duals des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L pourra être poursuivie par des pharmacomodulations des premiers composés duals issus de ce travail.

En effet, plusieurs composés portant une chaîne *O*-alkylée (**M25**, **M26**, **M29**, **M49**) ou une fonction polaire (**M33**, **M45**) présentent le profil de potentiels inhibiteurs duals des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L. Une possible combinaison de ces fonctions dans une seule molécule pourrait potentiellement améliorer l'activité inhibitrice des protéines cibles (Schéma 70).

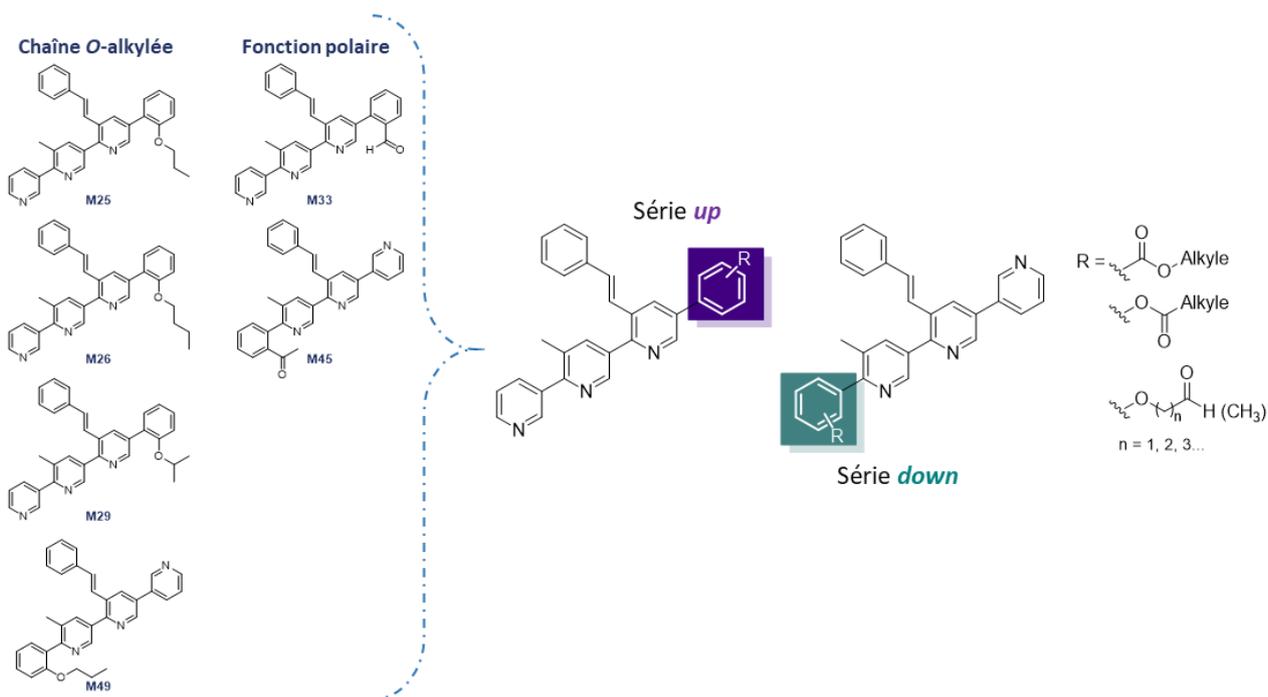


Schéma 70. Pharmacomodulations envisagées en série *up* et *down* à partir de composés « duals » obtenus.

A plus long terme, le développement d'inhibiteurs hybrides pourrait être envisagé. Lors de nos travaux, plusieurs molécules se sont révélées ne pas être des duals inhibiteurs mais uniquement des inhibiteurs puissants de la protéine Mcl-1. La conception d'inhibiteurs hybrides duals des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L pourrait être atteinte par fusion d'une molécule inhibitrice de Mcl-1 (pyridoclastax ou analogues tels que les composés **M51**, **M56**, **M59**, **M58**) et un inhibiteur de Bcl-x_L (ABT-737 ou ABT-263). En s'inspirant des travaux de Tanaka *et al.*²²⁰ nous envisageons de lier, à l'aide d'un *linker*, le motif de l'ABT-737 porteur de l'activité biologique et le motif terpyridinique substitué de nos composés (Schéma 71).

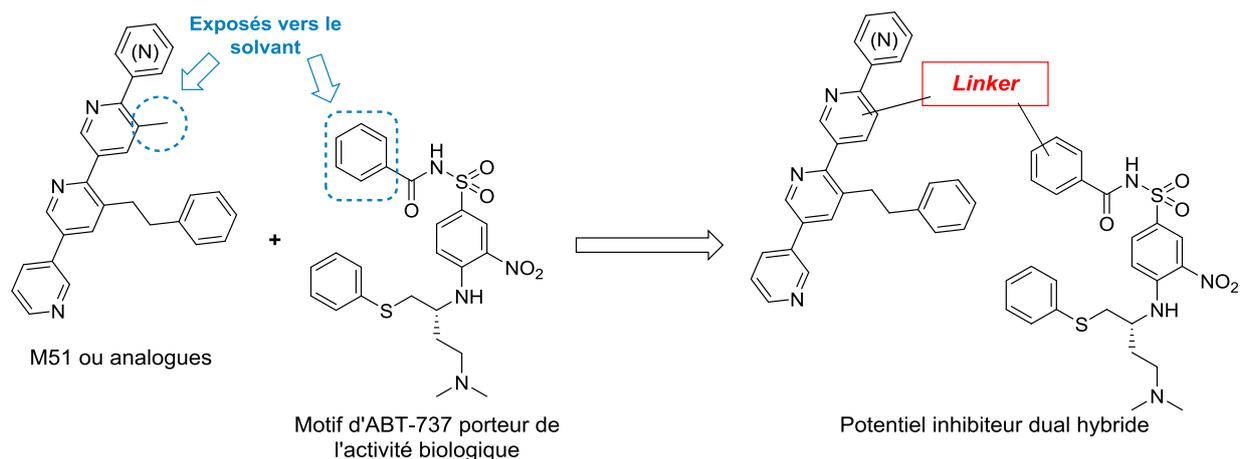


Schéma 71. Conception d'inhibiteurs duals hybrides Mcl-1/Bcl- x_L .

Par ailleurs, en raison de la thrombocytémie induite chez les patients traitées par des inhibiteurs de Bcl- x_L , la conception d'inhibiteurs duals Mcl-1/Bcl-2 est aussi à envisager. L'intérêt de développer ce type de composés a récemment été montré par les travaux de Savona et ses collaborateurs,²¹² où l'association d'un inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-2 (venetoclax/ABT-199) et d'un inhibiteur sélectif de la protéine Mcl-1 permet de surmonter la chimiorésistance acquise par les cellules de leucémie myéloïde aiguë traitées par le seul venetoclax (résistance liée à la surexpression de Mcl-1).

Une fois déterminé le motif de la structure de l'ABT-199 responsable de l'activité inhibitrice de la protéine Bcl-2, des inhibiteurs duals hybrides Mcl-1/Bcl-2 pourront être conçus par la même approche décrite pour la conception d'inhibiteurs duals hybrides Mcl-1/Bcl- x_L (Schéma 72).

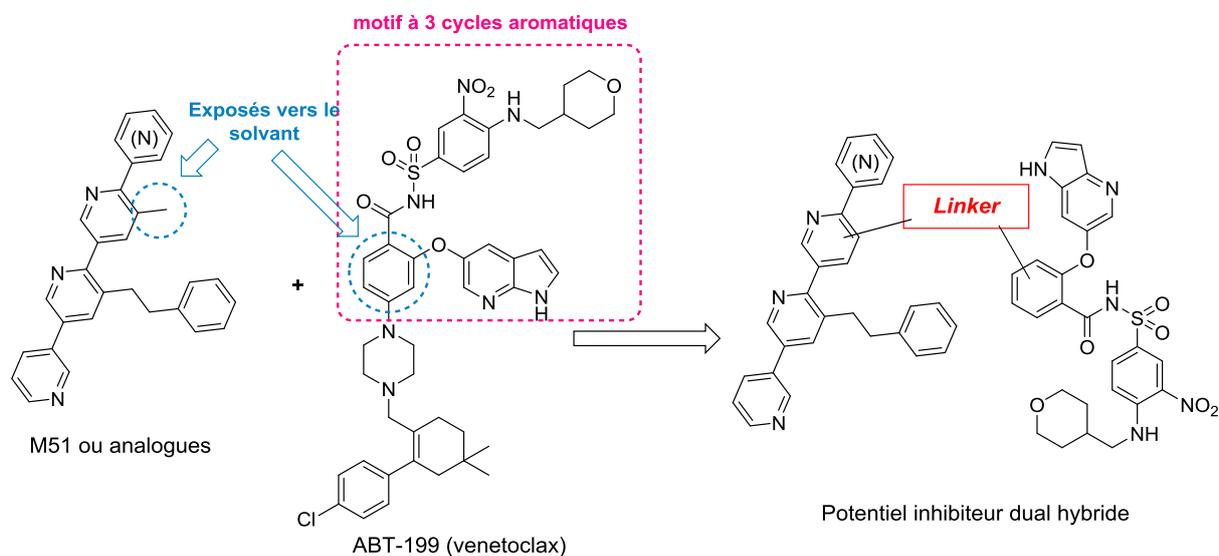


Schéma 71. Conception d'inhibiteurs duals hybrides Mcl-1/Bcl-2.

Concernant les travaux relatifs aux mimes du tétrapeptide AVPI de la protéine Smac, de nouvelles voies de synthèse, conçues à partir des travaux de Lubell et ses collaborateurs, ont permis la synthèse de 3 molécules. Une collaboration entre le CERMN et l'équipe du Pr Lubell à l'Université de Montréal a été initiée et aujourd'hui, des tests de polarisation de fluorescence de molécules mimes d'AVPI, sont en cours au CERMN. Les résultats obtenus permettront d'orienter de futures pharmacomodulations des composés décrits dans ce manuscrit afin d'en améliorer l'affinité pour le domaine BIR3 de la protéine XIAP. L'évaluation biologique cellulaire de ces composés, menée par l'équipe du Pr Nils Metzler-Nolte à l'Université de Ruhr en Allemagne, est actuellement réalisée et permettra ainsi de conforter les résultats issus des tests de FPA.

Finalement, 63 nouvelles molécules ont été conçues, synthétisées, caractérisées et évaluées biologiquement. Ces nouveaux composés viennent enrichir la chimiothèque du CERMN et pourront être utilisées dans des criblages sur d'autres cibles thérapeutiques. En outre, ces molécules, pour les unes mimes d'hélice α et pour les autres mimes de feuillet β , apportent une diversité structurale nouvelle à notre chimiothèque.

Partie expérimentale

Synthèse d'inhibiteurs de Mcl-1/Bcl-x_L

General Methods

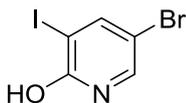
All solvents and chemicals were used as purchased unless stated otherwise. All NMR spectra were recorded on Bruker Avance III 400 MHz or Avance III HD 500 MHz spectrometers. Proton and carbon-13 NMR spectra are reported as chemical shifts (δ) in parts per million (ppm). Coupling constants (J) are reported 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 were recorded as neat compound using a Perkin Elmer FT-IR spectrometer. Absorptions are reported in wavenumbers (cm^{-1}) and only peaks of interest are reported. Melting points of solids were measured with a Griffin apparatus. 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. Chromatography was carried out using flash silica gel 60 Merck (0.063-0.200 mm) as the stationary phase. Flash chromatography were performed using a Biotage Isolera One flash chromatography. The eluting solvent, indicated for each purifications, was determined by thin layer chromatography (TLC) performed using Merck 0.2 mm precoated plates of silica gel with Kieselgel 60 F264. The products were visualized using UV fluorescence (254 nm).

General synthetic procedures

- **Synthetic procedure for halogen-halogen exchange reaction (A):** To a solution of the appropriate chloro- or bromopyridine derivative in acetonitrile (0.2 M), NaI (2.5 equiv) and acetyl chloride (1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 4 h, following by TLC. Procedure was repeated until reaction complete. The mixture was cooled to room temperature and the reaction was carefully quenched by addition of saturated NaHCO_3 aqueous solution until pH 8, and then extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated NaHSO_3 aqueous solution. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a crude residue which was used in the next reaction without further purification.

- **Synthetic procedure for Suzuki-Miyaura coupling (B):** To a reaction vessel containing a solution of the appropriate bromo- or iodopyridine derivative in 1,4-dioxane (0.2 M) under nitrogen atmosphere, the boronic acid reactant (1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (5 mol%) and saturated K_3PO_4 aqueous solution (2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 2-48 h, followed by TLC. The mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted in ethyl acetate. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography as reported.

Intermédiaires



Chemical Formula: C₅H₃BrINO

Molecular Weight: 299.89 g/mol

Melting Point: 63 °C

5-Bromo-3-iodopyridin-2-ol 1. To a round bottom flask containing 5-Bromopyridin-2-ol (5.0 g, 28.7 mmol) in acetonitrile (120 mL), *N*-iodosuccinimide (7.1 g, 31.6 mmol, 1.1 equiv) was added. The solution was refluxed for 4 h, following the reaction by TLC. The suspension was cooled to room temperature and the solid was filtered and washed with MeOH to afford 7.1 g of **1** as a pink solid (83% yield).

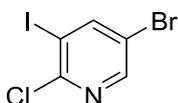
IR (KBr disc): 3490, 1630, 1607, 1522, 1457, 1309, 863, 683, 628 cm⁻¹.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.14 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.20 (br s, 1H, OH).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.5, 146.8, 145.9, 100.7, 92.9.

MS (ESI+): *m/z* 300.25 [M + H⁺], 302.26 [M⁺ + 2].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₅H₂BrClIN

Molecular Weight: 318.34 g/mol

Melting Point: 67 °C

5-Bromo-2-chloro-3-iodopyridine 2. 5-Bromo-3-iodopyridin-2-ol **1** (9.0 g, 30.0 mmol) was dissolved in phenylphosphonic dichloride 90% (100 mL). The mixture was stirred and heated at 160 °C for 4 h, followed by TLC. The mixture was cooled down to room temperature and quenched by slow addition into a 1 L flask filled with ice and ammonia 28% (200 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate, the organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 9/1) to afford 7.8 g of **2** as a white solid (82% yield).

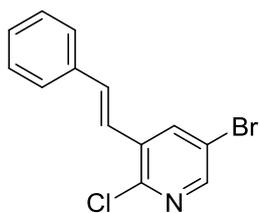
IR (KBr disc): 3081, 3038, 1525, 1391, 1352, 1136, 1012, 890, 711, 515 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.40 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 153.2, 150.2, 149.6, 118.4, 95.3.

MS (ESI+): *m/z* 318.17 [M + H⁺], 320.14 [M⁺ + 2], 322.15 [M⁺ + 4].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₁₃H₉BrClN

Molecular Weight: 294.58 g/mol

Melting Point: 104 °C

(E)-5-Bromo-2-chloro-3-styrylpyridine 3. To a reaction vessel containing 5-bromo-2-chloro-3-iodopyridine **2** (13.0 g, 40.8 mmol) in *n*-butanol (300 mL) under nitrogen

atmosphere, (*E*)-styrylboronic acid (9.0 g, 61.2 mmol, 1.5 equiv), Pd(dppf)Cl₂-DCM (166 mg, 0.21 mmol, 0.5 mol%) and K₂CO₃ (11.3 g, 81.6 mmol, 2.0 equiv) were added. The mixture was stirred at reflux overnight. The mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and then, concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1, then 98/2) to afford 9.6 g of **3** as a white solid (80% yield).

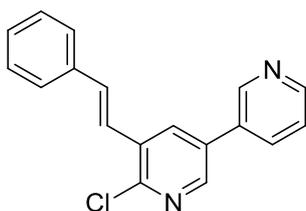
IR (KBr disc): 3036, 1627, 1530, 1494, 1447, 1389, 1152, 1116, 1063, 956, 897, 755, 719, 687, 491 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38–7.34 (m, 1H, H_{Ar}), 7.27 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.12 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 148.6, 148.5, 136.7, 135.9, 134.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.7, 129.1, 128.9 (2 C_{Ar}H), 127.1 (2 C_{Ar}H), 121.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 119.3.

MS (ESI+): *m/z* 294.33 [M + H⁺], 296.30 [M⁺ + 2], 298.30 [M⁺ + 4].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₁₈H₁₃ClN₂

Molecular Weight: 292.77 g/mol

Melting Point: 159 °C

(E)-6-Chloro-5-styryl-3,3'-bipyridine 4. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **3** (3.8 g, 12.7 mmol) in

1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (1.7 g, 14.0 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (734 mg, 0.64 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (6.7 g, 31.8 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 4/1 to 1/1) to afford 3.0 g of **4** as a white solid (80% yield).

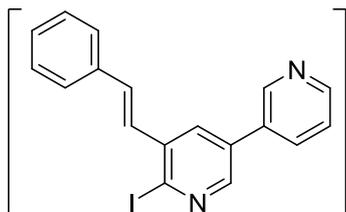
IR (KBr disc): 3045, 3019, 2924, 2853, 1638, 1578, 1446, 1427, 1385, 1166, 1087, 1057, 1023, 951, 921, 804, 729, 714, 687 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.61–7.59 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49–7.41 (m, 4H, H_{Pyr}, 3 H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.38–7.34 (m, 1H, H_{Ar}), 7.21 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.0, 149.5, 147.9, 146.1, 136.2, 136.1, 134.7, 134.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9, 132.9, 132.5, 132.3, 128.9 (2 C_{Ar}H), 127.1 (2 C_{Ar}H), 123.9, 122.7 (Ar-CH=CH-Pyr).

MS (ESI+): *m/z* 293.35 [M + H⁺], 295.34 [M⁺ + 2].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₁₈H₁₃IN₂

Molecular Weight: 384.22 g/mol

Melting Point: 160 °C²¹⁶

(E)-6-Iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine 5. Following *procedure A*, to a solution of (*E*)-6-chloro-5-styryl-3,3'-bipyridine **4** (3.5 g, 12.1 mmol) in acetonitrile, NaI (4.5 g, 4.8 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.4 g, 18.1 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 16 h, affording 4.3 g of crude residue (80% of **5**, by ¹H-NMR) as a yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

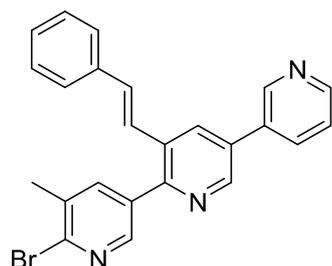
IR (KBr disc): 3079, 3045, 3023, 2924, 1634, 1574, 1544, 1495, 1453, 1420, 1381, 1163, 1087, 1060, 1023, 959, 914, 805, 729, 712, 680 cm⁻¹.²¹⁶

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.89 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.93 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.61–7.59 (m, 2H, H_{Ar}), 7.48–7.41 (m, 3 H, 2H_{Ar}, Pyr-H), 7.38–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.1, 148.0, 144.8, 140.7, 135.4, 135.2, 134.1, 133.4, 133.2, 132.9, 128.7 (2 C_{Ar}H), 128.0, 127.4, 126.4 (2 C_{Ar}H), 124.0, 115.9.

MS (ESI+): *m/z* 385.41 [M + H⁺], 386.40 [M⁺ + 1].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₂₄H₁₈BrN₃

Molecular Weight: 428.33 g/mol

Melting Point: 149 °C

(E)-6-Bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine 6. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-iodo-5-styryl-3,3'-bipyridine **5** (1.5 g, 3.9 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (930 mg, 4.3 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (225 mg, 0.19 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (2.0 g, 9.8 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 95/5 to 4/1) to afford 751 mg of **6** as a yellow solid (45% yield).

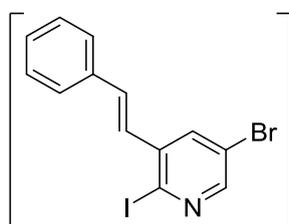
IR (KBr disc): 3039, 1588, 1557, 1490, 1438, 1379, 1190, 1120, 1053, 1023, 970, 907, 804, 746, 708, 721, 686, 540 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (dd, *J* = 2.4, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.50 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.92 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.50–7.44 (m, 3H, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.40–7.29 (m, 3H, H_{Ar}), 7.22 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 152.8, 149.8, 148.4, 148.1, 147.0, 145.0, 139.9, 136.4, 135.3, 134.7, 134.6, 133.5, 133.2, 133.1, 132.8, 132.2, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.8, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.5, 124.0, 22.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 428.24 [M + H⁺], 430.29 [M⁺ + 2].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₁₃H₉BrIN

Molecular Weight: 386.03 g/mol

Melting Point: 78 °C²¹⁶

(E)-5-Bromo-2-iodo-3-styrylpyridine 7. Following *procedure A*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-2-chloro-3-styrylpyridine **3** (4.8 g, 16.3 mmol) in acetonitrile, NaI (6.1 g, 40.8 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (2.0 g, 24.5 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 12 h, affording 5.22 g of crude residue (80% of **7**, by $^1\text{H-NMR}$) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

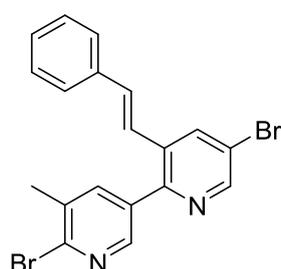
IR (KBr disc): 3054, 3023, 1629, 1492, 1446, 1377, 1269, 1109, 1026, 952, 889, 751 cm^{-1} .²¹⁶

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.29 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.83 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.09 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, Ar-CH=CH-Pyr), 6.94 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 149.6, 139.6, 135.9, 135.1, 134.7, 129.0, 128.9 (2 C_{ArH}), 128.1, 127.1 (2 C_{ArH}), 121.1, 120.8.

MS (ESI+): m/z 386.31 [$\text{M} + \text{H}^+$], 388.24 [$\text{M}^+ + 2$].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_2$

Molecular Weight: 430.14 g/mol

Melting Point: 143 $^\circ\text{C}$

(E)-5,6'-Dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine 8. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-2-iodo-3-styrylpyridine **7** (3.0 g, 7.7 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (1.8 g, 8.4 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (445 mg, 0.38 mmol, 5 mol%) and K_3PO_4 (4.1 g, 19.3 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1 to 95/5) to afford 1.8 g of **8** as a yellow solid (55% yield).

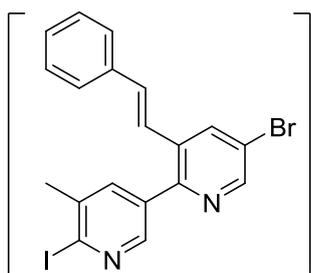
IR (KBr disc): 3031, 1393, 1111, 1050, 968, 898, 740, 685, 499 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.65 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.41 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.17 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.83 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.36 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.12 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.99 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.46 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 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 C_{ArH}), 128.8, 126.9 (2 C_{ArH}), 123.4, 120.4, 22.0 (CH_3).

MS (ESI+): m/z 431.51 [$\text{M} + \text{H}^+$], 433.53 [$\text{M}^+ + 2$].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₁₉H₁₄BrIN₂
Molecular Weight: 477.14 g/mol
Melting Point: 147 °C²¹⁶

(E)-5-Bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine 9. Following *procedure A*, to a solution of (*E*)-5,6'-dibromo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **8** (3.8 g, 8.9 mmol) in acetonitrile, NaI (3.3 g, 22.3 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.0 g, 13.4 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed

for 8 h, affording 4.0 g of crude residue (90% of **9**, by ¹H-NMR) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

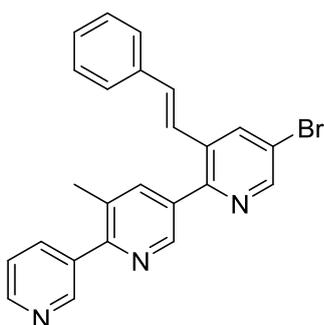
IR (KBr disc): 3029, 1576, 1449, 1428, 1389, 1112, 1089, 968, 900, 686, 498 cm⁻¹.²¹⁶

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.73 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.34–7.30 (m, 1H, H_{Ar}), 7.14 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.98 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (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 C_{Ar}H), 128.8, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.6, 123.4, 120.4, 26.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 477.48 [M + H⁺], 479.54 [M⁺ + 2].

Data are consistent with that reported in the literature.²¹⁶



Chemical Formula: C₂₄H₁₈BrN₃
Molecular Weight: 428.33 g/mol
Melting Point: 136-138 °C

(E)-5-Bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine 10. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **9** (2.0 g, 4.2 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (570 mg, 4.6 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (243 mg, 0.2 mmol, 5 mol%) and

K₃PO₄ (2.3 g, 10.5 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 3 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 8/2 to 1/1) to afford 1.1 g of **10** as an off-white solid (60% yield).

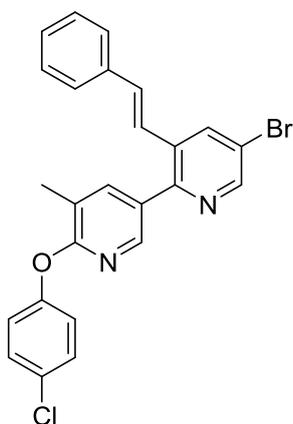
IR (KBr disc): 3032, 2917, 1635, 1414, 1384, 1118, 950, 740, 541 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.78 (dd, *J* = 2.1, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.21 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.45 (m, 3H, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.38–7.28 (m, 3H, H_{Ar}), 7.16 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.5, 152.4, 149.9, 149.6, 149.3, 148.1, 139.9, 136.9, 136.6, 136.3, 133.9, 133.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.6, 132.3, 131.4, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.9, 127.1 (2 C_{Ar}H), 123.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.5, 120.4, 20.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 428.74 [M + H⁺], 430.62 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 428.0762 ; Found: 428.0772.



Chemical Formula: C₂₅H₁₈BrClN₂O
Molecular Weight: 477.79 g/mol
Melting Point: 130-131 °C

(E)-6-(4-Chlorophenoxy)-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine 11. To a sealed tube containing (*E*)-5-bromo-6'-iodo-5'-methyl-3-styryl-2,3'-bipyridine **9**

(200 mg, 0.42 mmol) in DMF (4 mL), 4-chlorophenol (54 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv), Cu(0) powder (3 mg, 0.042 mmol, 10 mol%) and Cs₂CO₃ (410 mg, 1.3 mmol, 3.0 equiv) were added under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 4 h, followed by TLC. The reaction was quenched adding NaOH 4% (10 mL) and DCM (10 mL). The organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (c-hexane/ethyl acetate 95/5) to afford 175 mg of **11** as a white solid (87% yield).

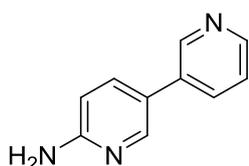
IR (KBr disc): 2930, 1577, 1489, 1403, 1244, 1204, 1088, 746 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.65 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.21–8.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.88 (dd, *J* = 2.4, 1.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.43–7.39 (m, 2H, H_{Ar}), 7.38–7.36 (m, 2H, H_{Ar}), 7.35 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.15–7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 7.09 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.04 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 161.8, 152.6, 152.6, 149.3, 145.5, 141.1, 136.5, 136.3, 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.2, 130.2, 129.9, 129.6 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.7, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 122.8 (2 C_{Ar}H), 121.8, 119.8, 16.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 477.54 [M + H⁺], 479.54 [M⁺ + 2], 481.56 [M⁺ + 4].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 477.0369 ; Found: 477.0369.



Chemical Formula: C₁₀H₉N₃

Molecular Weight: 171.20 g/mol

Melting Point: 82-84 °C

[3,3'-Bipyridin]-6-amine 12. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing 5-bromopyridin-2-amine (100 mg, 0.58 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (78 mg, 0.64 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (34 mg, 0.029 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (308 mg, 1.5 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 73 mg of **12** as an off-white solid (73% yield).

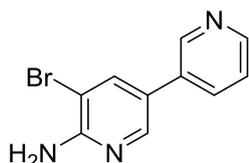
IR (KBr disc): 3340, 3172, 1657, 1607, 1583, 1516, 1475, 1427, 1386, 851, 743 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.80 (dd, *J* = 2.5, 0.9 Hz, 1H), 8.46 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 2.5, 0.9 Hz, 1H), 7.97 (ddd, *J* = 7.9, 2.5, 1.6 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.41 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 6.18 (br s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 159.6, 147.3, 146.4, 146.1, 135.4, 133.7, 132.6, 123.8, 120.6, 108.1.

MS (ESI+): *m/z* 172.38 [M + H⁺].

