



HAL
open science

Synthèse et évaluation biologique de DIMs (diindolylméthanes) complexes à propriétés pro-apoptotiques

Aboubacar Diaby

► **To cite this version:**

Aboubacar Diaby. Synthèse et évaluation biologique de DIMs (diindolylméthanes) complexes à propriétés pro-apoptotiques. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB160 . tel-04481866

HAL Id: tel-04481866

<https://theses.hal.science/tel-04481866>

Submitted on 28 Feb 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.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie

Année 2016

n°...

THÈSE

Présentée

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Par

M. Aboubacar DIABY

**SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE DIM_s
(DIINDOLYLMÉTHANES) COMPLEXES AUX PROPRIÉTÉS
PRO-APOPTOTIQUES**

Soutenue le 25 novembre 2016

Membres du jury :

Mme Sylvie MICHEL, Pr	Directeur de thèse
M. Patrick DALLEMAGNE, Pr	Rapporteur
Mme Joelle DUBOIS, Dr	Rapporteur
M. Patrick DESCHAMPS, Dr	Examineur
Mme Hélène MUNIER-LEHMANN, Dr	Examineur
Mme Élisabeth SEGUIN, Pr	Examineur
M. Xavier CACHET, Dr	Examineur

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie

Année 2016

n°...

THÈSE

Présentée

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Par

M. Aboubacar DIABY

**SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE DIM_s
(DIINDOLYLMÉTHANES) COMPLEXES AUX PROPRIÉTÉS
PRO-APOPTOTIQUES**

Soutenue le 25 novembre 2016

Membres du jury :

Mme Sylvie MICHEL, Pr	Directeur de thèse
M. Patrick DALLEMAGNE, Pr	Rapporteur
Mme Joelle DUBOIS, Dr	Rapporteur
M. Patrick DESCHAMPS, Dr	Examineur
Mme Hélène MUNIER-LEHMANN, Dr	Examineur
Mme Élisabeth SEGUIN, Pr	Examineur
M. Xavier CACHET, Dr	Examineur

Remerciements

À Madame Joelle DUBOIS

Directeur de Recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette

À Monsieur Patrick DALLEMAGNE

Professeur de Chimie Médicinale à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Caen-Normandie

qui m'ont honoré en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse

À Madame Sylvie MICHEL

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

À Madame Hélène MUNIER-LEHMANN

Directeur de Recherche au Laboratoire de Chimie et Biocatalyse à l'Institut Pasteur de Paris

À Monsieur Patrick DESCHAMPS

Maître de Conférences - HDR au Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

À Monsieur Xavier CACHET

Maître de Conférences - HDR au Laboratoire de Pharmacognosie, Chimie des substances Naturelles, Électrochimie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

À Madame Elisabeth SEGUIN

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Rouen, Normandie

qui m'ont fait l'honneur de siéger dans le jury de cette thèse

Mes remerciements les plus sincères.

Cette thèse, résultat d'un travail de recherche de près de trois ans et demi, a été réalisé au sein du Laboratoire de Pharmacognosie, Chimie des substances Naturelles, Électrochimie - UMR CNRS 8638, COMETE - en collaboration avec le Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques - UMR CNRS 8015, LCRB - de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris Descartes.

Je voudrais adresser tous remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé au cours de cette thèse.

À Madame Sylvie MICHEL,

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

Pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, pour m'avoir accordé votre confiance, pour m'avoir permis de réaliser un petit pas dans le monde de la recherche scientifique, pour votre patience, je vous exprime toute ma profonde gratitude.

À Monsieur Xavier CACHET,

Maître de Conférences - HDR au Laboratoire de Pharmacognosie, Chimie des substances Naturelles, Électrochimie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

Je tiens à vous remercier infiniment pour m'avoir encadré, tout au long de la réalisation de cette thèse dans l'enthousiasme et dans un esprit de défi scientifique, pour m'avoir guidé vers les bonnes références.

À Monsieur Nicolas LEULLIOT,

Professeur de Cristallographie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

Pour m'avoir ouvert la porte de votre laboratoire et permis de travailler dans de meilleures conditions parmi les biologistes et biochimistes, pour m'avoir accordé un peu de votre temps dans ce travail de recherche, je vous en serai toujours reconnaissant.

À Monsieur Patrick DESCHAMPS,

Maître de Conférences - HDR au Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes

Vibrants et chaleureux remerciements pour votre implication dans mes travaux de thèse, pour tout le temps que vous m'avez consacré, pour votre aide précieuse, pour m'avoir encouragé avec enthousiasme et beaucoup sourire, je vous adresse l'expression de ma considération la plus profonde.

Je tiens également à remercier :

- Madame Pascale LEMOINE, *Maître de Conférences au Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris Descartes*, pour avoir son apport important dans la diffraction et la résolution de la structure de mes molécules,
- Madame Pascale LEPROUX, du Service de Spectrométrie de Masse du Laboratoire Toxicologie, pour m'avoir consacré un peu de temps précieux pour la réalisation des expériences en spectrométrie de masse,
- Monsieur Jérôme BIGNON, *Chercheur IR2 à la Plate-forme CIBI de l'Institut des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette*, pour avoir réalisé les tests de cytotoxicité et pro-apoptotiques de mes composés.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de l'ensemble des membres du Laboratoire de Pharmacognosie, Chimie des Substances Naturelles, Électrochimie et du Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Magali, Lila, Madru, Florian, qui ont été disponibles au quotidien pour me donner un coup main, sans oublier Egor pour son sens du partage, Tsvetelina pour ses encouragements indéfectibles, Thomas, pour son aide sur l'appareillage de chromatographie.

Je souhaiterais dire vivement merci à ma famille au sens large du terme qui n'a cessé de m'apporter prière e bénédiction durant toutes ces années d'études. Un remerciement spécial à mes oncles BABI Ousmane et DIABY Moustapha qui ont toujours cru en moi. À Diane, je dis un merci particulier pour son soutien moral tout le long de cette thèse.

À la mémoire de ma grand-mère Aïssata KONÉ

Sommaire

Liste des abréviations utilisées.....	5
Introduction générale.....	6

Chapitre 1 : Le récepteur NR4A1, cible potentielle de composés pro-apoptotiques. Cas des phényldiindolylméthanes (PhéDIMs)	9
---	----------

I- Introduction.....	10
II- L'apoptose : une voie majeure en thérapie anticancéreuse	11
II.A- Les voies de régulation de l'apoptose	13
II.B- Contrôle mitochondrial de l'apoptose par la famille Bcl-2.....	16
II.B.1- Rôle de la protéine <i>Bcl-2</i>	16
II.B.2- Intérêt du ciblage de la protéine Bcl-2 : Conversion de gène anti-apoptotique en pro-apoptotique.....	17
II.C- Les inhibiteurs des protéines d'apoptose - <i>Inhibitor of apoptosis proteins</i> - IAPs.....	19
II.C.1- Par inhibition des caspases	19
II.C.2- IAPs, comme cibles potentiels dans l'apoptose	20
II.D- Molécules agissant comme agents pro-apoptotiques	20
II.D.1- Par voie extrinsèque ²³	20
II.D.2- Par voie intrinsèque.....	21
III- NR4A1 : une cible potentielle dans la thérapie anticancéreuse	27
III.A- Les récepteurs nucléaires.....	27
III.B- Structure et fonctions d'activation de NR4A1	28
III.B.1- Caractéristiques structurales de NR4A1.....	28
III.B.2- Fonctions d'activation de NR4A1	30
III.C- NR4A1 et le cancer ⁹⁴	30
IV- Les ligands de NR4A1.....	32
V- Phényldiindolylméthanes interagissant avec NR4A1	32
VI- Conclusion	40

Chapitre 2 : Synthèses de phényldiindolylméthanes (PhéDIMs) – Étude structurale des PhéDIMs oxydés	41
---	-----------

I- Introduction.....	42
II- Travaux antérieurs sur les PhéDIMs de synthèse.....	44
II.A- Voies de synthèse de PhéDIMs symétriques.....	44
II.A.1- PhéDIMs symétriques obtenus à partir d'indoles et de carbonyles.....	49
II.A.1.a- Synthèse de PhéDIMs symétriques catalysée par des acides protiques.....	49
II.A.1.b- Synthèse de PhéDIMs symétriques catalysée par des acides de Lewis.....	53
II.A.1.c- Synthèse de PhéDIMs symétriques sans catalyseur acide.....	59

Sommaire

II.A.2- Synthèse par couplage oxydatif de benzylamines et d'indoles	60
II.A.3- Synthèses à partir de dérivés d'acides de Meldrum en série indolylméthane (addition nucléophile)	61
II.A.4- Synthèse à partir dérivés de nitrobenzène (Réaction de Bartoli).....	63
II.A.5- Synthèse de PhédIMs à partir d'alcynes terminaux	65
II.A.6- Synthèse à partir de sulfones acétyléniques	67
II.B- Voies de synthèses de PhédIMs non symétriques, en série racémique ou asymétriques	68
II.B.1- Synthèse par couplage d'un phényl-3-indolylméthanol et d'un indole.....	69
II.B.1.a- Synthèse de phényl-3-indolylméthanol.....	69
II.B.1.b- Méthodes de couplage de phényl-3-indolylméthanol avec des indoles	82
II.B.2- Synthèse à partir d'acides indolylméthyl barbituriques	87
II.B.3- Synthèse impliquant des dérivés indolylméthylés de l'acide de Meldrum	87
II.B.4- Synthèse impliquant les indolylphthalides substitués.....	88
III- Travaux personnels	89
III.A. Introduction : historique et objectifs	89
III.B- Synthèse des PhédIMs symétriques.....	96
III.B.1- Synthèse des PhédIMs symétriques de la Série 1.....	97
III.B.2- Synthèse des PhédIMs symétriques de la Série 2	100
III.B.2.a- Synthèse du 6-(N-morpholino)-1H-indole 246	101
III.B.2.b- Mise au point des conditions de réaction pour la synthèse du composé 234	102
III.B.2.c- Essai de préparation du composé 239 par amination de type Buchwald-Hartwig à partir du PhédIM dibromé 232	106
III.B.3- Synthèse des PhédIMs de la série 3	107
III.B.3.a- Réactivité du composé 233	107
III.B.3.b- Mise au point de conditions de réaction pour la synthèse du composé 233	108
III.C- Synthèse de PhédIMs non symétriques (série 4).....	111
III.C.1- Etude des conditions de couplage du carbinol 139 avec l'indole	113
III.C.1.a- Synthèse du phényl-3-indolylméthanol 139.....	113
III.C.1.b- Couplage de l'indole et du phényl-3-indolylméthanol 139.....	115
III.C.1.c- Couplage du phényl-3-indolylméthanol 139 avec le 5-méthoxy-1H-indole et le scatole (3-méthyl-1H-indole).....	119
III.C.2- Synthèse du PhédIM 241.....	121
III.C.2.a- Synthèse du phényl-3-indolylméthanol 254	121
III.C.2.b- Couplage du phényl-3-indolylméthanol 254 avec l'indole.....	121
III.D- Etude structurale des produits d'oxydation des PhédIMs ou PhédIMOX	128
III.D.1- Etat des connaissances sur les PhédIMOX : aspects synthétiques et structuraux	128

Sommaire

III.D.2- Analyse structurale du composé 256 en solution.....	138
III.D.2.a- Recoupement des différentes données de la littérature et hypothèse du carbinol.....	138
III.D.2.b Etude de l'oxydation des PhédIMs 241 et 30	143
III.D.3- Suivi de l'oxydation des PhédIMs 24, 30 et 241 par RMN	151
III.D.4- Hypothèses sur la structure du composé 256 à l'état solide.	152
III.D.5- Synthèse des PhédIMOx 275 et 276	154
IV- Conclusion	155

Chapitre 3 : Étude des interactions des PhédIMs avec la protéine cible NR4A1 – Évaluation biologique des PhédIMs comme agents pro-apoptotiques	156
---	------------

I- Introduction.....	157
II- Méthodes de mise en évidence et de caractérisation des interactions LBD NR4A1/PhédIMs	158
II.A- Quenching de fluorescence.....	158
II.A.1- Principe	158
II.A.2- Détermination de la constante de dissociation K_d	159
II.B.- Docking moléculaire.....	160
II.B.1- La méthode de l'EADock ²³⁸	161
II.B.2- Swissdock ²⁴⁰	162
II.C- La cristallogénèse	163
III- Travaux antérieurs	164
III.A- Interaction entre NR4A1 et la Cytosporone B ou ses analogues	166
III.A.1- Mise en évidence de l'interaction NR4A1 - Csn-B	167
III.A.2- Caractérisation structurale de l'interaction NR4A1 - Csn-B	167
III.A.3- Activité biologique de la Csn-B.....	168
III.A.4- Les analogues de Csn-B interagissant avec NR4A1	169
III.A.5- Analogues de Csn-B impliqués dans des processus biologiques	172
III.B- Interactions entre NR4A1 et les PhédIMs para-substitués.....	174
IV- Travaux personnels.....	177
IV.A- Étude d'interaction de PhédIMs avec la cible potentielle NR4A1	177
IV.A.1- Expression et production du domaine d'intérêt de NR4A1, le LBD	177
IV.A.1.a- Expression du domaine LBD de NR4A1 avec l'étiquette 6xHis.....	177
IV.A.1.b- Purification de la protéine : lyse cellulaire et chromatographie	180
IV.A.2- Mesure de l'affinité entre la protéine His-LBD-NR4A1 et les composés PhédIMs	181
IV.A.3- Analyse et comparaison des modes de fixation prédictibles.....	184
IV.A.3.a- Sites de fixation privilégiés des molécules	184

Sommaire

IV.A.3.b- Scores énergétiques et analyses des liaisons hydrogène	186
IV.A.4- Étude Structurale : Cristallogénèse	190
IV.A.4.a- Premier criblage robotisé de l'apoenzyme NR4A1.....	191
IV.A.4.b- Optimisation manuelle des conditions de cristallisation de l'apoenzyme NR4A1	191
IV.A.4.c- Deuxième criblage robotisé : essai de cristallisation de l'enzyme NR4A1 seule ou en présence de ligand (30 ou 231)	193
IV.A.4.d- Essai de cristallisation de l'enzyme NR4A1 seule ou en présence du ligand 231 selon les conditions de cristallisation décrites dans la littérature.....	193
IV.B- Évaluation biologique	199
IV.B.1- Méthodes employées pour les tests in vitro	199
IV.B.1.a- Évaluation de l'activité sur la viabilité et la prolifération des cellules humaines	199
IV.B.1.b- Évaluation de l'activité pro-apoptotique des cellules cancéreuses.....	200
IV.B.2- Résultats et discussion	200
IV.B.2.a- Effets cytotoxiques des trois séries de composés sur les quatre lignées cellulaires	201
IV.B.2.b- Effets pro-apoptotiques des composés PhéDIMs sur les cellules Mia Paca-2	204
V- Conclusion	205
Conclusion générale	207
Annexes.....	209
Liste des composés synthétisés	222
Partie expérimentale	227
A- Partie chimie	228
A-1- Synthèses chimiques, conditions générales.....	228
A-2- Conditions particulières de synthèse.....	229
A-3- Analyse par CLHP des composés 24, 230, 231, 256, 275 et 276.....	261
B- Partie biochimie	264
B-1- Matériel	264
B-2- Méthodes de production et de tests d'interaction de NR4A1	265
Listes des figures et tableaux.....	273
Liste des figures.....	274
Liste des tableaux.....	285
Références bibliographiques	286

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BH	Bcl-2 Homologous domains
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-directed protéase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Csn-B	Cytosporone B
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIM	3,3'-Diindolylméthane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FADD	Fas-associated protein with death domain
FDA	Food & drug administration
FF	Fullfitness
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IR	Infrarouge
LBD	Ligand binding domain
LKB1	Liver kinase B1 ou kinase hépatique B1
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGF-IB	Nerve growth factor IB
Ni-NTA	Nickel-Nitroloacetic acid
NRs	Nuclear receptors
LPS	lipopolysaccharide
PDB	Protein data bank
PhéDIM	1,1-di(3'-indolyl)-1-phénylméthane
PTPC	Permeability transition pore complex
RE	Réticulum endoplasmique
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis
SF	Simplefitness
TFA	Trifluoroacetic acid
TMSCl	Trimethylsilyl chloride
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOMM	Translocase of outer mitochondrial membrane
TR3	Testicular receptor
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminoethane hydrochloride
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis proteins

Introduction générale

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération désordonnée de cellules anormales au sein d'un organe. Les cellules cancéreuses se multiplient et donnent naissance à une tumeur qui, pour se vasculariser, va sécréter des facteurs engendrant la formation de vaisseaux sanguins par lesquels la tumeur reçoit les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa croissance (angiogénèse). Les cellules tumorales se développent pour atteindre les ganglions et se propagent par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Les causes du cancer peuvent être génétiques, environnementales (irradiation, ondes électromagnétiques...), ou liées au mode de vie (tabac, alcool, alimentation, exposition aux rayonnements ultraviolet solaires...). Le génome subit des mutations génétiques qu'il est normalement capable de réparer grâce aux processus biologiques comme l'apoptose. L'altération de ce système de réparation, favorise alors la conservation de ces mutations par la cellule qui devient par la suite anormale.

Pour le traitement des cancers, plusieurs thérapies sont employées, parmi lesquelles la chimiothérapie. Celle-ci, impliquant des agents cytotoxiques, est utilisée dans les cas de cancer du sang ou métastases pour tuer les cellules cancéreuses. Cependant, l'apparition de phénomènes dits de résistances, ou encore la survenue d'effets secondaires souvent graves, par manque de sélectivité des médicaments cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales, limitent considérablement l'efficacité des traitements. C'est la raison pour laquelle les thérapies ciblées, impliquant des cibles thérapeutiques spécifiques (enzymes, récepteurs, protéines...) font l'objet d'investigations importantes. Plusieurs molécules pouvant agir par un mécanisme sélectif ont fait leur apparition. Par exemple, le Glivec® (imatinib) et l'Iressa® (gefitinib), des inhibiteurs de tyrosine kinases, ou l'Avastin® (bevacizumab), un anticorps monoclonal humanisé « antiangiogénique », bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché. La combrétastatine 4A, considéré comme un agent « antivasculaire », a fait l'objet de développement clinique de phase II et est actuellement évaluée en combinaison avec d'autres composés dans le traitement de cancers comme celui de la thyroïde. Cette approche dite « antivasculaire » proche de l'approche « antiangiogénique », consiste à détruire les vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs, limitant l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules tumorales et donc arrêtant leur progression. Une autre stratégie dite « pro-apoptotique », ayant pour but d'activer ou de stimuler les voies de signalisations de l'apoptose (processus par lequel la cellule déclenche son autodestruction), est distinguée des autres approches. Parmi les agents potentiellement « pro-apoptotiques », nous avons les phényldiindolylméthanes (PhéDIMs) qui sont capables d'interagir avec une cible : le récepteur nucléaire NR4A1. Toutefois, la série de PhéDIMs rapportés dans la littérature et susceptibles d'induire l'apoptose, est limitée aux seuls composés monosubstitués sur le groupement phényle alors que la liste de composés PhéDIMs

polysubstitués de synthèse ne cesse d'augmenter. De plus, les PhédIMs ont tendance à s'oxyder partiellement à l'air mais très peu d'études biologiques ont été effectuées sur l'oxydation complète de PhédIMs et leur structure décrite semble incompatible avec les données spectroscopiques.

Pour ces raisons, nous avons été amenés à investiguer de nouveaux PhédIMs potentiellement pro-apoptotiques et ciblant NR4A1. Le sujet de thèse porte en effet sur la synthèse de PhédIMs, l'étude de leur interaction avec la protéine d'intérêt et leur évaluation biologique. Nous ferons d'abord une brève présentation sur l'apoptose suivie d'un rappel sur le récepteur NR4A1 en tant que cible thérapeutique majeure dans l'apoptose. Ensuite, les conditions et les travaux de synthèse de PhédIMs seront largement exposés. Nous terminerons par la présentation des travaux sur les interactions entre les PhédIMs synthétisés et le domaine de liaison du ligand de NR4A1. Les résultats préliminaires de l'évaluation biologique en terme d'effets pro-apoptotiques seront enfin présentés.

Chapitre 1 : Le récepteur NR4A1, cible potentielle de composés pro-apoptotiques. Cas des phényldiindolylméthanes (PhéDIMs)

I- Introduction

La médecine traditionnelle utilise très souvent les produits naturels d'origine végétale comme remèdes pour le traitement des pathologies humaines. Les plantes constituent aussi un inépuisable réservoir de composés phytochimiques pouvant servir au développement de nouveaux médicaments. Les plantes de la famille des *Brassicaceae* (anciennement Crucifères) comme les brocolis (Fig. 1), contiennent une gamme importante de composés actifs, les glucosinolates dont un composé majoritaire est la glucobrassicine ^{1,2}. La glucobrassicine (**1**) est un indol-3-ylméthylglucosinate qui s'hydrolyse rapidement en milieu acide pour donner l'indole-3-carbinol, I3C (**2**). Ce dernier, très instable en milieu acide, subit des réactions de condensation pour donner de nombreux composés parmi lesquels le 3,3'-diindolylméthane (DIM) (**3**) ³⁻⁵.

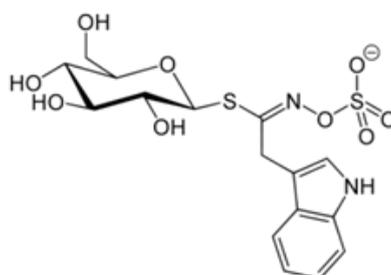
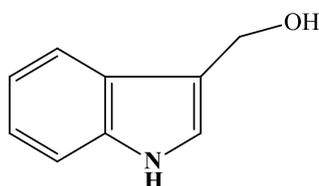
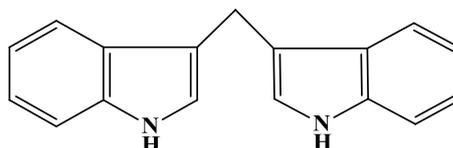


Figure 1 : Brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

1 : Indol-3-ylméthylglucosinate



2 : Indole-3-carbinol (I3C)



3 : 3,3'-diindolylméthane (DIM)

Des travaux sur les propriétés biologiques de DIM mettent en évidence des activités antitumorale, antimicrobienne, antiinflammatoire et immunomodulatrice ⁶. Les effets de l'alimentation sur la prévention du cancer font également l'objet de nombreux travaux ³. C'est dans ce cadre que les effets de I3C et de DIM ont été rapportés : induction de l'apoptose sur des lignées cellulaires du cancer du nasopharynx (NPC/CNE-2), de la prostate (lignée cellulaire humaine PC3), du sein, du colon ⁷⁻⁹. L'indole-3-carbinol a été introduit en essai clinique de phase I pour la prévention du cancer du sein chez des femmes non fumeuses à haut risque de cancer du sein mais sur le site, la collection des données a été effectuée en 2008 et il n'y a pas de conclusion publiée à ce jour ¹⁰.

L'introduction d'un groupement phényle sur le pont méthylène du DIM (phénylindolylméthane, PhéDIM) éliminerait tout effet hormonal. Plusieurs dérivés PhéDIMs possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment anticancéreuses et immuno-modulatrices vis-à-vis de cellules cancéreuses humaines ¹¹⁻¹³.

Parmi les processus physiologiques ciblés dans la chimiothérapie du cancer, l'un des plus couramment étudié est l'apoptose, un mécanisme par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction. Certains PhéDIMs sont connus comme étant des inducteurs pro-apoptotiques qui interagissent avec des cibles telles que NR4A1, un récepteur nucléaire orphelin jouant, lui aussi, un rôle dans l'apoptose.

Dans ce premier chapitre, nous ferons d'abord une présentation sur les différentes de voies de signalisation de l'apoptose ainsi que quelques différentes macromolécules ou molécules induisant ou inhibant ce processus de mort cellulaire. Ensuite, nous exposerons les fonctions du récepteur nucléaire NR4A1 et notamment son implication dans l'apoptose. Pour conclure, l'activité de composés PhéDIMs substitués sera développée et leurs relations structure-activité seront étudiées.

II- L'apoptose : une voie majeure en thérapie anticancéreuse

Le terme apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit par les biologistes R.A. Lockshin et C.M. Williams en 1964 ¹⁴. Ce terme vient du grec (apoptosis) et désigne la chute des feuilles d'un arbre ou des pétales d'une fleur à l'automne. Parmi, les formes de mort cellulaire programmées, à côté de l'apoptose, on trouve également la mort par catastrophe mitotique impliquant une inactivation inappropriée du complexe Cdk1/cycline B et la mort par autophagie montrant des vacuoles contenant des parties de cytoplasme dans les cellules.

A côté de ces formes de mort cellulaire « physiologiques » on a longtemps opposé la nécrose qui se traduit par une rupture de la membrane cellulaire. La nécrose, de mécanisme d'action mal connu, se définit plutôt négativement par absence de marqueurs apoptotiques ou autophagiques.

Ces termes ont été définis par G. Kroemer et coll. dans Cell Death Differ ¹⁵.

L'apoptose se déroule selon deux phases successives qui comprennent la formation de corps apoptotiques suivie de leur phagocytose.

L'apoptose est un processus physiologique, normal qui intervient dans le développement embryonnaire, la régulation du système immunitaire ¹⁶⁻²⁰. L'apoptose permet la formation de structures, comme par exemple les espaces interdigitaux, elle est aussi impliquée dans le contrôle du nombre de cellules, ou homéostasie, l'élimination des cellules anormales, en particulier en cas de

lésions de l'ADN. Elle assure la sélection des lymphocytes T du thymus permettant ainsi l'optimisation du système immunitaire (par phénomène de sélection positive et négative des cellules capables de lier aux molécules CMH ou possédant une forte affinité avec les CMH). Par un mécanisme de défense de l'organisme contre le cancer ou les agents infectieux, l'apoptose permet aussi l'élimination des cellules tumorales ou des cellules infectées par des pathogènes, des lymphocytes en surnombre après une réaction immunitaire.

Elle peut être aussi responsable, par excès ou par défaut, de pathologies variées ¹⁶, comme la réduction de la masse de cellules bêta pancréatiques ²¹.

En cas de dysfonction, l'apoptose peut entraîner les anomalies suivantes :

- Sur une cellule "encore normale" : accumulation cellulaire, longévité cellulaire, résistance à la surveillance immunitaire etc.
- Sur une cellule cancéreuse : indépendance vis-à-vis de facteurs de croissance cellulaire, induction d'une angiogenèse, apparition de métastases, résistance aux traitements etc.

Le dérèglement de l'apoptose étant une cause principale du développement des tumeurs et des résistances aux traitements, la restauration de l'apoptose constitue une approche thérapeutique très étudiée.

Les gènes contrôlant l'apoptose ont été identifiés par Sydney Brenner, H. Robert Horvitz et John E. Sulston qui ont obtenu en 2002 le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour leurs travaux sur l'organogenèse et la mort cellulaire programmée.

Le processus apoptotique peut être initié par plusieurs stimuli différents, tels que les facteurs de croissance, l'ADN endommagé, la dérégulation du cycle cellulaire ou la ligature des récepteurs de mort ¹⁷⁻²⁰. Ces différents stimuli apoptotiques induisent divers événements de signalisations précoces, lesquels ensuite convergent en activant une voie biochimique centrale qui est responsable de l'exécution de l'apoptose.

La durée du processus apoptotique complet est estimée à environ une heure. Après son déclenchement, le point de non-retour est atteint avec la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

II.A- Les voies de régulation de l'apoptose

L'exécution de l'apoptose passe essentiellement par l'activation des caspases (de l'anglais cysteine-dependent aspartate-directed proteases), une famille de protéases à cystéine avec une spécificité pour les résidus d'acide aspartique après lesquels elles clivent les protéines^{19,20,22}. La surexpression des caspases induit l'apoptose. Elles sont synthétisées sous forme inactive (pro-caspases). L'activation des caspases provoque des modifications post-traductionnelles conduisant à la formation de caspases initiatrices (casp 1, 2, 5, 8 à 12) puis de caspases effectrices (casp 3, 6 et 7). L'action des caspases s'exerce seulement sur certaines protéines clés impliquées dans la structuration ou le fonctionnement de la cellule. Il existe un point de non retour au-delà duquel le phénomène est irréversible et qui correspond à l'activation des protéines effectrices. Une centaine de substrats ont été identifiés à ce jour, substrats qui peuvent être classés en 4 catégories²³ (Tab. 1). Nous développerons par la suite l'activité anti-apoptotique que peuvent exercer deux de ces substrats : les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) et certains gènes de la mitochondrie de la famille Bcl-2.

Tableau 1 : Protéines clés impliquées dans la structuration et le fonctionnement cellulaire et constituant des substrats pour des caspases²³

catégorie	Substrats cellulaires
Protéines impliquées dans l'apoptose	- Caspases, - Bid, <i>Bcl-2</i> , Bcl-XL (à voir plus loin) - IAPs (inhibiteur d'apoptose, à voir plus loin) - DFF45/ICAD (facteur de fragmentation d'ADN, 45 kDa ; son inactivation permet le clivage internucléosomique.
Protéines kinases	Akt, FAK (kinases impliquées dans des signaux de survie) PAK2 (kinase pro-apoptotique impliquée dans la formation des corps apoptotiques.
Protéines de structure et protéines essentielles	- Gelsoline (entraîne la coupure des microfilaments d'actine et contribuerait ainsi à l'arrondissement des cellules et à leur détachement de la matrice extracellulaire) - Kératines, vimentine
Protéines impliquées dans des mécanismes de réparation cellulaire	- DNA PK (active les mécanismes de réparation de l'ADN en cas de cassure double-brin) - ATM (active les mécanismes de réparation de l'ADN suite à certains dommages) - PARP (active un mécanisme de réparation de l'ADN).

Une apoptose des cellules tumorales peut, en théorie, être induite en interférant avec les systèmes de transduction intracellulaires, la stimulation des récepteurs de mort cellulaire ou l'introduction de molécules pro-apoptotiques. Il existe deux principales voies distinctes d'induction de l'apoptose via l'activation de caspases : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque^{24,22,20} (Fig.

2). Une troisième voie moins connue est une voie intrinsèque du réticulum endoplasmique, responsable du repliement fonctionnel des protéines. Dans ces trois voies, les caspases jouent un rôle central.

La voie de signalisation extrinsèque implique la stimulation des récepteurs de mort, que sont les protéines transmembranaires, par des ligands spécifiques, à partir des signaux provenant de l'environnement de la cellule ²³. Par exemple, le ligand TNF (*Tumor Necrosis Factor*) se lie au récepteur TNFR1 et assure la transmission du signal, ou encore la protéine Fas (ou CD95) qui se lie à son ligand FasL (ou CD95L) au niveau des lymphocytes T. Dans le cas de la formation du complexe Fas/FasL, la transduction du signal induite par sa liaison fait intervenir les domaines FADD (Fas Associated Death Domains, *protéine adaptatrice*) induisant, au niveau de la membrane, le recrutement d'un complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) activant les pro-caspases initiatrices -8 et -10. L'activation de ces caspases en amont est suffisante pour activer directement les caspases effectrices telles que les caspases-3, -6 et -7, ou indirectement induire l'apoptose en clivant le Bid (ou BH3), gène pro-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2 et impliqué dans la libération dans le cytosol du cytochrome c et suivi du déclenchement de cascade de caspase-3 et -7 (Fig. 2).^{22,25-27}

D'autres récepteurs de mort, tels que DR3, DR4 et DR5, peuvent aussi initier la voie extrinsèque de l'apoptose en se liant à leur ligand respectif Apo3L et TRAIL.

La voie de signalisation intrinsèque (ou voie mitochondriale ou voie du stress) est généralement initiée par des signaux internes à la cellule tels que l'activation du facteur de transcription p53 lors des dommages importants à l'ADN. L'activation de cette voie repose principalement sur la formation de pores de transition grâce aux gènes de la famille Bcl-2 au niveau de la membrane mitochondriale par l'ouverture du PTPC, un complexe multi-protéique de la membrane interne mitochondriale. Tout comme dans le cas de la voie extrinsèque de l'apoptose, cette ouverture permet la libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques normalement mitochondriales telles que le cytochrome c. Ensuite, le cytochrome c cytosolique se lie à la protéine Apaf-1 et le complexe ainsi formé se fixe à la pro-caspase-9 pour former un autre complexe nommé l'apoptosome. La caspase-9 est activée au sein de ce complexe et est capable à son tour d'activer les caspases effectrices comme la caspase-3 et probablement la caspase-6 et -7 ^{22,28,29}. Il s'en suit une cascade de caspases aboutissant à l'apoptose (Fig. 2).

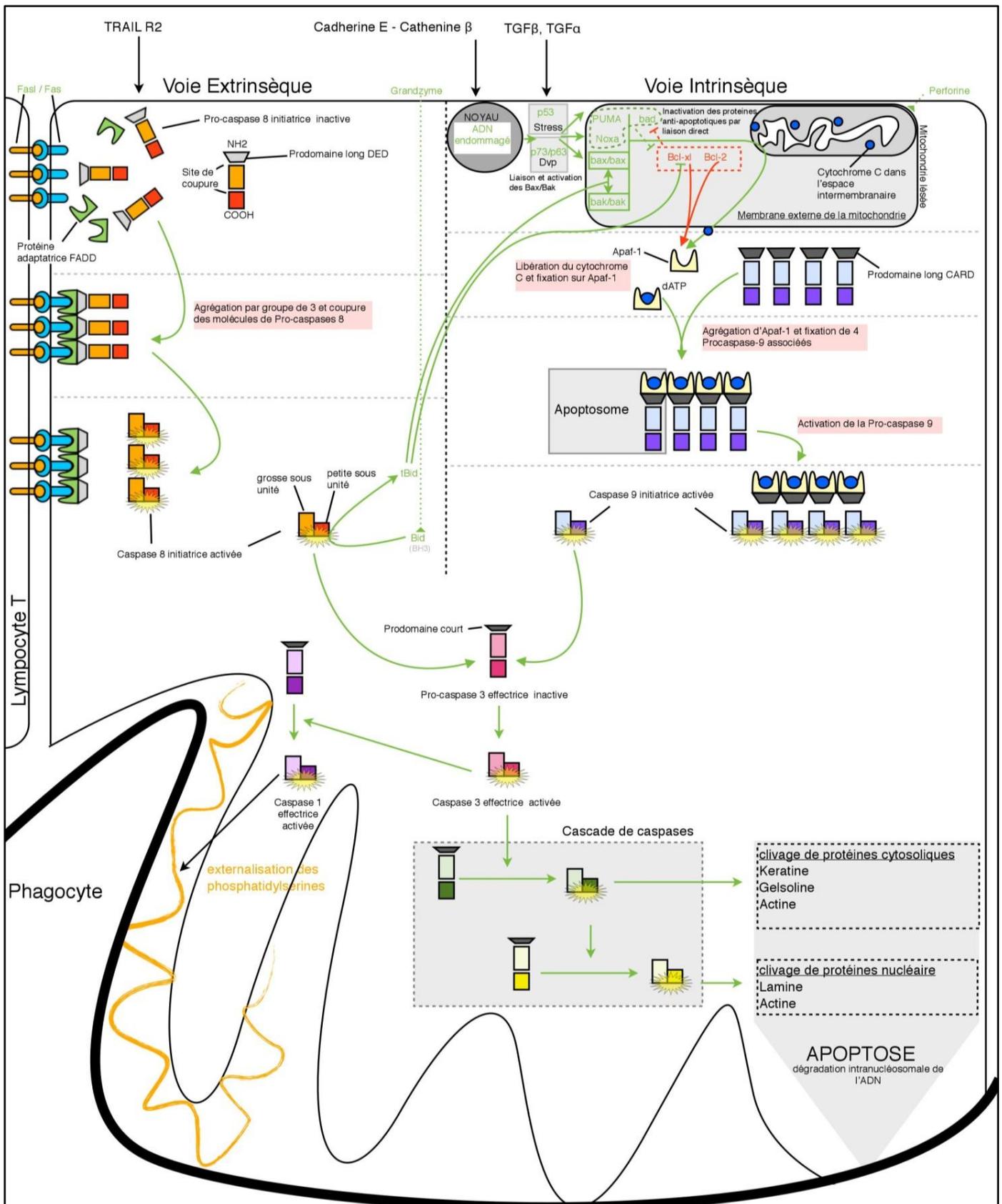


Figure 2 : Mécanisme de régulation de l'apoptose : voie intrinsèque et voie extrinsèque ³⁰

II.B- Contrôle mitochondrial de l'apoptose par la famille Bcl-2

II.B.1- Rôle de la protéine Bcl-2

L'oncogène *Bcl-2* qui induit la viabilité cellulaire a été découvert dans les lymphomes à cellules B dans les années 1980. Un réarrangement au niveau des chromosomes 14 et 18 induit une surexpression de la protéine *Bcl-2* s'opposant à l'apoptose³¹.

Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Il existe au moins une vingtaine de protéines dans cette famille ; certaines sont plus impliquées pour la viabilité cellulaire, protéines anti-apoptotiques (*Bcl-2*, Bcl-XL, Bcl-w etc.), et d'autres sont pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid etc.). Ces protéines possèdent chacune au moins l'un des quatre domaines nommés BH (*Bcl-2 Homologous domains*)^{20,32,33} (Fig. 3). *Bcl-2*, située sur la membrane mitochondriale, entrave l'homodimérisation de Bak et de Bax et empêche ainsi la formation de pores de transition de perméabilité qui favorisent le relargage du cytochrome c dans le cytosol. Les protéines *Bcl-2*, en formant des dimères *Bcl-2/Bcl-2* ou des hétérodimères avec les protéines Bak et Bax, jouent donc un rôle anti-apoptotique^{16,20}. En effet, *Bcl-2* est capable d'inhiber l'apoptose induite par des agents cytotoxiques, des radiations ionisantes ou des glucocorticoïdes^{16,32,33}.

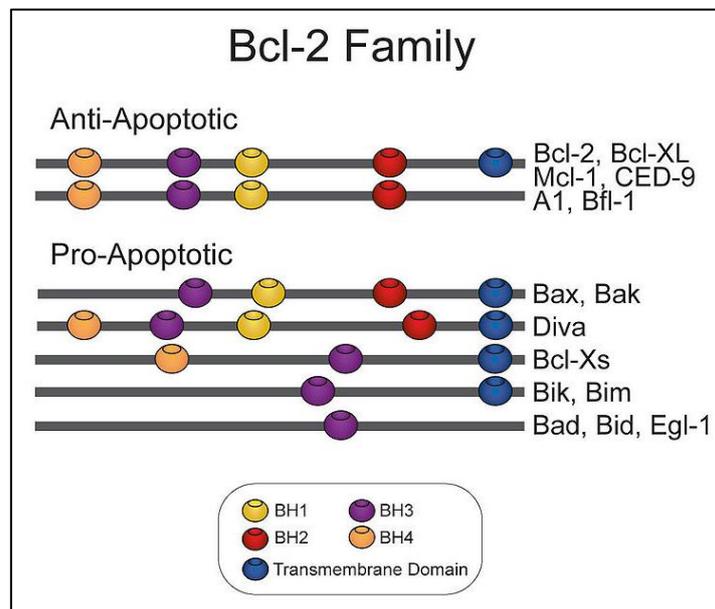


Figure 3 : Classification des différents membres de la famille Bcl-2³⁴

II.B.2- Intérêt du ciblage de la protéine Bcl-2 : Conversion de gène anti-apoptotique en pro-apoptotique

La protéine *Bcl-2* peut être inhibée par une protéine comme Bad (*Bcl-associated agonist of cell death*, en anglais). Bad est une protéine de la famille de Bcl-2 de type BH3 seulement, ce qui signifie qu'elle ne possède qu'un seul domaine d'homologie avec les autres protéines de cette famille, en l'occurrence, le domaine BH3. En conditions pro-apoptotiques, elle forme un lien avec *Bcl-2* et l'empêche de se lier aux protéines pro-apoptotiques multi-domaines telles Bax et Bak. Dans ces conditions, *Bcl-2* n'empêche plus l'homodimérisation de Bax ou de Bak. Ces dernières peuvent donc s'homodimériser pour former des pores. Le cytochrome c peut alors migrer de la mitochondrie, passer dans le cytosol et se lier au facteur activateur des protéases apoptotiques (Apaf-1, apoptotic peptidase activating factor)³⁵. Ceci déclenche une cascade de réactions aboutissant à l'activation d'enzymes protéolytiques : caspases (cystéine-protéases), et à la formation de l'apoptosome²⁰ (Fig. 4).

De plus, selon la voie qui active la cellule vers la mort cellulaire programmée, il est possible que l'inhibition par *Bcl-2* soit contournée. Ainsi, si l'apoptose est activée par liaison du ligand de Fas avec son récepteur, il se produit une accumulation de caspase-3 dans le cytosol. Dans ces conditions, la caspase-3 est capable de cliver *Bcl-2* dans sa boucle de l'extrémité NH2. Ce clivage a pour effet, non seulement d'altérer les fonctions anti-apoptotiques de *Bcl-2*, mais aussi de lui conférer un pouvoir pro-apoptotique. Dans ces conditions, le processus de mort cellulaire est accéléré par la présence de *Bcl-2* clivé. Les processus par lesquels *Bcl-2* accélère l'apoptose à la suite de son clivage sont encore inconnus^{16,20}.

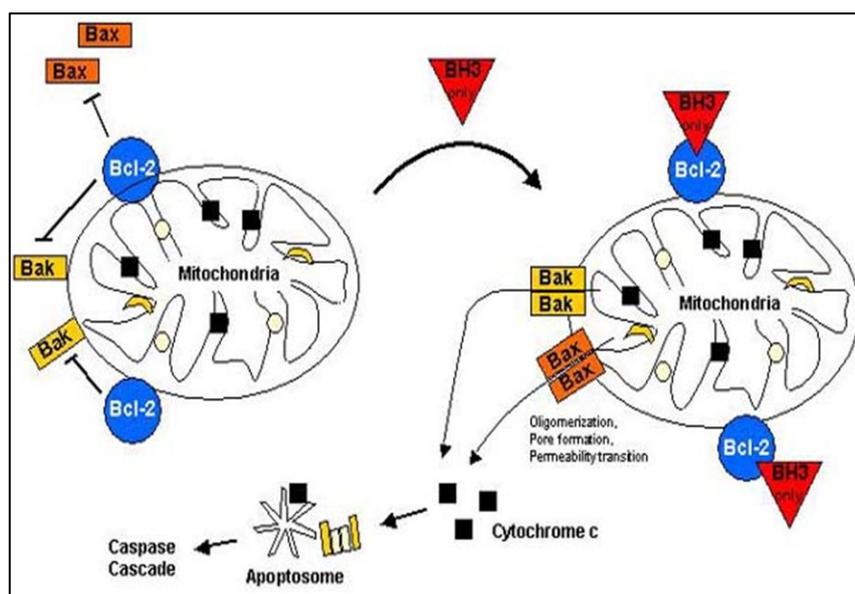


Figure 4 : Régulation de l'apoptose par clivage de *Bcl-2*

En outre, au niveau de la mitochondrie, il est démontré que *Bcl-2* est capable d'interagir avec un récepteur du noyau cellulaire appelé NR4A1. L'interaction de NR4A1 avec *Bcl-2* représente le premier exemple où un récepteur nucléaire se lie à un membre de cette famille. Ainsi l'interaction entre NR4A1 et *Bcl-2* permet indirectement une homodimérisation des protéines Bax et de Bak déclenchant la libération du cytochrome c suivie de l'apoptose^{32,36}. Cette interaction NR4A1-*Bcl-2* convertit *Bcl-2* en molécule pro-apoptotique. Alors comment *Bcl-2* est-elle convertie en une tueuse en se liant à NR4A1 ? En effet, les membres anti-apoptotiques tels que *Bcl-2* possèdent des poches hydrophobes qui sont essentielles pour leur effet, et leur domaine BH3 est dissimulé. Par contre, les membres pro-apoptotiques tels que Bax ont un domaine BH3 exposé, lequel se lie aux poches hydrophobes des membres anti-apoptotiques (*Bcl-2*) pour inhiber leur effet de survie. La région de la boucle non structurée, longue d'environ 50 acides aminés et située entre les domaines BH4 (hélice α_1) et BH3 (hélice α_2)³⁷ (Figure 5), extrêmement complexe, joue

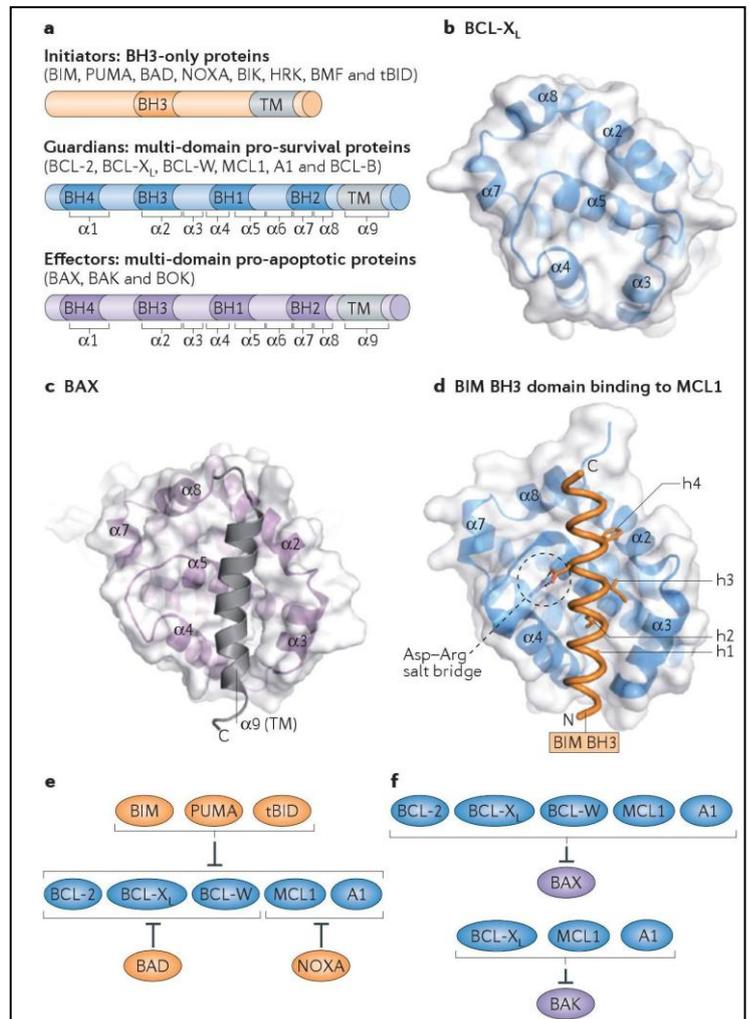


Figure 5 : La structure des protéines de la famille de Bcl-2 et la sélectivité de leurs interactions (Czabotar et al., 2013)

un rôle important dans la régulation des fonctions de *Bcl-2*^{32,33}. Lors de la fixation de NR4A1 sur la région de cette boucle de *Bcl-2*, le sillon de la liaison hydrophobe de *Bcl-2* subit un arrangement extensif entraînant l'exposition de son domaine BH3. Ce changement de conformation est responsable de la conversion de *Bcl-2* cytoprotectrice en *Bcl-2* cytodestructrice^{32,33} (Fig. 6). Le récepteur nucléaire NR4A1 se comporte en agent potentiellement pro-apoptotique. Alors, la question est de savoir comment NR4A1 migre du noyau cellulaire jusqu'à sa fixation à *Bcl2*. Cet aspect sera traité dans le paragraphe consacré au récepteur NR4A1.

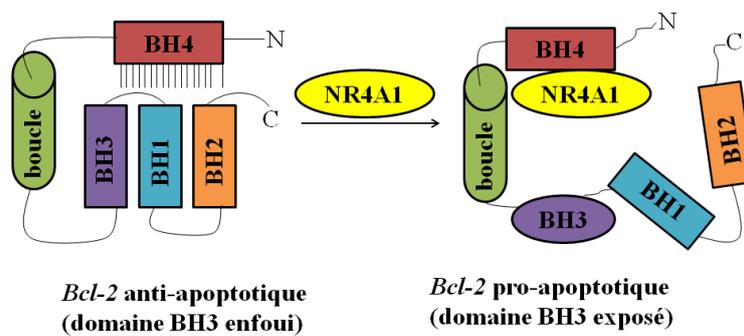


Figure 6 : Schéma de la conversion de *Bcl-2* par NR4A1. La conformation anti-apoptotique de *Bcl-2* est maintenue par la formation de liaison de BH3 avec la poche hydrophobe impliquant la région C-terminal. L'interaction de NR4A1 avec la boucle engendre un réarrangement conduisant à l'exposition du domaine BH3.³³

Remarque : Le réticulum endoplasmique RE, organe cellulaire lié à la membrane nucléaire, semble très impliqué dans l'apoptose. Il agirait selon deux modes d'action²³ : par initiation de l'apoptose indépendante de la mitochondrie ou par sensibilisation de la mitochondrie aux signaux pro-apoptotiques. Dans les deux cas, il s'ensuit une libération de la caspase initiateur 12.

II.C- Les inhibiteurs des protéines d'apoptose - *Inhibitor of apoptosis proteins* - IAPs

II.C.1- Par inhibition des caspases

La cascade des enzymes caspases est sous le contrôle d'inhibiteurs endogènes d'apoptose appartenant à la famille des IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*). Sept protéines de cette famille ont été identifiées (NAIP, XIAP, cIAP1, c-IAP2, Survivine, Livine, Ts-IAP) chez certains organismes, et elles ciblent des caspases initiateur et/ou effectrices (Fig. 7a).

Deux mécanismes d'inhibition des caspases sont possibles. L'un est basé sur l'interaction entre au moins l'un des trois domaines BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) (Fig. 7b) que possèdent les IAPs et les caspases. Ce domaine BIR est un caractère essentiel des IAPs, mais ne serait pas suffisant pour assigner un rôle anti-apoptotique à une protéine. L'autre mécanisme implique le domaine RING de certains IAPs humains²³.

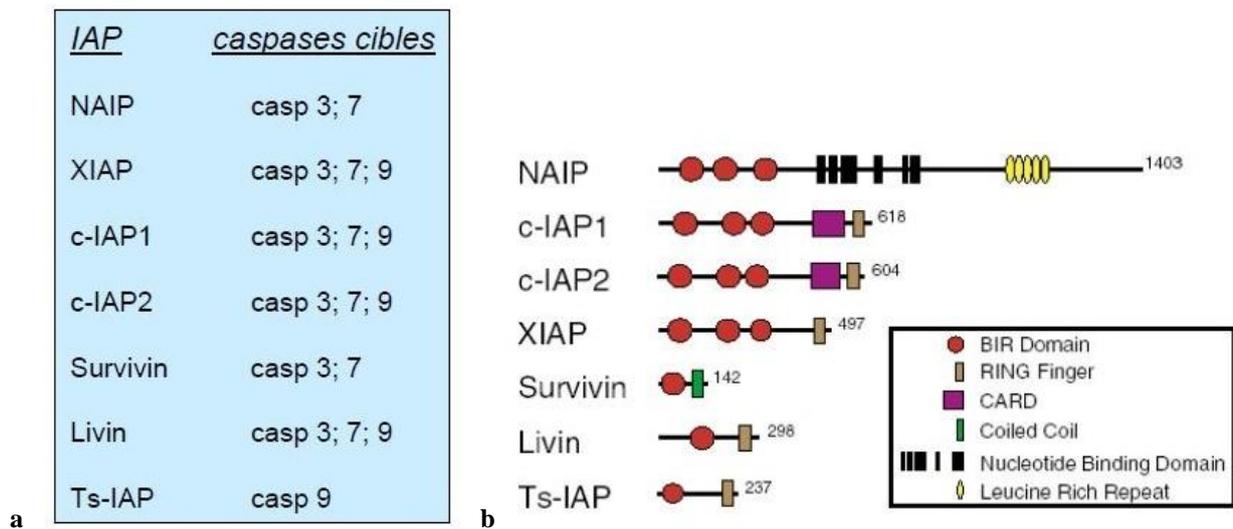


Figure 7 : a) Les IAPs et leur cibles enzymatiques correspondantes, b) Les IAPs possèdent tous au moins un domaine BIR et certains le domaine RING²³

II.C.2.- IAPs, comme cibles potentiels dans l'apoptose

Les IAPs sont des protéines anti-apoptotiques dont le niveau d'expression est élevé dans certaines tumeurs. Le processus d'amplification génique conduisant à la surexpression de certaines IAPs, a été mis en évidence.

L'inhibition de l'expression de ces protéines ou de leur activité par d'autres protéines ou par des petites molécules de synthèse, constitue une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer par voie apoptotique^{23,38}.

II.D- Molécules agissant comme agents pro-apoptotiques

II.D.1- Par voie extrinsèque²³

Une possibilité d'activer l'apoptose par la voie extrinsèque est d'administrer le ligand de synthèse de récepteur de mort ou un agoniste de ce ligand au patient afin d'induire l'apoptose des cellules tumorales. Cela a pour avantage d'accéder directement aux caspases par la machinerie des récepteurs de mort et limite en théorie les résistances. Toutefois, l'utilisation expérimentale de ligands comme TNF ou CD95L/FasL s'est révélée peu prometteuse car ces ligands engendrent des effets secondaires létaux (réaction inflammatoire importante tel un choc septique dans le cas de TNF et destruction des hépatocytes dans le cas de FasL).

La découverte du ligand TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) constitue cependant un espoir car ce ligand et ses récepteurs sont exprimés dans la quasi-totalité des

tissus normaux, ce qui montre que des mécanismes de protection existent dans les tissus sains. Par ailleurs, il a été démontré que TRAIL induit la mort cellulaire par apoptose de divers types de cellules tumorales (lignées ou culture primaire).

II.D.2- Par voie intrinsèque

L'une des stratégies d'initiation de l'apoptose consiste à faire intervenir des molécules synthétiques ou d'origine naturelle qui vont cibler la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose. Parmi ces molécules nous avons :

- *Gossypol et ses dérivés ciblant des protéines de la famille Bcl-2*

Le gossypol (**4**) est un polyphénol isolé des graines de cotonnier du genre *Gossypium* (famille des Malvaceae) (Fig. 8). Il a été extrait pour la première par Kuhlmann en 1861 et c'est en 1899 que Marchelewski obtint la forme cristalline pure, qu'il nomma gossypol (formé du nom *Gossyp*(ium) + polyphén(ol))³⁹. C'est le pigment responsable de la couleur de l'huile de coton.

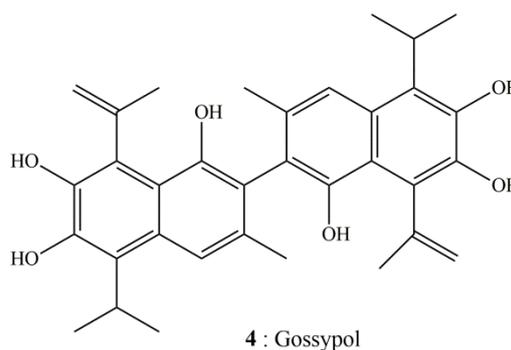


Figure 8 : *Gossypium herbaceum* (MALVACEAE)⁴⁰

Le gossypol se trouve dans des structures particulières dites « glandes à gossypol » de plusieurs espèces de cotonnier mais il peut également être extrait des écorces de *Thespesia populnea*, arbuste appartenant aussi à la famille des Malvaceae, et qui pousse en Afrique, en Asie et dans les Îles Pacifiques⁴¹.

Le gossypol est un pigment toxique pour l'homme et les animaux, en revanche les graines dépourvues de glandes peuvent être utilisées pour l'alimentation humaine ou animale CIRAD, La graine de cotonnier, une source potentielle de nouveaux produits alimentaire ou industriels⁴².

En ce qui concerne ses activités, le gossypol est en phase 2 de développement clinique sous le

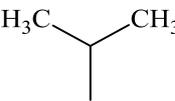
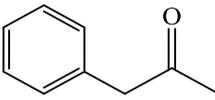
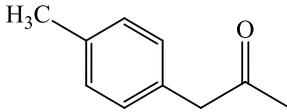
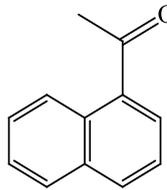
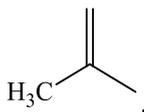
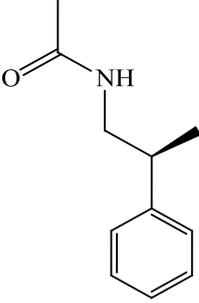
nom de **AT-101** dans un cas très particulier de cancer du poumon à petites cellules. Il est utilisé par voie orale et agit comme inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*Bcl-2*, Bcl-XL, Bcl-W et Mcl-1) et comme inducteur des protéines pro-apoptotiques noxa et puma ⁴³.

Pellecchia et coll. ont développé une méthode par spectroscopie RMN pour suivre les interactions intermoléculaires entre de petites molécules et des macromolécules en se basant sur la sensibilité du déplacement chimique des atomes en fonction de leur environnement, apportant ainsi des informations précises sur cet environnement comme la liaison d'un ligand à une protéine ou un acide nucléique cible et les parties impliquées dans la liaison ⁴⁴.

D'après les travaux de Wei et coll., guidés en partie par cette méthode de criblage par RMN, une série de dérivés de synthèse 5,5'-gossypol substitués se sont avérés de potentiels antagonistes des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL. Dans cette série, le composé le plus actif est BI79D10 (**5**) qui interagit avec Bcl-XL, *Bcl-2* et Mcl-1 à des concentrations inhibitrices (CI₅₀) respectives de 0,19 ; 0,36 et 0,52 µM (Tab. 2), et inhibe la croissance cellulaire de lignée des cellules cancéreuses humaines H460 du poumon avec une concentration efficace (CE₅₀) de 680 nM. Il est aussi un inducteur d'apoptose, dose-dépendante, de lignée cellulaire humaine RS11846 du lymphome ⁴⁵.

D'autres dérivés du gossypol ont également été développés ; il s'agit de composés obtenus par « design rationnel » comme le **Sabutoclax** ou **BI-97C1 (9)** qui a montré une puissante activité sur un large spectre de tumeurs humaines. Le mode et la structure du gossypol dockée et liée à Bcl-XL a fournit des relations structure-activité virtuelles qui ont conduit à l'isolement du composé **9** un isomère optiquement actif de l'apogossypol. Le dérivé gossypol **9** a présenté une meilleure efficacité dans l'inhibition de la croissance des cellules PC-3 et dans le traitement de tumeur au sein d'un modèle de souris transgénique de lymphome, par rapport à son analogue **5** ⁴⁶.