Data are consistent with that reported in the literature.²⁴⁷



Chemical Formula: C₁₀H₈BrN₃

Molecular Weight: 250.10 g/mol

Melting Point: 170 °C

5-Bromo-[3,3'-bipyridin]-6-amine 13. To a reaction vessel containing [3,3'-bipyridin]-6-amine **12** (9.0 g, 52.6 mmol) in acetic acid (150 mL), Na₂CO₃ (5.6 g, 52.6 mmol, 1 equiv) and then Br₂ (10.1 g, 63.1 mmol, 1.2 equiv) were slowly added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h, followed by TLC. Water was added (150 mL) and the solution was basified with NaOH 4 N aqueous solution

²⁴⁷ Tardia, P.; Stefanachi, A.; Niso, M.; Stolfi, 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.

to pH 8 then $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was added. The product was extracted with ethyl acetate. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 11.8 g of **13** as a white solid (90% yield).

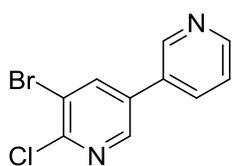
IR (KBr disc): 3309, 3151, 1658, 1597, 1503, 1430, 1470, 1253, 1045, 711 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.85 (dd, $J = 2.4, 0.9$ Hz, 1H), 8.50 (dd, $J = 4.7, 1.6$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.03 (ddd, $J = 8.0, 2.5, 1.6$ Hz, 1H), 7.42 (ddd, $J = 8.0, 4.8, 0.9$ Hz, 1H), 6.48 (br s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 156.1, 147.9, 146.8, 145.2, 138.1, 133.0, 132.1, 123.8, 122.7, 103.5.

MS (ESI+): m/z 250.34 [$\text{M}^+ + \text{H}$], 253.29 [$\text{M}^+ + 2$].

HRMS (ESI): m/z Calcd. for [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 249.9980 ; Found: 249.9972.



Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{BrClN}_2$

Molecular Weight: 269.53 g/mol

Melting Point: 180-182 $^\circ\text{C}$

5-Bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine 14. To a reaction vessel containing 5-bromo-[3,3'-bipyridin]-6-amine **13** (2.0 g, 8.0 mmol) in HCl 12 N (30 mL), NaNO_2 (1.0 g, 24.0 mmol, 3.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 3 h, followed by TLC. The reaction was quenched by adding water (90 mL) and NaOH 4 N to pH 9 leading to the precipitation of a white solid. The resulting precipitate was filtrated and washed with Et_2O affording 2.4 g of pure **14** as a white solid (quantitative yield).

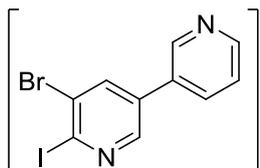
IR (KBr disc): 3015, 2923, 1421, 1366, 1342, 1161, 1153, 1012, 805, 711 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.70 (dd, $J = 4.9, 1.6$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.86 (ddd, $J = 7.9, 2.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.44 (ddd, $J = 8.0, 4.8, 0.8$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 150.6, 150.3, 148.1, 146.1, 140.5, 134.6, 134.0, 131.2, 124.1, 120.8.

MS (ESI+): m/z 269.29 [$\text{M} + \text{H}^+$], 271.30 [$\text{M}^+ + 2$], 273.32 [$\text{M}^+ + 4$].

HRMS (ESI): on going.



Chemical Formula: C₁₀H₆BrIN₂

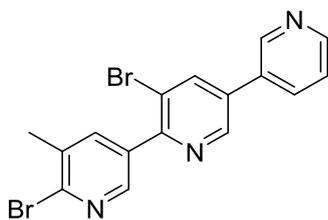
Molecular Weight: 360.98 g/mol

5-Bromo-6-iodo-3,3'-bipyridine 15. Following *procedure A*, to a solution of 5-bromo-6-iodo-3,3'-bipyridine **14** (3.3 g, 12.3 mmol) in acetonitrile, NaI (4.62 g, 30.8 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.5 g, 18.5 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 8 h, affording 4.5 g of crude residue (82% of **15**, by ¹H-NMR) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.65 (dd, *J* = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.21 (dt, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.53 (ddd, *J* = 7.9, 4.7, 0.9 Hz, 1H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 149.8, 147.9, 147.0, 137.9, 134.6, 133.5, 130.4, 129.5, 124.2, 123.9.

MS (ESI+): *m/z* 361.20 [M + H⁺], 363.20 [M⁺ + 2].



Chemical Formula: C₁₆H₁₁Br₂N₃

Molecular Weight: 405.09 g/mol

Melting Point: 206-208 °C

3',6-Dibromo-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine 16. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing 5-bromo-6-iodo-3,3'-bipyridine **15** (4 g, 11.1 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (2.6 g, 12.2 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (641 mg, 0.56 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (5.9 g, 1.5 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1 to 7/3) to afford 1 g of **16** as a white solid (22% yield).

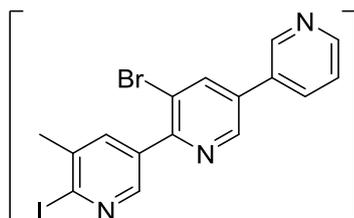
IR (KBr disc): 3437, 3034, 3012, 2924, 1558, 1451, 1408, 1390, 1366, 1103, 1052, 1003, 909, 801, 709, 678 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 3.7, 0.8 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.95–7.87 (m, 2H), 7.46 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 2.49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 153.6, 150.3, 148.3, 147.9, 146.8, 145.2, 145.1, 139.8, 139.6, 134.9, 134.6, 134.4, 134.2, 131.6, 124.1, 22.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 404.32 [M + H⁺], 406.29 [M⁺ + 2], 408.31 [M⁺ + 4].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 403.9398 ; Found: 403.9401.



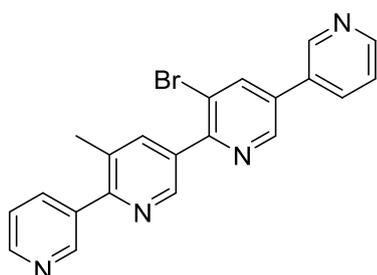
Chemical Formula: C₁₆H₁₁BrIN₃

Molecular Weight: 452.09 g/mol

3'-Bromo-6-iodo-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine 17. Following *procedure A*, to a solution of 3',6-dibromo-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine **16** (1.0 g, 2.5 mmol) in acetonitrile, NaI (926 mg, 6.3 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (314 mg, 4.0 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 16 h, affording 1.4 g of crude residue (75% of **17**, by ¹H-NMR) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.89 (dt, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H), 8.86 (m, 1H), 8.72 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.61 (dd, *J* = 2.4, 0.4 Hz, 1H), 8.22 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.95–7.90 (m, 1H), 7.82 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H), 7.47 (ddt, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 2.49 (s, 3H, CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 454.27 [M + H⁺], 455.26 [M + 2H⁺].



Chemical Formula: C₂₁H₁₅BrN₄

Molecular Weight: 403.28 g/mol

Melting Point: 164–166 °C

3''-Bromo-3'-methyl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine 18. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing 3'-bromo-6-iodo-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine **17** (1 g, 2.2 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (pyridin-3-yl)boronic acid (300 mg, 2.4 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (128 mg, 0.1 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (1.1 g, 5.5 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 9/1) to afford 500 mg of **18** as a pale yellow solid (55% yield).

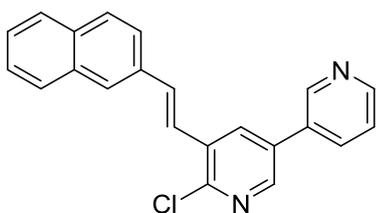
IR (KBr disc): 3432, 3034, 2960, 2927, 1587, 1572, 1450, 1427, 1414, 1363, 809, 770, 708 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.99 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.93–8.85 (m, 3H), 8.71 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.67 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 7.95 (ddt, *J* = 10.0, 7.9, 1.7 Hz, 2H), 7.45 (dddd, *J* = 13.6, 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.7, 154.3, 150.2, 150.0, 149.4, 148.3, 147.9, 146.7, 139.7, 139.6, 136.7, 135.9, 134.6, 134.2, 133.9, 131.6, 130.8, 124.1, 123.3, 120.3, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 403.42 [M + H⁺], 405.44 [M⁺ + 2], 406.44 [M⁺ + 3].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 403.0558 ; Found: 403.0563.



Chemical Formula: C₂₂H₁₅ClN₂

Molecular Weight: 342.83 g/mol

Melting Point: 195-198 °C

(E)-6-Chloro-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine 19a. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (1.0 g, 3.7

mmol) in DMF (20 mL) under nitrogen atmosphere, 2-vinylnaphthalene (710 mg, 4.6 mmol, 1.25 equiv), Pd(OAc)₂ (83 mg, 0.37 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (74 mg, 0.74 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (1.0 g, 7.4 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 7 h, followed by TLC. After cooling, the mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with DCM and the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by chromatographic column (ethyl acetate/MeOH 95/5) affording 977 mg of **19a** as a yellow solid (77% yield).

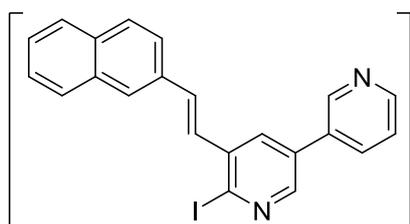
IR (KBr disc): 3055, 1627, 1451, 1382, 1058, 963, 819, 757, 474 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97–7.93 (m, 2H, H_{Pyr}, H_{Ar}), 7.94 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 3H, H_{Ar}), 7.80 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.57 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.52–7.49 (m, 2H, H_{Ar}), 7.46 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.37 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.1, 149.9, 148.3, 146.3, 134.6, 134.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.8, 133.7, 133.6, 133.2, 133.0, 132.6, 132.5, 128.8, 128.4, 128.0, 127.9, 126.9, 126.8, 124.0, 123.5, 123.0 (Ar-CH=CH-Pyr).

MS (ESI+): *m/z* 343.49 [M + H⁺], 345.45 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for C₂₂H₁₅ClN₂ [M+H]⁺: 343.1002; Found: 343.1004.



Chemical Formula: C₂₂H₁₅I N₂

Molecular Weight: 434.28 g/mol

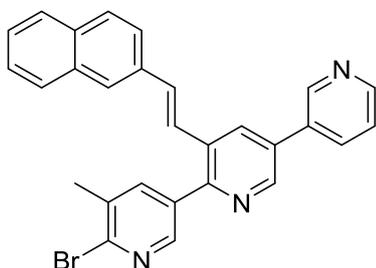
(E)-6-Iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine 20a. Into a 30 mL microwave sealed tube containing (E)-6-chloro-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **19a** (700 mg, 2.0 mmol) in acetonitrile (20 mL), NaI (3.6 g, 20.0 mmol, 10 equiv) and acetyl chloride (393 mg, 5.0

mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was microwave-irradiated at 100 °C for 2 h. The reaction was quenched by addition of saturated NaHCO₃ aqueous solution until pH 8 and transferred into a separating funnel. The solution was extracted with ethyl acetate and washed with saturated NaHSO₃ aqueous solution. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give 790 mg of crude residue as yellow solid (75% of **20a**, by ¹H-NMR) which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.93 (ddd, *J* = 7.7, 2.4, 1.5 Hz, 2H, H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.90–7.78 (m, 4H, H_{Pyr}, 3 H_{Ar}), 7.53–7.49 (m, 2H, H_{Ar}), 7.48–7.45 (m, 1H, H_{Ar}), 7.39 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.26 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.8, 148.1, 147.1, 138.4, 134.5, 134.3, 133.6, 133.55, 133.53, 133.4, 132.4, 131.1, 129.3, 128.7, 128.2, 127.9, 127.8, 126.7, 126.6, 123.9, 123.40, 123.38.

MS (ESI+): *m/z* 435.42 [M + H⁺], 437.47 [M⁺ + 2].



Chemical Formula: C₂₈H₂₀BrN₃

Molecular Weight: 478.39 g/mol

Melting Point: 158-160 °C

(E)-6-Bromo-5-methyl-3'-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,2':5',3''-terpyridine 21a. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (E)-6-iodo-5-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,3'-bipyridine **20a** (790 mg, 1.8 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (490 mg, 2.3 mmol, 1.25 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (210 mg, 0.18 mmol, 10 mol%) and K₃PO₄ (966 mg, 4.5 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 3 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (c-hexane/ethyl acetate 7/3 to 4/6) to afford 320 mg of **21a** as a white solid (40% yield).

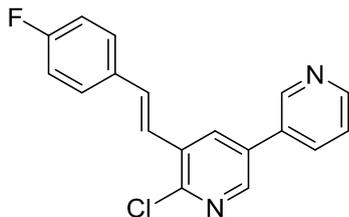
IR (KBr disc): 3049, 2917, 1585, 1382, 1052, 806, 730, 708 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.54 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.02 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.87–7.81 (m, 4H, H_{Ar}), 7.62 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53–7.47 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.39 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.26 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 158.5, 149.8, 149.0, 148.4, 148.1, 147.1, 145.1, 135.0, 135.4, 134.7, 133.9, 133.65, 133.61, 133.56, 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.1, 132.8, 132.2, 128.8, 128.3, 127.9, 127.7, 126.7, 126.6, 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 123.4, 22.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 478.49 [M + H⁺], 480.49 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 478.0919 ; Found: 478.0919.



Chemical Formula: C₁₈H₁₂ClFN₂

Molecular Weight: 310.76 g/mol

Melting Point: 176-178 °C

(E)-6-Chloro-5-(4-fluorostyryl)-3,3'-bipyridine 19b. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (700 mg, 2.6 mmol) in DMF (12 mL) under nitrogen atmosphere, 1-fluoro-4-vinylbenzene (397 mg, 3.2 mmol, 1.25 equiv), Pd(OAc)₂ (58 mg, 0.26 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (52 mg, 0.52 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (718 mg, 5.2 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 18 h, followed by TLC. The mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with DCM and the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) affording 600 mg of **19b** as an off-white solid (75% yield).

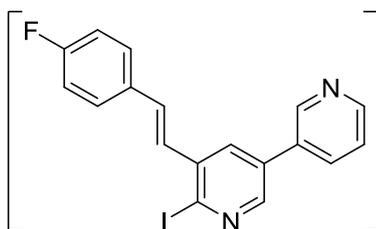
IR (KBr disc): 3042, 1605, 1510, 1424, 1237, 812 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.50 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.12 (dd, *J* = 2.4, 0.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.92 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.59–7.53 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.36 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14–7.07 (m, 2H, H_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.0, 149.9, 148.3, 146.3, 134.6, 133.2, 133.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9, 132.54, 132.52, 132.3, 128.9, 128.8, 124.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 122.7, 122.6, 116.2, 116.0.

MS (ESI+): *m/z* 311.45 [M + H⁺], 313.42 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 311.0751 ; Found: 311.0750.



Chemical Formula: C₁₈H₁₂FIN₂

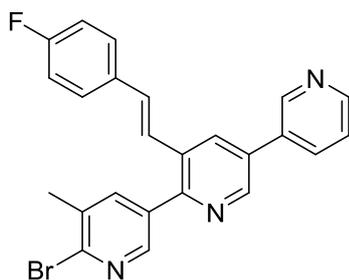
Molecular Weight: 402.21 g/mol

(E)-5-(4-Fluorostyryl)-6-iodo-3,3'-bipyridine 20b. Following *procedure A*, to reaction vessel containing (*E*)-6-chloro-5-(4-fluorostyryl)-3,3'-bipyridine **19b** (600 mg, 1.9 mmol) in acetonitrile, NaI (730 mg, 4.7 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (223 mg, 2.8 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h, affording 600 mg of crude residue (80% of **20b**, by $^1\text{H-NMR}$) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.87 (dd, $J = 2.4, 0.8$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, $J = 4.9, 1.6$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.92 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.59–7.54 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, $J = 7.9, 4.9, 0.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.19 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14–7.08 (m, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 149.9, 148.3, 148.2, 147.3, 138.4, 134.5, 133.6, 133.0, 132.5, 132.4, 131.2, 129.02, 129.00, 128.9, 128.8, 124.0, 116.2, 116.0.

MS (ESI+): m/z 403.48 [$\text{M} + \text{H}^+$], 404.50 [$\text{M}^+ + 1$].



Chemical Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{BrFN}_3$

Molecular Weight: 446.32 g/mol

(E)-6-Bromo-3'-(4-fluorostyryl)-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine 21b.

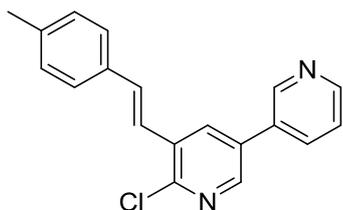
Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-(4-fluorostyryl)-6-iodo-3,3'-bipyridine **20b** (600 mg, 1.5 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (354 mg, 1.6 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)

(86 mg, 0.075 mmol, 5 mol%) and K_3PO_4 (790 mg, 3.7 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford 420 mg of **21b** as a yellow solid (63% yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.95 (dd, $J = 2.4, 0.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.83 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.48 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.18 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, $J = 7.9, 2.5, 1.7$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.93 (dd, $J = 2.4, 0.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.47 (ddd, $J = 7.9, 4.9, 0.9$ Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.45–7.40 (m, 2H, H_{Ar}), 7.17 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.09–7.02 (m, 3H, 2 H_{Ar} , Ar-CH=CH-Pyr), 2.49 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 164.2, 161.7, 152.7, 149.8, 148.4, 148.0, 147.1, 145.0, 139.9, 135.4, 134.6, 133.2, 133.0, 132.7, 132.6, 132.2, 132.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.6, 128.5, 124.3, 124.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 116.1, 115.9, 22.2 (CH_3).

MS (ESI+): m/z 446.55 [$\text{M} + \text{H}^+$], 448.55 [$\text{M}^+ + 2$].



Chemical Formula: C₁₉H₁₅ClN₂

Molecular Weight: 306.79 g/mol

Melting Point: 165 °C

(E)-6-Chloro-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine 19c. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (200 mg, 0.74 mmol) in DMF (3 mL) under nitrogen atmosphere, 1-methyl-4-vinylbenzene (109 mg, 0.93 mmol, 1.25 equiv), Pd(OAc)₂ (17 mg, 0.074 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (16 mg, 0.148 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (204 mg, 1.48 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 2 h, followed by TLC. After cooling, the mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with DCM and the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1 to 6/4) affording 194 mg of **19c** as a pale yellow solid (85% yield).

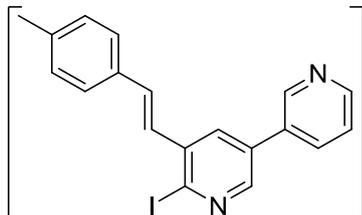
IR (KBr disc): 3429, 3048, 2921, 1627, 1513, 1423, 1389, 1161, 1088, 1061, 971, 797, 712 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 8.49 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 8.14 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 7.93 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.9 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H_{Ar}), 7.46 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.7 Hz, 1 H, H_{Pyr}), 7.41 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H_{Ar}), 7.18 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.40 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.8, 149.7, 148.2, 145.9, 139.0, 134.4, 133.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.4, 133.0, 132.7, 132.52, 132.54, 129.6 (2 C_{Ar}H), 127.0 (2 C_{Ar}H), 123.8, 121.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 21.4 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 307.41 [M + H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for C₁₉H₁₅ClN₂ [M+H]⁺: 307.1002; Found: 307.1012.



Chemical Formula: C₁₉H₁₅IN₂

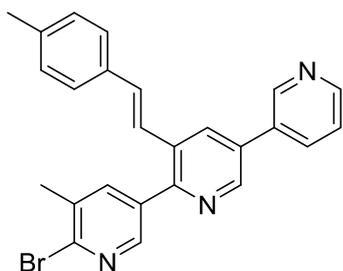
Molecular Weight: 398.25 g/mol

(E)-6-Iodo-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine 20c. Following *procedure A*, to reaction vessel containing (E)-6-chloro-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine **19c** (500 mg, 1.6 mmol) in acetonitrile, NaI (613 g, 4.0 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (191 mg, 12.4 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h, affording 620 mg of crude residue (85% of **20c**, by ¹H-NMR) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95–7.89 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.51–7.42 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.22 (m, 3H, Ar-CH=CH-Pyr, 2 H_{Ar}), 7.07 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.39 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.8, 148.1, 147.0, 139.1, 138.6, 134.5, 134.2, 133.5, 133.4, 132.5, 131.1, 129.7 (2 C_{Ar}H), 128.1, 127.1 (2 C_{Ar}H), 124.0, 123.4, 21.5.

MS (ESI+): *m/z* 399.44 [M + H⁺], 400.60 [M + 2H⁺].



Chemical Formula: C₂₅H₂₀BrN₃

Molecular Weight: 442.36 g/mol

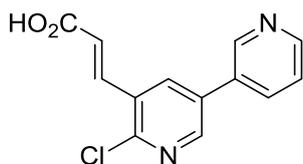
(E)-6-Bromo-5-methyl-3'-(4-methylstyryl)-3,2':5',3''-terpyridine 21c.

Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-iodo-5-(4-methylstyryl)-3,3'-bipyridine **20c** (397 mg, 0.76 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (180 mg, 0.84 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (44 mg, 0.038 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (403 mg, 1.9 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 6 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford 134 mg of **21c** as a yellow solid (40% yield).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.74 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.50 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.91 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.52–7.43 (m, 1H, H_{Pyr}), 7.37–7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 7.22–7.15 (m, 3H, Ar-CH=CH-Pyr, 2 H_{Ar}), 7.09 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃-Pyr), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 152.6, 149.7, 148.3, 148.1, 146.8, 144.9, 139.9, 138.9, 135.2, 134.7, 134.6, 133.6, 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.2, 132.7, 132.3, 129.7 (2 C_{Ar}H), 129.7, 126.9, 126.8 (2 C_{Ar}H), 123.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 22.2 (CH₃), 21.4 (CH₃-Pyr).

MS (ESI+): *m/z* 442.45 [M + H⁺], 443.25 [M + 2H⁺].



Chemical Formula: C₁₃H₉ClN₂O₂

Molecular Weight: 260.68 g/mol

Melting Point: > 250 °C

(E)-3-(6-Chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)acrylic acid 22. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (200 mg, 0.74 mmol) in DMF (3 mL) under nitrogen atmosphere, acide acrilique (40 mg, 0.55 mmol, 0.75 equiv), Pd(OAc)₂ (19 mg, 0.074 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (14 mg, 0.148 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (204 mg, 1.48 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 6 h, followed by TLC. After cooling, the mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with DCM and MeOH and the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH/NH₃ 8/1/1) affording 180 mg of **22** as a white solid (94% yield).

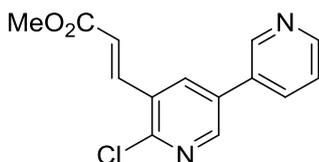
IR (KBr disc): 3435, 3180, 2924, 2869, 1633, 1400, 1113, 974, 805, 707 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.04 (dd, *J* = 2.5, 0.9 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.64 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.27 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.6 Hz, 1H), 7.53 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 6.81 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 206.6 (C=O carbonyl), 168.9, 149.5, 148.8, 148.0, 146.9, 134.7 (CH=CH-Pyr), 134.2, 132.7, 131.3 (CH=CH-Pyr), 130.9, 130.2, 123.9.

MS (ESI+): *m/z* 261.45 [M + H⁺], 263.43 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *on going*.



Chemical Formula: C₁₄H₁₁ClN₂O₂

Molecular Weight: 274.70 g/mol

Melting Point: 196-198 °C

Methyl (E)-3-(6-chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)acrylate 23. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (500 mg, 1.86 mmol) in DMF (10 mL) under nitrogen atmosphere, methyl acrylate (122 mg, 1.43 mmol, 0.75 equiv), Pd(OAc)₂ (41 mg, 0.19 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (38 mg, 0.38 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (525 mg, 3.8 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 18 h, followed by TLC. After cooling, the mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with ethyle acetate, the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) affording 458 mg of **23** as a white solid (88% yield).

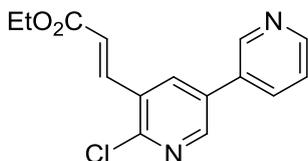
IR (KBr disc): 3433, 3050, 1716, 1630, 1422, 1383, 1328, 1288, 1272, 1031, 970, 706 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.07–8.01 (m, 2H, CH=CH-Pyr, Pyr-H), 7.88 (dt, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H), 7.45 (ddd, *J* = 8.0, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 3.85 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 166.2, 151.0, 150.1, 148.6, 148.2, 138.9 (CH=CH-Pyr), 134.5, 134.4, 133.3, 131.9, 129.8, 124.0, 123.3 (CH=CH-Pyr), 52.3 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 275.38 [M + H⁺], 276.50 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 275.0587 ; Found: 275.0586.



Chemical Formula: C₁₅H₁₃ClN₂O₂

Molecular Weight: 288.73 g/mol

Melting Point: 164-166 °C

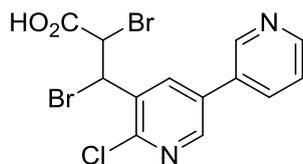
Ethyl (E)-3-(6-chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)acrylate 24. To a reaction vessel containing 5-bromo-6-chloro-3,3'-bipyridine **14** (500 mg, 1.86 mmol) in DMF (10 mL) under nitrogen atmosphere, ethyl acrylate (142 mg, 1.43 mmol, 0.75 equiv), Pd(OAc)₂ (41 mg, 0.19 mmol, 10 mol%), pentane-2,4-dione as ligand (38 mg, 0.38 mmol, 0.2 equiv) and K₂CO₃ (525 mg, 3.8 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 130 °C for 18 h, followed by TLC. After cooling, the mixture was filtered through a pad of Celite. The pad was washed with ethyle acetate, the organic layer was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) affording 427 mg of **24** as a white solid (78% yield).

IR (KBr disc): 3424, 3045, 1985, 1708, 1638, 1425, 1291, 1270, 1184, 1063, 981, 874, 805, 707 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.83 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H), 8.70 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.07 (dd, *J* = 2.5, 0.5 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 7.88 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H), 7.44 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.7, 162.6, 151.0, 150.1, 148.5, 148.1, 138.5 (CH=CH-Pyr), 134.5, 134.4, 131.8, 129.8, 124.0, 123.8 (CH=CH-Pyr), 61.2 (CH₂), 14.3 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 289.0744 ; Found: 289.0747.



Chemical Formula: C₁₃H₉Br₂ClN₂O₂

Molecular Weight: 420.49 g/mol

Melting Point: > 250 °C

2,3-Dibromo-3-(6-chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)propanoic acid 25. In a round bottom flask containing (*E*)-3-(6-chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)acrylic acid **22** (500 mg, 1.92 mmol) in chloroform (10 mL), Br₂ (368 mg, 2.30 mmol, 1.2 equiv) was added at 0 °C. The reaction was kept at this temperature for 30 minutes, then warmed to rt and stirred for 1 h, followed by TLC. The reaction was then kept in the fridge for 3 h leading to precipitation of a pink solid. The precipitate was filtrated, washed with chloroform and dried in the oven at 60 °C, affording 590 mg of **25** as an orange solid (73% yield).

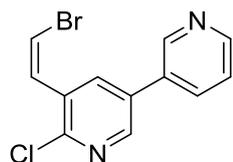
IR (KBr disc): 3447, 3067, 1723, 1638, 1551, 1431, 1268, 815, 762, 680 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9.25 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.83 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 1H), 5.85–5.69 (m, 2H, CHBr).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 168.7 (C=O carbonyl), 149.2, 148.5, 145.3, 143.8, 139.7, 137.1, 133.0, 132.4, 131.6, 125.8, 49.6 (CBr), 45.4 (CBr).

MS (ESI+): *m/z* 419.24 [M + H⁺], 421.39 [M⁺ + 2], 423.34 [M⁺ + 4].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 418.8798 ; Found: 418.8795.



Chemical Formula: C₁₂H₈BrClN₂

Molecular Weight: 295.96 g/mol

Melting Point: 132-134 °C

(Z)-5-(2-Bromovinyl)-6-chloro-3,3'-bipyridine 26. In a roundbottom-flask containing 2,3-dibromo-3-(6-chloro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)propanoic acid **25** (210 mg, 0.50 mmol) in DMF (2 mL), NEt₃ (10 mg, 0.10 mmol, 2.0 equiv) was added at 0 °C. The reaction was kept at this temperature for 30 minutes, then warmed to rt and stirred for 18 h, followed by TLC. The reaction is quenched with water and extracted with ethyl acetate. The organic layers were collected, washed with saturated Na₂CO₃ aqueous solution and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give 52 mg of **26** as an orange solid (35% yield).