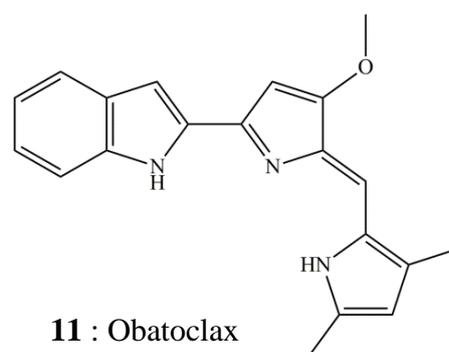
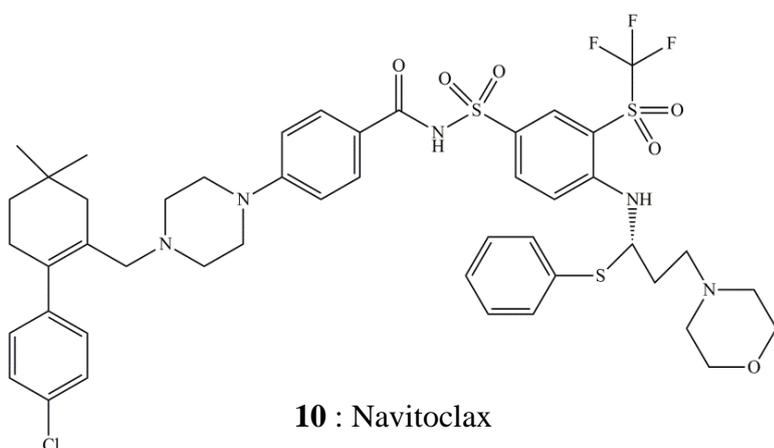
Tableau 2 : Activités biologiques de dérivés gossypol substitués sur les récepteurs Bcl-X_L, Bcl-2 et Mcl-1

Composé	R ₁ ,	R ₂	CI ₅₀ (μM)			K _d (μM)
			FPA			ITC
			Bcl-XL	Bcl-2	Mcl-1	Bcl-XL
5 : Apogossypol	H,		3,69	2,80	2,60	1,70
6 : BI79D10	H,		0,19	0,36	0,52	0,17
7 : BI79F7	H,		0,32	0,78	1,10	0,04
8 : BI79D9	H,		0,16	1,90	2,20	2,75
9 : BI79C1	 ,		0,13	0,56	0,049	--

FPA : Essai de polarisation de fluorescence (*Fluorescence polarization assay*) ;
 ICT : Titration calorimétrique isotherme (*Isothermal titration calorimetry*)

- **Autres petites molécules agissant sur des protéines de la famille Bcl-2 : Navitoclax (ABT-263) et Obatoclax, 10 et 11**

Les molécules, Navitoclax (**10**) et Obatoclax (**11**), sont en essais cliniques respectivement phase I et II pour le traitement de différents types de cancer et souvent combinés avec d'autres agents cytotoxiques comme le Ritumaxib⁴⁷⁻⁵⁰. Elles présentent des mécanismes d'action similaires en ciblant et en inhibant des gènes de la famille Bcl-2 (Bcl-XL, Bcl-w etc.) mais, Navitoclax, contrairement à Obatoclax, n'aurait aucun effet en dehors des cibles protéiques^{51,52}. Navitoclax est considéré comme un agent capable d'induire l'apoptose dans des cellules sénescents mais pas dans les cellules non sénescents et l'Obatoclax s'est avéré un inducteur d'apoptose dans les cellules cancéreuses (leucémie, lymphome) et un inhibiteur de la croissance tumorale⁵³.



- **Derivés indoliques de type Indolyl-3-carbinol (I3C) et 3,3'- diindolylméthane (DIM)**

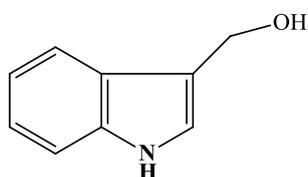
L'activité biologique de l'indole-3-carbinol (I3C), montre que ce composé indolique est un inhibiteur de la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses, telles que PC-3 et CA1a pour le cancer de la prostate, et MCF-7, MDA-MB-43 et MDA-MB-468 pour le cancer du sein et un inducteur de la mort cellulaire par apoptose^{7,54-58}. Selon le contexte cellulaire, le composé I3C agirait soit comme agoniste de gène pro-apoptotique (Bax) ou soit comme antagoniste de gène anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL)^{54,57-59}.

Tout comme I3C, le 3,3'-diindolylméthane (DIM) est cytotoxique pour des cellules cancéreuses et inhibe la croissance de plusieurs types de tumeurs et ces réponses sont accompagnées d'une activation de voies pro-apoptotiques telles que voie mitochondriale (régulation de Bcl-2 et amélioration de l'expression de Bax) ou voie du stress du réticulum endoplasmique⁶⁰.

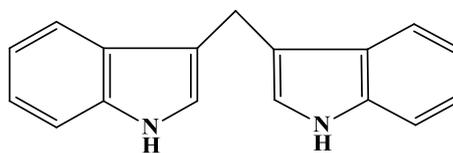
DIM induit certaines réponses observées pour I3C, ce qui serait cohérent avec la conversion de I3C en DIM dans les milieux de cultures cellulaires ⁶¹.

Afin d'accroître la biodisponibilité du DIM des formes locales (Cervikon-DIM), suppositoires intravaginaux, ont été préparées pour le traitement de cancers du col de l'utérus. Un essai clinique double aveugle a montré une efficacité et des effets secondaires acceptables pour le traitement de patients atteints de néoplasie intraépithéliale cervicale et pourrait présenter une bonne alternative pour des femmes jeunes stade I-II car il permet de conserver le col pour des grossesses ultérieures ⁶².

Les analogues et dérivés de synthèse sont développés ultérieurement dans la partie **IV** de ce chapitre.



2 : Indole-3-carbinol (I3C)



3 : 3,3'-diindolylméthane (DIM)

- **Oligonucléotides antisens (ASOs)**

Dans la stratégie antisens, les oligonucléotides synthétiques ou produits *in situ* par des constructions d'ADN, sont utilisés pour reconnaître spécifiquement l'ARN messager d'un gène. Le but est d'inhiber l'expression du gène correspondant, soit en induisant le clivage de l'ARNm, soit en bloquant physiquement l'ARNm ou en modifiant son métabolisme ⁶³. Plusieurs oligonucléotides anti-sens sont en cours d'études *in vitro* et *in vivo*. Nous n'en citerons ici que trois exemples.

Cette stratégie vise à réduire le niveau d'expression des protéines *Bcl-2*.

L'oblimersen (Genasense, G3139) (**12**), un oligodeoxyribonucléotide synthétique de 18 base (5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'), est utilisé pour inhiber l'expression de la protéine *Bcl-2*. Mais la mise sur le marché de Oblimersen a été refusée par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en juillet 2007. Par ailleurs, plusieurs essais cliniques de phase 1 et 2 tendent à montrer l'efficacité de la co-administration de G3139 avec les taxanes ⁶⁴ tels que le Docétaxel ou le Paclitaxel® dans le traitement des cancers de la prostate ^{65,66}, du sein ⁶⁷ et du poumon ⁶⁸.

Parmi les oligonucléotides antisens développés par Hu et coll., G4AS ODN (**13**), de séquence 5'-GCTGAGTCTCCATATTGCC-3', s'avérait le plus efficace en régulant à la baisse le taux de l'ARNm de la protéine XIAP anti-apoptotique (*X-linked inhibitor of apoptosis*) à 55 % et induirait la mort cellulaire à 60 % dans les cultures de cellules H460 (lignée cellulaire de cancer de poumon)

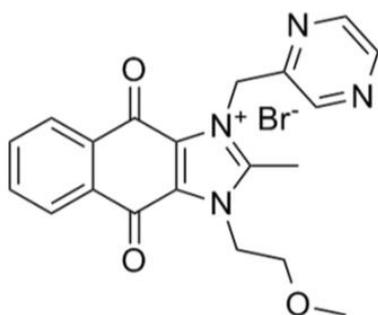
⁶⁹. La vinorelbine (Navelbine®) (**14**), agent anticancéreux issu de la recherche française, est utilisé dans le traitement des cancers du poumon et du sein. Selon Hu et coll., l'association de 15 mg/kg de **13** avec 5 mg/kg de **14** améliorerait l'activité chimiothérapeutique contre les cellules H460, par rapport à chaque agent utilisé seul ⁶⁹.

Par ailleurs, plusieurs approches thérapeutiques visant à inhiber l'expression de la protéine survivine continuent d'être développées. Par exemple, l'oligonucléotide antisens LY2181308 (5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3') (**15**) a été testé avec succès dans un essai clinique de phase I et la phase II serait en cours ⁷⁰.

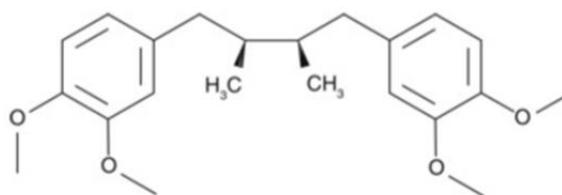
- Approches thérapeutiques autres que les oligonucléotides antisens (ASOs) ciblant la survivine

À côté des ASOs, il faut noter que de petites molécules inhibitrices de l'activité anti-apoptotique de survivine sont de plus en plus étudiées. La molécule YM155 (**16**), issue de criblage d'une chimiothèque pour son activité inhibitrice de la transcription de survivine, aurait permis d'induire une régression tumorale importante chez des patients au cours d'essais cliniques de phase I/II ⁷¹⁻⁷³⁷⁴⁻⁷⁶.

L'acide tétra-*O*-méthyl nordihydroguaiarétique (Terameprocol) (**17**) a montré des propriétés permettant de supprimer l'expression spl-dépendante du gène de la survivine et d'activer l'apoptose mitochondriale dans les cellules tumorales ⁷⁷ ou encore induisant une augmentation de la radiosensibilisation du carcinome pulmonaire non à petites cellules ⁷⁸.



16 : YM155



17 : Terameprocol

III- NR4A1 : une cible potentielle dans la thérapie anticancéreuse

III.A- Les récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires (NRs) sont des facteurs de transcription qui régulent plusieurs voies biologiques clés au niveau des tissus normaux, malades ou néoplasiques^{32,79,80}. De nouvelles fonctions de ces protéines sont continuellement découvertes. Il y a quarante huit NRs humains et, à peu d'exception près, ces récepteurs sont tous constitués d'un domaine *N*-terminal (A/B ou *N*-ter ou AF-1), d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD, pour DNA-Binding Domain) (C), d'une région charnière (D), et d'un domaine *C*-terminal (E/F ou *C*-ter ou AF-2) (Fig. 9). Vingt cinq de ces NRs sont classés comme des récepteurs "orphelins" c'est-à-dire sans ligand endogène connu⁸⁰. Parmi ces derniers récepteurs, nous avons les récepteurs orphelins NR4A au nombre de trois : NR4A1, NR4A2 et NR4A3⁸¹. Seul le récepteur NR4A1, aussi connu sous la dénomination de Nur77 (chez la souris) ou TR3 (chez l'homme) ou NGF-IB (chez le rat), est exprimé au niveau de plusieurs tissus cellulaires et joue un rôle dans les multiples fonctions cellulaires telles que la prolifération et la différenciation cellulaires et l'apoptose^{79,80}.

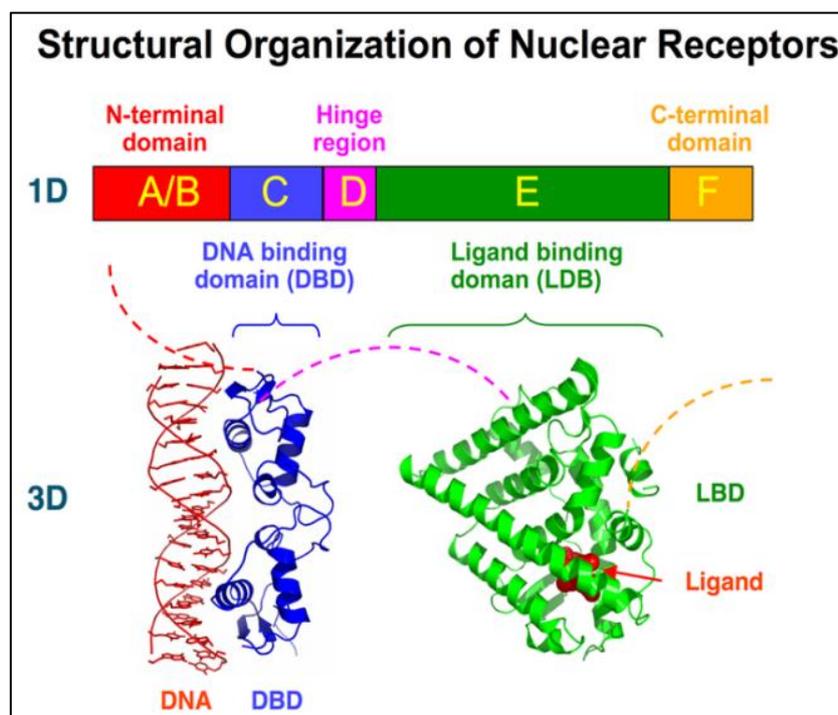


Figure 9 : Structure protéique des récepteurs nucléaires (NRs) : en haut - schématique 1D de séquences d'acides aminés d'un récepteur nucléaire ; en bas – structures 3D des domaines DBD (lié à l'ADN) et LBD (lié au ligand) du récepteur nucléaire des œstrogènes (ER). Le domaines N-terminal (A/B), la région charnière (D) et le domaine C-terminal sont représentés respectivement par les lignes discontinues rouges, violet et orange.

III.B- Structure et fonctions d'activation de NR4A1

NR4A1 est un récepteur nucléaire de la sous famille 4, du groupe A, membre 1. Ce récepteur est exprimé de manière ubiquitaire avec une expression légèrement plus élevée dans les tissus myogéniques et endocriniens ⁸². Le récepteur TR3 a été isolé en 1989. C'est un membre de la superfamille des récepteurs des stéroïdes. Le gène codant pour TR3 a pu être isolé à partir d'une bibliothèque d'ADN de prostate humaine et l'analyse de sa séquence nucléotidique a permis de mettre en évidence sa proximité avec le gène de souris Nur77 ⁸³.

Le gène NR4A1/TR3 (Fig. 10) peut être activé par un facteur de croissance présent dans le sérum, par PDGF (platelet derived Growth factor) et FGF (fibroblast growth factor) ^{84,85}.

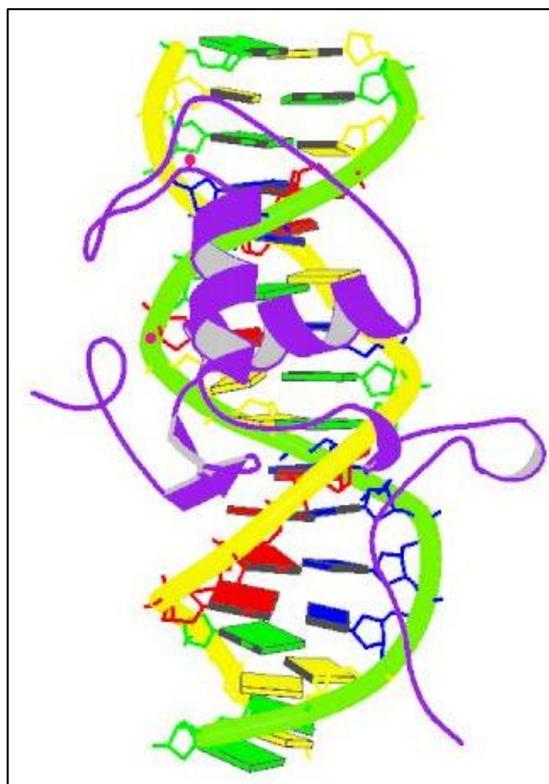


Figure 10 : Image du gène NR4A1/TR3, gène codant pour un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiques

III.B.1- Caractéristiques structurales de NR4A1

L'ARNm de NR4A1 (Nur77) code pour une protéine de 64 738 kDa avec un point isoélectrique de 6,72 ⁸⁶. Le gène NR4A1 contient sept exons : le domaine *N*-ter est codé sur l'exon 2, le domaine de liaison à l'ADN codé entre les exons 3 et 4, et les domaines de dimérisation et de liaison du ligand codés sur les exons 5 et 7 ⁸⁷. Le domaine *N*-ter de NR4A1 (NGFI-B) est responsable de l'activité transactivationnelle et le domaine *C*-ter est lui impliqué dans la régulation de la localisation subcellulaire et la transactivation ⁸⁸. Dans le DBD, le doigt de zinc (Znf) motif structural de petites protéines se caractérise par la coordination d'un ou plusieurs ions zinc pour stabiliser le repliement protéique (Fig. 11)⁸⁹. Le Znf est indispensable pour sa forte affinité avec l'ADN ⁹⁰. NR4A1 est riche en acides aminés : sérine et thréonine et contient beaucoup de sites de phosphorylation potentiels dans sa région *N*-ter alors que sa région *C*-ter en est pauvre ⁸⁸.

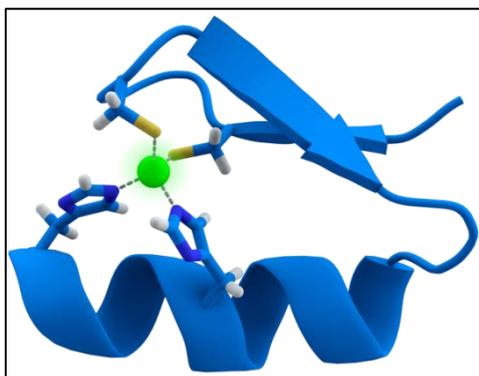


Figure 11 : Image de doigt de zinc Cys2His2 : l'ion zinc en vert, complexé à deux histidines (en bas) et deux cystéines (en haut)

Le domaine de liaison du ligand (LBD) de NR4A1 (Fig. 12) est atypique car il est différent du LBD classique des récepteurs nucléaires. Le LBD classique contient en effet une poche de liaison du ligand et un co-activateur qui, tous deux, sont absents dans la famille NR4A. Alors que la plus part des récepteurs nucléaires présentent une surface hydrophobe qui se traduit par une fente, NR4A1 possède une surface hydrophile ⁸¹.

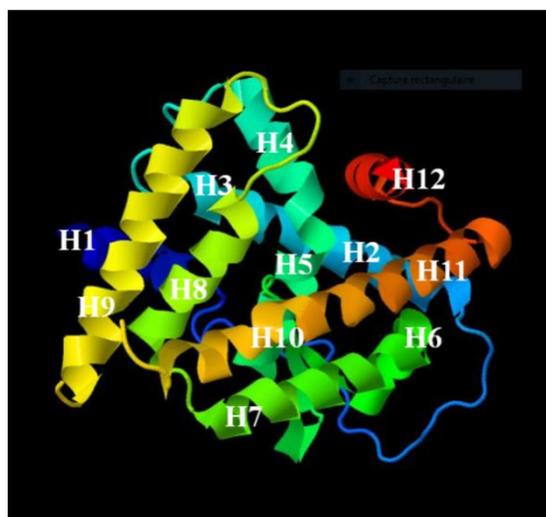


Figure 12 : Image 3D de la structure cristallographique du domaine LBD de NR4A1 comportant 12 hélices (code PDB 2QW4)

La structure cristallographique du LBD de NR4A1 (NGFI-B), adopte une conformation active et la poche hypothétique de liaison du ligand est remplie de chaînes latérales aromatiques et hydrophobes volumineuses comme celles observées pour les structures de NR4A2 (Nurr1) et DHR38 ^{91,92}. Dans l'ensemble, les structures LBD de NR4A1 et NR4A2 se superposent bien à

l'exception d'un déplacement sensible de l'hélice H12. Les échanges d'acides aminés conservés des hélices H3 ou H12 peuvent expliquer en partie ces différentes positions de H12. De plus, la permutation de la région H11-H12 entre NR4A1 et NRA2 (Nurr1), réduirait l'activité du domaine AF-2 de Nurr1 alors qu'à l'inverse, une légère augmentation de l'activité du LBD-NR4A1 est constatée. Les mutations individuelles de résidus (mutants M414L, L591I respectivement) de H12 ou H3, réduit là encore de manière significative l'activité cellule-dépendante du LBD de Nurr1. La mutation d'autres résidus de la surface hydrophobe dans la région H11-H12 affecte sévèrement la transactivation de Nurr1. Ces données mettent en évidence alors la spécificité de la position de l'hélice H12 et l'existence une nouvelle surface co-régulatrice qui déterminent les activités de AF-2 de NR4A1 et Nurr1 ⁷⁹.

III.B.2- Fonctions d'activation de NR4A1

Les fonctions d'activation ont été caractérisées à la fois au niveau des domaines *N*-ter et *C*-ter de la plus plupart des NRs et des variantes avec des suppressions/mutations dans plusieurs domaines clés ont été identifiés et leur fonctions étudiées. Par exemple, deux récepteurs nucléaires, appelés SHP (ou NR0B2) et DAX-1 (ou NR0B1), et n'ayant pas de DBD classique, peuvent s'associer avec un récepteur partenaire tel que NR4A1 en se liant uniquement à son domaine de liaison d'ADN ^{93,94}.

III.C- NR4A1 et le cancer ⁹⁵

Plusieurs études sur NR4A1 et son rôle dans le cancer montrent que ce récepteur pourrait se comporter tantôt comme un facteur de survie cellulaire, tantôt comme un facteur de mort cellulaire. Par exemple, les résultats de tests *in vivo* dans lesquels NR4A1 et NR4A3 ont été inactivés ont montré que NR4A1 agit comme un suppresseur de tumeur dans le cas de la leucémie myéloïde aigüe mais pourrait avoir un rôle oncogène sur d'autres types de leucémie. Sur les tumeurs solides, par exemple, NR4A1 est surexprimé dans le cancer du côlon, du pancréas, du sein (hormono-dépendant ou non) et du poumon, et chez les patients atteints en particulier du cancer du sein, du poumon et du côlon, une expression élevée de NR4A1 est un mauvais pronostic. L'activité fonctionnelle de NR4A1 dans le cancer a été largement étudiée dans des lignées cancéreuses (côlon, ovaire, mélanome, lymphome, col de l'utérus, pancréas) soit par inactivation partielle, soit par surexpression, et les résultats montrent que NR4A1 régule la prolifération cellulaire, la survie, la progression du cycle cellulaire, la migration et l'invasion.

Les mécanismes d'action de NR4A1 sont très complexes et impliquent à la fois des récepteurs nucléaires et cytosoliques. Les premières études sur NR4A1 démontrent qu'une nouvelle voie par laquelle le composé rétinoloïde **CD437** (acide 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphényl]-2-naphtalène carboxylique) (**18**) et plusieurs de ses analogues déclenchent l'apoptose de cellules cancéreuses en induisant l'exportation nucléaire de NR4A1. Cette exportation nucléaire, rappelons-le, est aussi liée à la formation du complexe pro-apoptotique NR4A1-*Bcl-2* au niveau de la mitochondrie. Elle est aussi observée en employant les mimes de peptides ou le paclitaxel. NR4A1, dans le cytosol, joue un rôle important dans le mécanisme d'action de plusieurs agents antinéoplasiques pro-apoptotiques tels que les médicaments à base de platine.

L'activité extranucléaire de NR4A1 est une réponse induite par des médicaments et qui se traduit par l'induction de l'apoptose. Les voies de signalisation de NR4A1 restent complexes. Une étude réalisée sur des cellules de cancer du colon ont permis de mettre en évidence des interactions avec p53, conduisant à son inactivation puis à une activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Fig. 13). Une autre voie régule l'expression de la survivine et d'autres gènes de la famille Sp1 *via* des zones riches en GC conduisant à la prolifération cellulaire et enfin une activation du gène MMP9 conduit à la suppression de la glycoprotéine E-cadhérine (ou E-CDH) avec pour conséquence l'invasion cellulaire.

Ces exemples démontrent que, de part son rôle coopératif, NR4A1 exercerait des fonctions fonction pro-oncogéniques. Ainsi, la recherche et le développement de composés antagonistes de NR4A1 constituerait une nouvelle stratégie pour la chimiothérapie du cancer. Wu et coll. ont identifié une série de composés qui se lie à NR4A1, et qui sont soit agonistes ou soit antagonistes de ce récepteur ; le chef de file de ces composés étant la Cytosporone B (Csn-B). Nous en reparlerons ultérieurement plus en détails au chapitre 3.

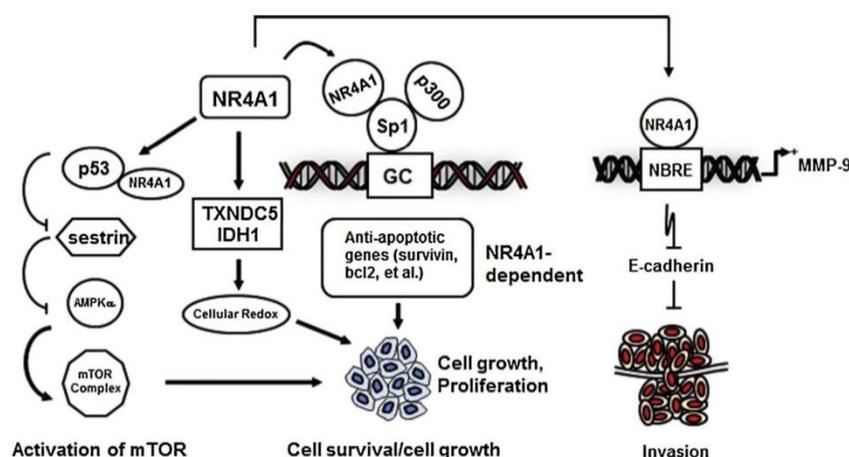
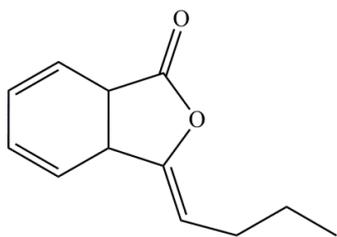


Figure 13 : Différentes voies de régulation de gènes par NR4A1 au sein de cellules cancéreuses du côlon⁹⁵

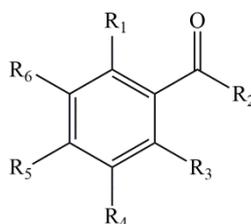
IV- Les ligands de NR4A1

Comme nous l'avons vu précédemment, certains composés induisant l'apoptose ne se lient pas directement sur le domaine de liaison de NR4A1 mais induisent la migration de NR4A1 et la formation d'un complexe avec *Bcl-2* conduisant à la perméabilité mitochondriale, d'autres vont se lier à NR4A1. La translocation de NR4A1, la localisation extracellulaire du récepteur sont à la fois fonction de la cellule considérée et du ligand.

Wu et coll. ont identifié une série de composés qui se lient à NR4A1, et qui sont soit agonistes ou soit antagonistes de ce récepteur. Le *n*-butylidène-phthalide (BP) (**19**) composé naturel isolé d'*Angelica sinensis* et la Cytosporone B (Csn-B) (**20**) ont montré des activités *in vitro* et *in vivo* sur le glioblastome multiforme. La Csn-B **20** et ses dérivés tels que l'éthyl-2-(2,3,4-triméthoxy-6-(1-octanoyl)phényl) acétate (TMPA) (**21**), le 1-3,4,5-trihydroxyphényl-nonan-1-one (THPN) (**22**), et pentyl 2-(3,5-dihydroxy-2-nonanoylphényl) acétate (PDNPA) (**23**) interagissent avec des acides aminés le LBD de NR4A1. Le chef de file de ces composés est la Csn-B (**20**) qui, en se liant au récepteur nucléaire NR4A1, va diminuer l'expression d'une protéine anti-apoptotique BRE. La Csn-B a une activité agoniste sur NR4A1 et exerce un effet antitumoral associé à l'export de NR4A1, THPN agirait de manière identique, et le TMPA et PDNPA se comporteraient comme des antagonistes de NR4A1⁹⁶⁻⁹⁹. Nous exposerons ultérieurement avec plus de détails les interactions entre les dérivés de Csn-B et NR4A1 dans le chapitre 3.



19 : *n*-butylidène-phthalide

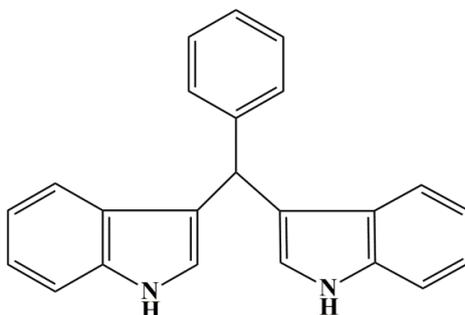


- 20** : R₁ = CH₂COOC₂H₅, R₂ = C₇H₁₅, R₃, R₅ = OH, R₄, R₆ = H (Csn-B)
21 : R₁ = CH₂COOC₂H₅, R₂ = C₇H₁₅, R₃ = H, R₄, R₅, R₆ = OCH₃ (TMPA)
22 : R₁, R₃ = H, R₂ = C₈H₁₇, R₄, R₅, R₆ = OCH₃ (THPN)
23 : R₁ = CH₂COOC₃H₁₁, R₂ = C₈H₁₇, R₃, R₅ = OH, R₄, R₆ = H (PDNPA)

V- Phényldiindolyméthanés interagissant avec NR4A1

À côté du DIM produit majoritaire issu de la condensation *in vivo*¹⁰⁰ et *in vitro* du composé I3C⁶¹, des composés de cette série peuvent également être obtenus par synthèse, en faisant réagir de l'indole ou des indoles substitués avec du formaldéhyde¹⁰¹.

Le remplacement du formaldéhyde par du benzaldéhyde permet d'obtenir alors une nouvelle de classe d'analogues synthétiques de DIM : les phényl-diindolylméthanes (PhéDIMs). Par ailleurs, à partir d'une culture de bactéries du genre *Vibrio* de souche WMBA, Yao et coll. ont isolé plusieurs métabolites secondaires dont l'un aurait été caractérisé et identifié comme étant le phényl-diindolylméthane non substitué (**24**)¹⁰².



24 : PhéDIM non substitué

Activités biologiques de PhéDIMs – Relations structure-activité

- *En Série PhéDIMs para-substitués*

Les PhéDIMs, contrairement aux DIMs, n'activeraient pas les récepteurs AhR, AR, ER¹¹⁻¹³.

Ces composés portant différents substituants en para du phényl comme un groupe *p*-X (X = trifluorométhyl, *t*-butyl, phényl, cyano...) se comportent comme des activateurs du peroxyosome PPAR α et inhibent la croissance des cancers comme le cancer du sein, du colon, de la vessie, de l'ovaire, de la prostate, du poumon, du pancréas et des reins¹². Cependant, il est maintenant admis que ces composés agissent sur des récepteurs nucléaires comme NR4A1. Et, en particulier, des travaux rapportés par l'équipe de S. Safe montrent l'activation de NR4A1 par un panel de PhéDIMs para-substitués (Fig. 14) au sein de lignées cellulaires humaines et l'induction de l'apoptose¹⁰³.

Les dérivés des DIMs sont des composés complexes car ils peuvent induire l'apoptose par induction ou inhibition de l'activité transcriptionnelle de NR4A1 en addition d'une induction indépendante de NR4A1 par induction de l'apoptose *via* la voie de stress du réticulum endoplasmique¹⁰⁴.

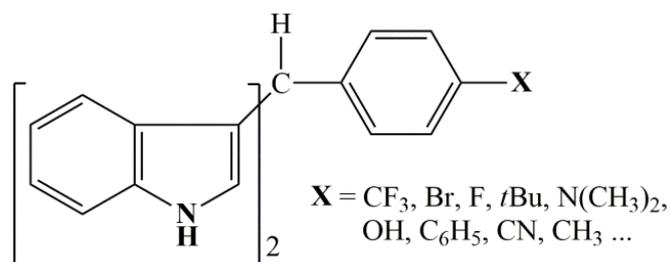


Figure 14 : Formule générale des Phédims para-substitués.

Les Phédims para-substitués sont en général des agents pro-apoptotiques potentiels qui peuvent être classés en deux groupes selon leur mode d'action sur le récepteur NR4A1 : les agonistes tels que le *p*OCH₃-Phédim (**25**) et les antagonistes tels que le *p*OH-Phédim (**26**). L'antagoniste **26** en interagissant avec le récepteur NR4A1 l'empêche d'activer les gènes anti-apoptotiques tels que la survivine ou encore la voie de signalisation de l'enzyme mTOR impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et la croissance cellulaire (voir § III.C de ce chapitre 1). Ceci aurait pour conséquence l'induction de l'apoptose des lignées cellulaires ACHN et 786-O (cancer du rein)¹⁰⁵, A549 et H460 (cancer du poumon)^{106,107}. Toutefois, le mécanisme d'action de **26** reste très complexe, car il induit au sein des cellules cancéreuses Panc1, à la fois le récepteur de mort DR5 et le stress du réticulum endoplasmique qui sont deux voies de signalisation possibles de l'apoptose¹⁰⁸. L'agoniste *p*OCH₃-Phédim induit une diminution de la prolifération des cellules Panc-1. Contrairement à **26**, le composé **25** active NR4A1 et induit ainsi la protéine p21 qui inhibe à son tour la progression du cycle cellulaire. Il a été démontré que l'activation de NR4A1 par **25** se déroule au sein même du noyau cellulaire¹⁰⁹. Cet agoniste de NR4A1 peut aussi induire d'autres protéines pro-apoptotiques comme TRAIL au sein de cellules cancéreuses RKO du côlon¹¹⁰.

Dans le tableau 3 sont résumées les activités cytotoxiques de quatre Phédims étudiés par l'équipe de S. Safe et ayant pour cible NR4A1^{103,105,106,108,110-113}. Les effets cytotoxiques de ces Phédims para-substitués ou non peuvent varier d'une lignée cellulaire à l'autre et peuvent, dans tous les cas, être corrélés avec l'activation de plusieurs marqueurs d'apoptose tels les caspases.

Les composés *p*H-Phédim (**24**) et *p*OCH₃-Phédim (**25**) s'avèrent plus actifs en terme de cytotoxicité sur les lignées cellulaires Panc-28 (10 μM), alors que *p*OH-Phédim (**26**) et *p*CO₂CH₃-Phédim (**27**) seraient plus efficaces respectivement sur les lignées cellulaires L3.6pL (11,35 μM) et ACHN (11,7 μM).

Les composés **24** et **25**, d'une part (en bleu) et les composés **26** et **27**, d'autre part, (en jaune) ont des concentrations inhibitrices médianes (CI₅₀) comprises respectivement entre 10 et 15 μM, et entre 10 et 20 μM. Ces concentrations sont très proches de celles permettant l'activation des

protéines apoptotiques TRAIL, caspases -8, -9 et 3 (10 - 15 μM et 15 - 25 μM respectivement). Il faut noter que **26** et **27** n'activent pas directement TRAIL, ligand impliqué dans l'initiation de l'apoptose par voie extrinsèque.

Le PhéDIM **25** peut être alors considéré comme étant à la fois un inducteur d'apoptose NR4A1-dépendant et NR4A1-indépendant ¹⁰⁹.

Le mécanisme d'action de **25** dans l'induction de l'apoptose des cellules RKO peut emprunter la voie intrinsèque par augmentation du ratio bax-bax suivie de la libération du cytochrome c de la mitochondrie, ou la voie extrinsèque par activation du récepteur de mort DR5 ¹¹¹.

Par ailleurs, les composés **25** et **26** sont des agents cytotoxiques qui inhibent la croissance de cellules tumorales du poumon A549 avec des CI_{50} de 14,3 et 16,2 μM mais aussi des agents inducteurs d'apoptose. Il a également été montré que l'association de docétaxel avec l'un ou l'autre de ces deux PhéDIMs augmentait la cytotoxicité avec des CI_{50} de 0,46 μM et 0,51 μM ¹⁰⁶. Le pourcentage des cellules entrant en apoptose est aussi affecté positivement par les combinaisons docétaxel / **25** et docétaxel / **26** selon les concentrations indiquées sur la figure 15, conduisant à plus de 40 % des cellules en apoptose pour des concentrations de 20 μM de PhéDIMs (= C-DIM sur la figure 15) et 10 nM de docétaxel. Toutefois, l'on peut remarquer que la concentration pour induire l'apoptose est supérieure à celle de la cytotoxicité.

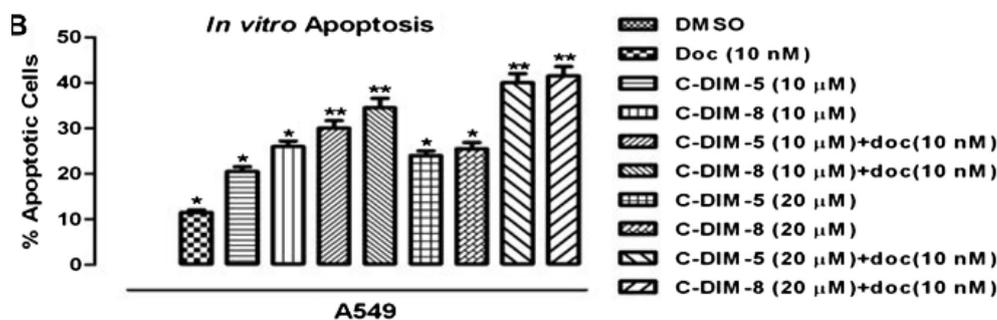


Figure 15 : Induction de l'apoptose par combinaison du docétaxel avec les C-DIM : **25** (= C-DIM 5), **26** (= C-DIM 8) sur cellules A549 (adénocarcinome humain de cellules épithéliales) ¹⁰⁶

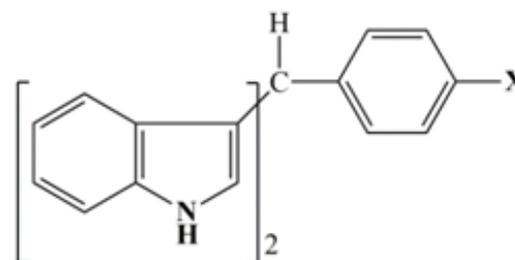


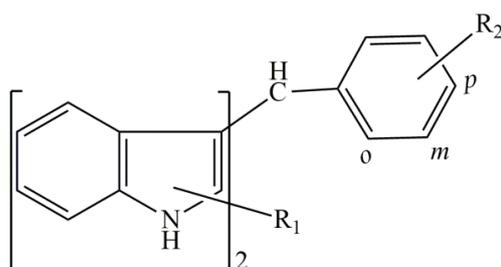
Tableau 3 : Activités biologiques de PhédIMs ciblant NR4A1 ^{103,105,108,110-113}

Composés	Cytotoxicité sur les lignées cellulaires humaines cancéreuses (CI ₅₀ en µM) :										Concentrations de clivage de marqueurs d'apoptose (en µM)				
	côlon		pancréas			vessie		poumon		du rein		TRAIL	Casp-8	Casp-9	Casp-3
	RKO	Panc-28	L3.6pL	MiaPaCa-2	Panc-1	UC-5	KU7	A549	ACHN	786-O					
24 : X = H	15	10	--	--	--	11,8	11,2	--	--	--	12,5 - 15	10 - 12,5	10 - 12,5	10 - 12,5	
25 : X = OCH ₃	10	10	--	--	--	12,3	9,3	14,29	--	--	12,5 - 15	10 - 12,5	12,5	12,5	
26 : X = OH	--	20	11,35	13,87	15,61	--	--	16,18	13,6	13	--	20 - 25	--	15 - 20	
27 : X = CO ₂ Me	--	--	--	--	--	--	--	--	11,7	13,4	--	--	--	15 - 20	

- Relations structure-activité en série PhédIMs substitués

Une étude de relations structure-activité a été menée par l'équipe de Safe sur un ensemble de PhédIMs ayant au moins un substituant sur les noyaux aromatiques.

L'activation de NR4A1 par un panel de PhédIMs (Fig. 16) a été testée dans un premier temps sur les lignées cellulaires Panc-28. Le composé **25** a été pris comme modèle et la position du groupement méthoxyle a été modifiée, introduction en *mé*ta (**28**) ou en *ortho* (**29**). Seul le composé *para*-substitué **25** s'est montré actif (Fig. 16). De plus, d'autres analogues PhédIMs substitués sur les noyaux indoliques en position 1 et 1' ou en positions 2 et 2' par un groupement méthyle (**30** à **35**) ont été évalués dans les mêmes conditions que précédemment et se sont avérés inactifs. L'activation de NR4A1 par les PhédIMs dépendrait donc de la nature des substituants sur les noyaux phénylique et indolique ¹⁰³.



- 24** : R₁ = H, R₂ = H
- 25** : R₁ = H, R₂ = *p*-OCH₃
- 28** : R₁ = H, R₂ = *m*-OCH₃
- 29** : R₁ = H, R₂ = *o*-OCH₃
- 30** : R₁ = 1,1'-diméthyl, R₂ = H
- 31** : R₁ = 2,2'-diméthyl, R₂ = H
- 32** : R₁ = 1,1'-diméthyl, R₂ = *p*-OCH₃
- 33** : R₁ = 2,2'-diméthyl, R₂ = *p*-OCH₃
- 34** : R₁ = 1,1'-diméthyl, R₂ = *p*-CF₃
- 35** : R₁ = 2,2'-diméthyl, R₂ = *p*-CF₃

Figure 16 : Panel de PhédIMs, possédant des groupements méthoxyle ou trifluorométhyle sur le groupement phényle et/ou un groupement méthyle sur les indoles, étudié en RSA sur les lignées cellulaires Panc-28

Dans un second temps, la même équipe de Safe a évalué l'activation de l'apoptose des lignées cancéreuses pancréatiques (Panc-1 et Panc-28) par une série de PhédIMs substitués avec un atome de brome ou de fluor sur le noyau phényle (Fig. 17). Aucun de ces composés de la série n'activerait NR4A1 (et le récepteur nucléaire PPAR γ). En revanche, tous les halogéno-PhédIMs testés induisent l'apoptose en activant la voie du stress du réticulum endoplasmique (RE). Toutefois, la présence de groupement méthyle sur l'atome d'azote des indoles (**37** ; **40** ; **43** ; **46** ; **49** ; **52**), diminuerait considérablement l'activité apoptotique. Ce qui indique que la fonction amine (NH) libre des indoles joue aussi un rôle important pour l'activation du stress RE. Parmi ces PhédIMs halogénés, les composés **36** et **45** se sont avérés plus actifs en termes d'inhibition de la prolifération des cellules Panc-1 avec des valeurs CI₅₀ de 7,2 μ M et 9,3 μ M respectivement ¹⁰⁴.

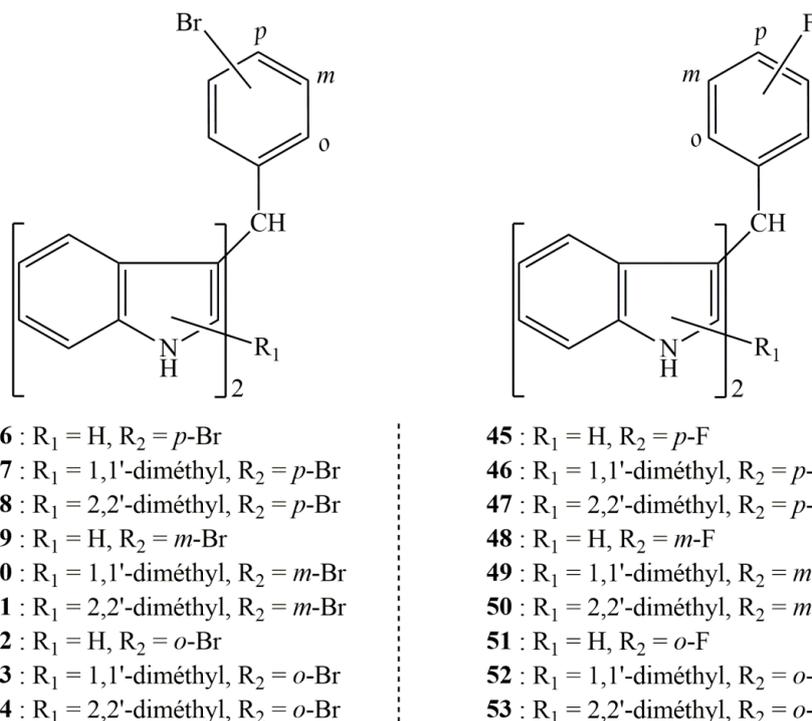


Figure 17 : Série de PhédIMs, possédant des groupements bromo ou fluoro sur le groupement phényle et/ou un groupement méthyle sur les indoles, étudiée en RSA sur les lignées cellulaires Panc-1 et Panc-28

Par ailleurs, une autre étude, réalisée par cette équipe, a montré que la survivine, protéine anti-caspase, pourrait être inhibée par les composés **36** et **38** dans les cellules cancéreuses SW480 (côlon) et Panc-28 (pancréas) pour des concentrations comprises entre 10 μM et 20 μM . Cette inhibition de l'expression de la survivine est accompagnée par le clivage de PARP caspase-dépendant au sein de ces cellules cancéreuses et l'induction de l'apoptose ¹¹⁴.

- Autres dérivés PhédIMs agissant comme agents pro-apoptiques

Une série de conjugués PhédIM-pyrrolobenzodiazépine dans lesquels les 2 parties sont liées par différentes chaînes O-alkyl, a été préparée par Kamal et coll. à partir du composé **26** ou de l'*o*-OH-PhédIM (**54**) d'une part et de dérivés de pyrrolobenzodiazépines (**PBDs**) d'autre part (Fig. 18). La structure de ces composés est proche de celle d'un composé entré en essais clinique de phase II qui comporte 2 unités pyrrolobenzodiazépine liées par une liaison diéther ^{115,116}.

Selon ces auteurs, tous ces composés présenteraient une activité cytotoxique significative sur un certain nombre de lignées cellulaires avec une efficacité particulière sur la lignée MCF7 (Tab. 4). Deux d'entre eux (**57** et **60**) se montrent plus efficaces avec des concentrations inhibitrices de

croissance (GI_{50}) les plus faibles sur les différentes lignées et sont respectivement de $0,19 \mu\text{M}$ et $0,14 \mu\text{M}$ sur MCF7. Ces deux composés **57** et **60** semblent être plus actifs en terme de cytotoxicité que les composés **26** et **54** à une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de $2 \mu\text{M}$ et induisent de façon significative l'apoptose. Leurs effets apoptotiques sont confirmés par traitement des cellules MCF-7 avec une concentration de $8 \mu\text{M}$ de chacun des composés **57** et **60**. Une augmentation de l'expression du clivage PARP est observée et les protéines caspase-7 sont activées au sein des cellules MCF-7 ¹¹⁷.

Il faut noter que les pyrrolobenzodiazépines (PBDs) représentent une famille de substances naturelles produites par des *actinomyces* des genres *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Streptosporangia* connus pour leur efficacité en terme d'activité antitumorale mais qui est toutefois limitée par la cardiotoxicité de certains d'entre eux en clinique ¹¹⁸⁻¹²⁰.

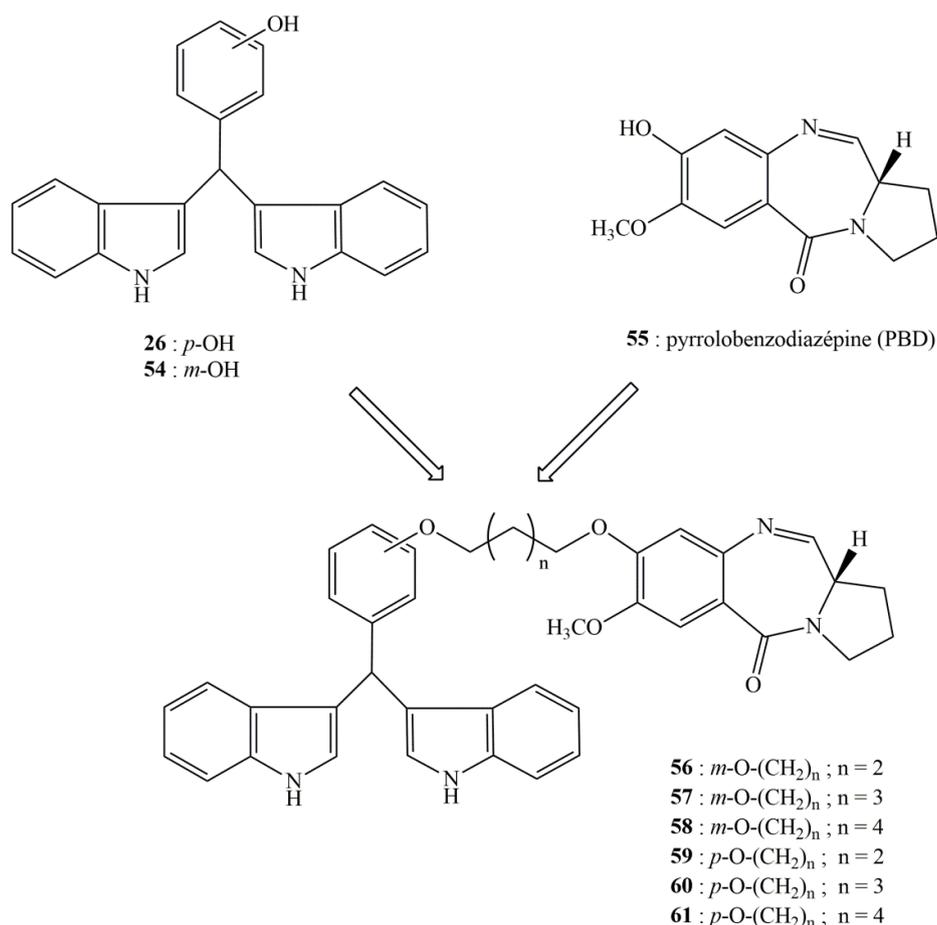


Figure 18 : Série de composés potentiellement anticancéreux, constitués d'une molécule PhéDIM et d'une molécule PBD, liées par une chaîne alkyle de n carbones (n = 2 ; 3 ; 4)

Tableau 4 : Activité biologique (concentration inhibitrice 50 en μM) de composés PhéDIM-PBDs au sein d'une sélection de lignées de cellules cancéreuses humaines ¹¹⁷.

composé	MCF-7 ^a	Zr-75-1 ^a	A2780 ^b	Colo ^c	SiHa ^d	A549 ^e	KB ^f
56	2,01	- ^h	27	28,50	- ^h	- ^h	- ^h
57	0,19	- ^h	0,18	0,16	2,20	- ^h	2,30
58	2,01	- ^h	2,29	2,30	30,8	- ^h	30,1
59	0,18	26,50	2,07	24	2,49	- ^h	2,30
60	0,14	0,12	0,11	26,1	0,18	2,40	0,13
61	0,14	- ^h	2,46	- ^h	- ^h	29	- ^h

^a cancer du sein ; ^b cancer de l'ovaire ; ^c cancer du côlon ; ^d cancer du col de l'utérus ; ^e cancer du poumon ; ^f cancer de la bouche ; ^h valeurs de CI_{50} non déterminées

VI- Conclusion

L'analyse des données de la littérature permet de mettre en évidence le rôle de la protéine NR4A1, récepteur hormonal nucléaire ayant de nombreuses fonctions physiologiques. Il peut être stimulé par différents ligands qui en s'associant à l'ADN vont réguler de nombreux gènes mais aussi par des voies complexes, il est impliqué dans la survie cellulaire et l'apoptose. Cette protéine est codée par le gène *NR4A1*. Ce gène possède des gènes homologues dans différentes espèces.

Son implication dans l'apoptose peut sembler contradictoire avec son rôle dans la survie de la cellule, il est en effet capable d'activer des gènes impliqués dans l'apoptose ou de translocation vers la mitochondrie en interagissant avec la protéine *Bcl-2* en libérant le cytochrome *c*. Son rôle est donc complexe et dépendant de la cellule considérée et de l'environnement moléculaire.

Dans le cancer, son activité peut favoriser la carcinogénèse mais son caractère protecteur a été mis en évidence dans de nombreux types de tumeurs solides dans lesquelles il induit l'apoptose,

Une classe de ligands interagissant avec NR4A1, les PhéDIMs se sont montrés capables d'induire l'apoptose, faisant de NR4A1 une cible prometteuse pour la chimiothérapie antitumorale.

Chapitre 2 : Synthèses de phényldiindolyméthanes (PhéDIMs) – Étude structurale des PhéDIMs oxydés

I- Introduction

Historiquement, les premiers travaux sur les diindolylméthanes en général et sur les phényldiindolylméthanes en particulier ont été rapportés par E. Fischer en 1886 avec la synthèse du 1,1-di(3'-méthyl-2'-indolyl)-1-phénylméthane. Pour obtenir ce composé, il chauffa du benzaldéhyde avec du 3-méthyl-1*H*-indole (ou scatole) en présence de chlorure de zinc (Fig. 19)¹²¹. Toutefois, la synthèse de ce composé dans ces conditions n'a pu être reproduite par la suite¹²².

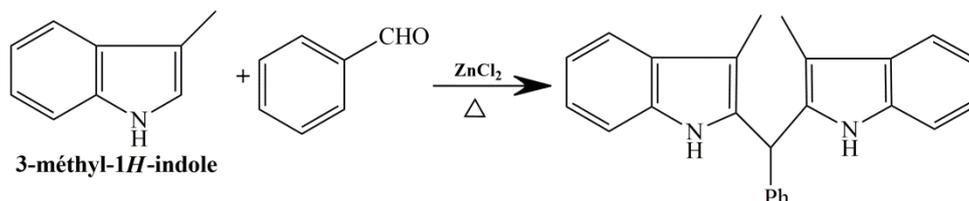


Figure 19 : Synthèse du 1,1-di(3'-méthyl-2'-indolyl)-1-phénylméthane¹²¹

L'année suivante, E. Fischer rapporta la synthèse du 1,1-di(2'-méthyl-3'-indolyl)-1-phénylméthane obtenu dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment, mais en utilisant cette fois-ci du 2-méthyl-1*H*-indole comme indole de départ (Fig. 20)¹²³.

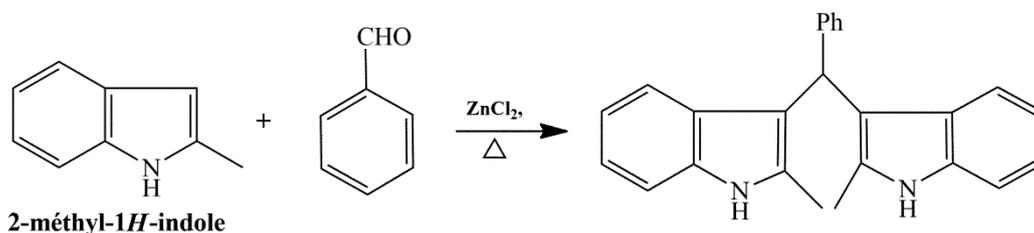


Figure 20 : Synthèse du 1,1-di(2'-méthyl-3'-indolyl)-1-phénylméthane¹²³

Cette fois, ces travaux ont pu être reproduits et vérifiés ultérieurement¹²². Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la position C-3 du noyau indolique (Fig. 21) est plus réactive que la position C-2 lors de la substitution électrophile aromatique^{124,125}. La substitution en C-2 est par ailleurs réalisable mais dans d'autres conditions (voir plus loin).

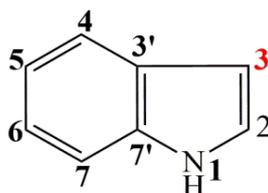


Figure 21 : Formule numérotée de l'indole

C'est au milieu du XX^e siècle que le 3,3'-diindolylméthane (ou DIM) est obtenu à partir de l'halogénure de (*N,N,N*-triméthyl)-1*H*-indole-3-méthanaminium et de 1*H*-indole en présence d'hydroxyde de sodium¹²⁶. Le mécanisme réactionnel proposé par les auteurs est le suivant (Fig. 22) :

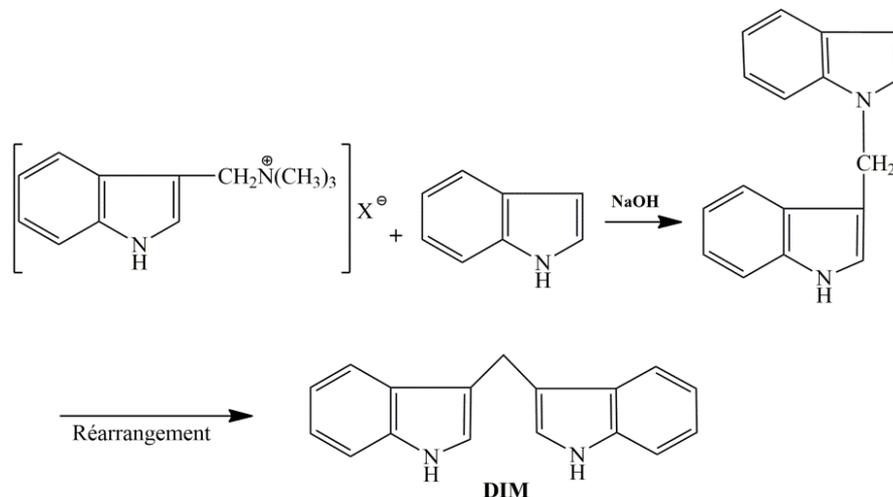


Figure 22 : Mécanisme de formation du 3,3'-diindolylméthane ou DIM¹²⁶

Le DIM peut aussi être obtenu par la réduction de la 3,3'-diindolylméthanone par LiAlH₄ (Fig. 23)¹²⁷. Notons enfin que, depuis les années 60, le nombre de méthodes rapportées dans la littérature, permettant l'obtention des DIMs synthétiques ayant un ou deux substituants sur le méthane, n'a cessé de croître¹²⁸. Comme nous le verrons par la suite, il s'agit pour l'essentiel de méthodes mettant en jeu un carbonyle.

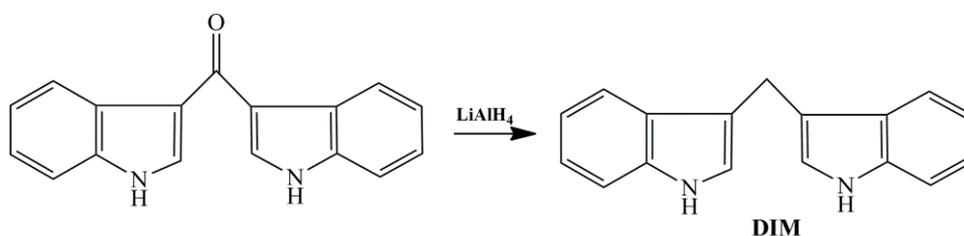


Figure 23 : Synthèse du DIM à partir de la 3,3'-diindolylméthanone¹²⁸

Nous avons limité les recherches bibliographiques aux 3,3'-DIMs portant au moins un groupement phényle (substitué ou pas) sur le méthane, il s'agit donc de dérivés du 1,1-di(3'-indolyl)-1-phénylméthane, que nous dénommerons de manière triviale PhédIM (Fig. 24).