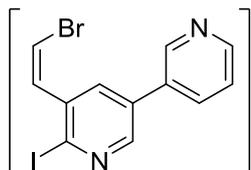
IR (KBr disc): 3433, 3047, 2920, 2856, 1618, 1548, 1406, 1378, 1328, 1084, 1060, 1022, 916, 802, 706 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.68 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.89 (dt, *J* = 7.9, 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.0, 149.9, 148.2, 146.9, 137.2, 134.5, 132.3, 132.2, 130.2, 128.1 (Br-CH=CH-Pyr), 124.1, 112.3 (Br-CH=CH-Pyr).

MS (ESI+): *m/z* 295.36 [M + H⁺], 297.38 [M⁺ + 2], 299.39 [M⁺ + 4].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 294.9638 ; Found: 294.9639.



Chemical Formula: C₁₂H₈BrIN₂

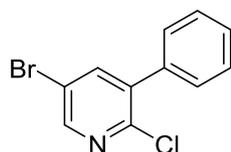
Molecular Weight: 387.02 g/mol

(Z)-5-(2-Bromovinyl)-6-iodo-3',3'-bipyridine 27. Into a 10 mL microwave sealed tube containing (Z)-5-(2-bromovinyl)-6-chloro-3',3'-bipyridine **26** (112 mg, 0.38 mmol) in acetonitrile, NaI (568 mg, 3.8 mmol, 10 equiv) and acetyl chloride (74 mg, 0.95

mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was irradiated at 100 °C for 1 h. The mixture was quenched by addition of saturated NaHCO₃ aqueous solution until pH 8 and transferred to a separating funnel. The solution was extracted with ethyl acetate and washed with saturated NaHSO₃ aqueous solution. The organic layers were collected, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give 100 mg of crude residue as yellow solid (70% of **27**, by ¹H-NMR) which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.85 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 2.5, 0.6 Hz, 1H), 7.89 (ddq, *J* = 6.8, 2.5, 1.4 Hz, 1H), 7.44 (dddd, *J* = 8.0, 4.8, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH=CH-Pyr), 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH=CH-Pyr).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.9, 148.1, 147.8, 136.9, 135.6, 134.5, 133.7, 132.7, 128.8, 124.0, 122.4, 112.2.



Chemical Formula: C₁₁H₇BrClN

Molecular Weight: 268.54 g/mol

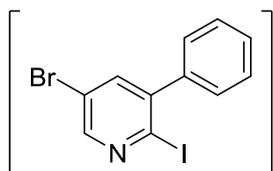
5-Bromo-2-chloro-3-phenylpyridine 28. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing 5-bromo-2-chloro-3-iodopyridine **2** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane

under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (31 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.011 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (121 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1 to 95/5) to afford 61 mg of **28** as a white solid (100% yield).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.82 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.47–7.43 (m, 4H, H_{Ar}), 7.39–7.34 (m, 1H, H_{Ar}).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 149.1, 141.8, 138.4, 136.2, 134.7, 129.2 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.5 (2 C_{Ar}H), 127.7.

MS (ESI+): *m/z* 266.95 [M + H⁺], 268.94 [M⁺ + 2], 270.94 [M⁺ + 4].



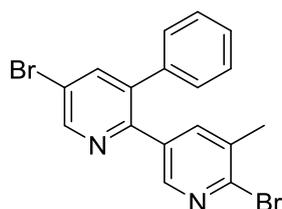
Chemical Formula: C₁₁H₇BrIN

Molecular Weight: 359.99 g/mol

5-Bromo-2-iodo-3-phenylpyridine 29. Following *precedure A*, to reaction vessel containing 5-bromo-2-chloro-3-phenylpyridine **28** (2.5 g, 9.3 mmol) in acetonitrile (50 mL) NaI (3.5 g, 23.3 mmol, 2.5 equiv) and acetyl chloride (1.1 g, 14.0 mmol, 1.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 12 h, affording 3.0 g of crude residue (80% of **29**, by ¹H-NMR) as yellow solid which was used in the next reaction without further purification.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.51–7.47 (m, 3H, H_{Ar}), 7.40–7.36 (m, 2H, H_{Ar}).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.0, 140.1, 139.2, 134.7, 131.2, 129.1 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.4 (2 C_{Ar}H), 127.7.



Chemical Formula: C₁₇H₁₂Br₂N₂

Molecular Weight: 404.11 g/mol

Melting Point: 106-108 °C

5,6'-Dibromo-5'-methyl-3-phenyl-2,3'-bipyridine 30. Into a 10 mL microwave sealed tube containing 5-bromo-2-iodo-3-phenylpyridine **29** (300 mg, 0.83 mmol) in 1,4-dioxane (5 mL) under nitrogen atmosphere, (6-bromo-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (180 mg, 0.83 mmol, 1.0 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (48 mg, 0.042 mmol, 5 mol%) and a K₃PO₄ saturated aqueous solution (440 mg, 2.08 mmol, 2.5 equiv) were added. The mixture was irradiated at 100 °C for 6 h. The resulting mixture was filtered through a pad of Celite and the pad was washed with ethyl acetate. The filtrate was concentrated under reduced pressure to obtain the crude residue which was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 99/1 to 95/5) affording 248 mg of **30** as a pale yellow solid (74% yield).

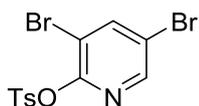
IR (KBr disc): 3442, 3037, 2921, 1587, 1555, 1447, 1421, 1393, 1114, 1049, 905, 785, 756, 700 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.74 (dd, *J* = 2.3, 1.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.89 (dd, *J* = 2.3, 1.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.62 (dd, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.37–7.31 (m, 3H, H_{Ar}), 7.19–7.13 (m, 2H, H_{Ar}), 2.31 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.3, 149.8, 148.1, 144.2, 141.1, 139.3, 138.0, 137.7, 134.7, 134.3, 129.3 (2 C_{Ar}H), 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.5, 120.0, 22.0 (CH₃).

MS (ESI⁺): *m/z* 403.56 [M + H⁺], 405.66 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 402.9445 ; Found: 402.9448.



Chemical Formula: C₁₂H₉Br₂NO₃S

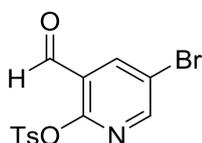
Molecular Weight: 407.08 g/mol

Melting Point: 97.4–97.9 °C²⁴⁸

5-Bromo-3-formylpyridin-2-yl 4-methylbenzenesulfonate 31. To a stirred suspension of 3,5-dibromo-2-hydroxypyridine (5.06 g, 20 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) maintained at 0 °C were added Et₃N (5.40 mL, 24 mmol, 2.0 equiv), DMAP (244 mg, 0.2 mmol, 10 mol%) and then TsCl (4.58 g, 24 mmol, 1.2 equiv). The resulting mixture was allowed to warm up to rt and stirred for 2 h. The reaction mixture was subsequently washed with water, 1 N hydrochloric acid, and saturated sodium bicarbonate solution. The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and concentrated to give a crude residue. Recrystallization from EtOH gave 7.6 g of **31** as a white solid (92% yield).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Tos}), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Tos}), 2.48 (s, 3H, CH₃).

Data are consistent with that reported in the literature.²⁴⁸



Chemical Formula: C₁₃H₁₀BrNO₄S

Molecular Weight: 356.19 g/mol

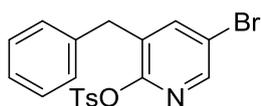
Melting Point: 86.7–87.3 °C²⁴⁸

5-Bromo-3-formylpyridin-2-yl-4-methylbenzenesulfonate 32. In an oven-dried flask was charged the tosylate **31** (10.0 g, 24.5 mmol) and a stirring bar. The atmosphere was flushed 3 times with N₂ and dry THF (60 mL) was added. The resulting colorless solution was cooled down to -30 °C (acetonitrile/liq. N₂ bath) and a solution (1.3M) of *i*PrMgCl·LiCl (20.8 mL, 27.0 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The resulting brownish solution was stirred at -30 °C for 2 h, and then a solution of DMF (3.8 mL, 49.2 mmol, 2.0 equiv) in THF (20 mL) was added dropwise. The resulting mixture was allowed to warm up at rt and stirred for 1 h. On completion, the reaction mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (80 mL) and stirred for 5 min. The product was extracted with Et₂O (3x 80 mL) and the combined organic layers were washed with water (100 mL) and brine (100 mL), and then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered. The solvents were removed under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 100/0 to 75/25) to afford 7.68 g of **32** as a white solid (88% yield).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.21 (s, CHO), 8.49 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.36 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Tos}), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Tos}), 2.48 (s, 3H, CH₃).

Data are consistent with that reported in the literature.²⁴⁸

²⁴⁸ Ren, H.; Knochel, P. Regioselective Functionalization of Trisubstituted Pyridines Using a Bromine-Magnesium Exchange, *Chem. Commun.*, **2006**, 0, 726–728.



Chemical Formula: C₁₉H₁₆BrNO₃S

Molecular Weight: 418.30 g/mol

Melting Point: -

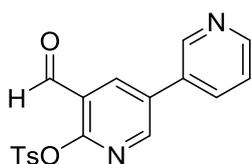
3-Benzyl-5-bromopyridin-2-yl 4-methylbenzenesulfonate 33. In an oven-dried sealed tube were dissolved the aldehyde **32** (180 mg, 0.5 mmol) and tosylhydrazine (139.7 mg, 0.75 mmol, 1.5 equiv) in dioxane (2 mL). The resulting colorless solution was heated at 80 °C for 2 h to give the tosylhydrazone, and then the phenylboronic acid and K₂CO₃ were added. The resulting mixture was heated at 100 °C for 18 h. On completion, the crude mixture was cooled at rt and diluted with water (5.0 mL) and the product was extracted with ethyl acetate (3x 5.0 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL) and brine (10 mL), and then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered. The solvents were removed under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (c-hexane/ethyl acetate 100/0 to 80/20) to afford 7.68 g of **33** as a colorless oil (80% yield).

IR (KBr disc): 3063, 3029, 2924, 1597, 1559, 1495, 1425, 1376, 1226, 1189, 1090, 903, 836, 713 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{Tos}), 7.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.35–7.26 (m, 5H, 3H_{Bn}+2H_{Tos}), 7.18–7.15 (m, 2H, 2H_{Bn}), 3.98 (s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 154.6, 146.6, 145.5, 142.7, 137.4, 134.1, 130.4, 129.8 (2C), 129.3 (2C), 129.0 (2C), 128.8 (2C), 127.1, 118.4, 35.6, 21.8.

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 418.0113 ; Found: 418.0120.



Chemical Formula: C₁₈H₁₄N₂O₄S

Molecular Weight: 354.38 g/mol

Melting Point: 104-106 °C

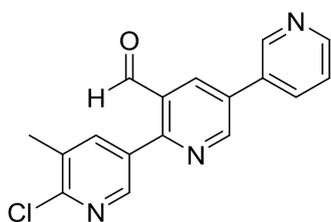
5-Formyl-[3,3'-bipyridin]-6-yl-4-methylbenzenesulfonate 34. To a microwave sealed tube containing 5-bromo-3-formylpyridin-2-yl-4-methylbenzenesulfonate **32** (1.20 g, 3.37 mmol), pyridin-3-ylboronic acid (613 mg, 5.06 mmol, 1.5 equiv), Pd(dba)₂ (93 mg, 0.169 mmol, 5 mol%), tri(2-furyl)phosphine (tfp, 80 mg, 0.34 mmol, 10 mol%) and TBAB (107 mg, 0.34 mmol, 0.1 equiv) was added THF (13 mL) followed by K₂CO₃ (1.1, 8.43 mmol, 2.5 equiv) as a solution in water (3.0 mL). The reaction mixture was heated at 80 °C for 24 h. The mixture was cooled down to rt and diluted with water (10 mL) and the product was extracted with ethyl acetate (2 x 15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by flash chromatography (c-hexane/ethyl acetate 75/25 to 0/100) to afford 895 mg of **34** as a off-white solid (75% yield).

IR (KBr disc): 3052, 2867, 2753, 1702, 1594, 1458, 1427, 1369, 1220, 1173, 1127, 1087, 922, 705 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.34 (s, 1H, CHO), 8.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Tos}), 7.89 (ddd, *J* = 7.9, 2.0, 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.44 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Tos}), 2.49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 187.0, 157.6, 151.0, 150.0, 147.8, 146.3, 136.9, 134.9, 133.4, 133.3, 131.5, 130.1 (2C), 129.0 (2C), 124.2, 122.4, 21.9.

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 355.0753 ; Found: 355.0755.



Chemical Formula: C₁₇H₁₂ClN₃O

Molecular Weight: 309.75 g/mol

Melting Point: 196-198 °C

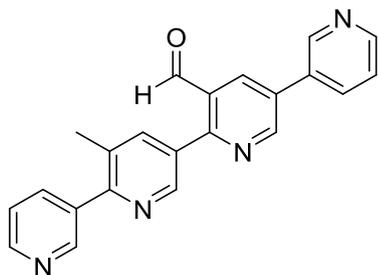
6-Chloro-5-methyl-[3,2':5',3''-terpyridine]-3'-carbaldehyde 35. To a microwave sealed tube containing 5-formyl-[3,3'-bipyridin]-6-yl-4-methylbenzenesulfonate **34** (140 mg, 0.40 mmol), (6-chloro-5-methylpyridin-3-yl)boronic acid (75.4 mg, 0.44 mmol, 1.1 equiv), Pd(dppf)Cl₂-DCM (32 mg, 0.04 mmol, 10 mol%) and flushed with N₂ was added 1,4-dioxane (1.6 mL) followed by K₂CO₃ (138 mg, 1.0 mmol, 2.5 equiv) as a solution in water (0.4 mL). The reaction mixture was heated at 100 °C for 2 h. The crude mixture was cooled to rt, diluted with ethyl acetate (10 mL) and filtered through a Celite pad. The filtrate was washed with water (5.0 mL) and brine (5.0 mL). The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a crude residue which was purified by flash chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate, 100/0 to 50/50) to afford 106 mg of the terpyridine **35** as a light yellow solid (86% yield).

IR (KBr disc): 3035, 2870, 1687, 1587, 1397, 1222, 1093, 1022, 924, 803, 710 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.17 (s, 1H, CHO), 9.14 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.95 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.74 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.54 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.45 (dd, *J* = 1.8, 0.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.00-7.99 (m, 1H, H_{pyr}), 7.94-7.93 (m, 1H, H_{pyr}), 7.50 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H, H_{pyr}), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 190.0, 157.1, 152.0, 150.3, 148.2, 147.9, 140.5, 134.6, 134.5, 133.5, 133.1, 131.9, 131.7, 129.8, 124.1, 19.9 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 310.0747 ; Found: 310.0752



Chemical Formula: C₂₂H₁₆N₄O

Molecular Weight: 352.39 g/mol

Melting Point: 216-218 °C

3'-Methyl-[3,2':5',2'':5'',3''''-quaterpyridine]-3''-carbaldehyde 36. To a microwave sealed tube containing 6-chloro-5-methyl-[3,2':5',3''-terpyridine]-3'-carbaldehyde **35** (100 mg, 0.32 mmol), (pyridin-3-yl)boronic acid (58 mg, 0.48 mmol, 1.5 equiv), Pd(dppf)Cl₂-DCM (26 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) and flushed with N₂ was added 1,4-dioxane (1.3 mL) followed by K₂CO₃ (138 mg, 1.0 mmol, 2.5 equiv) as a solution in water (0.32 mL). The reaction mixture was heated at 100 °C for 18 h. The crude mixture was cooled to rt, diluted with ethyl acetate (10 mL) and filtered through a Celite pad. The filtrate was washed with water (5.0 mL) and brine (5.0 mL). The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a crude residue which was purified by flash chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate, 100/0 to 50/50) to afford 79 mg of the quaterpyridine **36** as a off-white solid (70% yield).

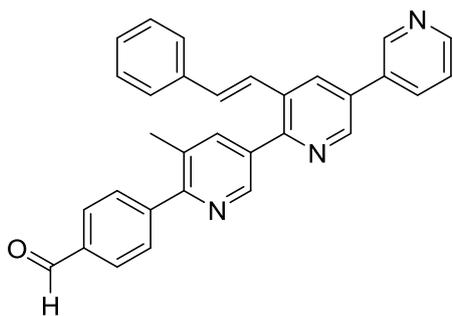
IR (KBr disc): 3057, 3036, 3013, 2952, 2915, 2868, 1699, 1587, 1575, 1559, 1447, 1417, 1373, 1013, 1027, 915, 813, 778, 712 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.26 (s, 1H, CHO), 9.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.98 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.93 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.79 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.74 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.71 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.03-8.97 (m, 3H, 3H_{pyr}), 7.52-7.47 (m, 2H, 2H_{pyr}), 2.54 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 190.4, 158.0, 156.8, 152.1, 150.3, 150.0, 149.7, 148.4, 148.3, 140.3, 136.7, 135.5, 134.7, 134.5, 133.4, 132.0, 131.74, 131.65, 129.9, 124.2, 123.4, 20.2 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 353.1402 ; Found: 353.1410.

Analogues du Pyridoclastax



Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₃O

Molecular Weight: 453.55 g/mol

Melting Point: 172-174 °C

(E)-4-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)benzaldehyde M00. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (200 mg, 0.47 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, were added (4-formylphenyl)boronic acid (106 mg, 0.71 mmol, 1.5 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.024 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (250 mg, 1.18 mmol, 2.5 equiv). The reaction mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/ MeOH 99/1 to 9/1) to afford 100 mg of **M00** as a white solid (47% yield).

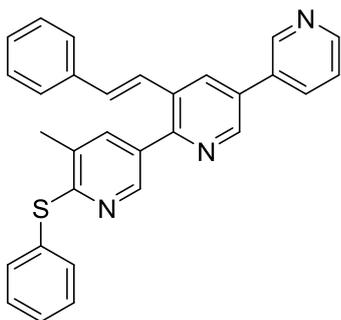
IR (KBr disc): 3026, 1695, 1605, 1572, 1418, 1207, 807, 752, 697 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.11 (s, 1H, CHO), 8.98 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87–8.85 (m, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05–8.01 (m, 4H, 2 H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.84–7.80 (m, 2H, 2 H_{Ar}), 7.48 (ddt, *J* = 7.3, 3.3, 1.5 Hz, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.39–7.34 (m, 2H, 2 H_{Ar}), 7.33–7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (m, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.49 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 192.1 (CHO), 157.1, 153.5, 149.7, 148.3, 148.0, 147.0, 146.2, 140.0, 136.5, 135.9, 134.6, 134.3, 133.2, 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.0, 132.7, 132.1, 131.1, 130.0 (2 C_{Ar}H), 129.7 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 454.59 [M + H⁺], 455.53 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 454.1919 ; Found: 454.1927.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃S

Molecular Weight: 457.60 g/mol

Melting Point: >250 °C

(E)-5-Methyl-6-(phenylthio)-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M01. To a reaction vessel containing (E)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (200 mg, 0.47 mmol) in DMSO (5 mL), benzenethiol (52 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv) and K₂CO₃ (130 mg, 0.94 mmol, 2.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 48 h, obtaining only 50% conversion of starting material. Benzenethiol (1.0 equiv) and K₂CO₃ (2.0 equiv) were recharged in the reaction mixture and reaction was completed after 24h. The mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 9/1) to afford 162 mg of **M01** as a white solid (75% yield).

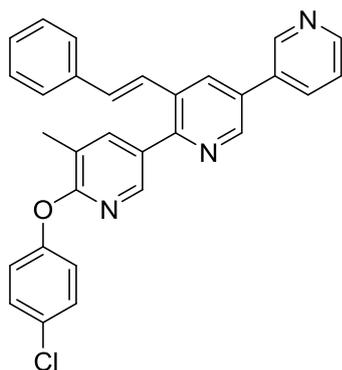
IR (KBr disc): 3022, 2978, 2333, 2067, 1631, 1589, 1539, 1384, 744, 680 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9.52 (s, 1H, H_{Pyr}), 9.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 9.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.95 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.14 (dd, *J* = 8.2, 5.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.90 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.62–7.52 (m, 5H, H_{Ar}), 7.47–7.38 (m, 5H, H_{Ar}), 7.36–7.29 (m, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.19 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 157.0, 153.0, 146.7, 145.9, 144.6, 141.9, 141.8, 141.0, 137.6, 136.0, 134.4, 134.1 (2 C_{Ar}H), 133.0, 132.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.1, 130.8, 129.9, 129.3, 129.0, 128.7 (2 C_{Ar}H), 128.4 (2 C_{Ar}H), 128.2, 127.9, 126.3 (2 C_{Ar}H), 123.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 17.8 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 458.59 [M + H⁺], 459.60 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 458.1691 ; Found: 458.1687.



Chemical Formula: C₃₀H₂₂ClN₃O

Molecular Weight: 475.98 g/mol

Melting Point: 139-142 °C

(E)-6-(4-Chlorophenoxy)-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M02. To a reaction vessel containing (E)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (70 mg, 0.16 mmol) in DMF (2 mL), 4-chlorophenol (20 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv), copper(0) powder (1 mg, 0.016 mmol, 10%) and Cs₂CO₃ (156 mg, 0.48 mmol, 3.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h. The mixture was cooled to room temperature, quenched with NaOH 1 M solution and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford 55 mg of **M02** as a white solid (72% yield).

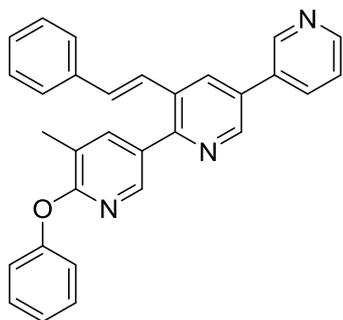
IR (KBr disc): 3420 (br), 1585, 1487, 1421, 1288, 1209, 1091, 971, 909, 824 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.27 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.96 (dd, *J* = 2.4, 1.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.49–7.46 (m, 1H, H_{Pyr}), 7.46–7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.38–7.33 (m, 4H, H_{Ar}), 7.32–7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.18 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 2.45 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 161.8, 153.8, 152.7, 149.6, 148.3, 146.8, 145.7, 141.2, 136.6, 134.5, 133.2, 132.8, 132.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5, 131.8, 130.6, 129.9, 129.7 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 122.7 (2 C_{Ar}H), 121.9, 16.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 476.54 [M + H⁺], 478.56 [M⁺ + 2].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 476.1530 ; Found: 476.1530.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O

Molecular Weight: 441.53 g/mol

Melting Point: 162 °C

(E)-5-Methyl-6-phenoxy-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M03. To a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (280 mg, 0.65 mmol) in DMF (7 mL), phenol (61 mg, 0.65 mmol, 1.0 equiv), copper(0) powder (4 mg, 0.065 mmol, 10%) and Cs₂CO₃ (635 mg, 1.95 mmol, 3.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h. The mixture was cooled to room temperature, quenched with NaOH 1 M solution and extracted in DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 157 mg of **M03** as a white solid (55% yield).

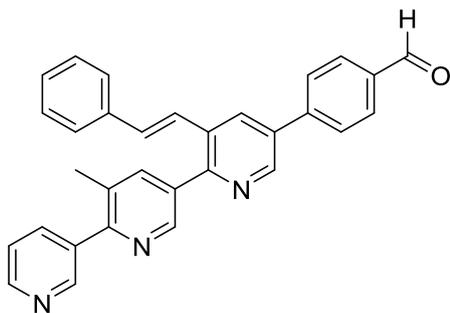
IR (KBr disc): 3059, 3032, 1589, 1576, 1491, 1450, 1420, 1398, 1241, 1200, 1164, 1132, 1023, 966, 910, 810, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.28 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.96 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.49–7.32 (m, 7H, H_{Pyr}, 6 H_{Ar}), 7.31–7.26 (m, 1H, H_{Ar}), 7.23–7.14 (m, 5H, 3 H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 162.1, 154.3, 154.0, 149.6, 148.3, 146.8, 145.8, 141.0, 136.6, 134.5, 133.3, 132.7 (2 C_{Ar}H), 132.4, 131.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 130.3, 129.5 (2 C_{Ar}H), 128.8 (2 C_{Ar}H), 128.4, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.6, 123.9, 122.0, 121.2 (2 C_{Ar}H), 16.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.54 [M + H⁺], 443.52 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1917.



Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₃O

Molecular Weight: 453.55 g/mol

Melting Point: 183-186 °C

(E)-4-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzaldehyde M04. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-formylphenyl)boronic acid (38 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 3 h. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 55 mg of **M04** as a pale yellow solid (52% yield).

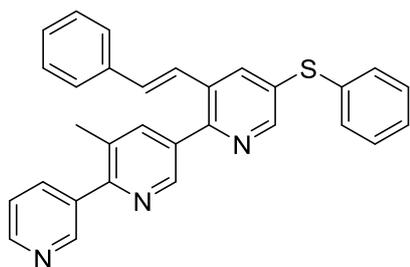
IR (KBr disc): 3023, 2927, 1697, 1603, 1572, 1450, 1384, 1214, 1177, 974, 828, 688 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.12 (s, 1H, CHO), 8.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.91 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.08–8.05 (m, 2H, H_{Ar}), 8.04 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.91–7.87 (m, 2H, H_{Ar}), 7.50–7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.39–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.26 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 191.7 (CHO), 155.5, 153.7, 150.1, 149.4, 148.2, 147.2, 143.3, 139.9, 136.7, 136.5, 136.1, 135.9, 134.8, 134.2, 133.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9, 132.1, 131.3, 130.6 (2 C_{Ar}H), 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.7, 127.9 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 454.50 [M + H⁺], 455.48 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 454.1919 ; Found: 454.1920.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃S

Molecular Weight: 457.60 g/mol

Melting Point: 104-107 °C

(E)-5'-Methyl-5-(phenylthio)-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M05. To a reaction vessel containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (250 mg, 0.58 mmol) in DMSO (12 mL) under nitrogen atmosphere, benzenethiol (70 mg, 0.64 mmol, 1.1 equiv), CuBr₂ (6 mg, 0.029 mmol, 5%), Cs₂CO₃ (378 mg, 1.16 mmol, 2.0 equiv) and ethyl 2-oxocyclohexane-1-carboxylate (10 mg, 0.058 mmol, 0.1 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 48 h. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) to afford 205 mg of **M05** as an off-white solid (77% yield).

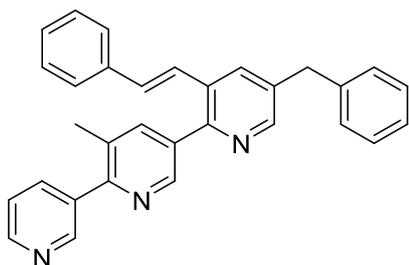
IR (KBr disc): 3059, 3084, 1591, 1417, 1012, 968, 745, 725. 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.67 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.98–7.95 (m, 3H, H_{Pyr}), 7.49 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.45–7.38 (m, 5H, H_{Pyr}, 4 H_{Ar}), 7.34 (q, *J* = 7.6 Hz, 3H, H_{Ar}), 7.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.14 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.03 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.47 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.3, 152.0, 150.0, 149.5, 149.3, 148.1, 139.9, 136.7, 136.4, 135.9, 135.6, 134.1, 133.5, 133.3, 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.2, 132.0 (2 C_{Ar}H), 131.2, 129.7 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6, 128.2, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 20.1 (CH₃).

MS (ESI⁺): *m/z* 458.53 [M + H⁺], 459.52 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 458.1691 ; Found: 458.1689.



Chemical Formula: C₃₁H₂₅N₃

Molecular Weight: 439.56 g/mol

Melting Point: 172 °C

(E)-5-Benzyl-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M06. To a reaction vessel containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (200 mg, 0.46 mmol) in dry THF (5 mL) under nitrogen atmosphere, benzylzinc(II) bromide 0.5 M (0.46 mmol, 1.0 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (53 mg, 0.046 mmol, 10%) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 48 h. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) to afford 89 mg of **M06** as a white solid (44% yield).