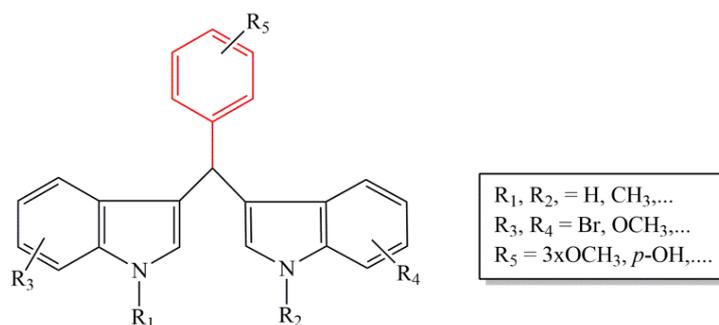


Figure 24 : Formule générale des dérivés du 1,1-di(3'-indolyl)-1-phénylméthane (PhédIMs) étudiés

II- Travaux antérieurs sur les PhédIMs de synthèse

Afin d'ordonner la bibliographie présentée dans les paragraphes suivants, nous proposons de classer les PhédIMs comme suit :

- **Les PhédIMs symétriques** : Ils sont caractérisés par la présence de deux unités indoliques identiques,
- **Les PhédIMs non symétriques racémiques ou asymétriques** : Ces PhédIMs disposent de deux unités indoliques substituées différemment (Fig. 25). Les substituants du carbone central C-1''' sont dans ce cas différents et le carbone est donc asymétrique. Généralement ces composés sont obtenus en série racémique. Le substituant **Z** est généralement un proton, plus rarement un groupement méthyle, fluorométhyle, phényle etc.

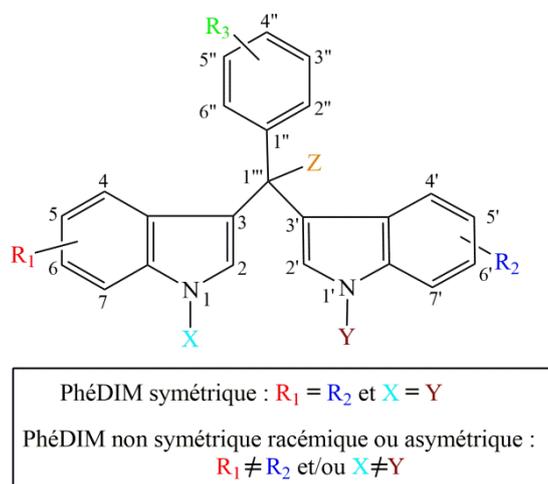


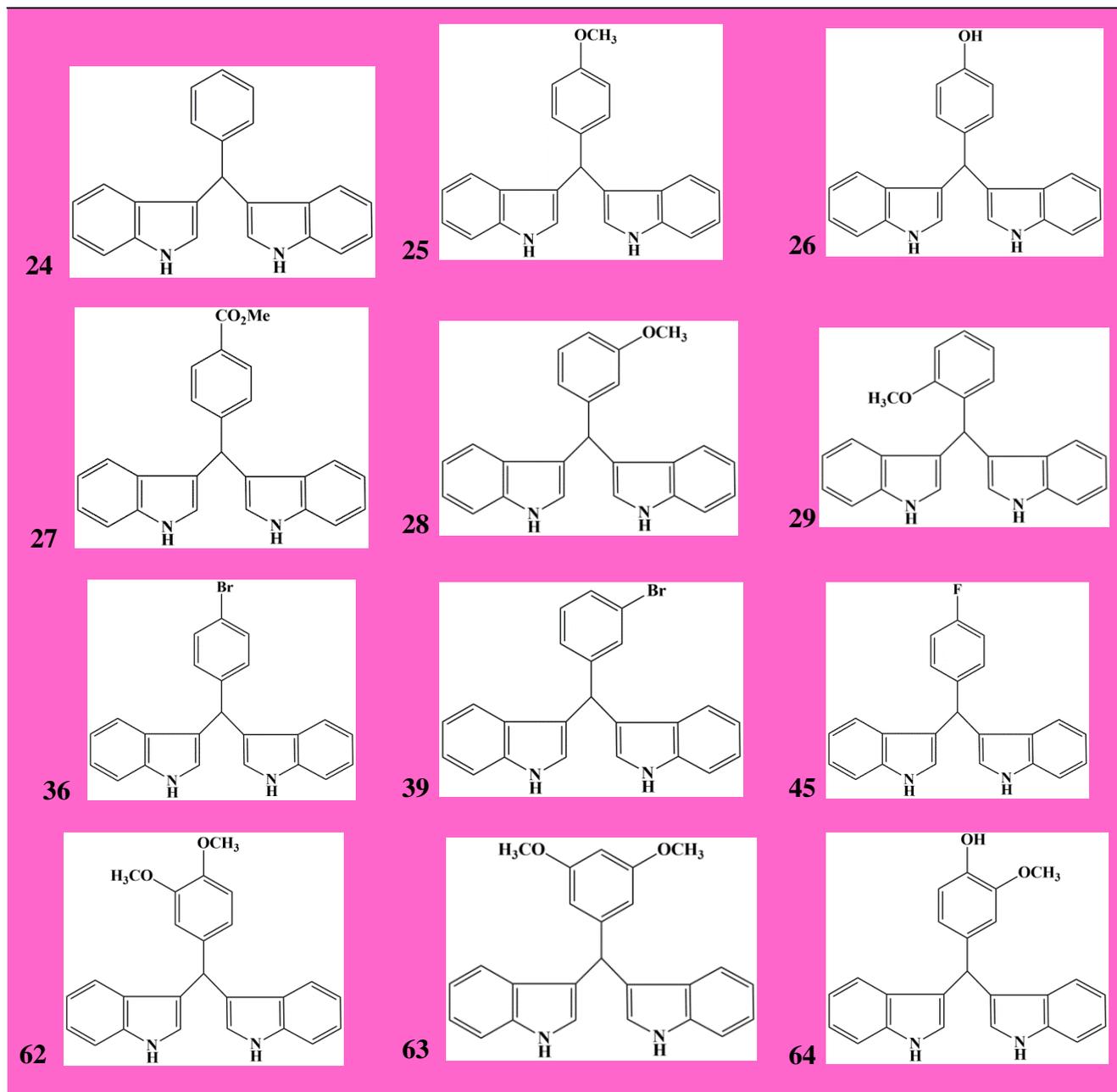
Figure 25 : Formule générale des PhédIMs symétriques ou non symétriques, racémiques et asymétriques

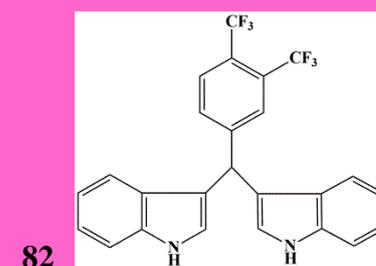
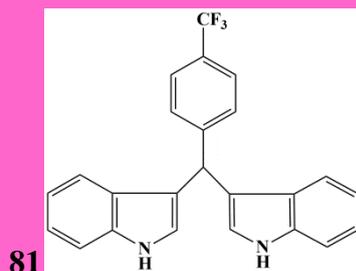
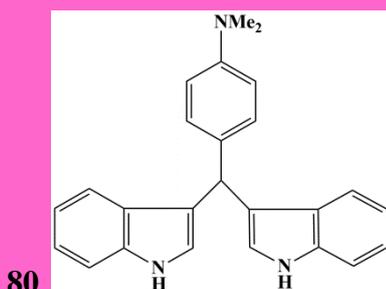
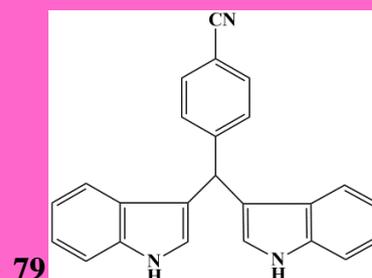
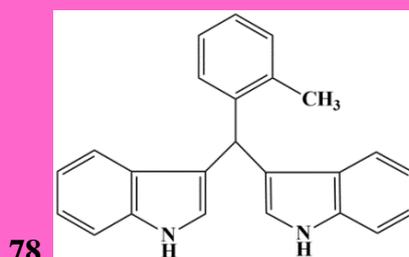
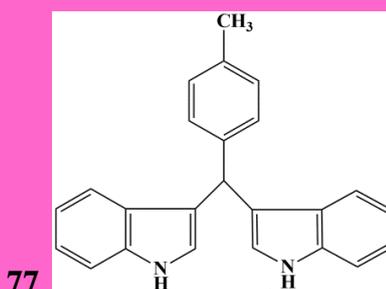
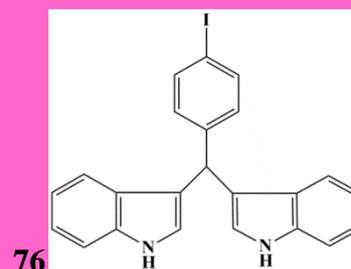
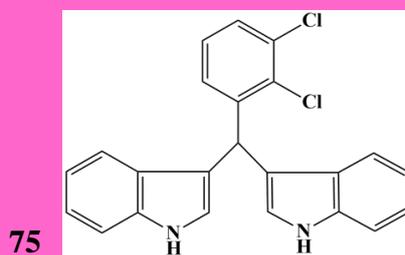
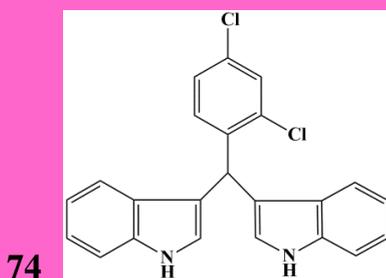
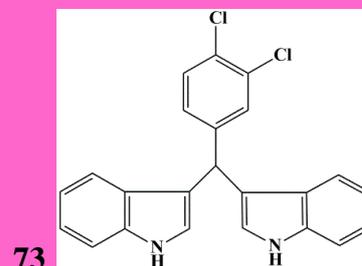
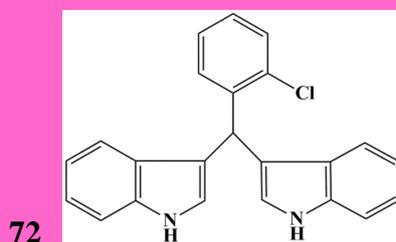
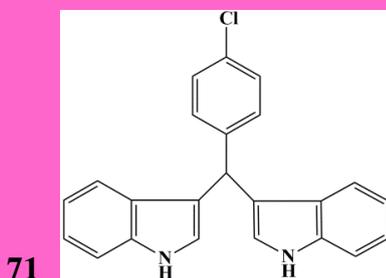
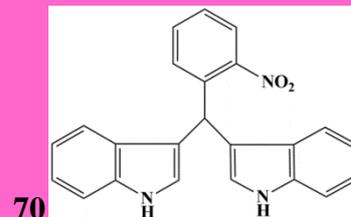
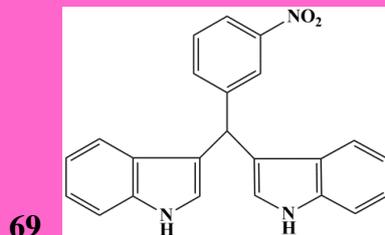
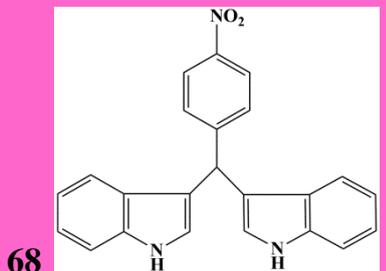
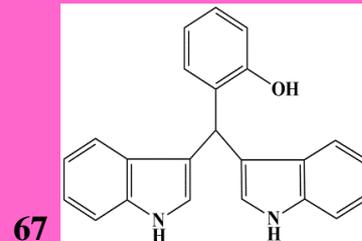
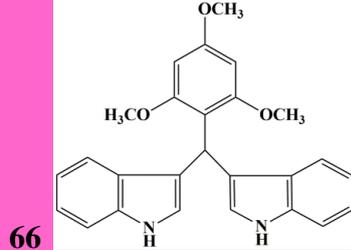
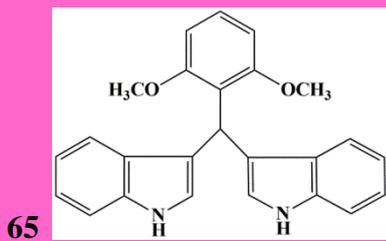
II.A- Voies de synthèse de PhédIMs symétriques

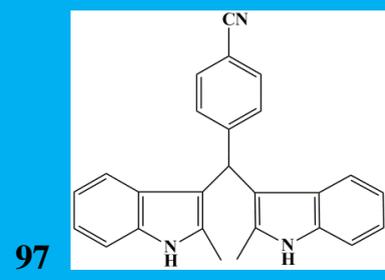
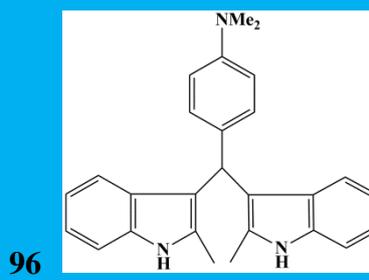
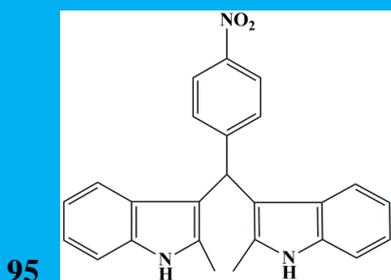
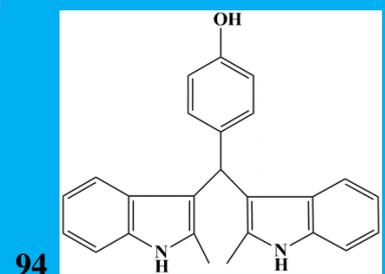
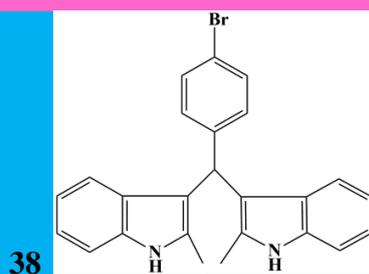
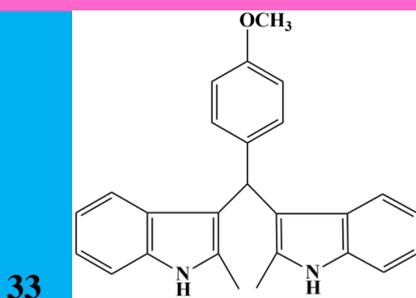
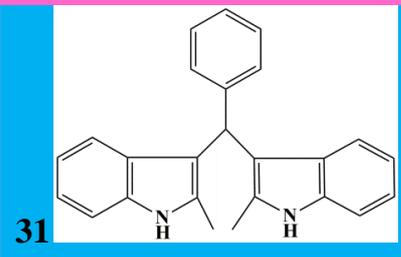
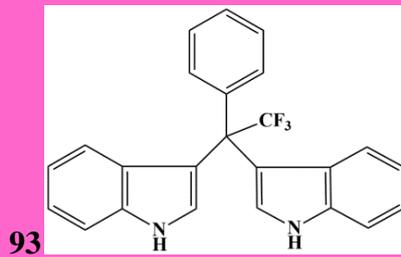
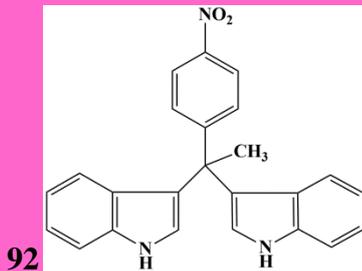
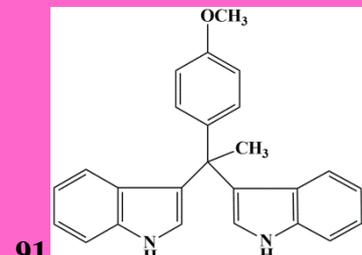
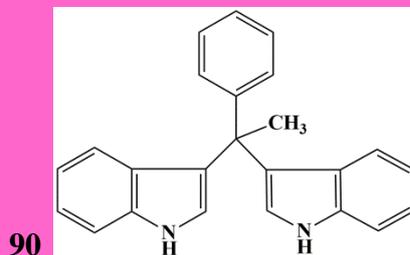
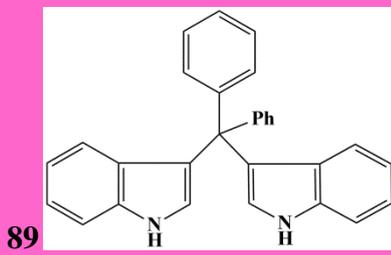
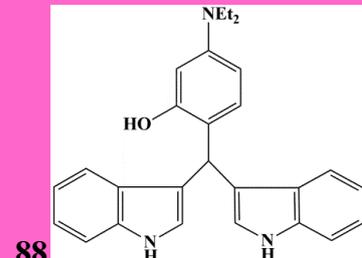
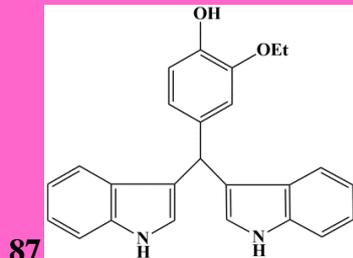
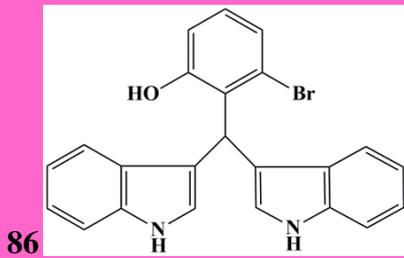
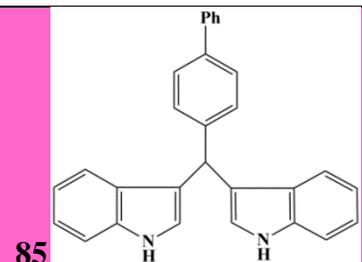
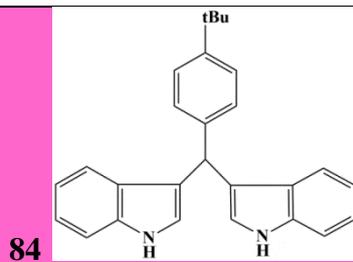
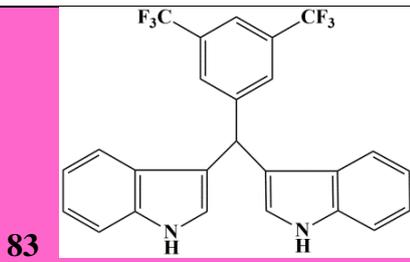
Les réactions sont généralement réalisées en présence d'un catalyseur (acide Brønsted ou Lewis), mais d'autres conditions de réaction (avec ou sans catalyseur, avec ou sans solvant) seront présentées. Pour des raisons de clarté, nous avons préféré d'abord dresser un tableau des principaux

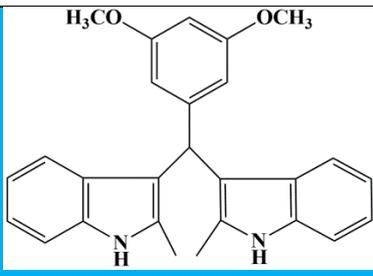
PhéDIMs symétriques dont la synthèse est rapportée dans la littérature (Tab. 5). Les composés ne possédant pas de substituant sur les indoles constituent la série A (en fond rose), les composés possédant un méthyle en position 2 et 2', la série B (en fond bleu), ceux substitués par un groupement méthyle sur l'azote, la série C (en fond jaune) et enfin ceux substitués sur les autres positions des indoles, la série D (en fond vert). Les conditions réactionnelles de leur obtention seront décrites par la suite (formule générale, Fig. 25).

Tableau 5 : Liste des principaux PhéDIMs symétriques de synthèse

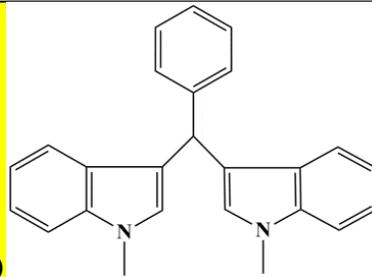




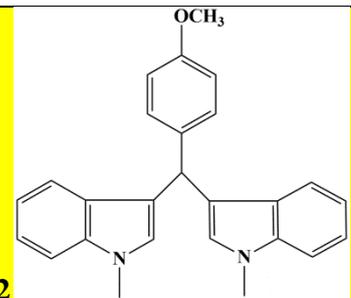




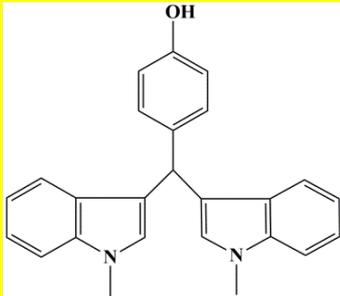
98



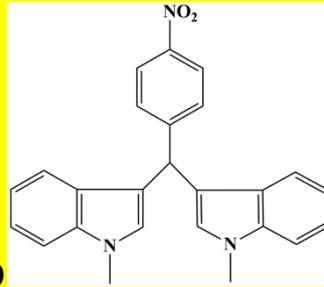
30



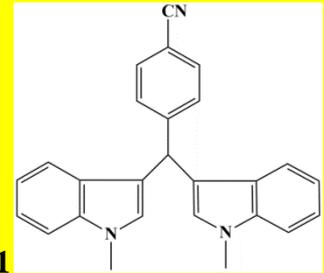
32



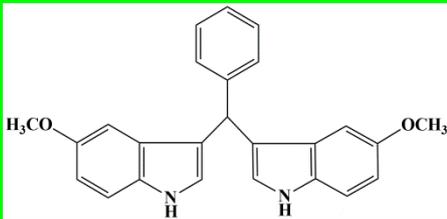
99



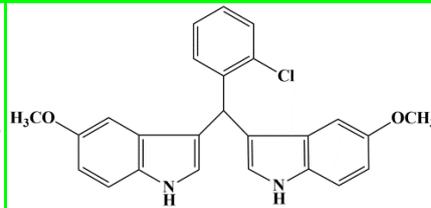
100



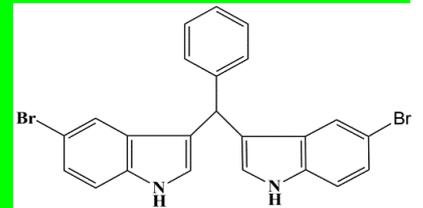
101



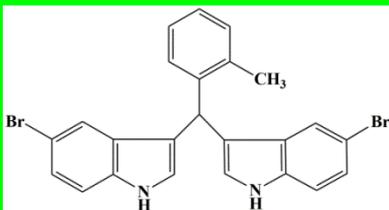
102



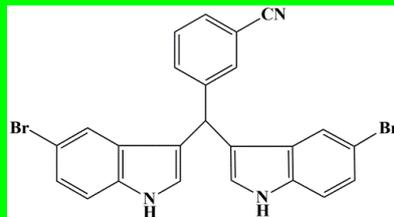
103



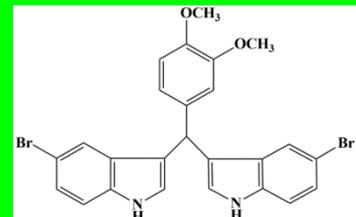
104



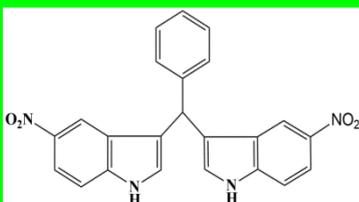
105



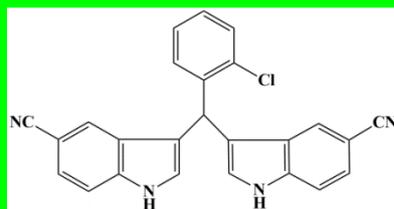
106



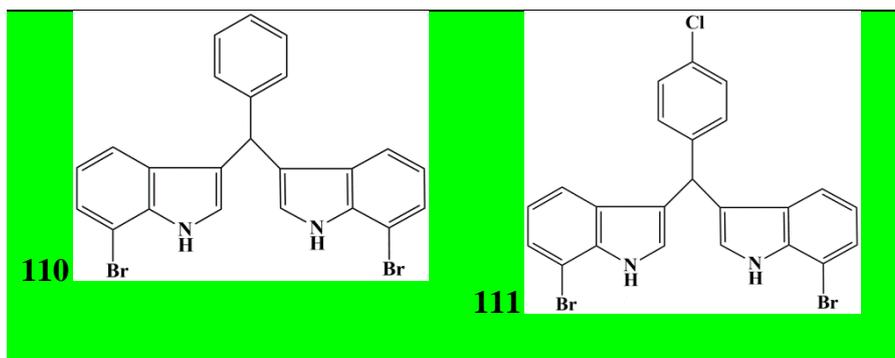
107



108



109



Cette liste comporte les composés fréquemment choisis comme exemples dans les publications « de chimie » pour évaluer et comparer l'efficacité des conditions expérimentales pour la synthèse des PhédIMs. On retrouve également certains de ces composés dans des études de relations structure-activité (RSA) en série PhédIM (par exemple les composés **24** ; **25** ; **26** ; **71** ; **36** ; **45** ; **79** ; **77** ; **27** ; **84** ; **76** ; **85**...^{103,114}. Les substituants présents sur les unités aromatiques (indoles ou phényle) comportent à la fois des groupements électro-attracteurs (ex. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{COOCH}_3$, $-\text{Ph}$, $-\text{CF}_3$...) et électro-donneurs (ex. $-\text{OCH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_3 ...). Malgré la diversité de ces fonctions présentes sur les unités aromatiques, et dans une moindre mesure le carbone central C-1'', l'accès aux PhédIMs est généralement limité aux précurseurs commerciaux disponibles (généralement simples). Par ailleurs, notons que la plupart des méthodes décrites ne sont pas de portée générale et qu'il existe des limitations liées à la réactivité des produits de départ.

II.A.1- PhédIMs symétriques obtenus à partir d'indoles et de carbonyles

La formation de PhédIMs peut être envisagée par substitution électrophile aromatique (SEAr) de l'indole par le carbone d'une fonction carbonyle (Fig. 25), potentiel centre électrophile. Cette réaction, nécessitant généralement l'utilisation d'un catalyseur, notamment un acide protique ou un acide de Lewis, est la plus fréquemment employée pour accéder aux PhédIMs et de nombreuses conditions réactionnelles sont rapportées dans la littérature.

II.A.1.a- Synthèse de PhédIMs symétriques catalysée par des acides protiques

II.A.1.a.1- Mécanisme général de réaction dans le cas des acides protiques

La réaction est catalysée par un acide protique et met donc en jeu un proton H^+ permettant l'activation des carbonyles comme centres électrophiles. Le bilan général de la réaction est précisé

ci-dessous. La formation des Phédims symétriques nécessite deux équivalents d'indole, pour un seul de carbonyle (Fig. 26).

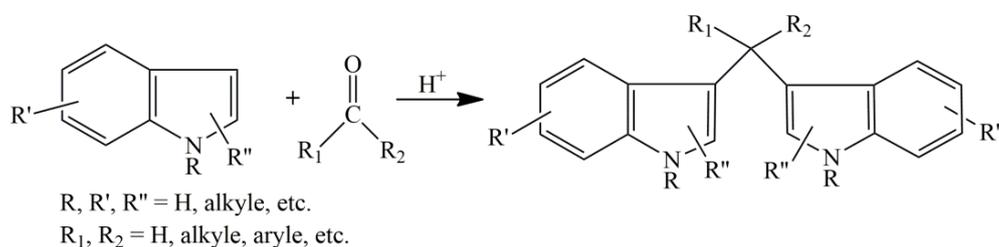


Figure 26 : Bilan général de la réaction de formation des Phédims à partir de carbonyles

Le mécanisme général de formation des Phédims symétriques est présenté sur le schéma suivant (exemple de la réaction d'un aldéhyde aromatique sur l'indole) (Fig. 27)¹²⁹.

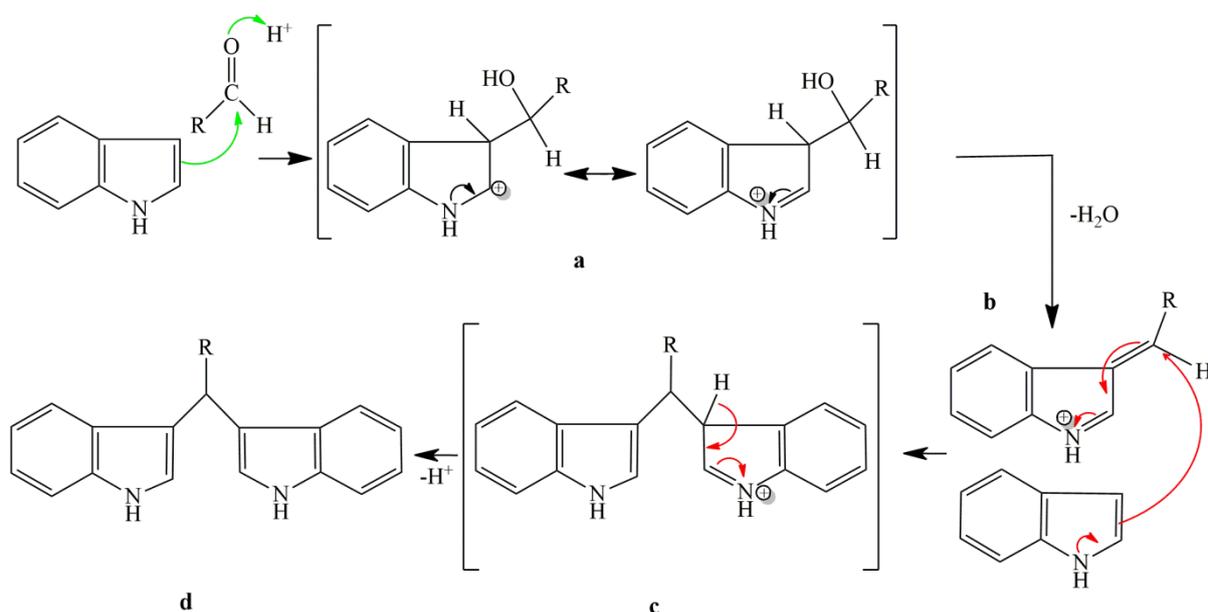


Figure 27 : Mécanisme général de la formation de Phédims en présence de proton H^+ ¹²⁹

La réaction des indoles avec les aldéhydes en présence de H^+ commence par la formation d'intermédiaires indolylcarbinols (**a**). Ces carbinols, instables en milieu acide, perdent une molécule d'eau, permettant d'accéder à des cations indoléniniums (**b**) qui se comportent à leur tour comme des électrophiles vis-à-vis d'une autre molécule d'indole. Une dernière étape de réaromatization (**c**) avec élimination du proton en position C-3 conduit finalement au Phédim attendu (**d**).

II.A.1.a.2- Conditions de préparation de PhédIMs en présence d'acide protique

Les nombreuses études rapportées dans la littérature sur la synthèse de PhédIMs à partir de carbonyles sont le plus souvent guidées par la recherche de conditions permettant l'obtention de meilleurs rendements avec des durées de réactions optimales, tout en prenant en compte le coût des réactifs, voire le choix de conditions de chimie verte respectueuse de l'environnement¹²⁹⁻¹³¹. Les principales conditions réactionnelles (type de catalyseur, solvant, température ou autre) de PhédIMs sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tab. 6).

Remarque : L'appellation « sans solvant » est généralement associée à la notion de « chimie verte » de manière plutôt abusive pour la plupart des réactions réalisées dans de telles conditions. En effet, même si la réaction proprement dite ne requière pas de solvant, le recours à des solvants est la plupart du temps nécessaire, soit au début pour l'étape de mélange/adsorption sur le catalyseur solide et/ou pour le traitement de la réaction.

Tableau 6 : Conditions de synthèse de PhédIMs en présence d'acides protiques

Entrée	Catalyseur, solvant, température, durée	PhédIMs	Rdt (%)
1	CF ₃ SO ₃ H/Na ₂ SO ₄ , 115 °C, 12 h ¹³²	24	74
2	SiW/TiO ₂ , SiW/SiO ₂ , SiW/MK10, ou SiW/KSF, t.a, 2 à 20 min ¹³¹	24 ; 25 ; 26 ; 68 ; 71 ; 77	51 à 98
3	PEG-6000-SO ₃ H, H ₂ O, t.a, 5 à 18 min ¹²⁹	24 ; 62 ; 67 ; 71 ; 74 ; 87 ; 88 ; 86 ; 76	86 à 97
4	[(CO ₂ H) ₂ .2H ₂ O] /CTAB, H ₂ O, t.a, 1,2 à 7h ¹³⁰	24 ; 25 ; 29 ; 26 ; 68 ; 70 ; 71 ; 72 ; 74 ; 36 ; 77 ; 90	70 à 98
5	Acide sulfamique, éthanol, t.a, 0,25 à 1,5 h ¹³³	24 ; 25 ; 62 ; 33 ; 26 ; 70 ; 71 ; 79 ; 77 ; 64	80 à 95
6	Résine type Amberlyst-15 [®] , CH ₃ CN, t.a, 4 à 18 h ¹³⁴	24 ; 25 ; 62 ; 102 ; 68 ; 71 ; 104 ; 77	73 à 99
7	Zeorkarb-225 [®] , CH ₃ CN, t.a, 4 à 8,5 h ¹³⁵	24 ; 33 ; 70 ; 71 ; 77 ; 64	70 à 95
8	Montmorillonite K10, t.a, 5 min à 12 h ¹³⁶	24 ; 25 ; 26 ; 69 ; 70 ; 107 ; 90	71 à 97

Rdt : rendement ; t.a : température ambiante

Wang et coll. ont étudié les conditions de synthèse de PhédIMs ayant un groupement -CF₃ sur la position centrale C-1'''. Ils ont montré que l'acide trifluorométhanesulfonique (CF₃SO₃H) à la concentration de 20 mole %, en présence de Na₂SO₄ (30 mole %) et par chauffage à 115 °C, pouvait catalyser la réaction de condensation de la trifluoroacétophénone avec l'indole pour donner le composé **93** (rendement 74 %). Le sulfate de sodium anhydre joue un rôle important, puisqu'il

permet de piéger l'eau formée au cours de la réaction. Selon ces auteurs, ces conditions réactionnelles peuvent être étendues à d'autres trifluoroacétophénonnes diversement substituées¹³².

L'hétéropolyacide $H_4SiW_{12}O_{14}$ (ou SiW) absorbé sur différents supports (TiO_2 , Montmorillonite K10 ou SiO_2 ou KSF) peut être utilisé comme catalyseur pour la synthèse de PhédIMs. Cet acide, insoluble dans de nombreux solvants, peut être récupéré à la fin de la réaction et est donc recyclable. Avec ce réactif, les durées de réactions sont courtes. Que la réaction soit menée en conditions avec solvant (CH_3CN) ou sans solvant, les rendements sont similaires¹³¹. Les conditions sans solvant (Tab. 6, entrée 2) peuvent être considérées comme respectueuses de l'environnement. Cependant, sa portée est limitée aux benzaldéhydes comme carbonyles à la seule exception de la cyclohexanone.

Rani et coll. ont développé un protocole de synthèse de PhédIMs catalysé par le réactif PEG-6000- SO_3H (il s'agit d'un acide sulfonique, dérivé du PEG-600). La réaction est réalisée en milieu aqueux avec des temps de réactions courts (Tab. 6, entrée 3). Le catalyseur est préparé à partir de PEG-6000 et d'acide chlorosulfonique (HSO_3Cl) dans le dichlorométhane à 0 °C. Il a l'avantage d'être facilement éliminable par simple lavage à l'eau¹²⁹. La procédure est appliquée à plusieurs aldéhydes notamment à neuf benzaldéhydes substitués ou non, ainsi qu'à seulement trois cétones (**90** ; **91** ; **89**).

Vaghei et coll. ont développé des conditions de synthèse de PhédIMs en transfert de phase en utilisant le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) comme surfactant et l'acide oxalique en solution dans l'eau comme catalyseur acide¹³⁰. Dans ces conditions, quinze PhédIMs - dont un à partir de l'acétophénone (**90**) - ont pu être synthétisés (Tab. 6, entrée 4). Ce procédé est considéré par les auteurs comme respectueux de l'environnement et non toxique.

L'acide sulfamique ($HOSO_2NH_2$) a été employé par Singh et coll. pour catalyser la condensation d'indoles avec des aldéhydes en milieu éthanolique (Tab. 6, entrée 5)¹³³. Le procédé a également été appliqué avec succès à deux cétones cycliques : la cyclohexanone et la cyclopentanone. La technique est peu coûteuse, simple d'emploi et bénéficie de durées de réactions courtes. Le catalyseur est de plus recyclable, car l'acide sulfamique peut être précipité dans l'éther diéthylique.

L'Amberlyst[®] 15 est une résine copolymère de styrène et de divinylbenzène sur laquelle sont fixés des groupements acides forts de type sulfonique. Son principal intérêt provient de son insolubilité dans les solvants organiques usuels et la possibilité de la séparer par simple filtration et enfin de la réutiliser. Ke et coll. ont démontré que cette résine peut être employée dans la synthèse de PhédIMs (Tab. 6, entrée 6)¹³⁴. Leur protocole expérimental consiste à dissoudre l'indole et

l'aldéhyde dans l'acétonitrile en présence de l'Amberlyst[®] 15. A la fin de la réaction, la solution est filtrée et la résine est récupérée et réactivée pour être recyclée.

Le Zeo-karb[®] 225, un catalyseur solide, recyclable et étiqueté « chimie verte », a été employé pour la synthèse de PhéDIMs (Tab. 6, entrée 7) à partir d'aldéhydes notamment de benzaldéhydes¹³⁵. Le Zeo-karb[®] 225, tout comme l'Amberlyst[®] 15, est une résine cationique échangeuse d'anions et recyclable en fin de réaction. Elle se présente sous forme de billes de polystyrène portant à leur surface des groupements de type acide sulfonique.

Une méthode de synthèse « sans solvant » a été développée par Chakrabarty et coll. qui ont utilisé de la Montmorillonite K10 (MK10) comme agent de couplage. Cette argile du groupe des phyllosilicates, présente en effet un caractère acide à la fois de Brønsted et de Lewis et peut être utilisé comme catalyseur acide solide¹³⁷. Celle-ci a donc été appliquée à la réaction de condensation des indoles avec les carbonyles. En pratique, deux équivalents d'indole et un de carbonyle sont adsorbés sur la MK10 après dissolution préalable dans du CH₂Cl₂ et évaporation à sec du mélange (Tab. 6, entrée 8)¹³⁶. Ces conditions sont efficaces pour le couplage d'aldéhydes et de benzaldéhydes. Nous pouvons toutefois noter que si pour la plupart des aldéhydes, la réaction est rapide, dans le cas du *p*-hydroxybenzaldéhyde, la durée de réaction atteint 2 h, ce qui, d'après les auteurs, pourrait s'expliquer par la présence de liaisons hydrogènes impliquant le groupement –OH. Le temps de réaction avec l'acétophénone est encore plus long (12 h) et le rendement associé plutôt modeste (71 %), probablement à cause de la gêne stérique liée au groupement méthyle.

II.A.1.b- Synthèse de PhéDIMs symétriques catalysée par des acides de Lewis

II.A.1.b.1- Mécanisme général de réaction catalysée par un acide de Lewis

Le mécanisme de formation de PhéDIMs à partir d'un carbonyle et de deux unités indoliques en présence d'un acide de Lewis (AL) est présenté dans le schéma ci-dessous (Fig. 28)¹³⁸. L'acide de Lewis, qui dispose d'une lacune électronique, forme un complexe avec l'oxygène du carbonyle ; ce qui induit la polarisation de la liaison C=O. Le carbone électrophile subit l'attaque nucléophile d'un indole (étape 1) en C-3. L'hydrogène de la position C-3 de l'indole est libéré pour donner l'intermédiaire ionique indolylcarbinol-AL (étape 2) instable en milieu acide. Le complexe indolylcarbinol-AL, pour se stabiliser, va former un cation de type indoléninium au caractère électrophile (étape 3). Ce dernier subit l'attaque nucléophile d'une autre unité indolique (étape 4) pour donner le PhéDIM correspondant, après une réaromatisation de l'indole avec élimination d'une molécule d'eau et régénération de l'acide de Lewis (étape 5) (Fig. 28).

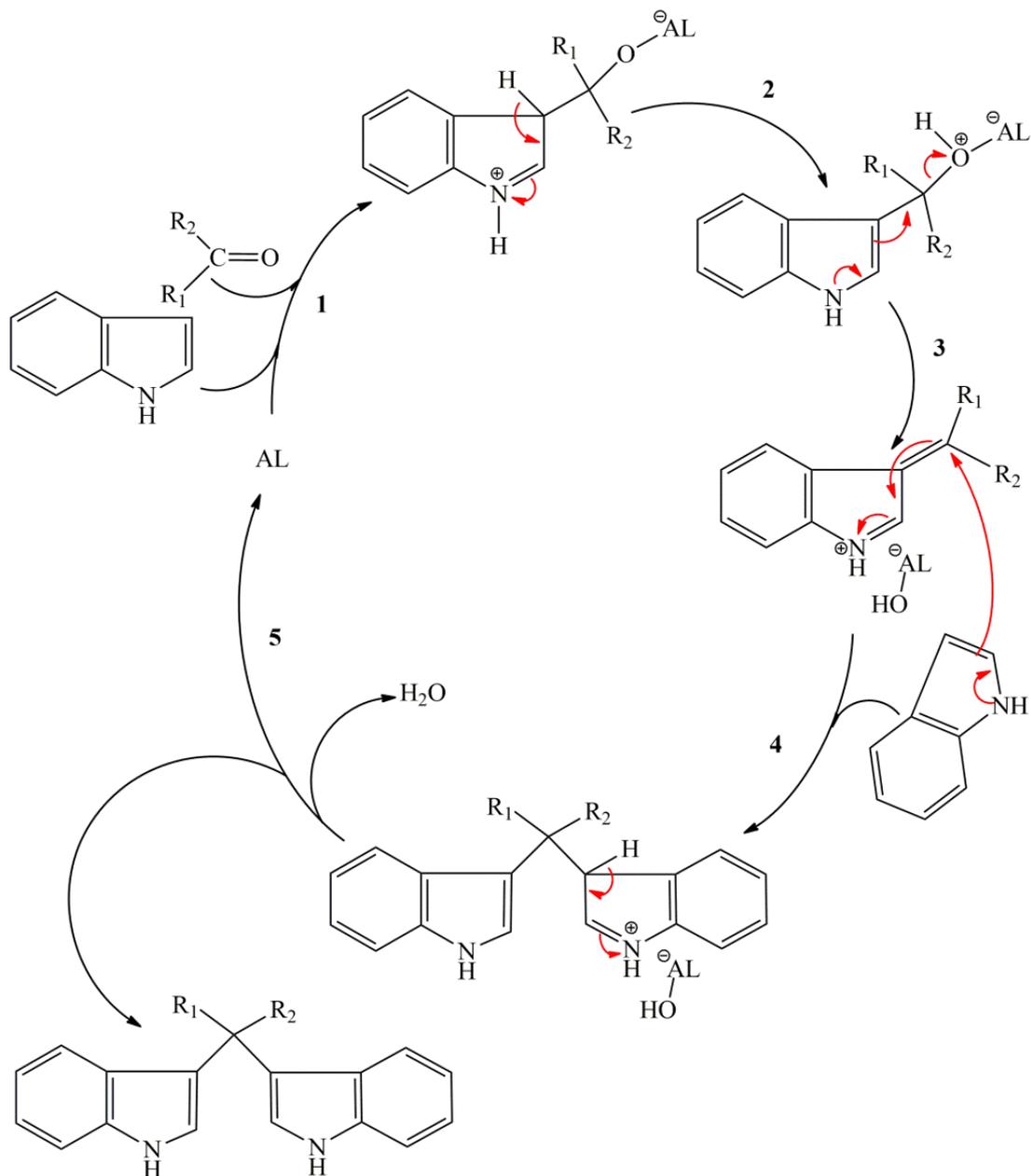


Figure 28 : Mécanisme de formation de PhéDIMS à partir de carbonyle et en présence d'un acide de Lewis ¹³⁸

II.A.1.b.2- Conditions d'obtention de PhéDIMS en présence d'un acide de Lewis

Tout comme les acides protiques, les AL sont utilisés pour la synthèse des PhéDIMS en fonction de leur efficacité, leur toxicité, leur coût, leur caractère recyclable. Dans le tableau 3 ci-dessous est regroupé un ensemble représentatif de conditions expérimentales de synthèse de PhéDIMS.

Tableau 7 : Conditions de synthèse de PhédIMs en présence d'acides de Lewis

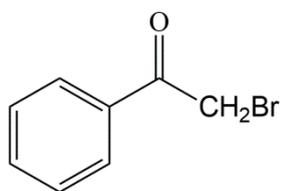
Entrée	Catalyseur, solvant, température, durée	PhédIMs	Rdt (%)
1	Triflate de lanthanide (Dy(OTf) ₃), EtOH/H ₂ O, t.a, 12 à 36 h ¹³⁹	1 ; 2 ; 19 ; 61	77 à 99
2	Triflate de lanthanide (In(OTf) ₃), CH ₃ CN, t.a, 25 à 35 min ¹⁴⁰	24 ; 68 ; 64	76 à 86
3	CuBr ₂ , CH ₃ CN, t.a, 15 min à 8 h ¹⁴¹	24 ; 25 ; 68 ; 69 ; 71 ; 72 ; 77 ; 64 ; 90	38 à 95
4	FeCl ₃ /SiO ₂ t.a, micro-onde, 2 à 2,5 h ¹⁴²	24 ; 25 ; 68 ; 69 ; 77 ; 80	72 à 93
5	(PhCH ₂ PPh ₃) ⁺ Br ₃ ⁻ / SiO ₂ , 90 °C, 5 à 180 min ¹⁴³	24 ; 28 ; 29 ; 63 ; 26 ; 68 ; 69 ; 70 ; 95 ; 71 ; 72 ; 36 ; 38 ; 77 ; 91 ; 92	75 à 96
6	AlCl ₃ / SiO ₂ , t.a, broyage, 35 à 120 min ¹⁴⁴	24 ; 25 ; 29 ; 26 ; 68 ; 69 ; 71 ; 72 ; 79 ; 90	70 à 97
7	Tribromure de pyridinium, AcOEt, t.a, 15 à 300 min ¹⁴⁵	24 ; 25 ; 26 ; 68 ; 69 ; 70 ; 71 ; 72 ; 75 ; 104 ; 77	95 à 99
8	ZrOCl ₂ .8H ₂ O, 20 % EtOH/H ₂ O, t.a, 1,5 à 9 h ¹³⁸	24 ; 25 ; 33 ; 26 ; 68 ; 69 ; 70 ; 71 ; 45 ; 79 ; 97 ; 31 ; 80 ; 30 ; 32 ; 100 ; 101	88 à 96
9	I ₂ , H ₂ O-SDS, 40 à 50 °C, 2 à 6 min ¹⁴⁶	24 ; 26 ; 68 ; 69 ; 71 ; 64 ; 30 ; 99 ; 100 ; 90 ; 89	92 à 98
10	Triflate d'argent (AgOTf), CHCl ₃ , t.a, 18 à 24 h ¹⁴⁷	24 ; 71 ; 77	90 à 95
11	BF ₃ .OEt ₂ , CH ₂ Cl ₂ , t.a, 2 min ¹⁴⁸	25 ; 28 ; 62 ; 66 ; 67 ; 69 ; 70 ; 72 ; 36 ; 39 ; 78 ; 107 ; 109 ; 106	87 à 95

Rdt : rendement ; t.a : température ambiante

Les triflates de certains métaux (Ag : AgOTf), dont des lanthanides tels que le dysprosium et l'indium (Dy(OTf)₃, In(OTf)₃) peuvent être utilisés en quantité catalytique (1 à 5 mole %) pour la synthèse de PhédIMs^{139,140,147}. Contrairement au chlorure d'aluminium (AlCl₃) qui a également été

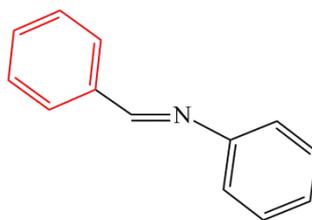
utilisé comme acide de Lewis catalysant la réaction de couplage (indole + carbonyle) (voir ci-après), ces catalyseurs s'avèrent stables en milieu aqueux ¹⁴⁹. Ainsi, le couplage en présence de Dy(OTf)₃ est réalisé dans un mélange EtOH/H₂O comme solvant. Dans ces conditions, les temps de réaction sont toutefois assez longs (12-36 h) ¹³⁹. Les composés synthétisés sont tous obtenus avec des rendements supérieurs à 76 %. Le nombre de PhédIMs synthétisés dans ces conditions reste toutefois limité (Tab. 7, entrées 1 ; 2 ; 10).

Le bromure de cuivre (II) a été étudié par Mo et coll. comme catalyseur (5 mole %) des réactions de substitutions électrophiles des indoles par des carbonyles. Les réactions sont alors réalisées en solution dans l'acétonitrile et à température ambiante ¹⁴¹ et permettent d'obtenir des PhédIMs correspondants à partir des benzaldéhydes avec d'excellents rendements compris entre 89 et 95 %, contrairement à l'acétophénone qui réagit avec l'indole pour donner le composé **90** avec un rendement de seulement 38 % (Tab. 7, entrée 3). Ce dernier résultat peut être expliqué par le fait que CuBr₂, peut également réagir avec l'acétophénone formant ainsi l' α -bromoacétophénone (voir formule ci-après) ¹⁵⁰.



α -bromoacétophénone

L'utilisation de FeCl₃ comme catalyseur acide de Lewis, pour la synthèse de PhédIMs dans des conditions « sans solvant », a été rapportée par Xia et coll. Les conditions mises au point consistent à adsorber les réactifs (indole + benzaldéhyde + FeCl₃, à 20 mole %) sur un gel de silice, puis à irradier le mélange par des microondes avec une énergie de 235 W pendant au moins 3 minutes. Cinq PhédIMs (**24** ; **25** ; **68** ; **69** ; **77** ; **80**) ont ainsi été obtenus avec des rendements supérieurs à 72 %. Il a été également montré que ces cinq PhédIMs pouvaient être obtenus dans les mêmes conditions en remplaçant les benzaldéhydes par des imines de type *N*-benzylidèneaniline (ce qui correspond à la réaction d'un benzaldéhyde avec l'aniline - voir formule ci-dessous), avec des rendements similaires (entre 73 et 85 %) ¹⁴². Cependant, ces conditions réactionnelles n'ont pas été appliquées aux cétones.



Formule de la N-benzylidèneaniline

Shirini et coll. ont montré l'intérêt du tribromure de benzyltriphenylphosphonium (BTPTB pour *benzyltriphenylphosphonium tribromide* en anglais) adsorbé sur silice comme catalyseur pour la préparation de PhédIMs *via* la substitution électrophile d'indoles avec des aldéhydes (Tab. 7, entrée 5)¹⁴³. La préparation du réactif, non commercial, est décrite comme peu coûteuse, et simple à mettre en œuvre. Le couplage ne nécessite pas de solvant et est donc considéré par les auteurs comme un exemple de « chimie verte ». Les conditions sont efficaces, les réactions étant à la fois rapides et associées à de bons rendements. Toutefois, cette méthode présente un inconvénient majeur puisqu'elle nécessite un chauffage à 90°C, ce qui peut engendrer des processus de dégradation. De plus, elle est limitée aux seuls aldéhydes et ne marche pas avec les cétones, y compris les acétophénones.

Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) est un acide de Lewis qui catalyse la condensation d'indoles avec des composés carbonylés avec toutefois de faibles rendements (par exemple, la condensation du benzaldéhyde avec l'indole donne le composé **24** avec un rendement de seulement 43 %). Bojourni et coll. ont amélioré les conditions d'utilisation de ce catalyseur en l'adsorbant sur de la silice (AlCl₃/SiO₂) et les ont appliquées à la synthèse de plusieurs PhédIMs (Tab. 7, entrée 6)¹⁴⁴. La réaction se fait effectivement sans solvant mais nécessite au préalable le broyage du mélange réactionnel dans un mortier. Cette méthodologie présente comme avantages d'une part, d'être applicable à l'acétophénone comme substrat de départ (couplage avec le 1*H*-indole), même si le temps de réaction correspondant est un peu long (2 h, 70 % de rendement) et d'autre part, que le catalyseur AlCl₃/SiO₂ peut être recyclé. Par contre, la préparation de ce réactif est plutôt longue (3 j) et s'effectue dans des conditions assez contraignantes et pas exemptes d'une certaine toxicité : sous atmosphère N₂, lavage préalable de SiO₂ à l'acide chlorhydrique, le mélange AlCl₃/SiO₂ devant être chauffé à reflux dans CCl₄ pendant deux jours.

Yang et coll. ont montré que le tribromure de pyridinium (PTB pour *pyridinium tribromide* en anglais) était un catalyseur efficace pour la synthèse de PhédIMs, la réaction étant effectuée dans l'acétate d'éthyle comme solvant, et à la température ambiante. Le catalyseur PTB est peu coûteux

et commercial. Ces conditions ont été appliquées avec succès à un panel d'aldéhydes et d'indoles (Tab. 7, entrée 7), mais fonctionnent peu ou pas avec des cétones¹⁴⁵.

L'oxychlorure de zirconium octahydraté ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$) permet de condenser des indoles avec des aldéhydes en milieu hydroalcoolique, la réaction étant réalisée à la température ambiante. Les avantages de $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ comme réactif sont sa stabilité vis-à-vis de l'humidité, sa faible toxicité et son caractère recyclable. Dans ces conditions, une large variété de PhéDIMs a pu être préparée (Tab. 7, entrée 8)¹³⁸. Par contre, le couplage du 1*H*-indole (pris comme substrat modèle) avec l'acétophénone ou bien la benzophénone ne fonctionne pas.

Le diiode (I_2 , 2 mole %) peut être utilisé en milieu aqueux, en présence d'un tensioactif tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS pour *sodium dodecyl sulfate* en anglais, 5 cmc (concentration micellaire critique)) pour la synthèse de PhéDIMs. Ces conditions, développées par Ganduly et coll. ont été appliquées à la condensation de divers indoles et carbonyles, dont trois cétones (cyclohexanone, acétophénone et benzophénone) (Tab.7, entrée 9). Toutefois, la durée de réaction dans le cas des cétones est plus longue (3 à 4,5 h), contrairement à ce qui est observé avec les aldéhydes (3 à 5 min)¹⁴⁶.

Par ailleurs, l'utilisation de I_2 pour ce type de couplage est également rapportée dans des conditions plus classiques de réaction en milieu homogène. Ainsi, des quantités catalytiques de I_2 (20 mole %) permettent le couplage d'un indole avec un carbonyle en solution dans CH_3CN à température ambiante, avec des temps de réaction inférieurs à la minute, même pour les cétones (seules ont été testées l'acétone, la cyclohexanone et l'acétophénone, avec par exemple un excellent rendement de 92 % pour le couplage de l'1*H*-indole avec l'acétophénone)¹⁵¹.

Les conditions de couplage dans l'acétonitrile ont récemment été appliquées avec succès à la synthèse de bis(di(indolyl)aryl)méthanés à partir de bis(salicylaldéhydes)¹⁵².

En outre, Ji et coll. ont montré que le couplage (aldéhyde + indole) en présence de I_2 en quantité catalytique (20 mole %) pouvait être réalisé en conditions sans solvant (Les réactifs sont alors mélangés au préalable à l'aide d'un mortier). Ces conditions n'ont toutefois pas été appliquées à des cétones¹⁵³.

Le caractère acide de Lewis faible de I_2 a été avancé pour expliquer le mécanisme probable de la réaction de couplage en présence de I_2 ¹⁵³

L'éthérate de trifluorure de bore ($BF_3 \cdot OEt_2$) est un catalyseur efficace pour la synthèse de PhéDIMs avec un temps de réaction court (en moyenne 2 min)¹⁴⁸. Toutefois, l'utilisation de cet acide de Lewis est délicate et nécessite des précautions d'emploi, car celui-ci est très sensible à l'air et se dégrade très vite au cours de la réaction. Il faut noter que l'emploi de ce réactif n'a pas été

appliqué à la préparation de PhédIMs à partir de cétones, mais seulement à la réaction d'aldéhydes avec des indoles (Tab. 7, entrée 11).

II.A.1.c- Synthèse de PhédIMs symétriques sans catalyseur acide

Si pour l'essentiel, les conditions de synthèses de PhédIMs à partir de carbonyles (ou leurs dérivés pour inclure les imines) décrites dans la littérature font intervenir un catalyseur à caractère acide, deux études -aux résultats plutôt étonnants- ont démontré que l'on pouvait s'affranchir de l'usage de ce catalyseur en réalisant simplement le couplage soit dans un solvant polaire à température ambiante (MeOH ou H₂O+SDS)¹⁵⁴, soit dans des conditions sans solvant, mais en chauffant à 80°C¹⁵⁵. Ces conditions sont rassemblées dans le tableau ci-après (Tab. 8).

Tableau 8 : Conditions réactionnelles de synthèse de PhédIMs sans catalyseur acide.

Entrée	Solvant, température, durée	PhédIMs	Rdt (%)
1	MeOH, t.a, 2,5 à 20 h ¹⁵⁴	24 ; 25 ; 68 ; 71 ; 72 ; 77 ;	60 à 90
2	H ₂ O-SDS, t.a, 1 à 5 h ¹⁵⁴	64	55 à 95
3	80 °C, 40 à 120 min ¹⁵⁵	24 ; 25 ; 62 ; 66 ; 26 ; 68 ; 69 ; 71 ; 36 ; 77 ; 96 ; 90 ; 89	87 à 94

Rdt : rendement ; t.a : température ambiante

Les auteurs Deb et Bhuyan ont montré qu'il était possible de coupler un indole (1*H*-indole, 2-méthylindole et 5-méthylindole) avec un carbonyle (la réaction ne marche qu'avec des aldéhydes et essentiellement des benzaldéhydes) sans recours à un catalyseur acide, mais en utilisant un solvant polaire protique comme le MeOH ou l'eau, les produits étant dans ce cas solubilisés avec de petites quantités de SDS¹⁵⁴. Les auteurs ont montré que la réaction ne fonctionnait pas quand ces solvants étaient substitués par l'acétonitrile, le chloroforme, le THF ou bien encore le toluène et n'ont par ailleurs pas essayé d'autres solvants polaires protiques (tels que d'autres alcools).

Ainsi dans ces conditions extrêmement simplifiées, la condensation du 1*H*-indole avec le benzaldéhyde (pour l'obtention du PhédIM **24**) est observée avec un rendement de 70 % dans le MeOH et de 95 % dans l'eau-SDS (Tab. 4, entrées 1 et 2). Notons que la durée de réaction dans l'eau-SDS est systématiquement plus courte que dans le MeOH (par exemple pour **24** : 2,5 h vs 12 h). Il semble donc que de tels solvants se comportent comme des catalyseurs acides protiques et que l'eau étant plus acide que le méthanol, de meilleurs rendements soient obtenus avec ce solvant.