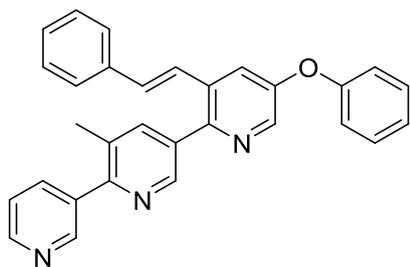
IR (KBr disc): 3025, 2922, 1666, 1608, 1494, 1450, 1415, 1386, 1197, 1041, 746, 706, 694 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.86 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 2.1, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.65 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.20 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.09 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.54 (dd, *J* = 4.8, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.53–7.50 (m, 2H, H_{Ar}), 7.40–7.35 (m, 4H, H_{Ar}), 7.35–7.30 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.30–7.27 (dt, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.24 (dt, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.19 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 4.10 (s, 2H, CH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 154.6, 151.7, 150.1, 149.5, 149.4, 147.9, 140.9, 140.1, 137.1, 136.9, 135.9, 134.9, 134.8, 134.5, 132.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.4, 131.2, 129.3 (2 C_{Ar}H), 129.2 (2 C_{Ar}H), 129.1 (2 C_{Ar}H), 128.6, 127.1 (2 C_{Ar}H), 126.7, 125.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.6, 38.2 (CH₂), 20.0 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 440.56 [M + H⁺], 441.60 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 440.2127 ; Found: 440.2127.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O

Molecular Weight: 441.53 g/mol

Melting Point: 123 °C

(E)-5'-Methyl-5-phenoxy-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M07. To a microwave sealed tube containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (500 mg, 1.16 mmol) in DMF (5 mL), phenol (109 mg, 1.16 mmol, 1.0 equiv), copper(0) powder (11 mg, 0.17 mmol, 10%) and Cs₂CO₃ (1.1 g, 3.48 mmol, 3.0 equiv) were added. The reaction mixture was microwave-irradiated at 165 °C for 1 h 30 min. The mixture was cooled to rt and extracted in ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 4/1) to afford 46 mg of **M07** as a white solid (10% yield).

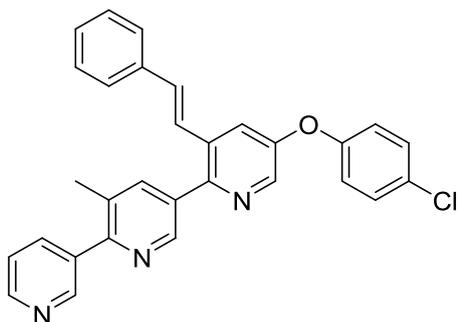
IR (KBr disc): 3039, 1580, 1488, 1409, 1283, 1287, 1156, 1014, 963, 739, 689 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.79 (dd, *J* = 2.1, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.44 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.96 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.66 (dd, *J* = 2.7, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.46–7.40 (m, 6H, H_{Pyr}, 5 H_{Ar}), 7.35–7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29–7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.24–7.19 (m, 1H, H_{Ar}), 7.18–7.13 (m, 3H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.03 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 156.3, 154.9, 153.6, 149.9, 149.1, 148.8, 148.2, 140.4, 140.0, 136.9, 136.4, 136.0, 134.4, 133.1, 132.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2, 130.3 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.6, 124.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 123.0, 119.1 (2 C_{Ar}H), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.53 [M + H⁺], 443.57 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1924.



Chemical Formula: C₃₀H₂₂ClN₃O

Molecular Weight: 475.98 g/mol

Melting Point: 66-70 °C

(E)-5-(4-Chlorophenoxy)-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M09. To a microwave sealed tube containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (500 mg, 1.16 mmol) in DMF (5 mL), 4-chlorophenol (149 mg, 1.16 mmol, 1.0 equiv), Copper(0) powder (11 mg, 0.17 mmol, 10%) and Cs₂CO₃ (1.1 g, 3.48 mmol, 3.0 equiv) were added. The reaction mixture was microwave-irradiated at 165 °C for 1 h 30 min. The mixture was cooled to rt and extracted in ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 4/1) to afford 26 mg of **M09** as a white solid (5% yield).

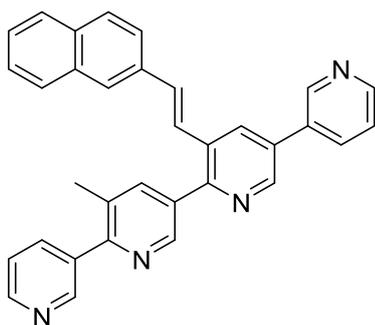
IR (KBr disc): 3032, 2970, 2923, 1577, 1484, 14161, 1284, 1222, 1088, 691 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.78 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.43 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (dt, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.95 (dd, *J* = 2.0, 0.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.65 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.43 (dd, *J* = 7.9, 6.0 Hz, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.40 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.38 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.36–7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.31–7.27 (m, 1H, Ar-H), 7.16 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 – 7.07 (m, 2H, H_{Ar}), 7.04 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.1, 155.0, 153.3, 150.1, 149.4, 149.2, 148.2, 140.4, 139.9, 136.7, 136.4, 136.0, 134.2, 133.3, 133.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2, 130.3 (2 C_{Ar}H), 129.6, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.7, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 123.1, 120.4 (2 C_{Ar}H), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 476.50 [M + H⁺], 478.47 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 476.1530 ; Found: 476.1532.



Chemical Formula: C₃₃H₂₄N₄
Molecular Weight: 476.58 g/mol
Melting Point: 212-214 °C

(E)-3'-Methyl-3''-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine M11. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'--(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,2':5',3''-terpyridine **21a** (310 mg, 0.65 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (88 mg, 0.72 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (37 mg, 0.033 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (344 mg, 1.62 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/ MeOH 99/1 to 9/1) to afford 93 mg of **M11** as an off-white solid (30% yield).

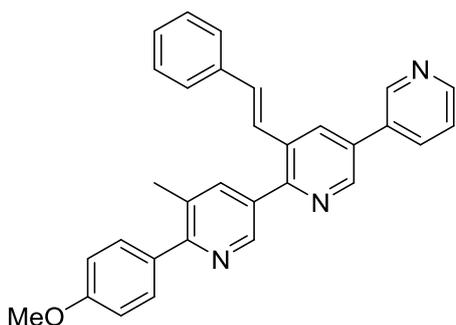
IR (KBr disc): 3051, 3049, 1627, 1574, 1417, 1392, 1015, 968, 905, 805, 712, 703 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.92 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.91 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.06 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05–7.98 (m, 2H, H_{Ar}), 7.87 (s, 1H, H_{Ar}), 7.84–7.79 (m, 3H, H_{Pyr}), 7.64 (dd, *J* = 8.6, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51–7.44 (m, 4H, H_{Ar}), 7.41 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.37 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.4, 153.6, 150.0, 149.7, 149.3, 148.3, 148.2, 147.0, 140.0, 136.8, 135.9, 134.6, 134.3, 134.0, 133.6, 133.4, 133.3, 133.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.0, 132.7, 132.2, 131.3, 128.7, 128.2, 127.8, 127.7, 126.7, 126.5, 125.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 123.43, 123.42, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 477.62 [M + H⁺], 478.63 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 477.2079 ; Found: 477.2093.



Chemical Formula: C₃₁H₂₅N₃O

Molecular Weight: 455.56 g/mol

Melting Point: 134-138 °C

(E)-6-(4-Methoxyphenyl)-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M16. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-methoxyphenyl)boronic acid (38 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at reflux for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (*c*-hexane/ethyl acetate 91/1 to 3/7) to afford 59 mg of **M16** as a yellow solid (54% yield).

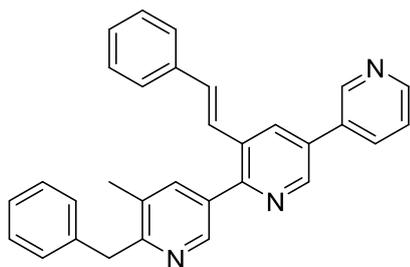
IR (KBr disc): 3001, 2834, 1610, 1594, 1448, 1297, 1173, 1025, 825, 747, 693 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.97 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.81 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.8 Hz, 0.7, 1H, H_{Pyr}), 8.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01 (dt, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.59 (dt, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.49–7.45 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.30–7.25 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.03–6.99 (m, 2H, H_{Ar}), 3.87 (s, 3H, O-CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.7, 158.2, 154.0, 149.4, 148.1, 147.7, 146.9, 139.8, 136.5, 134.7, 133.3, 133.0, 132.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.7, 132.67, 132.62, 132.0, 130.7, 130.5 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 113.7 (2 C_{Ar}H), 55.4 (OCH₃), 20.5 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 456.68 [M + H⁺], 457.69 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 456.2073 ; Found: 456.2076.



Chemical Formula: C₃₁H₂₅N₃
Molecular Weight: 439.56 g/mol
Melting Point: 64–68 °C

(E)-6-Benzyl-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M19. To a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in dry THF (3 mL) under nitrogen atmosphere, benzylzinc(II) bromide 0.5 M (0.23 mmol, 1.0 equiv) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.023 mmol, 10%) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 48 h. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) to afford 52 mg of **M19** as a white solid (52% yield).

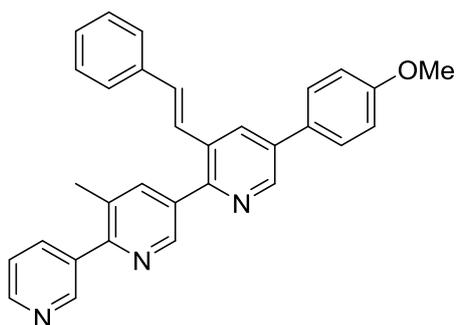
IR (KBr disc): 3386, 3025, 2929, 1592, 1493, 1420, 1379, 1023, 909, 725, 696 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (dd, *J* = 2.2, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.82 (dd, *J* = 2.2, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.49–7.44 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.38–7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31–7.27 (m, 4H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.24–7.21 (m, 1H, H_{Ar}), 7.20 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 4.29 (s, 2H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.2, 154.2, 149.7, 148.4, 147.6, 146.9, 139.1, 138.8, 136.6, 134.6, 133.2, 133.2, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.7, 132.6, 131.9, 131.9, 129.0, 128.96 (2 C_{Ar}H), 128.90 (2 C_{Ar}H), 128.5 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 126.3, 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 42.2 (CH₂), 19.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 440.65 [M + H⁺], 441.68 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 440.2127 ; Found: 440.2128.



Chemical Formula: C₃₁H₂₅N₃O

Molecular Weight: 455.56 g/mol

Melting Point: 129-132 °C

(E)-5-(4-Methoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M21. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-methoxyphenyl)boronic acid (38 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (c-hexane/ethyl acetate 7/3 to 1/9) to afford 68 mg of **M21** as a yellow solid (64% yield).

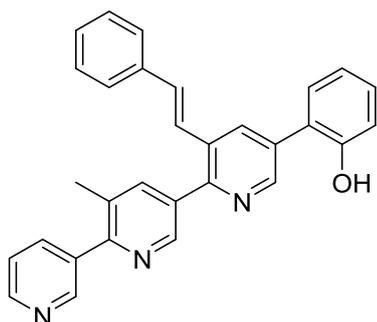
IR (KBr disc): 3035, 3003, 2963, 2938, 1610, 1515, 1413, 1246, 1289, 819, 689 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.85 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.79 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.62 (dd, *J* = 4.8, 1.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.13 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.93 (dt, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.62–7.57 (m, 2H, H_{Ar}), 7.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.38 (dd, *J* = 7.9, 4.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.26–7.21 (m, 1H, H_{Ar}), 7.20 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.04–6.99 (m, 2H, H_{Ar}), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.2, 160.1, 155.1, 152.0, 150.0, 149.3, 148.2, 147.0, 139.9, 136.7, 136.0, 135.7, 134.5, 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.0, 131.7, 131.2, 129.6, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.44, 128.41 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 114.7 (2 C_{Ar}H), 55.5 (OCH₃), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 456.68 [M + H⁺], 457.69 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 456.2076 ; Found: 456.2080.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O
Molecular Weight: 441.53 g/mol
Melting Point: 128-131 °C

(E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol M23. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, 4-(hydroxyphenyl)boronic acid (34 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 97/3) to afford 85 mg of **M23** as a white solid (84% yield).

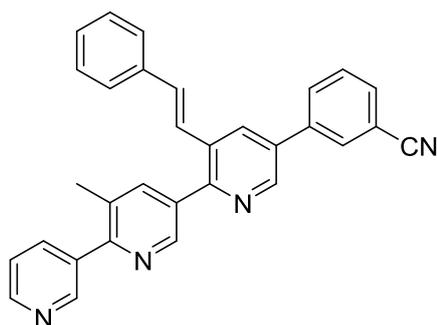
IR (KBr disc): 3033 2712 1590 1450 1382 1288 751 692 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.80 (dd, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.65 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (dt, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.53 (s, 1H, OH), 7.43 (dd, *J* = 7.4, 5.2 Hz, 3H, H_{Ar}), 7.38 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H_{Ar}), 7.28 (s, 1H, H_{Ar}), 7.22 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.05 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 2.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 154.9, 153.8, 152.1, 149.7, 149.2, 149.0, 148.2, 140.1, 137.0, 136.7, 136.0, 135.0, 134.5, 133.7, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.6, 131.3, 130.6, 130.0, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.4, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.0, 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.5, 121.1, 116.9, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.76 [M + H⁺], 443.75 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1914.



Chemical Formula: C₃₁H₂₂N₄

Molecular Weight: 450.55 g/mol

Melting Point: 187-189 °C

(E)-3-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzonitrile M24. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (3-cyanophenyl)boronic acid (37 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 1 h 30 min, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 67 mg of **M24** as a white solid (60% yield).

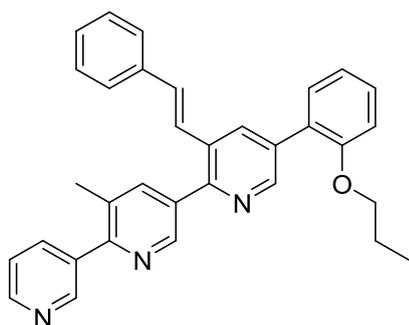
IR (KBr disc): 3048, 3029, 2228, 1575, 1449, 1414, 1393, 1016, 301, 796, 683 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.86 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.22 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.03 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01–7.97 (m, 2H, H_{Pyr}, H_{Ar}), 7.95 (ddd, *J* = 7.8, 1.9, 1.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.76 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.67 (td, *J* = 7.8, 0.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.50–7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, *J* = 7.8, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.40–7.35 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.5, 153.8, 150.0, 149.4, 148.2, 146.9, 140.0, 138.8, 136.8, 136.4, 135.9, 134.2, 134.0, 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.7, 132.2, 131.9, 131.6, 131.4, 130.9, 130.2, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.7, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 118.5, 113.7, 20.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 451.77 [M + H⁺], 452.71 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 451.1923 ; Found: 451.1915.



Chemical Formula: C₃₃H₂₉N₃O

Molecular Weight: 483.62 g/mol

Melting Point: 67–69 °C

(E)-5'-Methyl-5-(2-propoxyphenyl)-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M25. To a reaction vessel containing (E)-2-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol **M23** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 1-iodopropane (78 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 64 mg of **M25** as a yellow solid (57% yield).

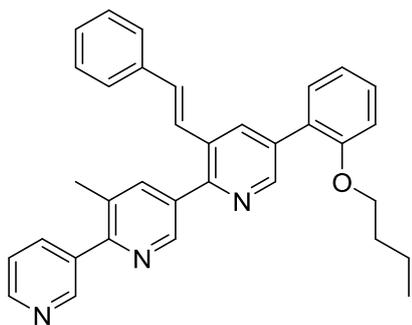
IR (KBr disc): 3408, 3026, 2952, 2877, 1588, 1449, 1493, 1414, 1383, 1274, 1240, 1124, 1012, 974, 910, 750, 714, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (dd, *J* = 2.1, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.67 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.30 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.48–7.36 (m, 5H, H_{Pyr}, 4 H_{Ar}), 7.37–7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29–7.24 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.10 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.05 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH₂), 2.49 (s, 3H, CH₃), 1.84 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 156.3, 155.0, 151.9, 150.1, 149.4, 149.2, 148.3, 140.0, 136.8, 136.7, 136.0, 135.1, 134.7, 133.8, 132.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2, 131.0, 130.6, 129.9, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.3, 126.8 (2 C_{Ar}H), 126.5, 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 121.1, 112.4, 70.1 (OCH₂), 22.7 (CH₂), 20.1 (CH₃), 10.9 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 484.83 [M + H⁺], 485.51 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 484.2389 ; Found: 484.2387.



Chemical Formula: C₃₄H₃₁N₃O

Molecular Weight: 497.64 g/mol

Melting Point: 67-69 °C

(E)-5-(2-Butoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M26. To a reaction vessel containing (E)-2-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol **M23** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 1-iodobutane (84 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 95 mg of **M26** as a yellow solid (83% yield).

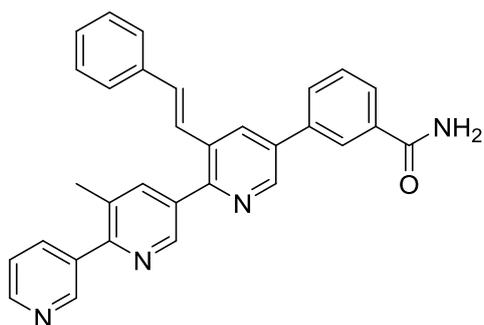
IR (KBr disc): 3405, 3029, 2955, 2669, 1674, 1597, 1493, 1449, 1426, 1414, 1382, 1243, 1126, 1076, 1012, 750, 691 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.86 (dd, *J* = 2.1, 0.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.30 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.48–7.38 (m, 5H, H_{Pyr}, 4 H_{Ar}), 7.37–7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30–7.23 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.06 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH₂), 2.50 (s, 3H CH₃), 1.79 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, OCH₂-CH₂), 1.49 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 156.4, 155.1, 151.9, 150.1, 149.5, 149.4, 148.3, 140.0, 136.9, 136.8, 136.1, 135.2, 134.8, 133.9, 132.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2, 131.0, 130.7, 129.9, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.3, 126.9 (2 C_{Ar}H), 126.5, 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 121.1, 112.4, 68.2 (OCH₂), 31.4 (OCH₂-CH₂), 20.1 (CH₃), 19.5 (CH₂-CH₃), 13.9 (CH₂-CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 498.81 [M + H⁺], 499.98 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 498.2545 ; Found: 498.2552.



Chemical Formula: C₃₁H₂₄N₄O

Molecular Weight: 468.56 g/mol

Melting Point: 127-130 °C

(E)-3-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzamide M27. To a reaction vessel containing (E)-3-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzamide **M24** (50 mg, 0.11 mmol) in 2-methyl-2-propanol (9 mL), ^tBuOK (37 mg, 0.33 mmol, 3.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 30 °C for 5 days. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (acetone/MeOH 8/2) to afford 37 mg of **M27** as an off-white solid (72% yield).

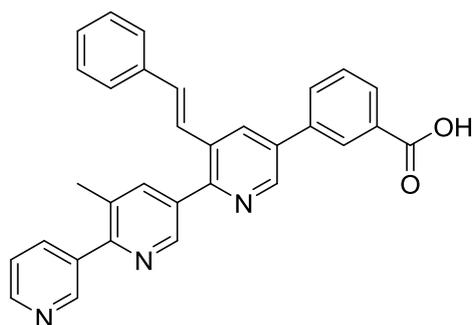
IR (KBr disc): 3321, 3184, 1625, 1578, 1451, 1409, 1360, 1123, 1019, 976, 900, 748, 708, 695 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9.03 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.77 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.66 (dd, *J* = 4.9, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.60 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.37 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.13–8.07 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 8.01–7.96 (m, 1H, H_{Ar}), 7.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.59–7.53 (m, 4H, Ar-CH=CH-Pyr, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.42–7.37 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.26 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 2.47 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 167.1 (C=O amide), 153.9, 152.2, 149.2, 148.5, 147.0, 146.3, 144.3, 139.1, 136.2, 136.1, 136.0, 134.9, 134.6, 134.0, 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.3, 131.9, 130.9, 130.4, 129.4, 128.7, 128.4 (2 C_{Ar}H), 127.7, 126.3 (2 C_{Ar}H), 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.1, 122.7, 19.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 469.69 [M + H⁺], 470.67 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 469.2028 ; Found: 469.2026.



Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₃O₂

Molecular Weight: 469.54 g/mol

Melting Point: 151-154°C

(E)-3-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzoic acid M28. To a reaction vessel containing (*E*)-3-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzonitrile **M24** (100 mg, 0.22 mmol) in 1,4-dioxane/MeOH (9/1, 10 mL), NaOH (35 mg, 0.88 mmol, 4.0 equiv) was added. The reaction mixture was refluxed for 18 h. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (acetone/MeOH 8/2) to afford 70 mg of **M28** as a white solid (68% yield).

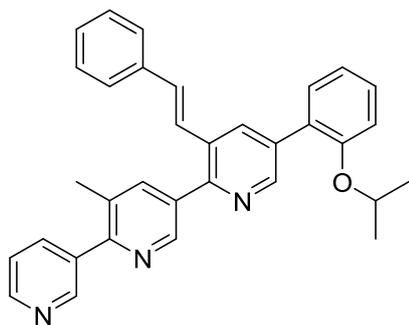
IR (KBr disc): 3425 (br, OH), 1713, 1632, 1551, 1370, 1352, 1170, 1016, 984, 907, 771, 743, 718, 700 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.94 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.66 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.51 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.33 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.11 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.98 (dt, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.90 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.59–7.49 (m, 5H, H_{Pyr}, 3 H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.38 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32–7.25 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 2.47 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.1 (C=O carboxylic acid), 153.9, 151.1, 149.2, 148.5, 147.0, 146.1, 139.7, 139.2, 136.2, 136.1, 135.1, 134.96, 134.94, 133.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.2, 131.6, 130.8, 130.4, 128.6, 128.3 (2 C_{Ar}H), 127.8, 127.7, 127.5, 127.1, 126.3 (2 C_{Ar}H), 124.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 122.7, 19.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 470.63 [M + H⁺], 471.61 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 470.1869 ; Found: 470.1866.



Chemical Formula: C₃₃H₂₉N₃O

Molecular Weight: 483.62 g/mol

Melting Point: 75-79°C

(E)-5-(2-Isopropoxyphenyl)-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M29. To a reaction vessel containing (E)-2-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol **M23** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 2-iodopropane (78 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 18 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 86 mg of **M29** as an orange solid (78% yield).

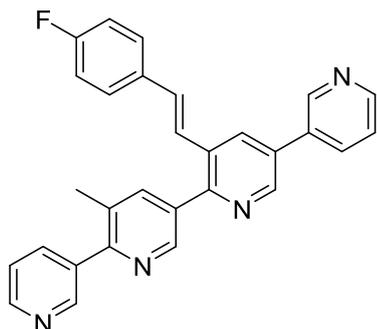
IR (KBr disc): 3398, 2973, 1598, 1492, 1451, 1394, 1245, 1127, 1106, 1049, 955, 752, 692 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (dd, *J* = 2.1, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.48–7.43 (m, 4H, H_{Pyr}, 3 H_{Ar}), 7.41–7.38 (m, 1H, H_{Ar}), 7.38–7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30–7.24 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11–7.05 (m, 2H, H_{Ar}), 4.65 (hept, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH), 2.50 (s, 3H, CH₃), 1.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.1, 155.0, 151.7, 150.0, 149.5, 149.2, 148.3, 140.0, 136.9, 136.8, 136.1, 135.1, 134.8, 134.1, 132.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.2, 131.1, 130.9, 129.8, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.3, 127.3, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 121.1, 114.2, 70.7 (CH), 22.2 (2 x CH₃), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 484.74 [M + H⁺], 485.73 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 484.2389 ; Found: 484.2386.



Chemical Formula: C₂₉H₂₁FN₄
Molecular Weight: 444.51 g/mol
Melting Point: 135-138 °C

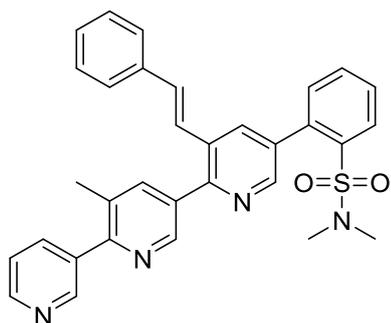
(E)-3''-(4-Fluorostyryl)-3'-methyl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine M30. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-3'-(4-fluorostyryl)-5-methyl-3,2':5',3''-terpyridine **21b** (420 mg, 0.94 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, pyridin-3-ylboronic acid (127 mg, 1.03 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (54 mg, 0.047 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (498 mg, 2.35 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at reflux for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 95/5) to afford 175 mg of **M30** as a white solid (42% yield).

IR (KBr disc): 3398, 3032, 1602, 1508, 1417, 1235, 1014, 969, 819, 704, 508 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.97 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.90 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.84 (dd, *J* = 2.1, 0.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (dddd, *J* = 10.1, 7.9, 2.3, 1.6 Hz, 2H, H_{Pyr}), 7.46 (m, 4H, 2 H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.20 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.08–7.02 (m, 2H, H_{Ar}), 2.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.1, 161.6, 155.5, 153.5, 150.0, 149.7, 149.4, 148.3, 148.1, 147.1, 139.9, 136.8, 135.9, 134.6, 134.2, 133.1, 133.0, 132.7, 132.0, 131.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 128.6, 128.5, 124.64, 124.62, 124.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 116.1, 115.9, 20.1 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 445.1828 ; Found: 445.1827.



Chemical Formula: C₃₂H₂₈N₄O₂S
Molecular Weight: 532.66 g/mol
Melting Point: 160-165 °C

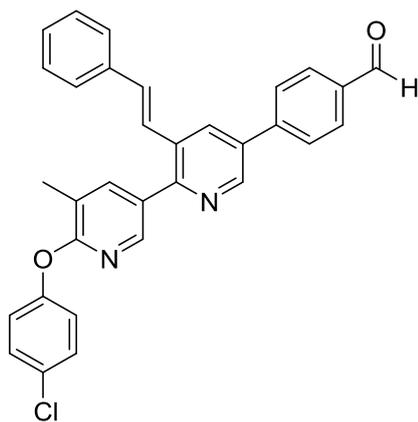
(E)-N,N-dimethyl-2-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzenesulfonamide M31. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (2-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)phenyl)boronic acid (58 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 48 mg of **M31** as an off-white solid (39% yield).

IR (KBr disc): 3431, 3049, 3019, 2933, 1597, 1573, 1429, 1415, 1383, 1276, 1206, 1128, 1014, 708, 537 cm⁻¹.
¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05–8.02 (dd, *J* = 1.4, 0.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.70 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.62 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.48–7.43 (m, 4H, H_{Ar}), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.29–7.19 (m, 3H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 2.53 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.5, 153.2, 150.2, 149.5, 148.4, 148.2, 140.1, 137.68, 137.66, 136.8, 136.7, 136.1, 136.0, 135.0, 134.5, 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9, 132.8, 131.4, 130.7, 130.6, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.6, 127.1 (2 C_{Ar}H), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.5, 36.6 (2 x CH₃), 20.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 533.66 [M + H⁺], 534.65 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *on going*.



Chemical Formula: C₃₂H₂₃ClN₂O₂

Molecular Weight: 503.00 g/mol

Melting Point: 140-144 °C

(E)-4-(6'-(4-Chlorophenoxy)-5'-methyl-3-styryl-[2,3'-bipyridin]-5-yl)benzaldehyde M32. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (E)-6-(4-chlorophenoxy)-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **11** (170 mg, 0.36 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-formylphenyl)boronic acid (59 mg, 0.40 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (21 mg, 0.018 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (191 mg, 0.90 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (c-hexane/ethyl acetate 9/1 to 1/1) to afford 72 mg of **M32** as an off-white solid (40% yield).

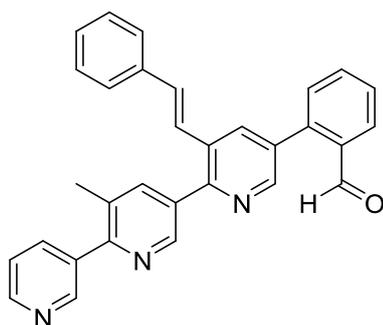
IR (KBr disc): 3026, 1698, 1604, 1586, 1575, 1489, 1475, 1417, 1399, 1284, 1213, 1085, 971, 840, 824, 748, 686 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.11 (s, 1H, CHO), 8.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.27 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.22 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.97 (dd, *J* = 2.4, 1.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.46–7.43 (m, 2H, H_{Ar}), 7.39–7.33 (m, 4H, H_{Ar}), 7.34–7.25 (m, 1H, H_{Ar}), 7.19 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.15–7.11 (m, 2H, H_{Ar}), 2.45 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 191.8 (CHO), 161.8, 154.0, 152.7, 147.0, 145.7, 143.4, 141.2, 136.6, 136.0, 134.3, 132.9, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.8, 130.67 (2 C_{Ar}H), 130.64, 129.9, 129.7 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 127.9 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.2 (Ar-CH=CH-Pyr), 122.8 (2 C_{Ar}H), 121.9, 16.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 503.47 [M], 504.72 [M + H⁺], 505.48 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 503.1526 ; Found: 503.1529.



Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₃O

Molecular Weight: 453.55 g/mol

Melting Point: 152-155 °C

(E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzaldehyde M33. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (2-formylphenyl)boronic acid (39 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (122 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 84 mg of **M33** as a white solid (80% yield).

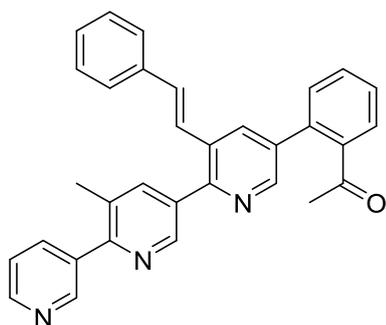
IR (KBr disc): 3036, 1686, 1597, 1449, 1190, 1012, 970, 822, 760, 746, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.14 (s, 1H, CHO), 8.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.12 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05 (dd, *J* = 2.0, 0.5 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (dt, *J* = 7.8, 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.75 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.62 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.57–7.53 (dd, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.46–7.42 (m, 3H, H_{Ar}), 7.36–7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30–7.23 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 191.3 (CHO), 155.5, 153.5, 150.0, 149.4, 148.9, 148.2, 141.3, 140.0, 136.7, 136.4, 135.9, 135.4, 134.19, 134.15, 134.0, 133.4, 133.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.5, 131.3, 131.2, 129.05, 129.00, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.3, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 454.63 [M + H⁺], 455.63 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 454.1919 ; Found: 454.1920.



Chemical Formula: C₃₂H₂₅N₃O
Molecular Weight: 467.57 g/mol
Melting Point: 65-70 °C

(E)-1-(2-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenyl)ethan-1-one M34. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-acetylphenyl)boronic acid (41 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (122 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 18 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 70 mg of **M34** as a yellow solid (65% yield).

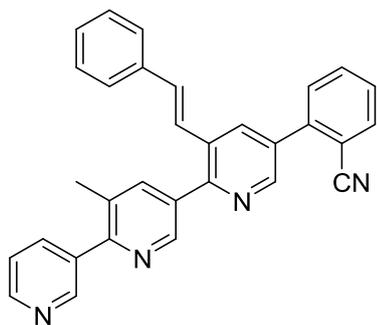
IR (KBr disc): 3409, 3022, 1686, 1590, 1414, 1245, 1012, 911, 765, 714, 692, 591 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.98 (dt, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.75 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.62 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.48 (dd, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.46–7.42 (m, 3H, H_{Ar}), 7.36–7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29–7.21 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 202.5 (C=O carbonyl), 155.3, 152.9, 150.0, 149.3, 148.28, 148.21, 140.0, 139.9, 136.8, 136.7, 136.6, 136.3, 136.0, 134.4, 134.3, 133.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.53, 131.51, 131.3, 131.2, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.6, 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 30.4 (COCH₃), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 468.64 [M + H⁺], 469.65 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 468.2076 ; Found: 478.2074.



Chemical Formula: C₃₁H₂₂N₄
Molecular Weight: 450.55 g/mol
Melting Point: 178-180 °C

(E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzonitrile M35. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (400 mg, 0.92 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere (2-cyanophenyl)boronic acid (150 mg, 1.01 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (54 mg, 0.047 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (493 mg, 2.33 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 3 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 72 mg of **M35** as a white solid (17% yield).

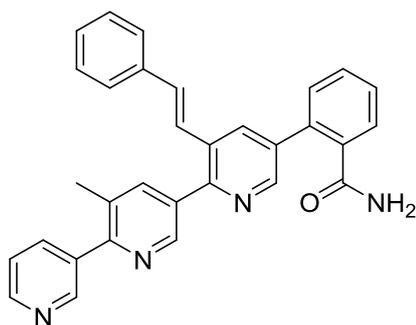
IR (KBr disc): 3024, 2221, 1593, 1572, 1447, 1417, 1385, 1197, 1073, 1015, 987, 916, 763, 745, 686 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.89 (dd, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.89 (dd, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.77 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.67 (dd, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.58 (td, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.49–7.43 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.38–7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 7.32–7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.4, 154.0, 150.0, 149.3, 148.2, 148.0, 141.4, 140.1, 136.9, 136.6, 136.0, 134.7, 134.26, 134.22, 133.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.4, 133.3, 131.9, 131.3, 130.1, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.6, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 118.4, 111.8, 20.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 451.63 [M + H⁺], 452.71 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 451.1923 ; Found: 451.1921.



Chemical Formula: C₃₁H₂₄N₄O

Molecular Weight: 468.56 g/mol

Melting Point: 110 °C

(E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzamide M36. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (400 mg, 0.92 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (2-cyanophenyl)boronic acid (150 mg, 1.01 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (54 mg, 0.047 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (493 mg, 2.33 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 3 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 8/2) to afford 220 mg of **M36** as a white solid (50% yield).

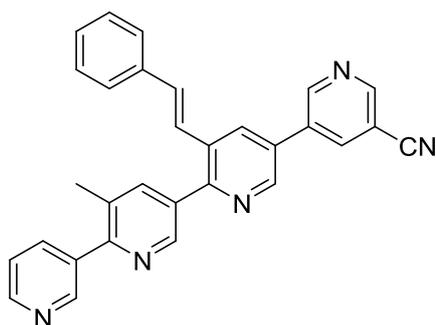
IR (KBr disc): 3300, 1666, 1598, 1492, 1449, 1415, 1382, 1074, 1015, 913, 764, 714, 692, 621 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.78 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.64 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.62 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.14 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99–7.93 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.67 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.58–7.52 (m, 1H, H_{Ar}), 7.48–7.44 (m, 2H, H_{Ar}), 7.44–7.39 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.30 (dd, *J* = 8.3, 6.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27–7.22 (m, 1H, H_{Ar}), 7.18 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.14 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.24 (d, *J* = 47.0 Hz, 2H, NH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.5 (C=O amide), 155.0, 152.7, 149.7, 149.0, 148.0, 147.9, 140.0, 136.9, 136.5, 135.9, 135.8, 135.4, 135.3, 134.4, 134.3, 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.5, 131.2, 130.8, 130.6, 128.8 (2 C_{Ar}H), 128.5, 128.47, 128.45, 126.8 (2 C_{Ar}H), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 20.0 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 469.60 [M + H⁺], 470.63 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 469.2028 ; Found: 469.2027.



Chemical Formula: C₃₀H₂₁N₅

Molecular Weight: 451.53 g/mol

Melting Point: 221-223°C

(E)-3'-Methyl-3''-styryl-[3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine]-5'''-carbonitrile M37. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (250 mg, 0.58 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere (5-cyanopyridin-3-yl)boronic acid (94 mg, 0.64 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (34 mg, 0.029 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (307 mg, 1.45 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 48 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 120 mg of **M37** as a white solid (46% yield).

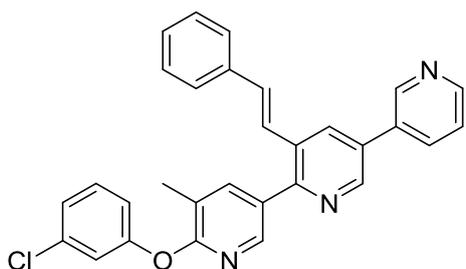
IR (KBr disc): 3062, 2234, 1592, 1493, 1449, 1416, 1378, 1014, 962, 899, 782, 763, 745, 617 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.17 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.98 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.91 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (dd, *J* = 2.5, 1.7 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.28 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.23 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.51–7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, *J* = 7.8, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.40–7.35 (m, 2H, H_{Ar}), 7.34–7.30 (m, 1H, H_{Ar}), 7.26 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.52 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.9, 154.8, 152.0, 151.6, 150.2, 149.6, 148.3, 146.8, 140.1, 137.7, 136.8, 136.4, 136.0, 134.04, 134.01, 133.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.0, 132.7, 131.5, 130.9, 129.2 (2 C_{Ar}H), 129.0, 127.2 (2 C_{Ar}H), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.5, 116.4, 110.8, 20.3 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 452.69 [M + H⁺], 453.68 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 452.1875 ; Found: 452.1877.



Chemical Formula: C₃₀H₂₂ClN₃O

Molecular Weight: 475.98 g/mol

Melting Point: 108-110 °C

(E)-6-(3-Chlorophenoxy)-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M39. To a reaction vessel containing (E)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (70 mg, 0.16 mmol) in DMF (2 mL), 3-chlorophenol (20 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv), copper(0) powder (1 mg, 0.016 mmol, 10%) and Cs₂CO₃ (156 mg, 0.48 mmol, 3.0 equiv) were added. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 24 h. The mixture was cooled to room temperature, quenched with NaOH 1M solution and extracted in DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford 46 mg of **M39** as a peach solid (60% yield).

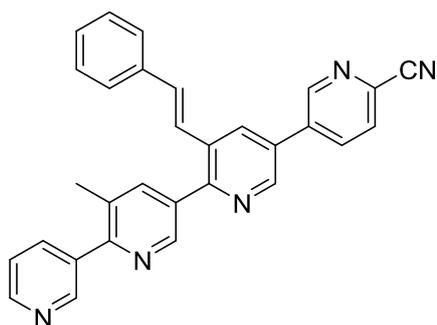
IR (KBr disc): 3039, 1585, 1472, 1417, 1398, 1300, 1252, 1207, 1156, 965, 886, 804, 772, 748, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.29 (dd, *J* = 2.2, 0.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01–7.96 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.49–7.42 (m, 3H, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.35 (td, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32–7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1H, H_{Ar}), 7.21 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.19–7.16 (m, 3H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.09 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 1.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 2.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 161.5, 155.0, 153.8, 149.6, 148.3, 146.9, 145.8, 141.3, 136.6, 134.9, 134.6, 133.2, 132.8, 132.7, 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 131.8, 130.9, 130.3, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.1, 124.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 122.1, 121.7, 119.5, 16.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 476.59 [M + H⁺], 478.56 [M⁺ + 2], 497.54 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 476.1530 ; Found: 476.1532.



Chemical Formula: C₃₀H₂₁N₅

Molecular Weight: 451.53 g/mol

Melting Point: 183-187 °C

(E)-3'-Methyl-3''-styryl-[3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine]-6'''-carbonitrile M40. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (250 mg, 0.58 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-cyanopyridin-3-yl)boronic acid (94 mg, 0.64 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (34 mg, 0.029 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (307 mg, 1.45 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 48 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 53 mg of **M40** as a white solid (20% yield).

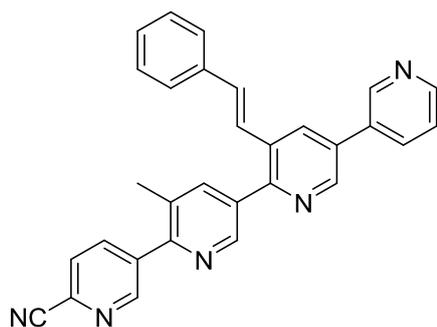
IR (KBr disc): 3430, 3029, 2234, 1591, 1416, 1015, 935, 847, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.08 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.91 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.26 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (dd, *J* = 8.0, 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01–7.97 (dt, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.89 (dd, *J* = 8.1, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.50–7.47 (m, 2H, H_{Ar}), 7.45 (ddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.38 (ddt, *J* = 9.1, 7.4, 1.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.35–7.30 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.8, 154.8, 150.1, 149.6, 149.5, 148.2, 146.8, 140.0, 136.7, 136.5, 136.3, 135.8, 135.3, 133.9, 133.86 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.5, 132.9, 132.5, 131.4, 131.3, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.9, 128.8, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 117.1, 20.2 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 452.62 [M + H⁺], 453.60 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 452.1875 ; Found: 452.1879.



Chemical Formula: C₃₀H₂₁N₅

Molecular Weight: 451.53 g/mol

Melting Point: 186-188 °C

(E)-3'-Methyl-3''-styryl-[3,2':5',2'':5'',3''']-quaterpyridine-6-carbonitrile M41. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (250 mg, 0.58 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (6-cyanopyridin-3-yl)boronic acid (94 mg, 0.64 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (34 mg, 0.029 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (307 mg, 1.45 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 48 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 40 mg of **M41** as a white solid (15% yield).

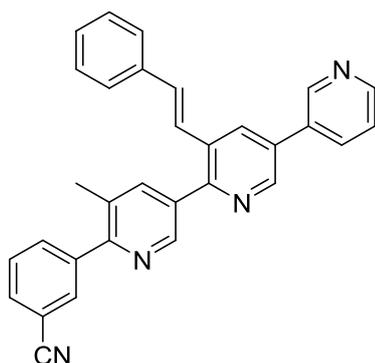
IR (KBr disc): 3421, 3031, 2960, 2230, 1586, 1491, 1448, 1422, 1381, 1361, 1191, 1194, 1024, 1011, 972, 916, 870, 750, 708 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.03 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.98 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.89 (dd, *J* = 2.2, 0.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.07 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.02 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.85 (dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.51–7.45 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.39–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.21 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.52 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 153.3, 153.1, 151.5, 149.8, 148.6, 148.4, 147.1, 140.3, 139.1, 137.7, 136.4, 135.2, 134.6, 133.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.3, 133.17, 133.10, 132.9, 132.3, 131.6, 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.8, 128.2, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.0, 117.3, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 452.57 [M + H⁺], 453.51 [M + 2H⁺], 474.57 [M + Na].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 452.1875 ; Found: 452.1879.



Chemical Formula: C₃₁H₂₂N₄
Molecular Weight: 450.55 g/mol
Melting Point: 119-121 °C

(E)-3-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)benzonitrile M43. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-cyanophenyl)boronic acid (35 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 98/2) to afford 60 mg of **M43** as a yellow solid (57% yield).

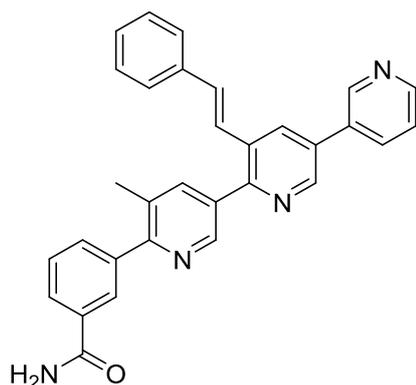
IR (KBr disc): 2922, 2227, 1585, 1452, 1415, 1385, 1144, 966, 895, 803, 762, 738, 685 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05–8.00 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.96 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.89 (dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.73 (dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.51–7.45 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.40–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.24 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.9, 153.4, 149.8, 149.1, 148.0, 147.8, 146.9, 141.3, 141.2, 140.1, 136.3, 135.0, 134.3, 133.5, 133.37 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.30, 132.8, 132.7, 132.1, 131.8, 130.9, 129.2 (2 C_{Ar}H), 128.9, 128.6, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.1, 112.5, 20.0 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 451.68 [M + H⁺], 452.80 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 451.1923 ; Found: 451.1926.



Chemical Formula: C₃₁H₂₄N₄O

Molecular Weight: 468.56 g/mol

Melting Point: 150 °C

(E)-3-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)benzamide M44. To a reaction vessel containing (E)-3-(5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)benzonitrile **M43** (50 mg, 0.11 mmol) in 2-methyl-2-propanol (10 mL), ^tBuOK (37 mg, 0.33 mmol, 3.0 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 30 °C for 4 days. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (acetone/MeOH 9/1) to afford 36 mg of **M44** as a white solid (64% yield).

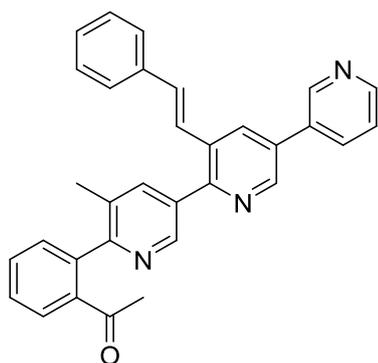
IR (KBr disc): 3150, 1691, 1626, 1380, 1025, 916, 805, 740, 683 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.79–8.75 (m, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.62 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.14 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.02 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, H_{Pyr}), 7.82 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.68 (dt, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.26 (dd, *J* = 8.3, 6.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.22–7.17 (m, 1H, H_{Ar}), 7.17–7.10 (m, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.60 (s, 1H, NH), 6.15 (s, 1H, NH), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 210.9 (C=O amide), 169.4, 157.4, 153.5, 149.5, 148.2, 147.7, 146.9, 140.4, 139.9, 136.4, 134.6, 133.8, 133.7, 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.8, 132.6, 132.5, 132.0, 131.0, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6 (2 C_{Ar}H), 128.2, 127.4, 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.7 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 469.68 [M + H⁺], 470.68 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 469.2028 ; Found: 469.2033.



Chemical Formula: C₃₂H₂₅N₃O

Molecular Weight: 467.57 g/mol

(E)-1-(2-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)phenyl)ethan-1-one M45. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (2-acetylphenyl)boronic acid (43 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) to afford 73 mg of **M45** as a yellow oil (65% yield).

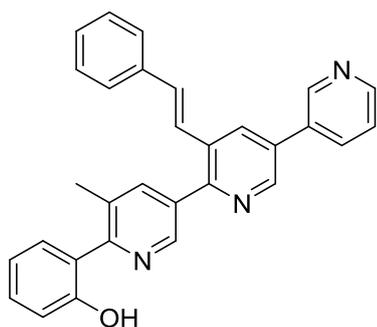
IR (KBr disc): 1686, 1419, 1252, 750 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.64 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.96–7.91 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.73 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.45 (dd, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.43–7.35 (m, 4H, H_{Ar}), 7.28 (dd, *J* = 8.3, 6.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.23–7.10 (m, 3H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 2.23 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 189.6 (C=O carbonyl), 158.9, 153.8, 149.6, 148.2, 147.2, 146.8, 139.6, 139.3, 138.9, 136.4, 134.5, 133.8, 133.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.9, 132.8, 132.5, 132.0, 131.4, 131.2, 130.1, 128.8 (2 C_{Ar}H), 128.7, 128.4, 128.3, 126.8 (2 C_{Ar}H), 124.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 29.3 (COCH₃), 19.5 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 468.61 [M + H⁺], 469.64 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 468.2076 ; Found: 468.2082.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O
Molecular Weight: 441.53 g/mol
Melting Point: 88°C

(E)-2-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)phenol M47. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (2-hydroxyphenyl)boronic acid (34 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 4 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 98/2) to afford 56 mg of **M47** as a white solid (56% yield).

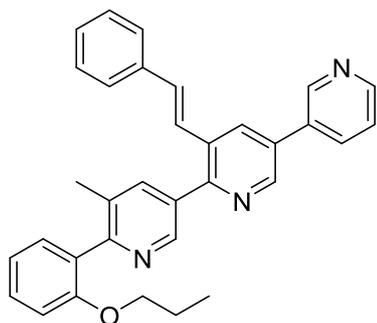
IR (KBr disc): 3434, 2954, 2923, 2852, 1577, 1491, 1449, 1420, 1291, 1254, 1212, 1107, 966, 750, 709 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.99 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.73 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.14 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.05 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.65 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.54–7.46 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.41–7.35 (m, 2H, H_{Ar}), 7.34–7.29 (m, 2H, H_{Pyr}, H_{Ar}), 7.24 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.11 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 2.68 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 158.0, 156.3, 153.1, 149.4, 148.0, 147.0, 145.1, 142.2, 138.2, 136.4, 135.0, 133.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 133.1, 133.0, 132.9, 132.2, 131.8, 131.0, 129.9, 129.1 (2 C_{Ar}H), 128.8, 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.5 (Ar-CH=CH-Pyr), 124.2, 121.3, 118.7, 118.3, 22.0 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.68 [M + H⁺], 443.70 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1916.



Chemical Formula: C₃₃H₂₉N₃O
Molecular Weight: 483.62 g/mol

(E)-5-Methyl-6-(2-propoxyphenyl)-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M49. To a reaction vessel containing (*E*)-2-(5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)phenol **M47** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 1-iodopropane (78 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 9/1) to afford 77 mg of **M49** as a yellow oil (80% yield).

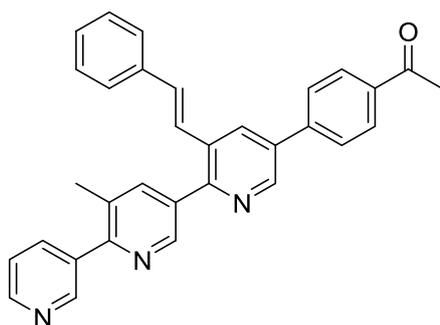
IR (KBr disc): 3032, 2964, 1600, 1494, 1448, 1419, 1380, 1271, 1233, 1118, 975, 711, 692 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.9, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.23 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.92 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.48–7.43 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.39–7.18 (m, 7H, 5 H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 3.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 2.28 (s, 3H, CH₃), 1.69 (h, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 157.4, 156.2, 154.3, 149.5, 148.3, 147.2, 146.8, 138.2, 136.6, 134.5, 133.3, 133.2, 132.8, 132.7, 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5, 131.9, 130.6, 129.9, 129.7, 128.8 (2 C_{Ar}H), 128.4, 126.8 (2 C_{Ar}H), 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 120.8, 112.1, 69.9 (OCH₂), 22.6 (CH₂-CH₃), 19.1 (CH₃), 10.6 (CH₂-CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 484.65 [M + H⁺], 485.77 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 484.2389 ; Found: 484.2392.



Chemical Formula: C₃₂H₂₅N₃O

Molecular Weight: 467.57 g/mol

Melting Point: 160 °C

(E)-1-(4-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenyl)ethan-1-one M50. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (E)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-acetylphenyl)boronic acid (43 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.011 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 1.45 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 9/1) to afford 31 mg of **M50** as a white solid (30% yield).

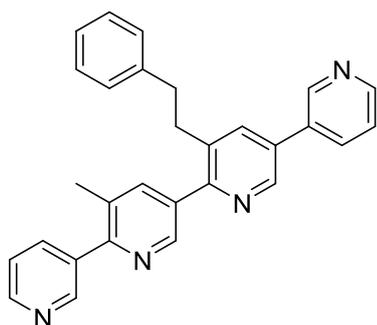
IR (KBr disc): 2922, 1682, 1605, 1572, 1450, 1412, 1382, 1296, 1014, 989, 903, 836, 817, 744 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.69 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16–8.11 (m, 2H, Ar-H), 8.04 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01 (dt, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.84–7.79 (m, 2H, H_{Ar}), 7.47 (tdd, *J* = 7.9, 4.3, 1.2 Hz, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.39–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.33–7.28 (m, 1H, H_{Ar}), 7.27 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.23 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.68 (s, 3H, COCH₃), 2.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 197.6 (C=O carbonyl), 155.3, 153.5, 149.9, 149.2, 148.2, 147.2, 141.9, 140.0, 136.9, 136.8, 136.5, 136.0, 135.0, 134.3, 133.2, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.1, 131.3, 129.3 (2 C_{Ar}H), 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.6, 127.5 (2 C_{Ar}H), 127.0 (2 C_{Ar}H), 124.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 26.9 (COCH₃), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 468.66 [M + H⁺], 469.78 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 468.2076 ; Found: 468.2081.



Chemical Formula: C₂₉H₂₄N₄
Molecular Weight: 428.54 g/mol
Melting Point: 90-92 °C

3'-Methyl-3''-phenethyl-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine M51. A reaction vessel containing a solution of pyridoclox (84 mg, 0.20 mmol) and Pd/C (10 %mol) in MeOH (20 mL) was bubbled with H₂ gas at 25 °C for 7 days. The solvent was removed under reduced pressure to give the crude residue which was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 90 mg of **M51** as a pale yellow solid (100% yield).

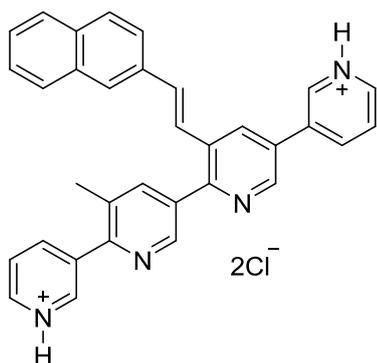
IR (KBr disc): 3430, 3034, 2925, 1592, 1451, 1415, 1388, 1015, 811, 713 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.88 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.83 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72–8.70 (m, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 2H, H_{Pyr}), 7.95 (dt, *J* = 7.8, 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.88 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.68 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.44 (ddt, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 2H, H_{Pyr}), 7.25–7.20 (m, 3H, H_{Ar}), 7.01 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.15 (t, *J* = 8.5, 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.92 (t, *J* = 8.5, 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.21, 155.20, 150.0, 149.6, 149.4, 148.3, 147.1, 145.9, 140.2, 139.4, 136.6, 136.5, 136.0, 135.2, 134.9, 134.5, 133.1, 132.7, 131.2, 128.7 (2 C_{Ar}H), 128.6 (2 C_{Ar}H), 126.5, 123.9, 123.3, 37.3 (Ar-CH₂), 34.4 (CH₂-Pyr), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 429.63 [M + H⁺], 430.66 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 429.2079 ; Found: 429.2078.



Chemical Formula: C₃₃H₂₆Cl₂N₄
Molecular Weight: 549.50 g/mol
Melting Point: 237-242 °C

(E)-3'-Methyl-3''-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine dihydrochloride M52. A solution of (E)-3'-methyl-3''-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine **M11** (100 mg, 0.21 equiv) in DCM (20 mL) was bubbled with HCl gas for 30 min to lead to the precipitation of product as a yellow solid (115 mg, 100% yield) which was filtered and dried in the oven at 40 °C.

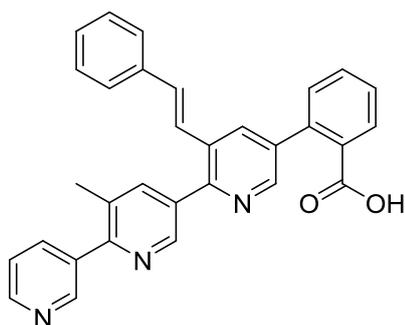
IR (KBr disc): 3384, 3057, 2589, 2023, 1633, 1609, 1544, 1459, 802, 750, 673 624, 481 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.57 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 9.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 9.20 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 9.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.99 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.88–8.84 (m, 1H, H_{Pyr}), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.17 (ddd, *J* = 11.7, 8.1, 5.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.05 (s, 1H, H_{Pyr}), 7.96–7.88 (m, *J* = 8.5, 7.8, 3.9 Hz, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.84 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.76 (dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53 (qd, *J* = 7.4, 7.0, 3.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.42 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.56 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 154.5, 153.2, 150.7, 146.6, 146.0, 145.9, 145.7, 144.2, 143.9, 142.5, 142.2, 142.2, 141.84, 141.81, 140.8, 140.7, 137.5, 136.29, 136.28, 135.7, 135.3, 133.0, 132.53, 132.49, 131.9, 129.5, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 126.7, 126.2, 18.0.

MS (ESI+): *m/z* 477.62 [M + H⁺], 478.65 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 239.1079 ; Found: 239.1067.



Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₃O₂

Molecular Weight: 469.54 g/mol

Melting Point: > 250 °C

(E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzoic acid M53. To a reaction vessel containing (E)-2-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)benzonitrile **M35** (100 mg, 0.22 mmol) in 1,4-dioxane/MeOH (9/1, 10 mL), NaOH (35 mg, 0.88 mmol, 4.0 equiv) was added. The reaction mixture was refluxed for 2 days. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 9/1) to afford 70 mg of **M53** as a white solid (68% yield).

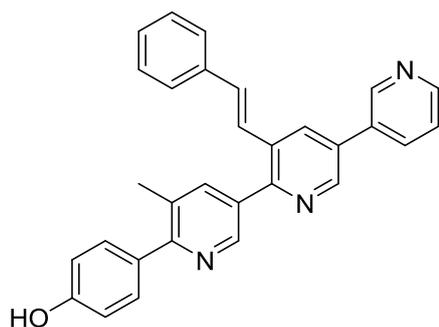
IR (KBr disc): 3040, 1675, 1609, 1593, 1452, 1416, 1350, 1174, 1015, 966, 918, 789, 761, 710, 689 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.00 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.92 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.91 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.80 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.58 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.03 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (dt, *J* = 7.8, 1.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.89 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.72–7.70 (m, 1H, H_{Ar}), 7.52–7.48 (m, 2H, H_{Ar}), 7.44 (ddd, *J* = 4.9, 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.38 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32–7.29 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25–7.20 (m, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 2.51 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 161.0, 154.9, 152.8, 149.1, 148.5, 147.3, 145.9, 138.9, 135.9, 135.7, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.5, 131.9, 131.0, 130.2, 128.8, 128.2, 128.1, 128.0 (2 C_{Ar}H), 127.8, 127.7, 127.5, 127.0, 125.9 (2 C_{Ar}H), 125.5, 124.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 121.6, 113.0, 19.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 470.45 [M + H⁺].

HRMS (ESI): *on going*.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O

Molecular Weight: 441.53 g/mol

Melting Point: 220-222 °C

(E)-4-(5-Methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)phenol M54. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine **6** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere, (4-hydroxyphenyl)boronic acid (34 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 24 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 97/3) to afford 49 mg of **M54** as a white solid (48% yield).

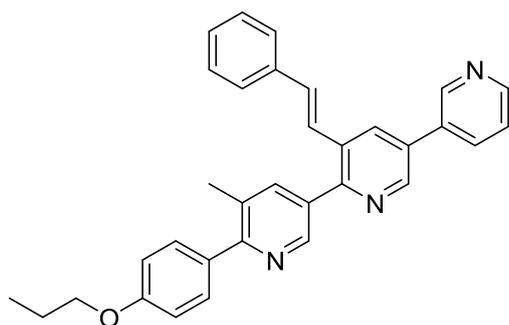
IR (KBr disc): 3024, 1609, 1587, 1516, 1447, 1419, 1379, 1281, 1245, 1172, 1151, 967, 934, 908, 841, 781, 747, 710, 692 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.99 (s, 1H, H_{Pyr}), 8.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.72 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.23 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.01 (ddd, *J* = 7.8, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.54–7.51 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49–7.45 (m, 3H, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.37–7.34 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31–7.27 (m, 2H, H_{Ar}, Ar-CH=CH-Pyr), 7.22 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 6.94–6.90 (m, 2H, Ar-H), 2.48 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 157.4, 155.2, 153.2, 148.7, 147.5, 146.8, 146.0, 138.8, 135.8, 133.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.4, 132.2, 132.1, 131.94, 131.92, 131.7, 131.1, 129.8 (2 C_{Ar}H), 129.7, 128.0 (2 C_{Ar}H), 127.6, 126.0 (2 C_{Ar}H), 124.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.1, 114.4 (2 C_{Ar}H), 19.4 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.58 [M + H⁺], 443.57 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1923.



Chemical Formula: C₃₃H₂₉N₃O

Molecular Weight: 483.62 g/mol

Melting Point: 65-68 °C

(E)-5-Methyl-6-(4-propoxyphenyl)-3'-styryl-3,2':5',3''-terpyridine M55. To a reaction vessel containing (E)-4-(5-methyl-3'-styryl-[3,2':5',3''-terpyridin]-6-yl)phenol **M54** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 1-iodopropane (78 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 5 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 98/2) to afford 62 mg of **M55** as a yellow solid (56% yield).

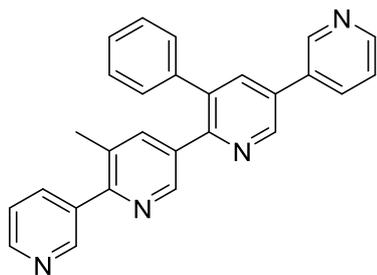
IR (KBr disc): 3028, 2961, 2873, 1607, 1511, 1449, 1420, 1379, 1303 1246, 1174, 1149, 1111, 974, 908, 835, 806, 749, 710, 691 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.81 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.00 (ddd, *J* = 7.9, 2.4, 1.6 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.97 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.61–7.56 (m, 2H, H_{Ar}), 7.50–7.44 (m, 3H, 2 H_{Ar}, H_{Pyr}), 7.38–7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31–7.26 (m, 2H, Ar-CH=CH-Pyr, H_{Ar}), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.04–6.98 (m, 2H, H_{Ar}), 3.99 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 2.49 (s, 3H, CH₃), 1.84 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.3, 158.3, 154.0, 149.6, 148.3, 147.7, 146.9, 139.7, 136.6, 134.6, 133.2, 133.0, 132.9 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.7, 132.6, 132.4, 132.0, 130.7, 130.5 (2 C_{Ar}H), 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.9, 114.3 (2 C_{Ar}H), 69.6 (OCH₂), 22.7 (CH₂-CH₃), 20.5 (CH₃), 10.6 (CH₂-CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 484.65 [M + H⁺], 485.64 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 484.2389 ; Found: 484.2390.



Chemical Formula: C₂₇H₂₀N₄
Molecular Weight: 400.49 g/mol
Melting Point: 158-162 °C

3'-Methyl-3''-phenyl-3,2':5',2'':5''',3'''-quaterpyridine M56. To a microwave sealed tube containing 5,6'-dibromo-5'-methyl-3-phenyl-2,3'-bipyridine **30** (100 mg, 0.25 mmol) in 1,4-dioxane (10 mL), pyridin-3-ylboronic acid (70 mg, 0.28 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (30 mg, 0.013 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (265 mg, 0.63 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was irradiated at 100 °C for 2 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 46 mg of **M56** as a brown solid (46% yield).

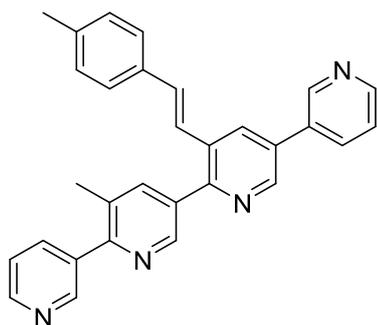
IR (KBr disc): 3031, 1586, 1569, 1475, 1422, 1410, 1377, 1188, 1150, 1093, 1005, 911, 809, 791, 762, 604 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.96 (m, 2H, H_{pyr}), 8.80 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.70 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.63 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.43 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.01–7.96 (m, 2H, H_{pyr}), 7.89 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.84 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.46 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H_{pyr}), 7.38 (m, 4H, H_{pyr}, 3 H_{Ar}), 7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 2.36 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 154.5, 153.2, 150.0, 149.7, 149.2, 148.4, 148.3, 147.0, 139.9, 138.8, 137.2, 136.9, 136.8, 135.9, 134.6, 134.4, 132.9, 132.6, 130.8, 129.5 (2 C_{Ar}H), 129.0 (2 C_{Ar}H), 128.3, 124.0, 123.3, 20.0 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 401.59 [M + H⁺], 402.57 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 401.1766 ; Found: 401.1766.



Chemical Formula: C₃₀H₂₄N₄
Molecular Weight: 440.55 g/mol
Melting Point: 176-180 °C

(E)-3'-Methyl-3''-(4-methylstyryl)-3,2':5',2'':5'',3'''-quaterpyridine M57. To a microwave sealed tube containing (*E*)-6-bromo-5-methyl-3'-(4-methylstyryl)-3,2':5',3''-terpyridine **21c** (140 mg, 0.32 mmol) in 1,4-dioxane (15 mL), pyridin-3-ylboronic acid (43 mg, 0.35 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (19 mg, 0.016 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (170 mg, 0.8 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was irradiated at 100 °C for 2 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to afford 56 mg of **M57** as a white solid (40% yield).

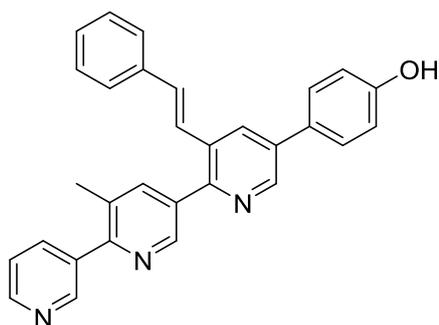
IR (KBr disc): 3019, 1613, 1574, 1481, 1442, 1416, 1393, 1378, 1334, 1181, 1126, 1030, 1014, 970, 928, 802, 782, 769, 705, 617 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.87–8.84 (m, 2H, H_{Pyr}), 8.71 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.23 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.03–7.96 (m, 3H, H_{Pyr}), 7.46 (ddd, *J* = 13.2, 7.8, 4.9 Hz, 2H, H_{Pyr}), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.20 (s, 2H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 155.3, 153.4, 150.0, 149.6, 149.3, 148.3, 148.2, 146.8, 139.9, 138.7, 136.7, 136.0, 134.6, 134.4, 133.8, 133.25, 133.23, 133.0 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.6, 132.3, 131.3, 129.6 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 124.0, 123.7, 123.4 (Ar-CH=CH-Pyr), 21.4 (Ph-CH₃), 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 441.60 [M + H⁺], 442.58 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 441.2079 ; Found: 441.2079.



Chemical Formula: C₃₀H₂₃N₃O

Molecular Weight: 441.53 g/mol

Melting Point: 85-89 °C

(E)-4-(5'-Methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol M58. Following *procedure B*, to a reaction vessel containing (*E*)-5-bromo-5'-methyl-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine **10** (100 mg, 0.23 mmol) in 1,4-dioxane under nitrogen atmosphere 4-(hydroxyphenyl)boronic acid (34 mg, 0.25 mmol, 1.1 equiv), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13 mg, 0.012 mmol, 5 mol%) and K₃PO₄ (124 mg, 0.58 mmol, 2.5 equiv) were added. The reaction mixture was refluxed for 2 h, followed by TLC. The crude residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 97/3) to afford 91 mg of **M58** as a white solid (90% yield).

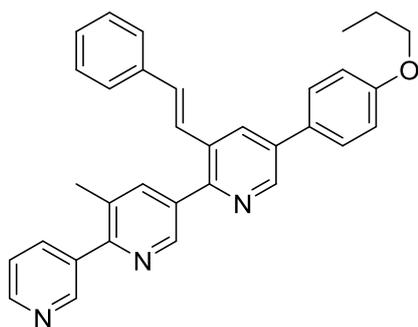
IR (KBr disc): 3025, 1609, 1590, 1492, 1517 1448, 1416, 1392, 1275, 1235, 1174, 1020, 966, 908, 831, 748, 728, 713, 690 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.04–7.99 (m, 2H, H_{Pyr}), 7.55–7.51 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49–7.43 (m, 3H, H_{Pyr}, 2 H_{Ar}), 7.36–7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29–7.26 (m, 1H, H_{Ar}), 7.23 (d, *J* = 16.3, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.19 (d, *J* = 16.3, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.01–6.95 (m, 2H, H_{Ar}), 2.47 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 157.7, 154.7, 151.6, 149.6, 148.9, 148.1, 146.8, 140.1, 137.2, 136.7, 136.2, 136.1, 134.7, 132.8 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.1, 131.8, 131.4, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.6, 128.5 (2 C_{Ar}H), 128.5, 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.1 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.6 (2 C_{Ar}H), 116.5, 20.1 (CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 442.54 [M + H⁺], 443.61 [M + 2H⁺].

HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 442.1919 ; Found: 442.1920.



Chemical Formula: C₃₃H₂₉N₃O

Molecular Weight: 483.62 g/mol

Melting Point: 134-138 °C

(E)-5'-Methyl-5-(4-propoxyphenyl)-3-styryl-2,3':6',3''-terpyridine M59. To a reaction vessel containing (E)-4-(5'-methyl-3-styryl-[2,3':6',3''-terpyridin]-5-yl)phenol **M58** (100 mg, 0.23 mmol) in DMF (10 mL), 1-iodopropane (78 mg, 0.46 mmol, 2.0 equiv) and K₂CO₃ (127 mg, 0.92 mmol, 4.0 equiv) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude residue which was purified by column chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 95/5) to afford 61 mg of **M59** as a white solid (55% yield).

IR (KBr disc): 3418, 3042, 2963, 2934, 2877, 1609, 1586, 1574, 1516, 1450, 1423, 1411, 1391, 1283, 1244, 1181, 1046, 1017, 963, 910, 823, 765, 747, 714, 689 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.90 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.85 (dd, *J* = 2.2, 1.1 Hz, 2H, H_{Pyr}), 8.68 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{Pyr}), 8.02 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.99 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.66–7.62 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49–7.46 (m, 2H, H_{Ar}), 7.44 (ddd, *J* = 7.8, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H_{Pyr}), 7.38–7.33 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30 (m, 1H, H_{Ar}), 7.26 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.08–7.04 (m, 2H, H_{Ar}), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 2.49 (s, 3H, CH₃), 1.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.7, 155.1, 152.0, 150.0, 149.3, 148.3, 147.0, 139.9, 136.83, 136.80, 136.1, 135.9, 134.6, 132.6 (Ar-CH=CH-Pyr), 132.1, 131.7, 131.2, 129.5, 128.9 (2 C_{Ar}H), 128.5, 128.4 (2 C_{Ar}H), 126.9 (2 C_{Ar}H), 125.3 (Ar-CH=CH-Pyr), 123.4, 115.3 (2 C_{Ar}H), 69.8 (OCH₂), 22.7 (CH₂CH₃), 20.1 (CH₃), 10.6 (CH₂CH₃).

MS (ESI+): *m/z* 484.59 [M + H⁺], 485.57 [M + 2H⁺].

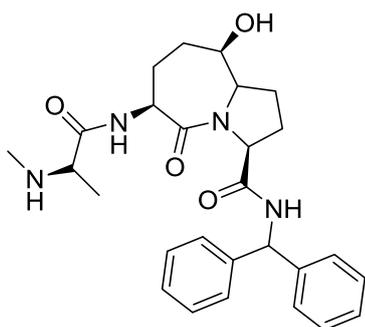
HRMS (ESI): *m/z* Calcd. for [M+H]⁺: 484.2389 ; Found: 484.2385.

Synthèse d'inhibiteurs de XIAP

General Methods

Unless otherwise specified, all non-aqueous reactions were performed under an inert argon atmosphere. All glassware was dried with a flame under flushing argon gas or stored in the oven, and let cool under an inert atmosphere prior to use. Anhydrous solvents (THF, DCM, CH₃CN and DMF) were obtained by passage through solvent filtration systems (Glass Contour, Irvine, CA) and solvents were transferred by syringe. Flash chromatography was performed on 230–400 mesh silica gel, and thin-layer chromatography was performed on alumina plates coated with silica gel (Merck 60 F254 plates). Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance or staining with ceric ammonium molybdate or potassium permanganate solutions. Melting points were obtained on a Büchi melting point B-540 apparatus and are uncorrected. Specific rotations, $[\alpha]_D$ values, were calculated from optical rotations measured at 25 °C in CHCl₃ or MeOH at the specified concentrations (*c* in g/100 ml) using a 0.5-dm cell length (*l*) on a Anton Paar Polarimeter, MCP 200 at 589 nm, using the general formula: $[\alpha]_D 25 = (100 \times \alpha)/(l \times c)$. Accurate mass measurements were performed on an LC-MSD instrument in electrospray ionization (ESI-TOF) mode at the Université de Montréal Mass Spectrometry facility. Sodium adducts $[M + Na]^+$ were used for empirical formula confirmation. Nuclear magnetic resonance spectra (¹H, ¹³C) were recorded on Bruker 400, 500 and 700 MHz spectrometers. ¹H-NMR spectra were referenced to CDCl₃ (7.26 ppm), CD₃OD (3.31 ppm), DMSO-d₆ (2.50 ppm) or (CD₃)₂CO (2.05 ppm) and ¹³C-NMR spectra were measured in CDCl₃ (77.16 ppm), CD₃OD (49.0 ppm), DMSO-d₆ (39.52 ppm) or (CD₃)₂CO (29.84 ppm) as specified below. Coupling constant *J* values were measured in Hertz (Hz) and chemical shift values in parts per million (ppm). Infrared spectra were recorded in the neat on a Perkin Elmer Spectrometer FT-IR instrument, and are reported in reciprocal centimeters (cm⁻¹). Analytical HPLC, 10 to 90% methanol (or acetonitrile) (0.1% FA) in water (0.1% FA) over 12 min followed by 90% methanol (or acetonitrile) (0.1% FA) in water (0.1% FA) over 1 min, flow rate of 0.5 mL/min on a SunFire reverse-phase column from Waters (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm, C18). Only new compounds are described below.

Intermédiaires



Chemical Formula: C₂₇H₃₄N₄O₄

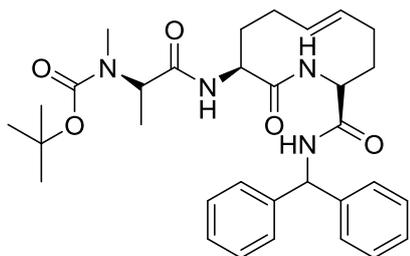
Molecular Weight: 478.59 g/mol

(3S,6S,9R)-N-Benzhydryl-9-hydroxy-6-((S)-2-(methylamino)propanamido)-5-oxooctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a]azepine-3-carboxamide 50. To a solution of **46** (50 mg, 0.15 mmol, prepared according to reference 241b) in 1.5 mL of 1,4-dioxane were added 0.5 mL of a 2 N LiOH solution. The mixture was stirred at room temperature for 2 h and then neutralized with 1 N HCl to pH 4. The mixture was extracted

with ethyl acetate (3 x 15 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give compound **47** (ESI MS: *m/z* 327 [M - H]⁻), which was used in the following step without purification.

To a solution of compound **47** in THF (3 mL) were added 3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (DEPBT) (90 mg, 0.31 mmol, 2.0 equiv) and *N,N*-diisopropylethylamine (55 μL, 0.31 mmol, 2.0 equiv). This mixture was stirred 15 minutes before addition of *N*-(diphenylmethyl) amine (42 mg, 0.23 mmol, 1.5 equiv). The mixture was stirred at room temperature overnight and then extracted with ethyl acetate (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give compound **48** (ESI MS: *m/z* 494 [M + H]⁺, 516 [M + Na]⁺), which was used in the following step without purification.

A solution of compound **48** in DCM (10 mL) at 0°C was bubbled with HCl gas for 2 h, then solvent was removed and the obtained ammonium salt was dissolved in DCM (10 mL). TBTU (58 mg, 0.18 mmol, 1.2 equiv) and HOBt (25 mg, 0.18 mmol, 1.2 equiv) were added, the mixture was stirred for 15 minutes before addition of Boc-*N*-methyl-*L*-alanine (46 mg, 0.23 mmol, 1.5 equiv) and *N,N*-diisopropylethylamine (80 μL, 0.45 mmol, 3.0 equiv). The mixture was stirred at room temperature overnight and then concentrated under reduced pressure. The crude containing compound **49** (ESI MS: *m/z* 579 [M + H]⁺) was dissolved in DCM (10 mL) and treated with HCl gas at 0 °C for 2 h. The solvent was evaporated and the crude was purified by HPLC affording 15 mg of a white powder. The NMR analysis (¹H, ¹³C) of obtained revealed only 20% of desired compound **50**, mixed with an unknown compound.



Chemical Formula: C₃₂H₄₂N₄O₅

Molecular Weight: 562.71 g/mol

Melting Point: 131-135 °C

Tert-butyl((S)-1-(((3S,10R,E)-10-(benzhydrylcarbamoyl)-2-oxo-1,2,3,4,5,8,9,10-octahydrozecin-3-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)carbamate 53.

To a solution of **44** (800 mg, 2.0 mmol, prepared according to reference 241b) in 20 mL of 1,4-dioxane were added 6 mL of a 2 N LiOH solution. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then neutralized with 1 N HCl until pH 4. The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 150 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give compound **51** (ESI MS: *m/z* 311 [M - H]⁻), which was used in the following step without purification.

To a solution of compound **51** in THF (3 mL) were added TBTU (770 mg, 2.4 mmol, 1.2 equiv) and HOBt (324 mg, 2.4 mmol, 1.2 equiv), the mixture was stirred for 15 minutes before addition of *N*-(diphenylmethyl) amine (550 mg, 3 mmol, 1.5 equiv) and *N,N*-diisopropylethylamine (1 mL, 5.7 mmol, 2.9 equiv). The mixture was stirred at room temperature overnight, then extracted with ethyl acetate (3 x 150 mL), the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give compound **52** (ESI MS: *m/z* 478 [M + H]⁺, 500 [M + Na]⁺), which was used in the following step without purification.

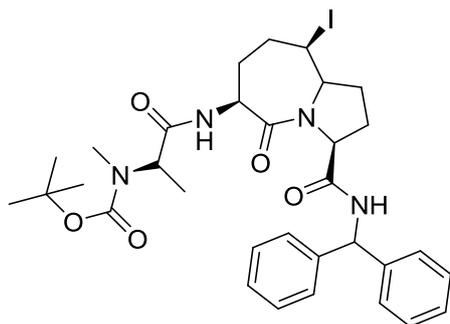
A solution of compound **52** in DCM (30 mL) at 0°C was bubbled with HCl gas for 2 h, then solvent was removed and the obtained ammonium salt was dissolved in DCM (30 mL). TBTU (240 mg, 0.72 mmol, 1.2 equiv) and HOBt (100 mg, 0.72 mmol, 1.2 equiv) were added, the mixture was stirred for 15 minutes before addition of Boc-*N*-methyl-*L*-alanine (183 mg, 0.9 mmol, 1.5 equiv) and *N,N*-diisopropylethylamine (300 μL, 3.0 equiv). The mixture was stirred at room temperature overnight and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography (DMC/MeOH 99/1) to give 250 mg of **53** as a white foam (22% yield).

[α]_D²⁵ - 28.8 (c = 0.7, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.28–7.19 (m, 10H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.91 (s, br, 1H), 6.63 (s, br, 1H), 6.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.49–5.32 (m, 2H), 4.58 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H), 4.43–4.34 (m, 2H), 2.40 (dt, *J* = 27.8, 14.1 Hz, 3H), 2.24 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.17–2.01 (m, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.67 (dd, *J* = 14.2, 4.4 Hz, 1H), 1.62–1.55 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.1, 172.5, 170.6, 141.7, 141.6, 133.0, 128.7 (2C), 128.7 (2C), 127.9, 127.5 (2C), 127.4 (2C), 127.3 (2C), 81.4, 56.7, 55.6, 54.8, 53.5, 52.7, 32.1, 31.7, 29.7, 29.2, 28.6, 28.5 (3C), 13.5.

ESI MS: *m/z* 463 [M - Boc]⁺, 563 [M + H]⁺, 586 [M + Na]⁺.



Chemical Formula: C₃₂H₄₁IN₄O₅

Molecular Weight: 688.61 g/mol

Melting Point: 98-101 °C

Tert-butyl-((2S)-1-(((3S,6S,9R)-3-(Benzhydrylcarbamoyl)-9-iodo-5-oxooctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a]azepin-6-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)carbamate 54. A solution of compound **53** (110 mg, 0.2 mmol) in acetonitrile (5 mL) was treated with NaHCO₃ (50 mg, 0.6 mmol, 3.0 equiv), followed by iodine (152 mg, 0.6 mmol, 3.0

equiv) in three portions. The mixture was stirred for 20 min at room temperature, then treated with 1 M aqueous solution of Na₂S₂O₃ until purple solution became clear. The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated in *vacuo*. Purification by chromatography (*n*-hexane/ethyl acetate 4/6 to 100% ethyl acetate) afforded 70 mg of **54** as yellow foam (50% yield).

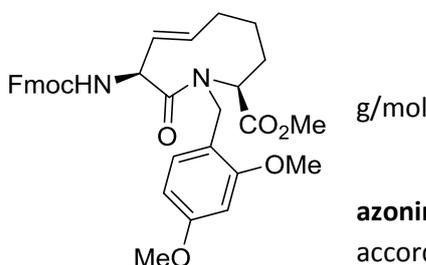
[α]_D²⁵ -78.8 (c = 0.7, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (s, 1H), 7.41–7.38 (m, 2H), 7.35 (ddd, *J* = 13.5, 7.3, 2.0 Hz, 2H), 7.28 (td, *J* = 7.1, 6.4, 1.4 Hz, 1H), 7.25–7.22 (m, 2H), 7.19–7.16 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.35 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.80–4.73 (m, 1H), 4.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.23 (dt, *J* = 10.2, 4.7 Hz, 1H), 4.09 (dt, *J* = 10.2, 5.9 Hz, 1H), 2.52–2.42 (m, 3H), 2.27–2.20 (m, 1H), 2.19–2.12 (m, 3H), 2.09–1.87 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.85 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS) δ 172.8, 170.5, 169.9, 141.7, 128.7 (2C), 128.3 (2C), 128.3 (2C), 127.6 (2C), 127.4 (2C), 126.9 (2C), 81.1, 77.4, 64.6, 62.1, 56.5, 56.4, 34.4, 33.8, 32.7, 30.6, 28.5 (3C), 26.6, 26.2, 13.1.

ESI MS: *m/z* 463 [M - Boc]⁺, 563 [M +

H]⁺, 586 [M + Na]⁺.



Chemical Formula: C₃₄H₃₆N₂O₇

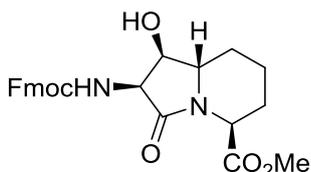
Molecular Weight: 584.67

g/mol

(3S,9S,Z)-Methyl-3-(N-Fmoc-amino)-1,2,3,6,7,8,9-heptahydro-1H-65 (570 mg, 0.93 mmol, prepared

1-(2,4-dimethoxybenzyl)-2-oxazonine-9-carboxylate 66. Dipeptide according to reference 243a) was

dissolved in 1,2-dichloroethane (2 L), treated with the Grubbs second-generation catalyst (119 mg, 0.14 mmol, 15 mol%), heated at reflux, and stirred for 8 h. Then reaction was cooled and Grubbs second-generation catalyst was added (79 mg, 0.09 mmol, 10 mol%). The reaction was heated at reflux, and stirred again for 8 h. After completion of the reaction, the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was taken up in a minimum volume of DCM, applied onto a silica gel column, and eluted with 35-40% ethyl acetate in *n*-hexane. Evaporation of the collected fractions afforded 380 mg of **66** (70% yield). Spectroscopic data was in accordance with ref 243a.



Chemical Formula: C₂₅H₂₆N₂O₆

Molecular Weight: 450.49 g/mol

Melting Point: 80-83 °C

Methyl (1R,2S,5S,8S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-

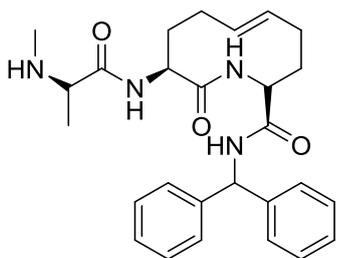
1-hydroxy-3-oxooctahydroindolizine-5-carboxylate 71. To a solution of **70** (200 mg, 0.36 mmol, prepared according to reference 243b) in 5 mL of acetonitrile, were added silver trifluoromethanesulfonate (275 mg, 1.01 mmol, 3.0 equiv) and water (65 µL, 10.0 equiv). The mixture was stirred at reflux for 48 h, followed by TLC (revealed by ninhydrin solution). Mixture was concentrated under reduced pressure and the crude compound was purified by column chromatography (DCM/MeOH 100/0 to 85/15), affording to afford 97 mg of compound **71** as an off-white solid (60% yield).

[α]_D²⁵ -30.6(c = 0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.61 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.32 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.39 (s, 1H, NH), 4.92 (s, 1H), 4.46 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, OCH₂), 4.34 (s, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.71 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 2.76 (s, 3H, OCH₃), 2.58 (s, 1H, NH), 2.21 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 1.98 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 1.84 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 1.49 (t, *J* = 13.4 Hz, 1H), 1.25 (s, 1H), 1.19 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H).

¹³C-NMR (176 MHz, CDCl₃) δ 170.8 (C=O), 169.0 (C=O), 157.3 (C=O), 143.9 (C_{Ar}), 143.7 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 127.9 (2 CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 125.3 (CH_{Ar}), 125.2 (CH_{Ar}), 120.14 (CH_{Ar}), 120.11 (CH_{Ar}), 70.1, 67.6, 61.5, 55.5, 52.8 (OCH₂), 51.8, 47.3, 28.6, 26.5, 21.0 (CH₃).

Mimes contraints d'AVPI



Chemical Formula: C₂₇H₃₄N₄O₃

Molecular Weight: 462.59 g/mol

Melting Point: 120-125 °C

(2R,9S,E)-N-Benzhydryl-9-((S)-2-(methylamino)propanamido)-10-oxo-1,2,3,4,7,8,9,10-octahydroazecine-2-carboxamide M60. A solution of compound **53** (80 mg, 0.14 mmol) was in DCM (20 mL) and treated with HCl

gas at 0 °C for 2 h. The solvent was evaporated and the crude was purified on a preparative reverse phase HPLC column (Phenomenex Gemini 5 μm, C18, 250 mm _ 21.2 mm) using a solvent gradient from 20% to 80% MeOH (containing 0.1% formic acid) in water (containing 0.1% FA), obtaining 50 mg of **M60** (77% yield).