D'après une publication de Patil et coll. datée de 2011, un certain nombre de PhédIMs ont été préparés par simple chauffage à 80°C, sans solvant, d'un indole avec un carbonyle¹⁵⁵. La réaction se

déroule aussi bien avec les benzaldéhydes que les cétones avec une durée un peu plus longue pour les dernières (120 min). Dans tous les cas, les PhédIMs sont obtenus avec de très bons rendements (Tab. 8, entrée 3) sans formation de sous-produits qui peuvent apparaître quand des catalyseurs acides sont utilisés.

II.A.2- Synthèse par couplage oxydatif de benzylamines et d'indoles

L'accès à des PhédIMs peut être envisagé par couplage oxydatif de benzylamines avec des indoles. Les conditions de la réaction impliquent du triflate de fer II ($\text{Fe}(\text{OTf})_2$) comme catalyseur acide, le dioxygène comme oxydant, le chlorobenzène comme solvant, afin de permettre un chauffage à 110 °C. Cette méthodologie a permis d'obtenir un certain nombre de PhédIMs plus ou moins fonctionnalisés (Fig. 29)¹⁵⁶. Toutefois, aussi intéressante soit-elle, cette approche est limitée à la synthèse des seuls PhédIMs ayant un hydrogène sur le méthane. Les rendements observés parfois limités pourraient s'expliquer par le fait que les PhédIMs sont sensibles à l'oxydation. Ce point sera abordé ultérieurement dans cette thèse et fera l'objet de développements particuliers.

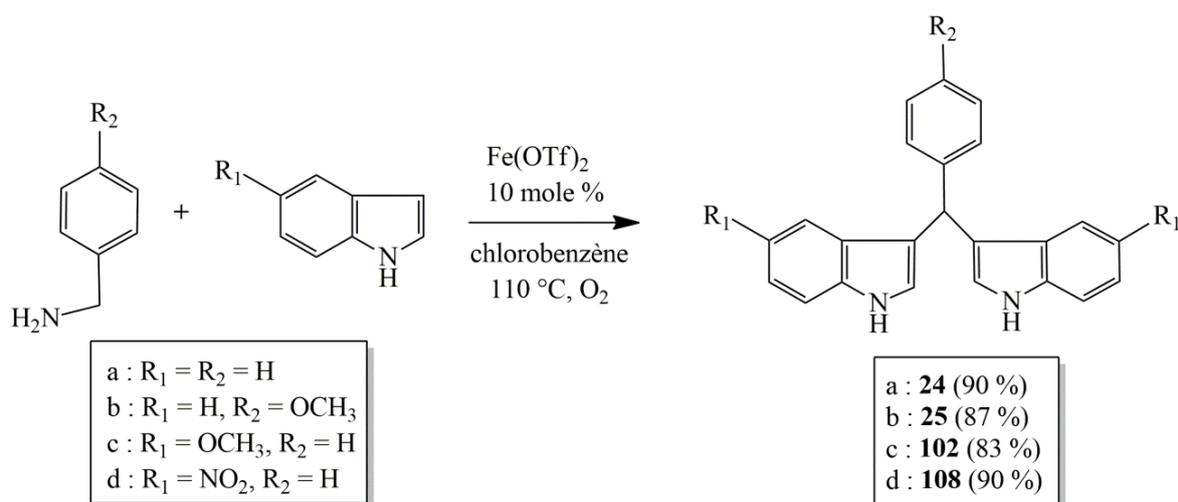


Figure 29 : Synthèse de PhédIMs à partir de benzylamines

Les auteurs ont proposé un mécanisme réactionnel plausible pour la formation des PhédIMs à partir d'un indole et d'une benzylamine (Fig. 30). Il pourrait se produire initialement une addition oxydative du fer sur l'amine primaire [a] générant ainsi le complexe [b]. L'oxydation de [b] conduit ensuite à une imine intermédiaire [c] et à la régénération du catalyseur. La réaction de [c] avec une autre molécule de benzylamine [a] conduit à la formation de l'imine [d] avec libération d'ammoniac. L'indole réagit alors avec l'imine [d] (substitution électrophile catalysée par $\text{Fe}(\text{OTf})_2$) conduisant à l'intermédiaire [e], qui se décompose en cation iminium [f]. Le complexe

[b] est également régénéré au cours de cette étape. Enfin, la substitution électrophile d'un autre indole par l'iminium [f] produit le PhéDIM attendu [g].

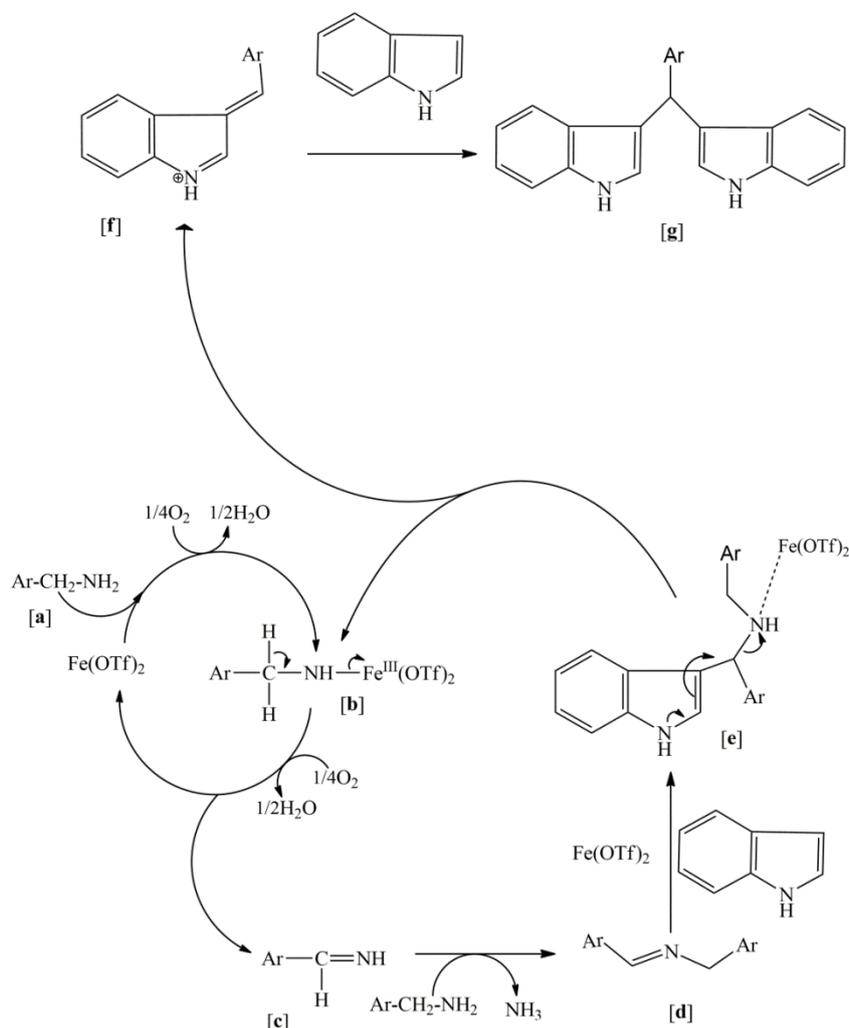


Figure 30: Mécanisme réactionnel proposé pour le couplage oxydatif de l'indole avec la benzylamine¹⁵⁶

II.A.3- Synthèses à partir de dérivés d'acides de Meldrum en série indolylméthane (addition nucléophile)

Armstrong et coll. ont mis au point une méthode de synthèse des PhéDIMS basée sur l'addition d'un substrat nucléophile (Nu) sur un dérivé aromatique d'acide de Meldrum (l'acide de Meldrum correspond au malonate d'isopropylidène et sa dénomination IUPAC est la 2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione), en présence de triflate de scandium ($\text{Sc}(\text{OTf})_3$), comme acide de Lewis¹⁵⁷. Il ne s'agit là en fait que d'une optimisation de conditions de couplage à partir de dérivés d'acide de

Meldrum développées par l'équipe de Fillon^{158,159}. Ces auteurs utilisaient des acides de Lewis forts tels qu' AlCl_3 incompatibles avec les nucléophiles riches en électrons tels que l'indole.

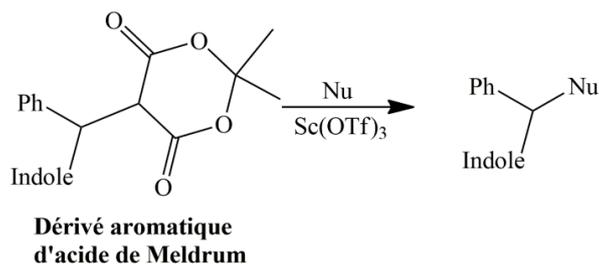


Figure 31 : Réaction d'addition nucléophile sur un dérivé d'acide de Meldrum

Par cette voie de synthèse, l'accès aux PhédIMs s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à préparer le substrat électrophile, à savoir le dérivé indolylméthylé d'acide de Meldrum, à partir d'un indole d'un aldéhyde et de l'acide de Meldrum, en présence de L-proline¹⁶⁰. La seconde étape est l'addition nucléophile d'une autre unité d'indole sur ce dérivé d'acide de Meldrum, en présence du $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, permettant ainsi d'obtenir les PhédIMs symétriques souhaités (Fig. 32). Il faut noter que cette synthèse est applicable à la préparation de PhédIMs non symétriques (voir paragraphe **II.B.3**).

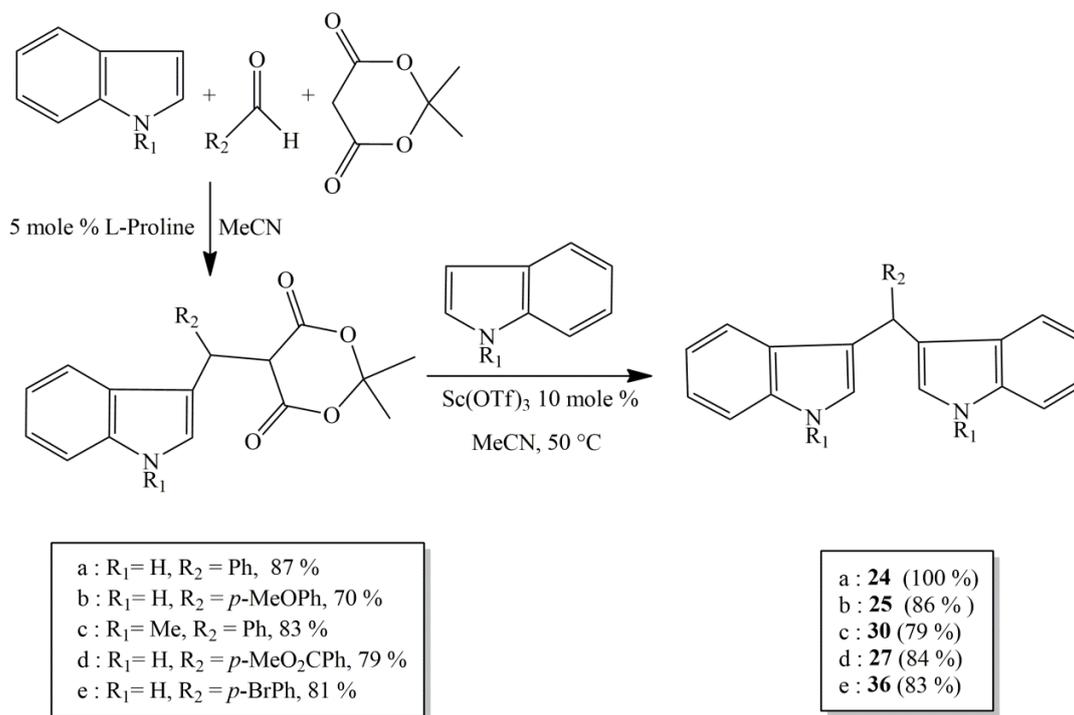


Figure 32 : Synthèse de PhédIMs en deux étapes à partir de dérivés d'acide de Meldrum¹⁵⁷

Le mécanisme réactionnel suivant a été proposé : L'acide de Lewis (AL) forme un complexe avec l'oxygène du groupement $\text{C}=\text{O}$ de l'une des fonctions lactones du dérivé d'acide de Meldrum

[a], ce qui favorise le départ de l'acide de Meldrum pour donner le cation indoléninium [b]. L'attaque nucléophile d'une autre unité indolique (ici identique) intervient par la suite pour former le PhéDIM [c] (Fig. 33).

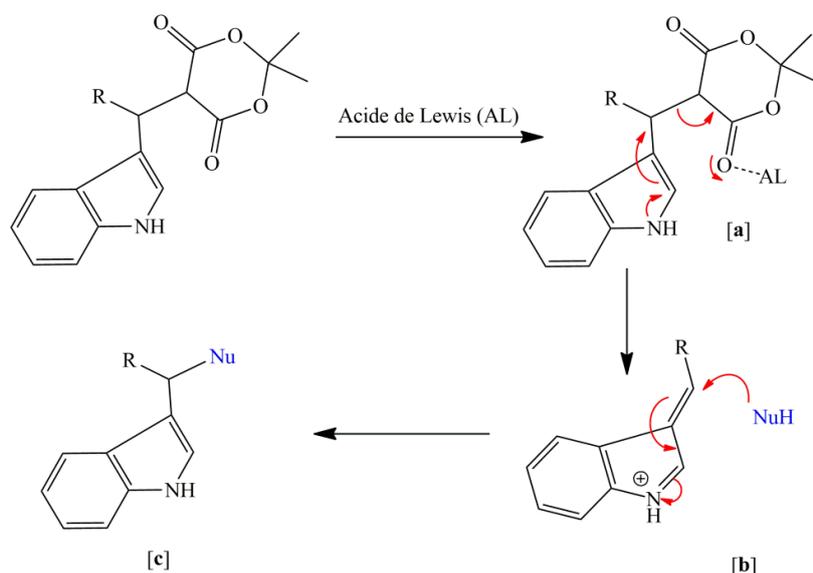


Figure 33 : Mécanisme hypothétique de la formation de PhéDIMs par addition d'un nucléophile sur un dérivé indolique d'acide de Meldrum en présence d'un acide de Lewis¹⁵⁷

II.A.4- Synthèse à partir dérivés de nitrobenzène (Réaction de Bartoli)

La synthèse de Bartoli est l'une des méthodes les plus efficaces pour accéder à des indoles substitués en position 7¹⁶¹. Par exemple, la réaction du 1-chloro-2-nitrobenzène avec le bromure de vinylmagnésium conduit, après traitement avec une solution aqueuse saturée de NH_4Cl au 7-chloroindole **112** (Fig. 34).

Remarque : Même si nous présentons dans un paragraphe particulier cette synthèse de PhéDIMs, celle-ci peut être considérée comme un exemple de couplage d'indole avec un carbonyle et pourrait donc être décrite dans le paragraphe II.A.1.

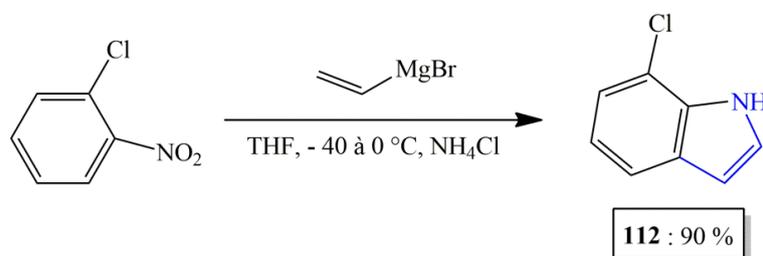


Figure 34 : Synthèse du 7-chloroindole selon la méthode de Bartoli¹⁶¹

Abe et coll. ont montré que le traitement du milieu réactionnel avec HCl aqueux à 10 %, ou bien avec une solution aqueuse de KHSO_4 , à la place de la solution de NH_4Cl , entraînait la

formation d'un second produit, en plus de l'indole attendu, identifié comme étant le DIM **115** ou **116** (Fig. 35) ¹⁶².

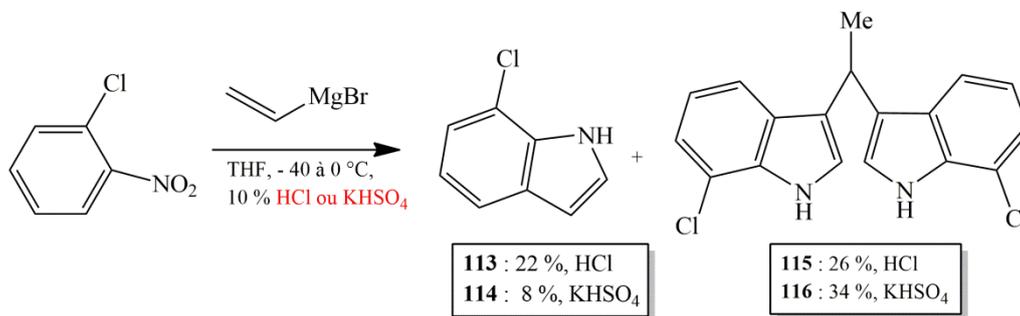


Figure 35 : Obtention d'un DIM au cours du traitement de la réaction de Bartoli par HCl ou KHSO₄ ¹⁶²

Bien qu'aucun mécanisme réactionnel de formation des DIMs ne soit proposé par les auteurs de cette étude, il est fort probable que dans ces conditions « plus acides », l'hydrolyse du bromure de vinylmagnésium en excès forme de l'acroléine qui se condense successivement avec deux unités indoliques.

À partir de ces observations, ceux-ci ont développé des conditions de réaction monotope pour accéder directement à des DIMs et notamment à des PhédIMs. Ainsi, en faisant réagir dans un premier temps le 1-bromo-2-nitrobenzène avec du bromure de vinylmagnésium (une ½ h à -40°C, puis 2 h à 0°C), puis en ajoutant à 0°C l'aldéhyde (par exemple le benzaldéhyde), puis la solution de KHSO₄, le PhédIM **110** est obtenu avec un rendement de 50 %. La débromation réductrice du composé **110**, par traitement avec *n*-Bu₃SnH en présence de AIBN, permet d'obtenir le PhédIM **24** (Fig. 36).

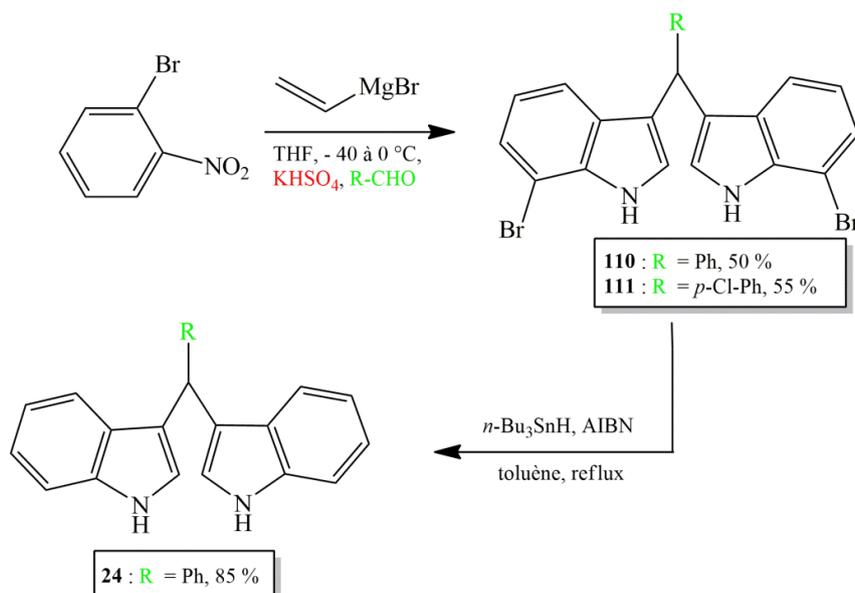


Figure 36 : Développement d'une réaction monotope pour l'accès à des PhédIMs à partir de la réaction de synthèse des indoles de Bartoli ¹⁶²

Il est clair que la formation du PhéDIM est consécutive à la formation de l'indole et que KHSO_4 (ou HCl aq. 10 %) joue ici le rôle de catalyseur acide dans la réaction de couplage de l'indole avec le benzaldéhyde.

II.A.5- Synthèse de PhéDIMs à partir d'alcynes terminaux

Xia et coll. ont montré qu'en présence du catalyseur organométallique $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ (bromopentacarbonylrhénium (I)), l'addition du *N*-méthylindole sur des acétylènes terminaux non activés était régiodivergente, suivant que la réaction était réalisée sans solvant ou dans le toluène. Ainsi, lorsque la réaction est menée dans le toluène (et chauffage à 90 °C), elle s'oriente vers la formation de composés de type 1,1-di(3,3'-indolyl)-1-benzylméthane (benzylDIM), en empruntant la voie d'addition «**anti-Markovnikov**». Au contraire, dans des conditions sans solvant (mais toujours avec chauffage à 90 °C), l'addition suit une orientation «**Markovnikov**» menant à des PhéDIMs (Fig. 37) ¹⁶³.

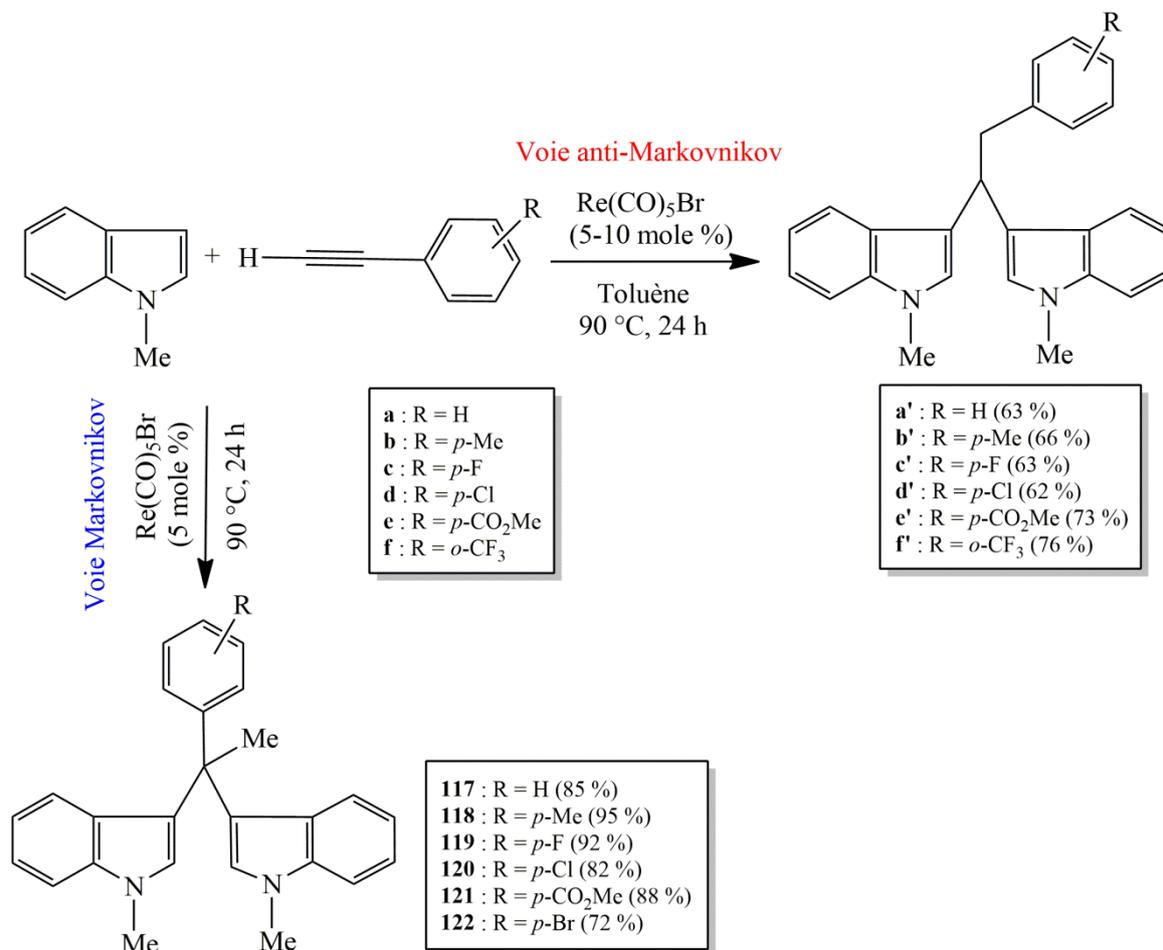


Figure 37 : Addition régiodivergente de *N*-méthylindole sur des alcynes terminaux, en présence de $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ ¹⁶³

Les auteurs de cette publication ont étudié le mécanisme de la réaction pour comprendre les raisons de cette régiosélectivité, en particulier en s'appuyant sur des données structurales et spectrales (utilisation d'un alcyne deutérié). Ils proposent le mécanisme suivant (Fig. 38), même s'ils admettent que certains points précis restent encore à élucider. Notons que d'une manière plus générale, dans les deux cas, il s'agit d'une succession de deux réactions d'addition d'indole sur un alcyne (*hydroindolation* en anglais), catalysées par un métal de transition.

La coordination du rhénium avec l'alcyne [a] conduit à l'intermédiaire [b1]. En conditions sans solvant, l'attaque nucléophile par le *N*-méthylindole [c] se produit sur le carbone interne de la triple liaison de l'alcyne, conduisant à la formation du 3-alcénylindole [d]. Finalement, le PhéDIM [e], qui correspond au produit attendu en suivant l'orientation « Markovnikov », est obtenu après une seconde « hydroindolation » [c] catalysée par le rhénium.

Dans l'autre cas (orientation « anti-Markovnikov »), quand la réaction est menée dans une solution diluée de toluène, il se produirait de manière préférentielle une migration de l'atome de deutérium à partir de l'intermédiaire [b1], conduisant à un intermédiaire [b2] (migration 1→2), puis au vinylidène [b3] (migration 1→2 à partir de [b2] ou migration 1→3 à partir de [b1]). L'attaque nucléophile de l'indole [c] sur le carbone porteur de l'atome de Re, suivie d'une étape de protonolyse conduirait au 3-alcénylindole [f]. Au final, comme pour la précédente voie, une seconde « hydroindolation » [c] catalysée par le rhénium permettrait d'expliquer la formation cette fois-ci d'un benzylDIM [g].

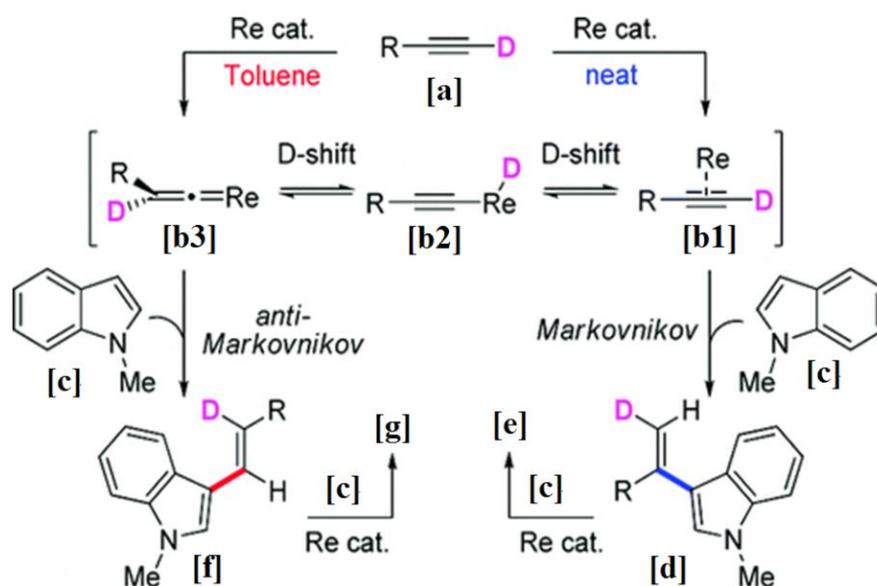


Figure 38 ; Mécanisme proposé pour l'addition régiodivergente de *N*-méthylindole sur des alcynes terminaux, en présence de $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$ ¹⁶³

Cette approche est intéressante pour accéder à des 3,3'-dindolyléthanes ($Z = \text{CH}_3$) symétriques. Toutefois, elle est dans l'état actuel des connaissances limitée aux indoles *N*-méthylés.

II.A.6- Synthèse à partir de sulfones acétyléniques

L'équipe de Xie a montré que l'on pouvait accéder à des 3,3'-diindolyléthanés sulfonylés, par une double addition de Michael d'indoles sur une sulfone acétylénique, la réaction étant catalysée par le triflate de cuivre (II) ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$) (Fig. 39) ¹⁶⁴.