IR : 3290, 3031, 2921, 2078, 1631, 1587, 1535, 1449, 1377, 1346, 1229, 1163, 1108, 1052, 1032, 988, 907, 841, 752, 734, 697, 600, 559, 473, 406.

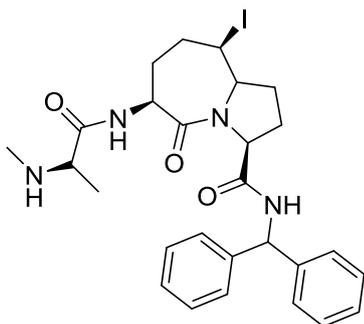
[α]_D²⁵ 26.6 (c 0.16, MeOH)

¹H-NMR (700 MHz, MeOD) δ 8.53 (s, 1H, NH), 7.34–7.29 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.27–7.24 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.23–7.20 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.11 (s, 1H), 5.57 (td, *J* = 12.0, 10.7, 5.9 Hz, 1H, CH=CH), 5.36 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH=CH), 4.71 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H, NH-CH₃), 2.38–2.28 (m, 3H), 2.19–2.10 (m, 2H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.79 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 1.71 (q, *J* = 12.9 Hz, 1H), 1.44 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH-CH₃).

¹³C-NMR (176 MHz, MeOD) δ 174.0 (C=O), 173.2 (C=O), 172.7 (C=O), 142.0 (C_{Ar}), 142.6 (C_{Ar}), 133.7 (CH=CH), 129.61 (4 CH_{Ar}), 128.73 (CH=CH), 128.5 (2 CH_{Ar}), 128.43 (2 CH_{Ar}), 128.39 (2 CH_{Ar}), 59.0, 58.1, 55.3, 54.5, 32.9 (CH₃-NH), 32.2, 31.4, 30.9, 29.0, 17.5 (CH₃).

ESI MS: *m/z* 463 [M + H]⁺, 464 [M + 2H]⁺

HPLC-MS (ESI+): *m/z* 463.2688



Chemical Formula: C₂₇H₃₃IN₄O₃

Molecular Weight: 588.49 g/mol

Melting Point: 125-127 °C

(3S,6S,9R)-N-Benzhydryl-9-iodo-6-((S)-2-(methylamino)propanamido)-5-oxooctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a]zepine-3-carboxamide M61. Compound **54** (70 mg, 0.10 mmol) was dissolved in DCM (10 mL) and treated with HCl gas at 0 °C for 2 h to obtain the ammonium salt. The solvent was evaporated and the crude was purified on a preparative reverse phase

HPLC column (Phenomenex Gemini 5 μm, C18, 250 mm _ 21.2 mm) using a solvent gradient from 20% to 80% MeOH (containing 0.1% formic acid) in water (containing 0.1% FA), obtaining 55 mg of **M61** (93 % yield).

IR : 3290, 3030, 1986, 1633, 1538, 1494, 1446, 1415, 1349, 1245, 1183, 1135, 1097, 1030, 914, 824, 740, 697, 639, 602, 558, 473.

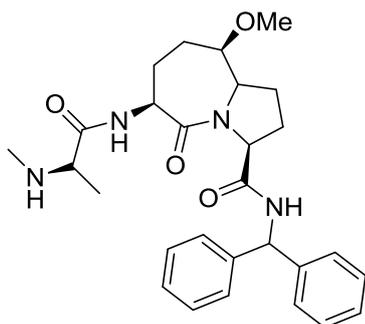
[α]_D²⁵ -81.6 (c 0.16, MeOH)

¹H-NMR (700 MHz, MeOD) δ 7.35–7.29 (m, 4H, H_{Ar}), 7.28–7.23 (m, 6H, H_{Ar}), 6.13 (s, 1H), 4.70–4.65 (m, 2H), 4.52 (dd, *J* = 9.4, 6.6 Hz, 1H), 4.45 (dt, *J* = 10.4, 4.9 Hz, 1H), 3.52 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.50–2.47 (m, 1H), 2.46 (s, 3H, NH-CH₃), 2.40–2.35 (m, 1H), 2.31–2.19 (m, 3H), 2.06–2.01 (m, 1H), 1.99–1.93 (m, 1H), 1.88–1.85 (m, 1H), 1.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH-CH₃).

¹³C-NMR (176 MHz, MeOD) δ 171.8 (C=O), 170.9 (C=O), 170.2 (C=O), 141.5 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 128.2 (2 CH_{Ar}), 128.0 (2 CH_{Ar}), 127.5 (2 CH_{Ar}), 127.4 (2 CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 63.2, 62.4, 57.5, 56.9, 54.7, 33.9, 33.5, 32.9, 31.2 (NH-CH₃), 26.04, 25.7, 15.7 (CH₃).

ESI MS: *m/z* 589 [M - Boc]⁺, 689 [M + H]⁺, 711 [M + Na]⁺

HPLC-MS (ESI+): *m/z* 589.1639



Chemical Formula: C₂₈H₃₆N₄O₄

Molecular Weight: 492.62 g/mol

Melting Point: 105-107 °C

(3S,6S,9R)-N-Benzhydryl-9-methoxy-6-((S)-2-(methylamino)propanamido)-5-oxooctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a]azepine-3-carboxamide M62. Silver trifluoromethanesulfonate (77 mg, 0.33 mmol) was flame-dried in a round bottom flask under argon flow, allowed to cool to room temperature, treated with a solution of compound **54** (74 mg, 0.11 mmol) in methanol (20 mL), stirred at room temperature overnight, and concentrated to dryness. The mixture was taken up in MeOH and filtered through a plug of Celite. The solvent was evaporated and the crude was purified on a preparative reverse phase HPLC column (Phenomenex Gemini 5 μm, C18, 250 mm × 21.2 mm) using a solvent gradient from 20% to 80% MeOH (containing 0.1% FA) in water (containing 0.1% formic acid), obtaining 40 mg of **M62** (81 % yield).

IR : 3303, 3064, 2934, 1985, 1651, 1539, 1495, 1450, 1380, 1245, 1197, 1158, 1098, 1029, 916, 851, 740, 699, 637, 573, 541, 516, 466, 410.

[α]_D²⁵ -43.2 (c 0.16, MeOH)

¹H-NMR (700 MHz, MeOD) δ 7.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31–7.25 (m, 7H, H_{Ar}), 7.24–7.21 (m, 1H, H_{Ar}), 6.14 (s, 1H), 4.47 (dd, *J* = 8.2, 6.0 Hz, 1H), 4.34 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.65 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.48 (ddd, *J* = 9.3, 7.6, 4.9 Hz, 1H), 3.38 (dt, *J* = 9.2, 6.5 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H, OCH₃), 2.60 (s, 3H, NH-CH₃), 2.21 (ddt, *J* = 15.0, 10.4, 5.3 Hz, 1H), 2.17–2.13 (m, 1H), 2.10–2.01 (m, 2H), 1.94 (dtd, *J* = 13.1, 7.7, 5.0 Hz, 1H), 1.90–1.83 (m, 2H), 1.53 (dq, *J* = 12.4, 6.0 Hz, 1H), 1.48 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH-CH₃).

¹³C-NMR (176 MHz, MeOD) δ 173.1 (C=O), 171.5 (C=O), 171.3 (C=O), 143.2 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 129.6 (2 CH_{Ar}), 129.4 (2 CH_{Ar}), 128.83 (2 CH_{Ar}), 128.79 (2 CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 79.3, 58.9, 58.4, 58.3, 58.2, 56.8 (OCH₃), 51.0, 32.3 (NH-CH₃), 25.9, 25.6, 24.2, 23.8, 16.7 (CH₃).

ESI MS: *m/z* 493 [M + H]⁺, 515 [M + Na]⁺

HPLC-MS (ESI+): *m/z* 493.2810

Annexes

A. Conception d'inhibiteurs des protéines Mcl-1 et Bcl-x_L

1. Résultats biologiques de certains composés **M**

(impédancemétrie)

1. 1. Test en présence d'ABT et de S63845

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 en présence de 1 µM de S63845 : Mcl-1 est inhibée.
- en bleu, les cellules cancéreuses sont en présence de 5 µM de l'ABT-737 : Bcl-x_L est inhibée.
- en vert, les cellules cancéreuses sont en présence de S63845 (1 µM) et de l'ABT-737 (5 µM) : l'index cellulaires chute. **Ce résultat est attendu car l'activité anti-apoptotique des 2 protéines de survie est inhibée.**

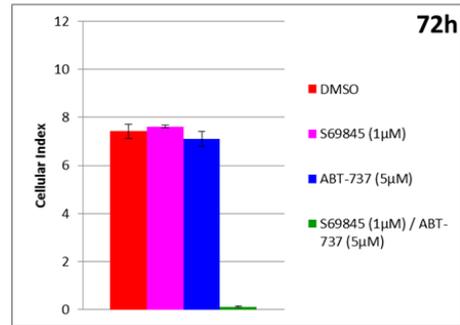
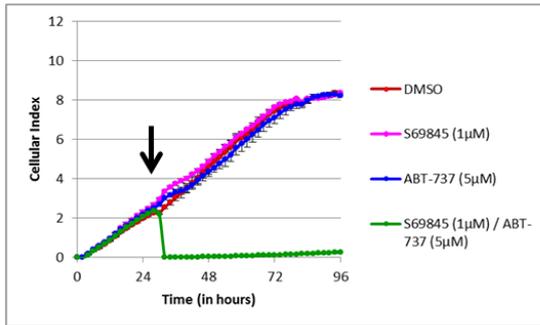
Les encadrés suivants correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie d'un composé **M** à une concentration indiquée :

- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en magenta, les cellules cancéreuses sont en présence de 1 µM de S63845.
- en bleu, les cellules cancéreuses sont en présence de 5 µM de l'ABT-737.
- en vert, le traitement par le composé **M** en agent seul.
- en violet, le traitement par le composé **M** en présence de l'ABT-737.
- en orange, le traitement par le composé **M** en présence de S63845.

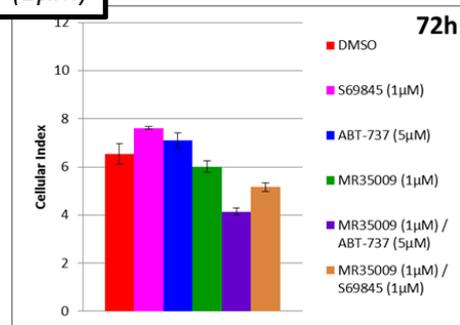
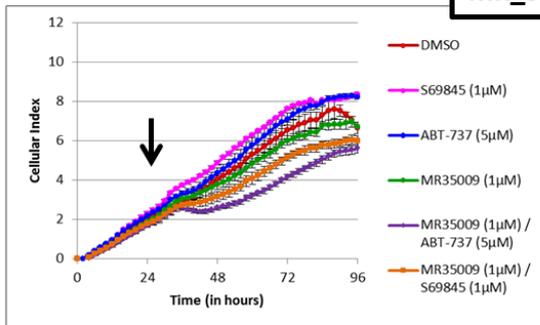
En se basant sur les différents profils d'activité pro-apoptotique reportés sur les fiches cartonnées (non toxique, cytostatique temporaire, cytostatique, cytotoxique partiel et cytotoxique), nous décrivons les résultats sous forme de tableaux.

❖ M09

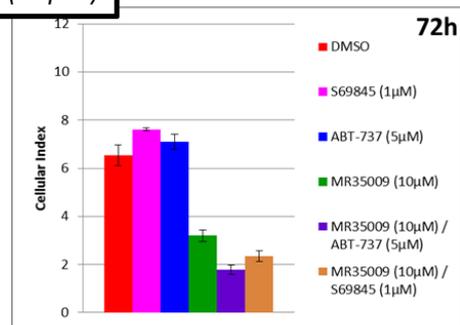
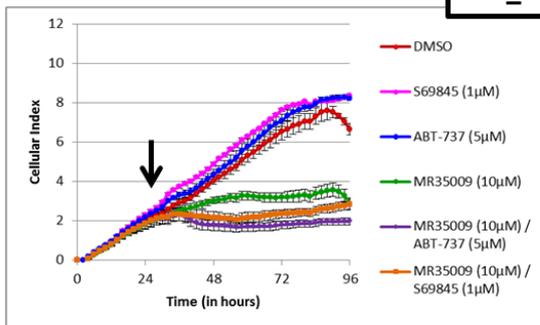
↓ traitement



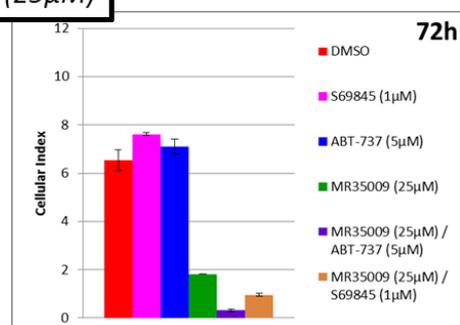
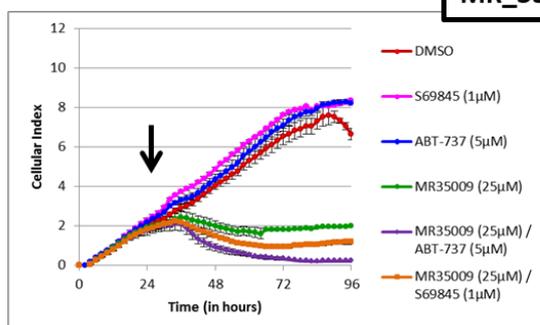
MR_35009 (1µM)



MR_35009 (10µM)



MR_35009 (25µM)



M09

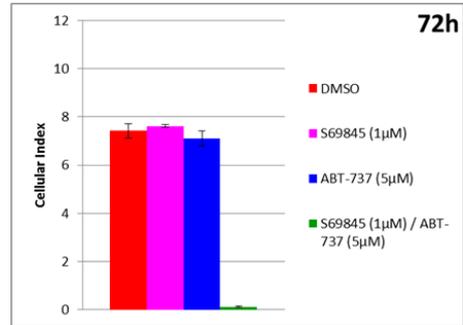
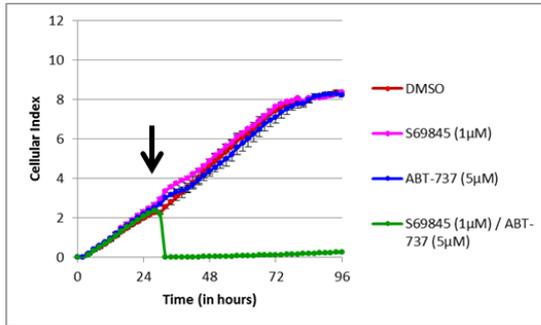
M09 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M09 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_L)

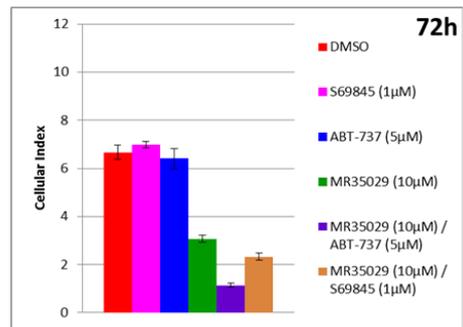
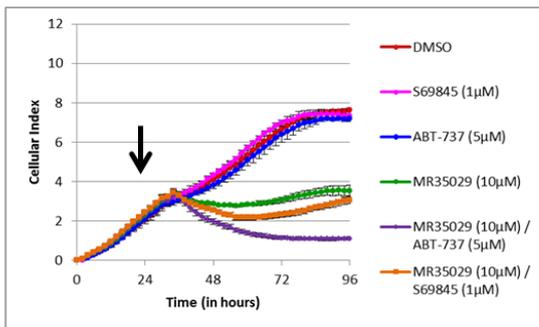
	M09	M09 + ABT-737 (5µM) (Activité de M sur Mcl-1)	M09 + S63845 (1µM) (Activité de M sur Bcl-x _L)
1 µM	Non toxique	Non toxique	Non toxique
10 µM	Cytostatique	Cytotoxique partiel	Cytostatique
25 µM	Cytotoxique partiel	Cytotoxique	Cytotoxique partiel

❖ M29

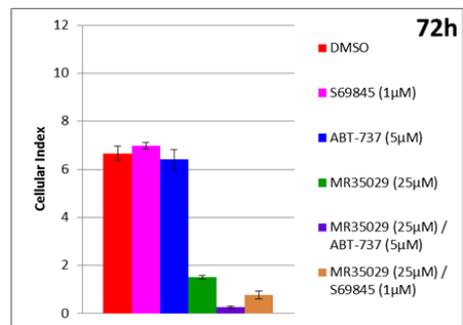
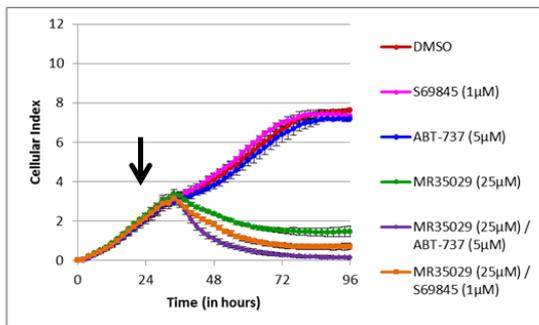
↓ traitement



MR_35029 (10µM)



MR_35029 (25µM)



M29

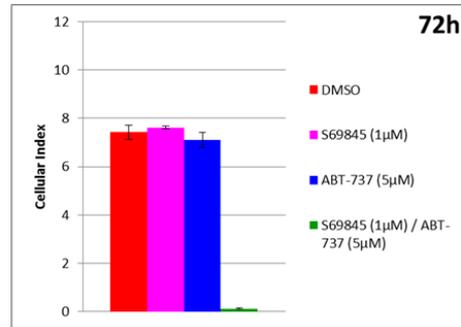
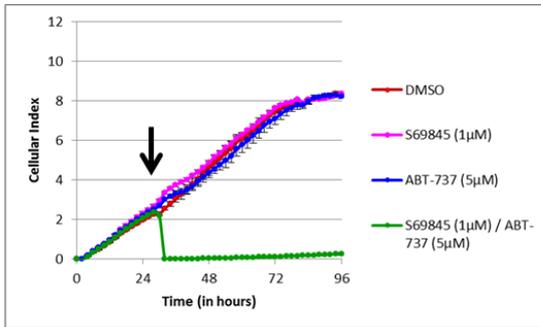
M29 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M29 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_L)

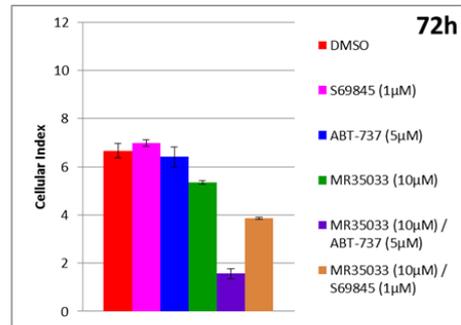
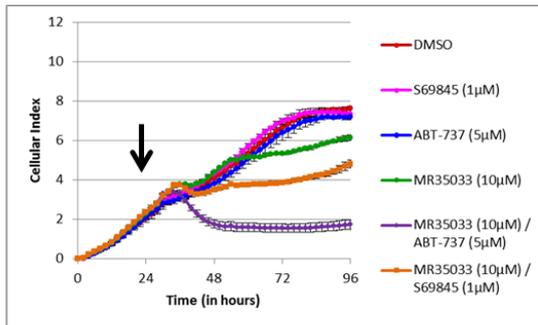
	M29	M29 + ABT-737 (5µM) (Activité de M sur Mcl-1)	M29 + S63845 (1µM) (Activité de M sur Bcl-x _L)
10 µM	Cytostatique	Cytotoxique partiel	Cytostatique partiel
25 µM	Cytotoxique partiel	Cytotoxique	Cytotoxique

❖ M33

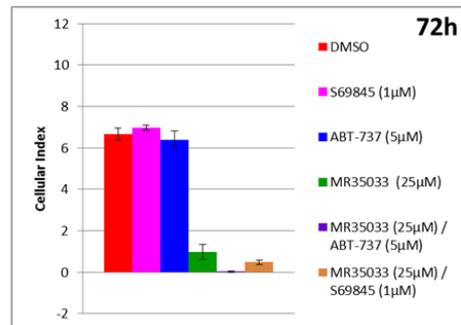
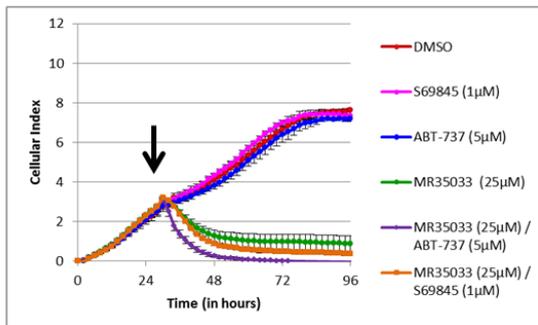
↓ traitement



MR_35033 (10µM)



MR_35033 (25µM)



M33

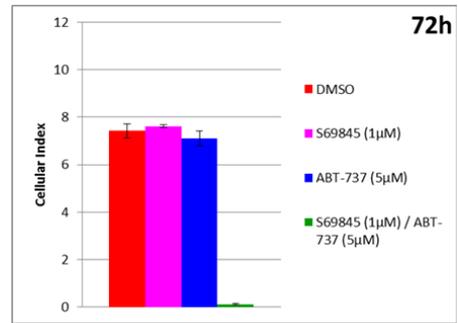
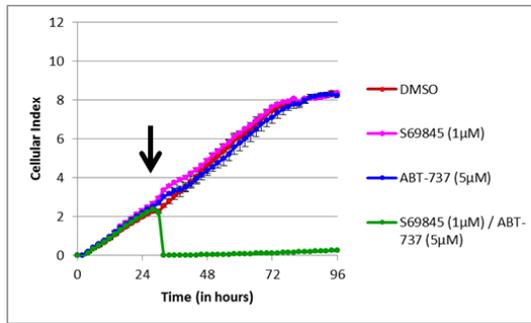
M33 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M33 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

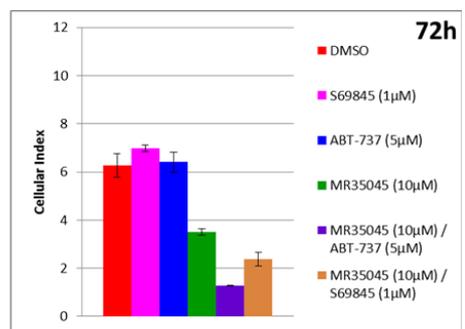
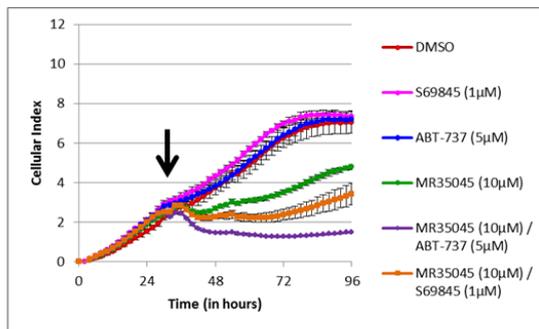
	M33	M33 + ABT-737 (5µM) (Activité de M sur Mcl-1)	M33 + S63845 (1µM) (Activité de M sur Bcl-x _i)
10 µM	Cytostatique	Cytotoxique partiel	Cytostatique temporaire
25 µM	Cytotoxique	Cytotoxique	Cytotoxique

❖ M45

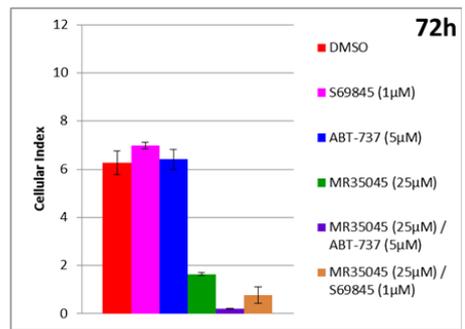
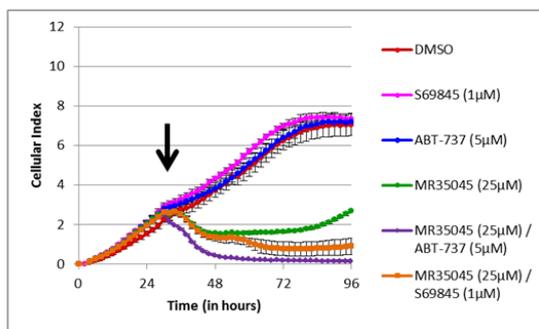
↓ traitement



MR_35045 (10µM)



MR_35045 (25µM)



M45

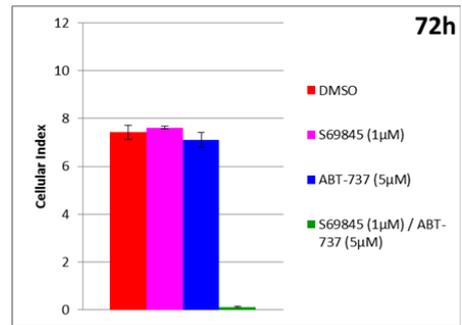
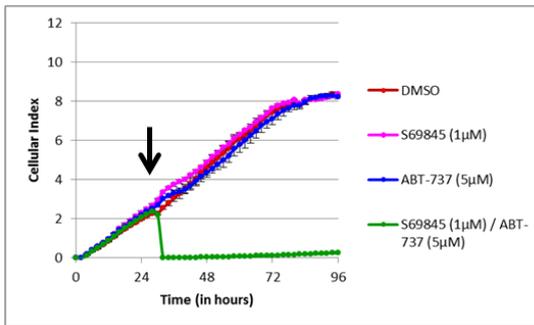
M45 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M45 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

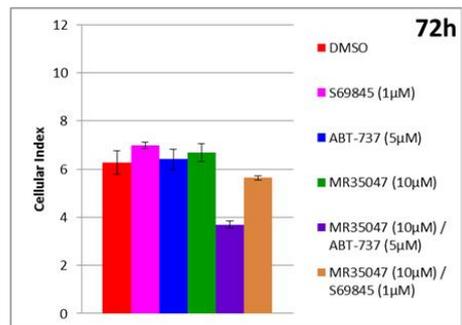
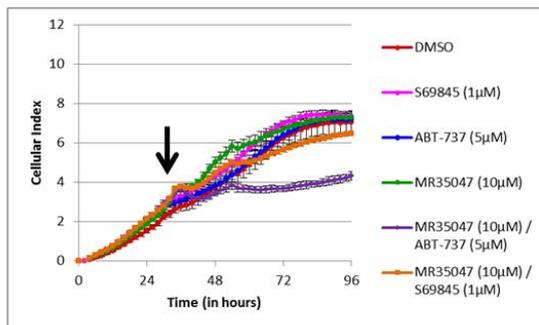
	M45	M45 + ABT-737 (5µM) (Activité de M sur Mcl-1)	M45 + S63845 (1µM) (Activité de M sur Bcl-x _i)
10 µM	Cytostatique temporaire	Cytostatique temporaire	Cytotoxique partiel
25 µM	Cytotoxique partiel	Cytotoxique	Cytotoxique

❖ M47

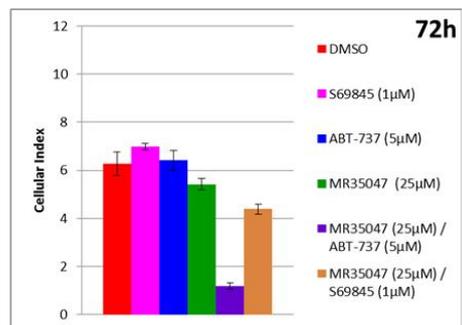
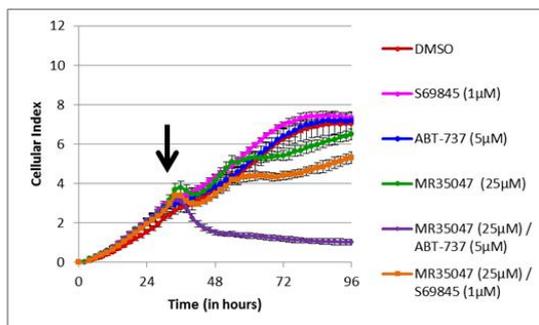
↓ traitement



MR_35047 (10µM)



MR_35047 (25µM)



M47

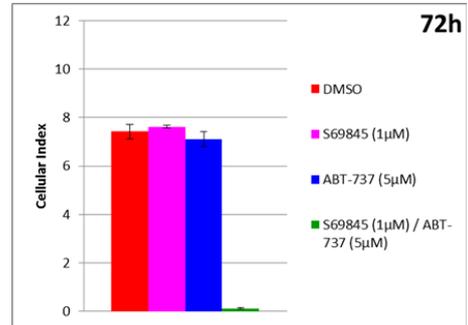
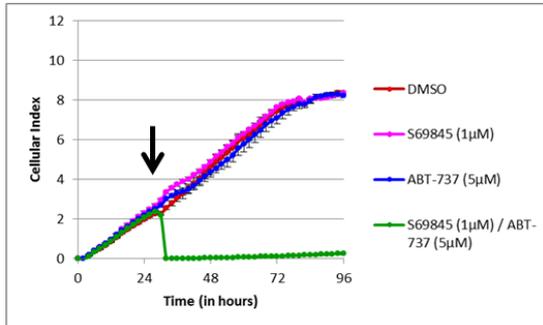
M47 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M47 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

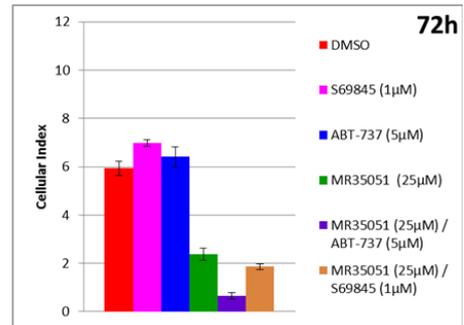
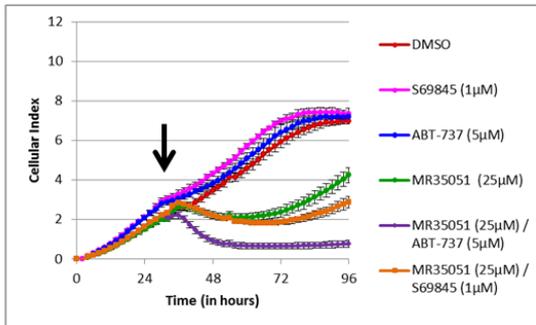
10 µM	Non toxique	Cytostatique	Non toxique
25 µM	Non toxique	Cytotoxique partiel	Non toxique

❖ M51

↓ traitement



MR_35051 (25µM)



M51

M51 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M51 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

25 µM

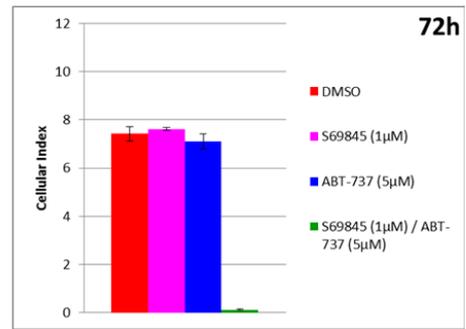
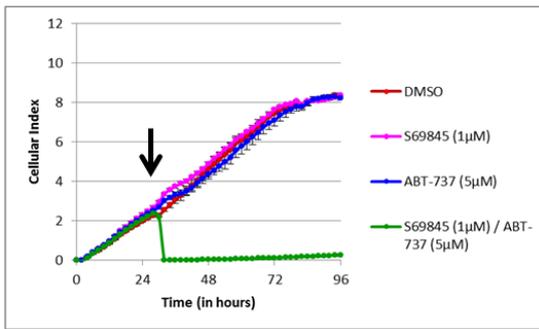
Cytostatique temporaire

Cytotoxique

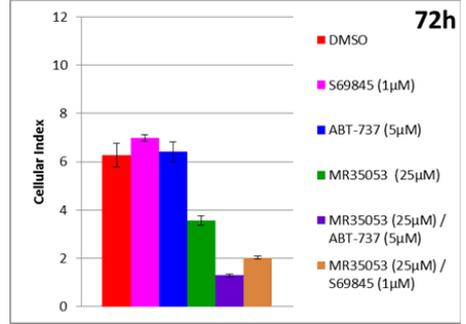
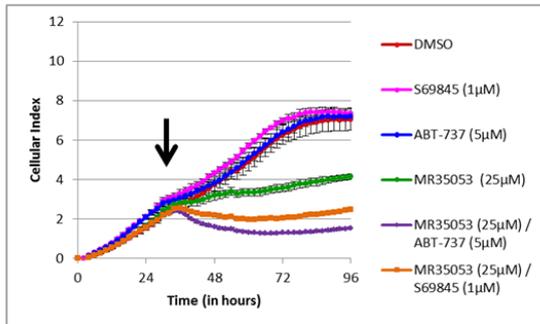
Cytostatique temporaire

❖ M53

↓ traitement



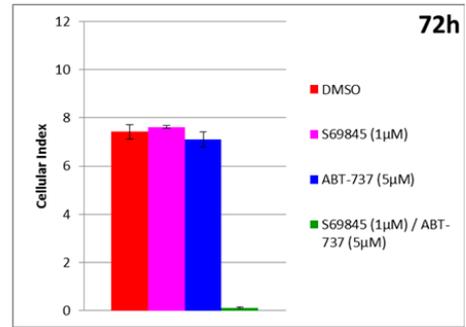
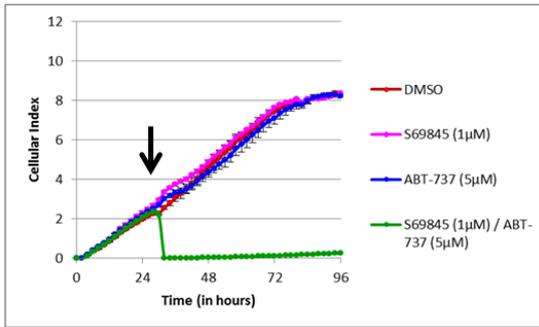
MR_35053 (25µM)



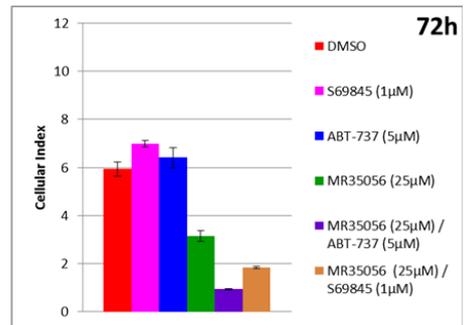
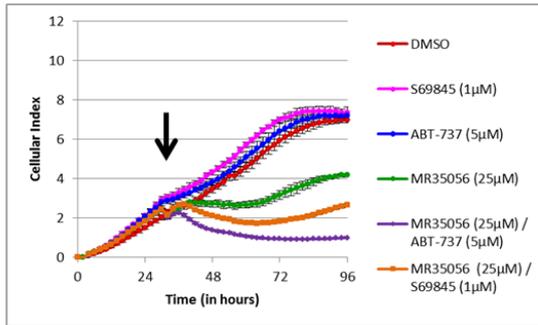
	M53	M53 + ABT-737 (5µM) (Activité de M sur Mcl-1)	M53 + S63845 (1µM) (Activité de M sur Bcl-x _i)
25 µM	Cytostatique	Cytotoxique partiel	Cytostatique

❖ M56

↓ traitement



MR_35056 (25µM)



M56

M56 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M56 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

25 µM

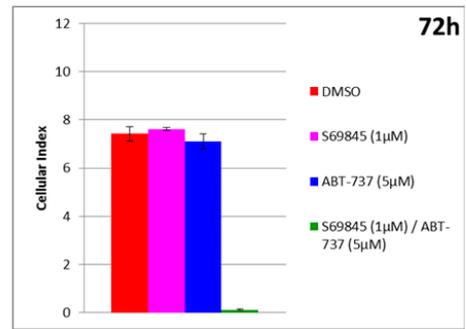
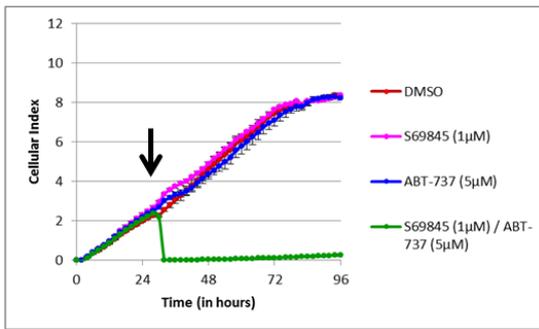
Cytostatique temporaire

Cytotoxique partiel

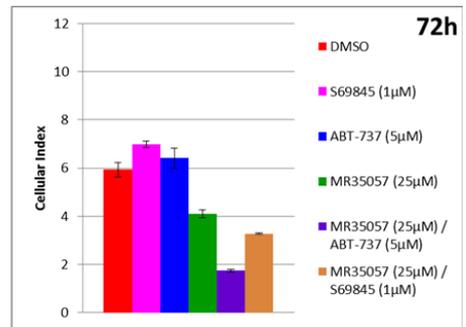
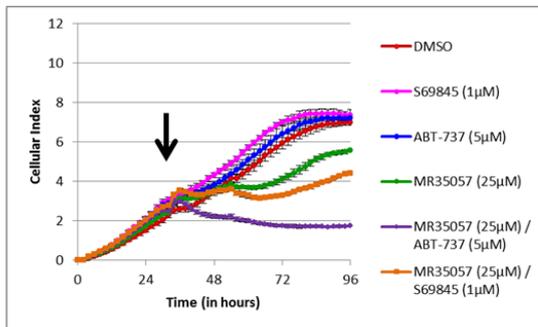
Cytostatique temporaire

❖ M57

↓ traitement



MR_35057 (25µM)



M57

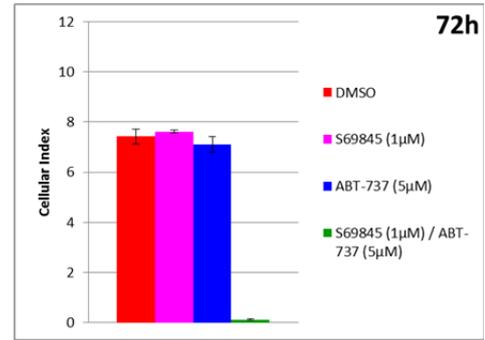
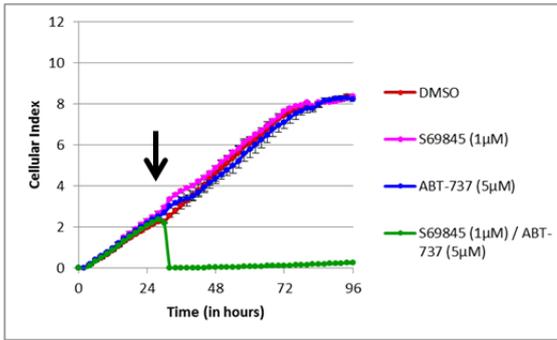
M57 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M57 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

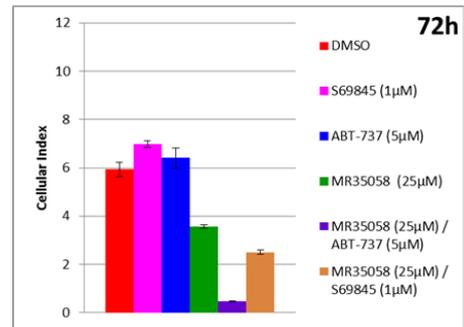
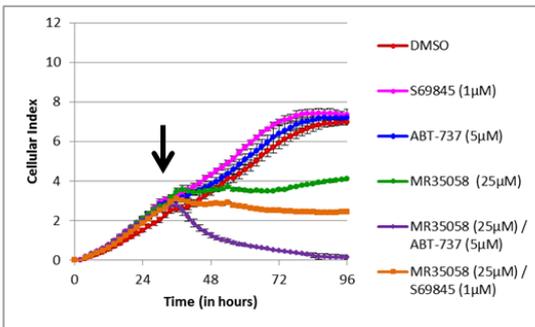
25 µM	Cytostatique temporaire	Cytostatique	Cytostatique temporaire
-------	-------------------------	--------------	-------------------------

❖ M58

↓ traitement



MR_35058 (25µM)



M58

M58 + ABT-737 (5µM)
(Activité de M sur Mcl-1)

M58 + S63845 (1µM)
(Activité de M sur Bcl-x_i)

25 µM	Cytostatique	Cytostatique	Cytotoxique
-------	--------------	--------------	-------------

1. 2. Test en présence de siRNA

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 : Bcl-x_L est inhibée.
- en bleu, les cellules cancéreuses sont transfectées par un siRNA Mcl-1 : 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 encadrés suivants correspondent aux résultats de l'évaluation par impédancemétrie d'un composé **M** à la concentration indiquée :

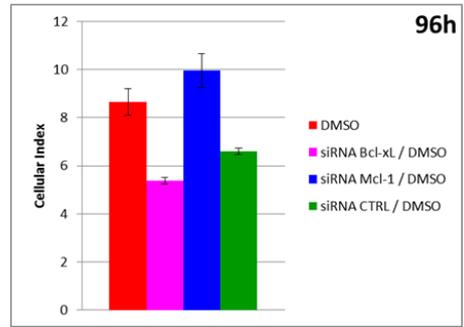
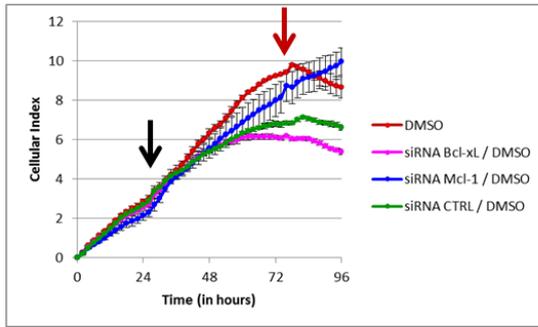
- en rouge, les cellules cancéreuses sont en présence de DMSO.
- en noir, le traitement par le composé **M** en agent seul.
- en magenta, le traitement des cellules cancéreuses transfectées par un siRNA Bcl-x_L par le composé **M**.
- en bleu, le traitement des cellules cancéreuses transfectées par un siRNA Mcl-1 par le composé **M**.

Il faut noter que dans le cas de l'utilisation de siRNA, la transfection entraîne la chute de l'index cellulaire, biaisant de ce fait, la chute de l'index cellulaire due au traitement par un composé **M**.

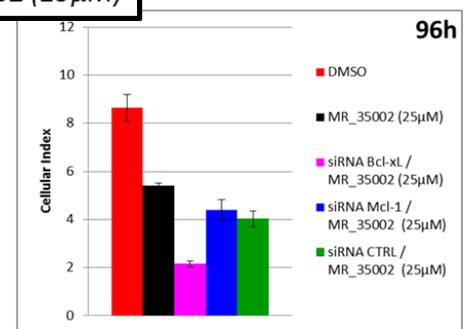
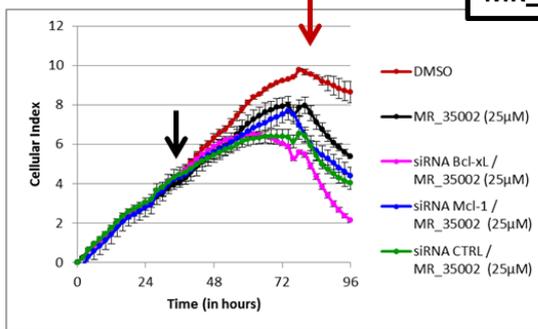
En se basant sur les différents profils d'activité pro-apoptotique reportés sur les fiches cartonnées (non toxique, cytostatique temporaire, cytostatique, cytotoxique partiel et cytotoxique), nous décrivons les résultats sous forme de tableaux.

❖ M02

↓ transfection ↓ traitement

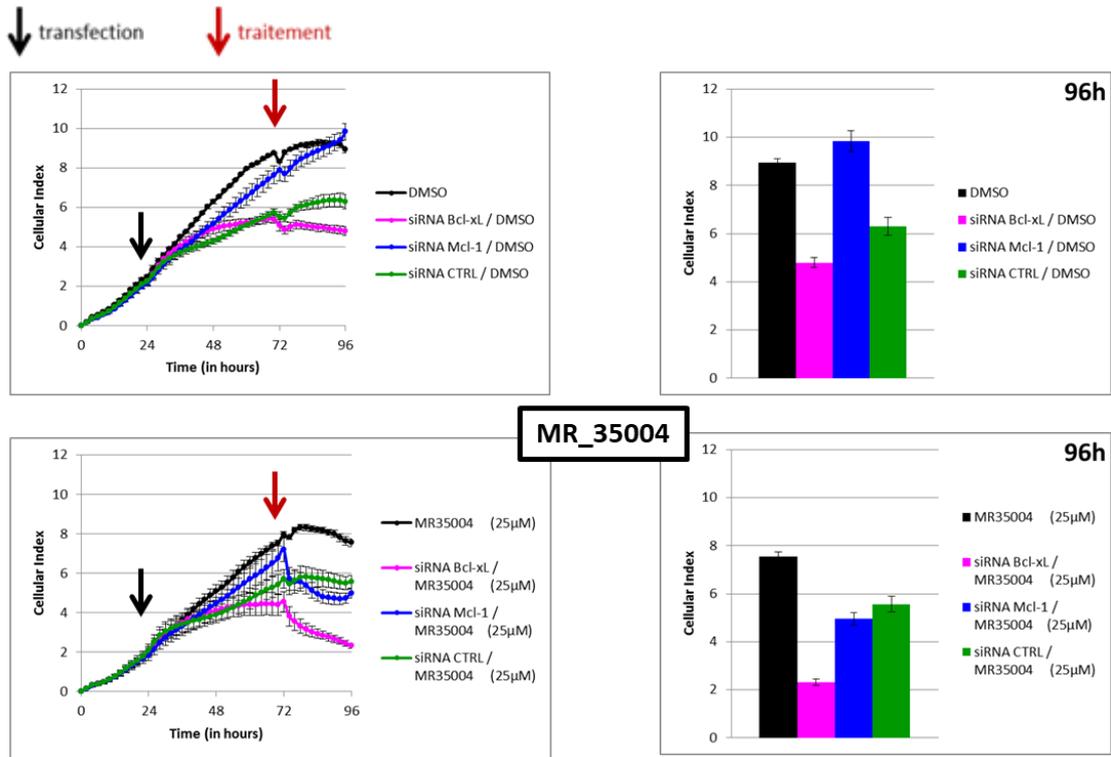


MR_35002 (25µM)



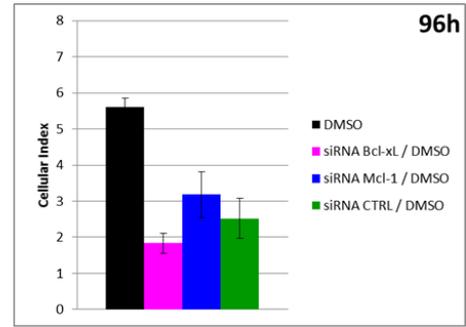
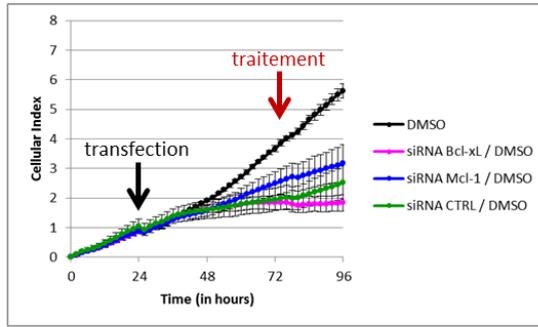
	M02	M02 + siRNA Bcl-x _L (Activité de M sur Mcl-1)	M02 + siRNA Mcl-1 (Activité de M sur Bcl-x _L)
25 µM	Cytostatique	Cytotoxique partiel	Cytostatique

❖ M04

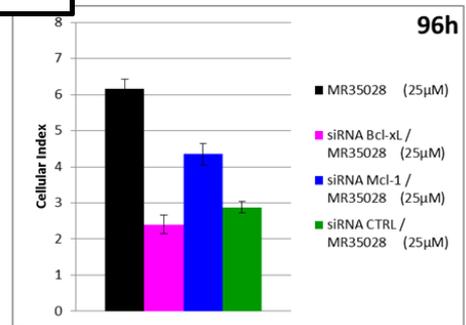
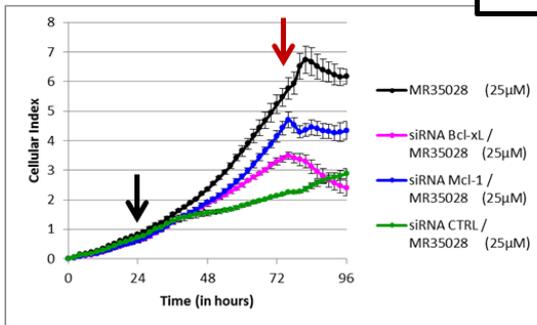


	M04	M04 + siRNA Bcl-x _L (Activité de M sur Mcl-1)	M04 + siRNA Mcl-1 (Activité de M sur Bcl-x _L)
25 µM	Non toxique	Cytotoxique partiel	Cytotoxique partiel

❖ M28



MR35028



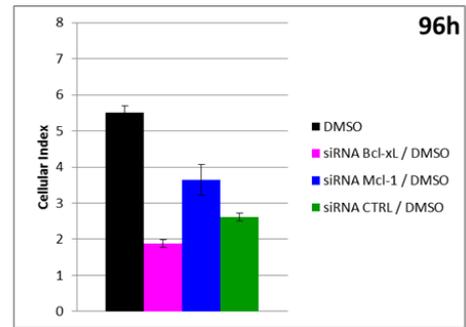
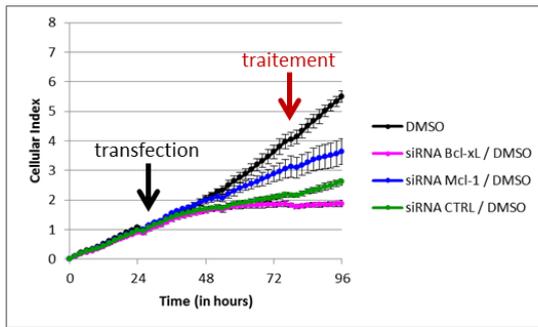
M28

M28 + siRNA Bcl-x_L
(Activité de M sur Mcl-1)

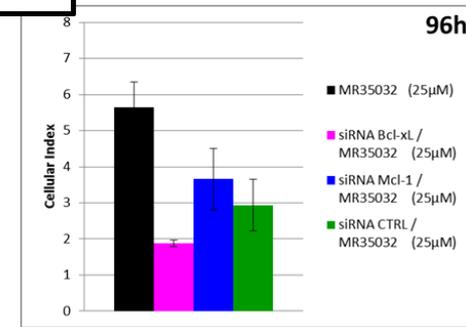
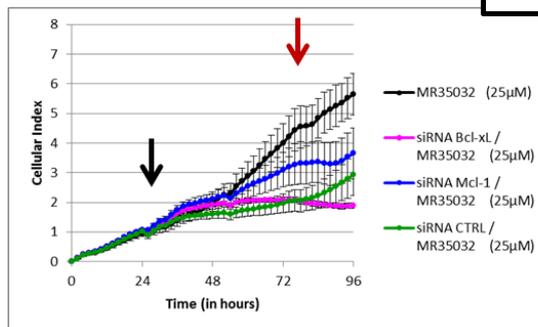
M28 + siRNA Mcl-1
(Activité de M sur Bcl-x_L)

<i>25 µM</i>	Non toxique	Cytostatique	Non toxique
--------------	-------------	--------------	-------------

❖ M32



MR35032



	M32	M32 + siRNA Bcl-x _L (Activité de M sur Mcl-1)	M32 + siRNA Mcl-1 (Activité de M sur Bcl-x _L)
25 µM	Non toxique	Non toxique	Non toxique

B. Conception d'inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille des IAP

1. Mesure de l'affinité par polarisation de fluorescence

Un test par polarisation de fluorescence a été mis en place afin de mesurer l'affinité de nos molécules envers le domaine XIAP-BIR3.

Ce test se déroule en deux étapes :

La première étape consiste à calculer la constante de dissociation (K_d) pour l'interaction entre le domaine XIAP-BIR3 et un ligand marqué par un fluorophore. Nikolovska-Coleska et al.²⁴⁹ ont décrit le peptide marqué AbuRPF-K(5-Fam)-NH₂ comme optimal pour le développement du test de polarisation de fluorescence. Une étude de saturation a été menée au laboratoire et a permis de déterminer un K_d de 24 ± 3 nM pour le complexe XIAP-BIR3/AbuRPF-K(5-Fam)-NH₂.

La seconde étape consiste à mettre en compétition nos composés avec le peptide AbuRPF-K(5-Fam)-NH₂, face au domaine XIAP-BIR3. Cela permet de mesurer l'inhibition de l'interaction entre XIAP-BIR3 et le peptide fluorescent, en déterminant la concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀). Pour cette étude de compétition les concentrations de XIAP-BIR3 et de AbuRPF-K(5-Fam)-NH₂ ont été fixées à 150 nM et 5 nM respectivement. Tous les composés ont été testés pour une gamme de concentrations allant de 10^{-8} M à $2,0 \cdot 10^{-4}$ M. Chaque expérience est réalisée à deux reprises et chaque point est dupliqué. Le Debio1143 a été utilisé comme témoin positif et a permis la détermination du pourcentage d'inhibition pour les composés présentant une affinité.

À partir des valeurs de polarisation obtenues, le pourcentage d'inhibition a été calculée pour chaque point et une régression non-linéaire des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 et a permis de déterminer les CI₅₀ pour chaque composé.

²⁴⁹ Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; et al. Development and Optimization of a Binding Assay for the XIAP BIR3 Domain Using Fluorescence Polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, *332* (2), 261–273.

Conception, synthèse et évaluation biologique de perturbateurs d'interactions protéine-protéine impliquées dans l'apoptose. Applications aux cancers de l'ovaire chimiorésistants.

Le cancer de l'ovaire représente la quatrième cause de décès par cancer chez la femme. En France, près de 4 500 nouveaux cas par an sont diagnostiqués, avec plus de 3000 décès chaque année. Ce cancer reste longtemps silencieux : un diagnostic souvent tardif, et le développement d'une chimiorésistance qui touche jusqu'à 75 % des patientes, expliquent le fort taux de mortalité et une survie à 5 ans estimée à moins de 45 %.

Les mécanismes responsables du développement de la chimiorésistance sont nombreux. Aujourd'hui, un fort intérêt est porté au développement de nouvelles stratégies de traitement en ciblant les protéines cellulaires inhibitrices de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Deux familles de protéines jouent un rôle cruciale dans la régulation de l'apoptose : la famille Bcl-2 et la famille IAP.

Nous nous sommes intéressés à la synthèse de petites molécules abiotiques, appelées foldamères. Ces composés sont capables de perturber les interactions entre les protéines anti-apoptotiques des familles Bcl-2 ou IAP, surexprimées dans le cancer de l'ovaire, et leurs partenaires biologiques (pro-apoptotiques). Ceci permet de libérer les protéines pro-apoptotiques et rétablir l'apoptose dans les cellules cancéreuses.

Ce travail de thèse a permis la conception, la synthèse, la caractérisation et l'évaluation biologique de molécules inhibitrices des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-x_L de la famille Bcl-2, et de possibles inhibiteurs de la protéine XIAP de la famille IAP.

Design, synthesis and biological evaluation of protein-protein interactions disruptors, involved in apoptosis. Applications to chemoresistant ovarian cancers.

Ovarian cancer is the 4th leading cause of cancer death in women. In France, nearly 4,500 new cases per year are diagnosed, with more than 3,000 deaths each year. This cancer remains silent for a long time: late diagnosis and chemoresistance development for up to 75% of patients, explain the high mortality rate and the 5-year survival estimated at less than 45%.

Mechanisms responsible for the development of drug resistance are numerous. Today, there is a strong interest in the development of new treatment strategies by targeting cellular proteins that inhibit apoptosis (programmed cell death). Two families of proteins play a crucial role in the regulation of apoptosis: the Bcl-2 family and the IAP family.

We are interested in the synthesis of small abiotic molecules, called foldamers. These compounds are able to disrupting the interactions between the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 or IAP families, overexpressed in ovarian cancer, and their biological (pro-apoptotic) partners. This releases the pro-apoptotic proteins and restores apoptosis in the ovarian cancer cells.

This PhD work allowed the design, synthesis, characterization and biological evaluation of inhibitors of Mcl-1 and Bcl-x_L anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family, and the development of possible inhibitors of the XIAP protein of IAP family.

Mots-clefs : cancer, ovaire, chimiorésistance, apoptose, ipps, avpi, smac, xiap, mcl-1, bcl-xl, suzuki-miyaura, ullmann, negishi, polypyridine, peptide, mime.