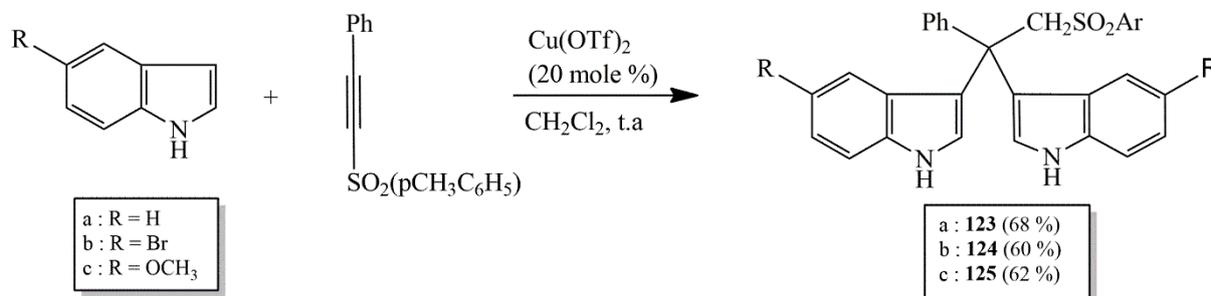


Figure 39 : Synthèse de 3,3'-diindolyléthanés sulfonylés par double addition de Michael d'indoles sur une sulfone acétylénique, en présence de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ¹⁶⁴

Le mécanisme catalytique suivant a été proposé par les auteurs pour expliquer la formation des 3,3'-diindolyléthanés sulfonylés. La première étape est une coordination du $\text{Cu}(\text{II})$ avec la triple liaison conduisant à l'intermédiaire **[b]**. L'addition de l'indole **[c]** sur la position β du sulfone acétylénique mène à l'intermédiaire vinyl-cuivre **[d]**. L'élimination du proton H-3, suivie d'une protonation en α du sulfone conduit au 3-alcénylindole **[e]** et à la régénération du catalyseur métallique. La seconde addition de Michael de l'indole **[c]** sur le composé **[e]**, selon un mécanisme similaire à la première, permet d'expliquer la formation du 3,3'-diindolyléthane sulfonylé **[f]** (Fig. 40).

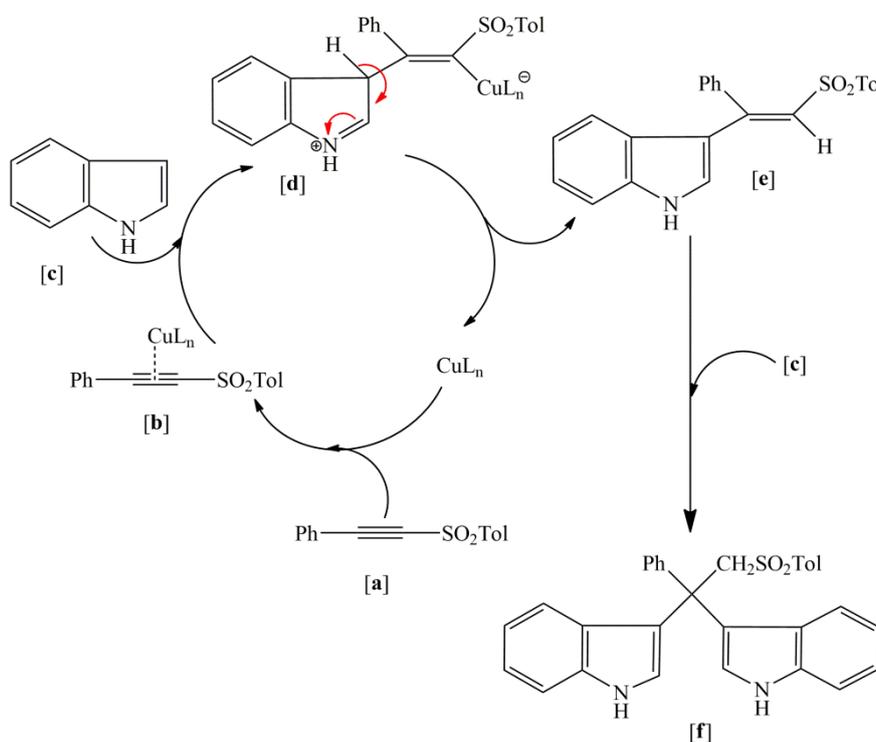


Figure 40 : Mécanisme proposé pour la formation de 3,3'-diindolyléthanés sulfonylés par double addition de Michael d'indoles sur une sulfone acétylénique, catalysée par $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ ¹⁶⁴

L'intérêt de cette approche est qu'elle permet d'accéder à des dérivés dont la fonction sulfonyle peut être diversement transformée (alkylation, désulfonation, oléfination de Julia...) et donc conduire à de nouvelles bibliothèques de diindolyéthanés diversement substitués sur le carbone central. Par ailleurs, comme nous l'avons vu au cours de cette revue bibliographique, les diindolyéthanés sont d'une manière générale des composés plus difficiles à préparer que les PhédIMs.

II.B- Voies de synthèses de PhédIMs non symétriques, en série racémique ou asymétriques

Contrairement aux PhédIMs symétriques, les composés PhédIMs non symétriques sont constitués de deux indoles qui diffèrent par la nature de leurs substituants (voir formule générale ci-après, Fig. 41). De fait, le carbone central C-1''' est asymétrique, ses quatre substituants étant différents. La majorité des synthèses rapportées de PhédIMs non symétriques sont en série racémique et donc les produits décrits comme tels. C'est la raison pour laquelle nous distinguerons dans cet inventaire les synthèses en série racémique, des synthèses en série énantiosélective. Par ailleurs, il faut noter que par rapport aux PhédIMs symétriques, ces composés ont fait l'objet d'un nombre relativement faible de travaux.

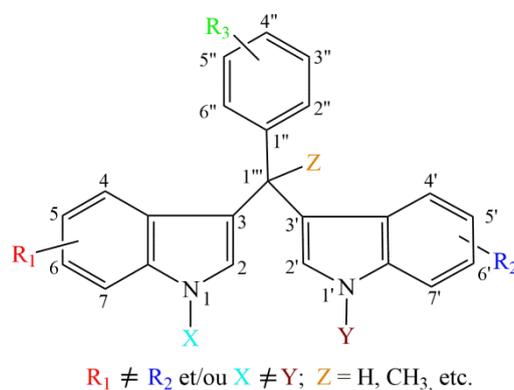


Figure 41 : Formule générale des PhédIMs non symétriques

D'un point de vue synthétique, les PhédIMs non symétriques sont obtenus à partir d'un intermédiaire stable et isolable, capable de générer dans certaines conditions (acides, voire par thermolyse) un cation de type indoléninium sur lequel réagira une autre unité indolique (voir le mécanisme général de synthèse des PhédIMs au point *II.A.1.b.1*). Cet intermédiaire est le plus souvent un carbinol ou l'éther de triméthylsilyle correspondant, c'est pourquoi nous détaillerons ci-après les voies d'accès aux de phényl-3-indolylméthanols.

II.B.1- Synthèse par couplage d'un phényl-3-indolylméthanol et d'un indole

Dans ce cas, et comme nous l'avons déjà évoqué ci-avant, la synthèse de PhéDIMs non symétriques se déroule en deux étapes : l'une consacrée à la préparation des phényl-3-indolylméthanol et l'autre au couplage avec un indole.

II.B.1.a- Synthèse de phényl-3-indolylméthanol

Il existe de manière générale, deux voies pour accéder à ces carbinols : une voie directe (réaction d'un indole avec un carbonyle) et une voie comportant deux étapes (une acylation d'un indole, suivie d'une réduction de la fonction carbonyle). Il existe de nombreux exemples de carbinols ainsi préparés, rapportés dans la littérature. Nous présenterons donc dans chaque cas des exemples représentatifs et en rapport avec nos travaux.

II.B.1.a.1- Voie d'accès en deux étapes : Par d'acylation de Friedel et Crafts, suivie d'une réduction par NaBH_4

- Etape d'acylation en position 3 de l'indole :

En se basant sur une réaction d'acylation de Friedel-Crafts, les auteurs, Ketcha et coll. de l'équipe de Gordon W. Gribble, et Guchhait et coll. ont préparé différentes phényl-3-indolylméthanolones par traitement d'une unité d'indole avec un chlorure de benzoyle, en présence d'un acide de Lewis^{165,166}.

Dans ces conditions de substitution électrophile aromatique (SEAr), l'acylation s'effectue préférentiellement en position 3 de l'indole. Ketcha et coll. ont utilisé AlCl_3 comme acide de Lewis, ce qui implique la nécessité de protéger l'indole précurseur, ici sous la forme d'un *N*-sulfonylindole, afin d'éviter sa polymérisation. Le clivage d'un tel groupement peut être facilement réalisé en présence de K_2CO_3 . Guchhait et coll. ont quant à eux montré qu'en employant ZrCl_4 comme catalyseur, la réaction pouvait également être réalisée avec des indoles non protégés sur l'azote (Fig. 42).

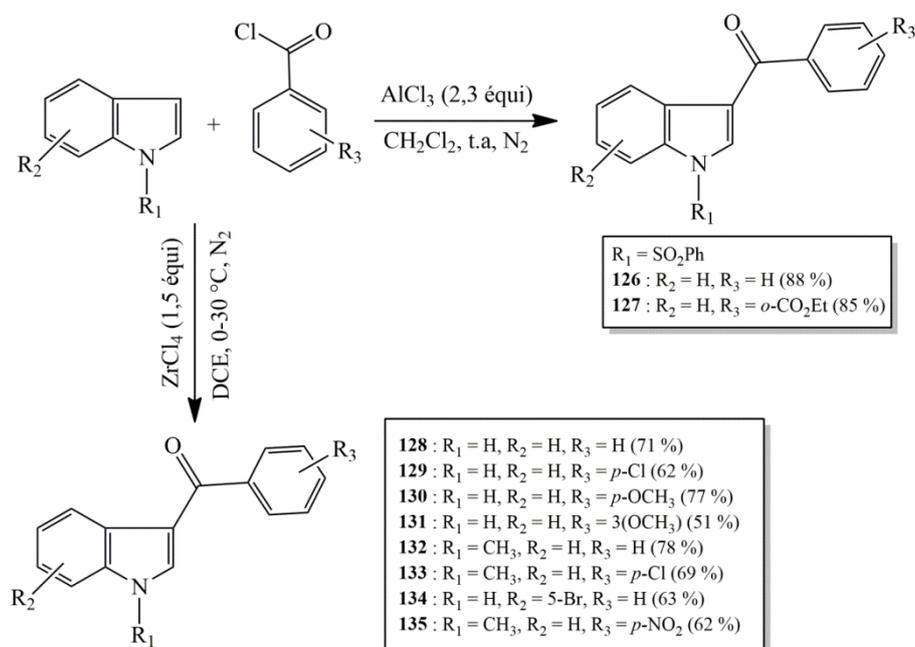


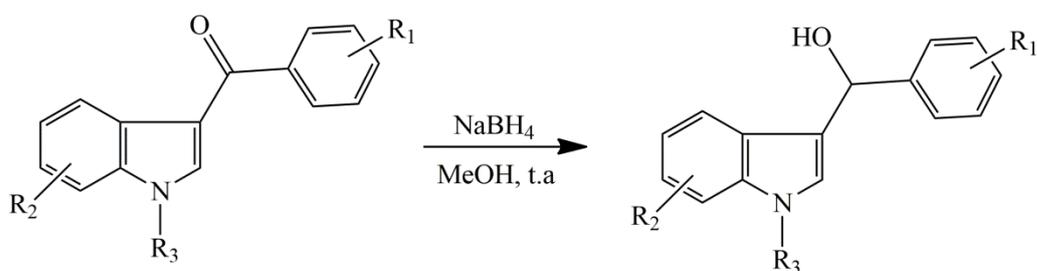
Figure 42 : Réactions d'acylation d'indoles en position 3, dans les conditions de Friedel et Crafts ^{165,166}

Il faut noter que les conditions initialement décrites par l'équipe de G. Gribble (AlCl_3 et indole *N*-protégé) ont précédemment été employées avec succès dans notre laboratoire dans le cadre de la synthèse de dérivés hétérocycliques de la combrétastatine, en série 3-aroyleindole^{167,168} ; ainsi que par Le Borgne et coll. pour la préparation d'inhibiteurs potentiels d'aromatases en série 3-(α -azolybenzyl)-1*H*-indole.¹⁶⁹ Ces derniers rapportent que l'acylation directe de 1*H*-indole par le chlorure de 4-fluorobenzoyl en présence d' AlCl_3 est accompagnée d'un rendement modeste de 21 % et qu'une protection préalable de l'azote indolique est favorable à la réaction (dans les mêmes conditions, l'acylation du *N*-méthylindole est réalisée avec un rendement de 60 %). Des exemples d'intermédiaires synthétisés au cours de ces travaux sont présentés ci-après dans la figure 25 concernant la réduction des méthانونes en carbinols.

Plus rarement, l'utilisation d'autres acides de Lewis est rapportée dans la littérature, tel que AlCl_2Et , utilisé par Dhiman et Samasastry pour effectuer le couplage du *N*-méthylindole avec le chlorure de benzoyl¹⁷⁰.

● Etape de réduction de la méthانونe

Dans un second temps, la fonction carbonyle peut être réduite en carbinol par l'action d'un hydrure. L'unité indolique est systématiquement protégée sur l'azote afin d'éviter des réactions secondaires.¹⁷¹ La réduction est généralement réalisée en présence de borohydrure de sodium (NaBH_4) dans le méthanol à température ambiante, ces conditions étant compatibles avec le groupement *N*-sulfonyl (Fig. 43)^{167,169}. LiAlH_4 a également été utilisé pour réduire de phényl-3-indolylméthانونes *N*-méthylées^{170,172}.



136 : R₁ = H, R₂ = H, R₃ = SO₂Ph-Me

137 : R₁ = 5-F, R₂ = H, R₃ = Et

64 - 98 % Le Borgne et coll., 1999

138 : R₁ = 5-F, R₂ = 5-Br, R₃ = Me

139 : R₁ = 3',4',5'-(OCH₃), R₂ = H, R₃ = SO₂Ph

140 : R₁ = 3',4',5'-(OCH₃)₃, R₂ = 6-OCH₃, R₃ = SO₂Ph 92 - 95 % Dupeyre et coll., 2006

Figure 43 : Exemple de réduction de phényl-3-indolylméthanones par NaBH₄ ^{167,169}

Remarque :

A part les conditions de Friedel-Crafts, il existe d'autres conditions réactionnelles efficaces permettant d'accéder à des phényl-3-indolylméthanones, en particulier par recours à des composés organométalliques :

i) **3-acylation par réaction de Grignard d'un halogénure d'indolylmagnésium formé *in situ* à partir d'un indole non protégé, avec un halogénure de benzoyle.**

Dans l'exemple présenté ci-dessous, le 3-benzoyl-1*H*-indole **84** est préparé dans ces conditions avec un faible rendement de 12 % à partir de l'indole (Fig. 44) ^{167,169}.

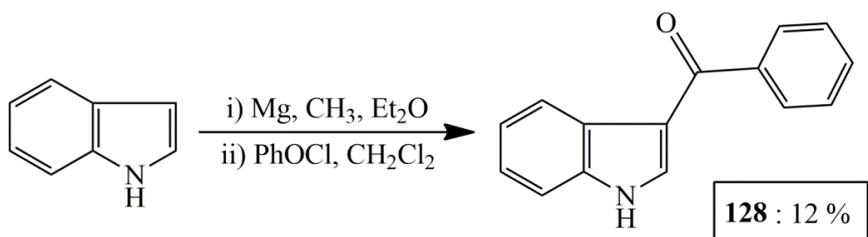


Figure 44 : Réaction de l'iodure d'indolylmagnésium sur le chlorure de benzoyle ^{167,169}

Ces conditions de couplage présentent l'intérêt de ne pas nécessiter d'éventuelle étape de clivage du groupement protecteur, en particulier dans le cas de molécules instables dans les conditions de déprotection. Comme évoqué précédemment pour les conditions d'acylation de Friedel et Crafts, celles-ci aussi ont largement été utilisées pour la préparation de dérivés hétérocycliques de la combrétastatine A4 (3-aroilindoles et dérivés). Toutefois, vu les faibles rendements généralement observés avec les conditions initiales (organomagnésien seul), de nouvelles conditions mixtes, associant un intermédiaire organométallique et un acide de Lewis, à

l'origine développées par Liou et coll., ont été appliquées par Ty et coll. et Liou et coll (Fig. 45)

168,173,174

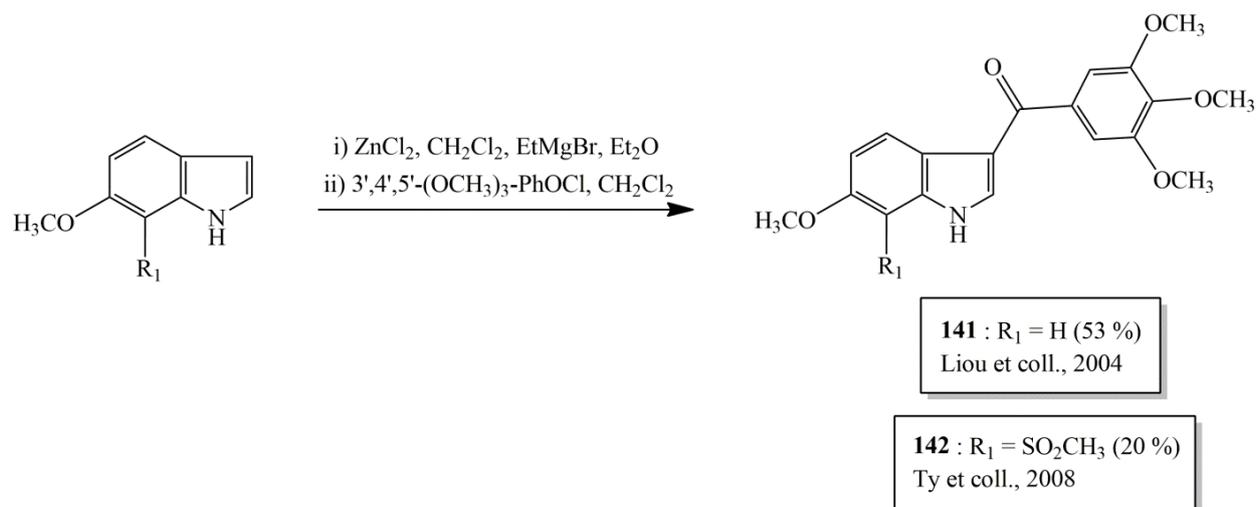


Figure 45 : Couplage d'un dérivé organométallique d'indole avec un halogénure d'acide, en présence d' AlCl_3

168,173

ii) 3-acylation par réaction d'un 3-lithioindole formé *in situ* à partir d'un 3-iodoindole (échange halogène-métal), sur un halogénure de benzoyle.

Saulnier et Gribble décrivent ainsi la préparation de la phényl-3-(*N*-sulfonylindolyl)méthanone avec un rendement de 76 % à partir du 3-iodoindole correspondant, en traitant celui-ci par du *t*-BuLi à très température pendant 5 minutes, puis ajout direct de l'électrophile (PhCOCl) (Fig. 46) ¹⁷⁵.

Il faut remarquer qu'en remplaçant le chlorure d'acide par le benzaldéhyde comme électrophile, les auteurs préparent directement dans ces conditions le carbinol avec un rendement de 89 %.

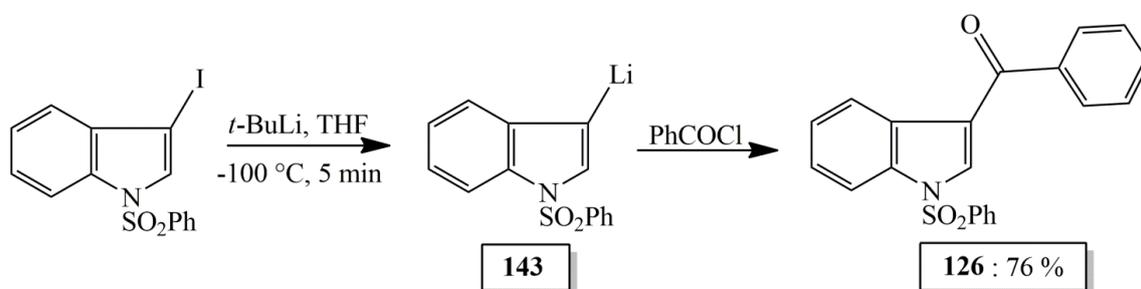


Figure 46 : Synthèse de la phényl-3-(*N*-phénylsulfonyl)indolylméthanone à partir du 3-iodo-*N*-phénylsulfonyl-1*H*-indole ¹⁷⁵.

iii) 3-acylation d'indoles par réaction décarboxylative catalysée par Cu(I), d'acides α -oxocarboxyliques, en présence de carbonate d'argent (Ag_2CO_3).

Wang et coll. ont mis au point des conditions plutôt efficaces d'acylation en position 3 d'indoles non protégés, consistant à traiter ces indoles avec un acide α -oxocarboxylique en présence d'acétate de cuivre (II) ($\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mole %) comme catalyseur. L'ajout d'un oxydant tel que Ag_2CO_3 (2 Eq.) est nécessaire pour régénérer le catalyseur. Le couplage décarboxylatif est réalisé par chauffage dans le DMSO ou le DMF à 90 °C.¹⁷⁶ Ces conditions permettent d'accéder à diverses phénylméthanones (substitutions variables en position *para* du phényle et en positions 5 et 6 de l'indole) – y compris le composé **84** avec de moyens et bons rendements (Fig. 47).

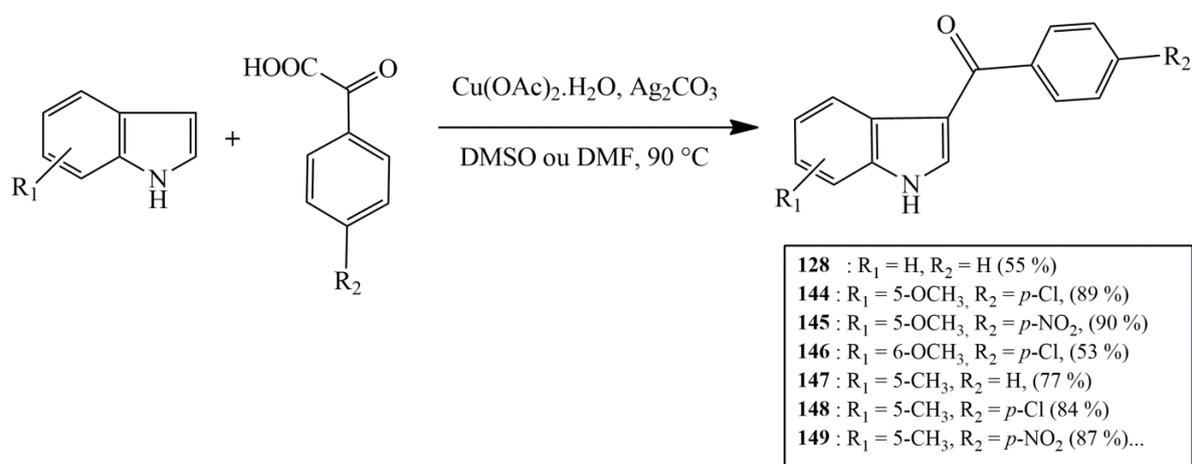


Figure 47 : Ensemble des phénylméthanones préparées par réaction de couplage décarboxylatif d'indoles avec un acide α -oxocarboxylique, en présence d'acétate de cuivre (II) et d' Ag_2CO_3 ¹⁷⁶

Quant au mécanisme possible de cette réaction, tel que proposé par les auteurs, celui-ci est rapporté dans la figure ci-dessous (Fig. 48).

La réaction électrophile de l'indole avec $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ conduirait à la formation de l'intermédiaire organocuvrique **I**, qui subit une étape de transmétallation avec l'espèce PhCOAg , elle-même formée au cours de la décarboxylation de l'acide phénylglyoxylique en présence de $\text{Ag}(\text{I})$. La ré-aromatation de l'intermédiaire $\text{Cu}(\text{III})$ ainsi formée (**II**) mène à l'intermédiaire $\text{Cu}(\text{III})$ **III**, et est suivie d'une étape d'élimination réductrice conduisant à la phénylméthanone attendue et à la formation d'acétate de cuivre (I) qui est ré-oxydé par l'excès de $\text{Ag}(\text{I})$, afin de régénérer $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

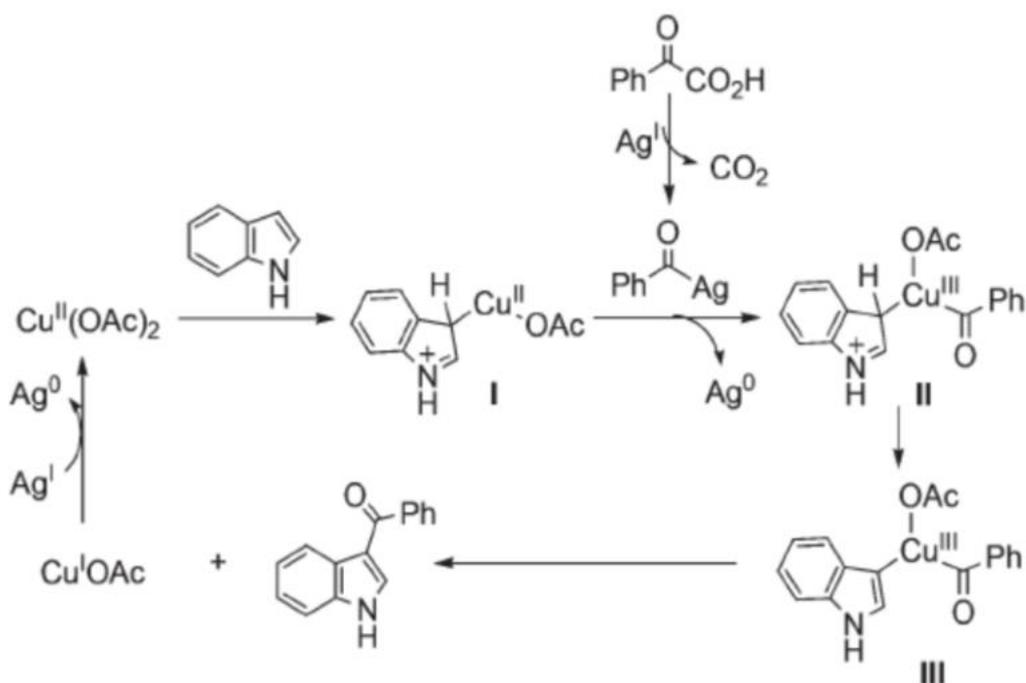


Figure 48 : Mécanisme supposé du couplage décarboxylatif d'indoles avec un acide α -oxocarboxylique en présence d'acétate de cuivre (II) et d' Ag_2CO_3 ¹⁷⁶

II.B.1.a.2- Voies d'accès en une seule étape :

1. Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanol par réaction d'un réactif organomagnésien (réactif de Grignard) sur un indole-3-carboxaldéhyde.

La réaction d'un halogénure de phénylmagnésium sur un indole-3-carboxaldéhyde, permet d'obtenir directement le carbinol correspondant. Cette réaction a été décrite à partir d'un indole non protégé^{177,178} ou protégé par un groupement *N,N*-diéthylcarbamide¹⁷⁹ ou *N*-phénylsulfonyl¹⁷⁸ (Fig. 49).

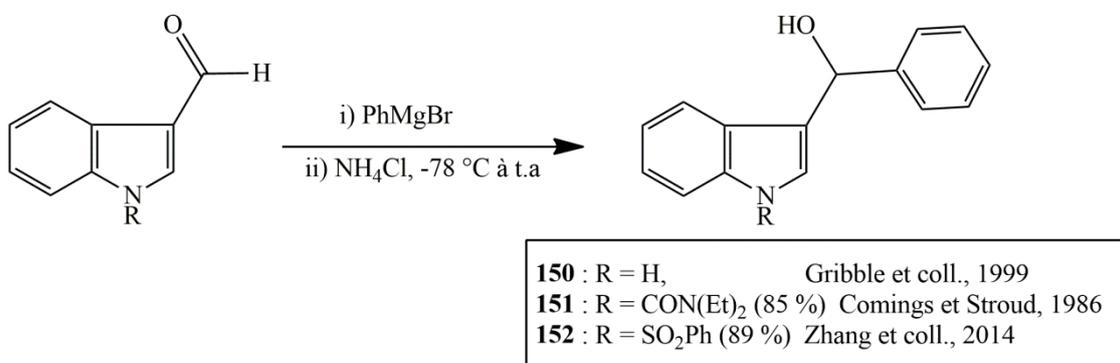


Figure 49 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanol à partir d'indole-3-carboxaldéhyde.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰

2. Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction d'un réactif organométallique issu d'un 3-halogénoindole, sur un benzaldéhyde.

2.1. Organomagnésiens et organozincates de lithium :

L'accès à des (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols peut être envisagé par réaction de réactifs de Grignard formés à partir de 3-iodoindoles protégés sur l'indole, sur un benzaldéhyde.

- Ainsi, Kondo et coll. ont préparé le (*N*-sulfonyl-1H-3-indolyl)(phényl)méthanol avec un rendement de 82 % par traitement du *N*-sulfonyl-3-iodoindole avec EtMgBr à 0 °C, puis le benzaldéhyde.¹⁸¹ Ce composé peut également être préparé *via* un organozincate de lithium (R-Zn(Me)₂Li) avec un rendement de 61 %, en traitant le même composé iodé de départ avec le complexe Me₃ZnLi-TMEDA (*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine).¹⁸²

- Tricotet et O'Shea ont mis au point des conditions de synthèse automatisée de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols, adaptées à des réactions en flux continue et réalisées dans des micro-réacteurs. Dans ce contexte, les composés sont préparés à partir de 3-iodoindoles protégés sur l'indole (*N*-CONEt₂, *N*-Boc).¹⁸³ Ces derniers sont transformés en réactifs de Grignard correspondants dans les conditions initialement développées par Knochel et coll.¹⁸⁴, à savoir en utilisant le complexe *i*PrMgCl.LiCl. Le traitement de l'organomagnésien formé avec le benzaldéhyde conduit finalement aux composés attendus (Fig. 50).

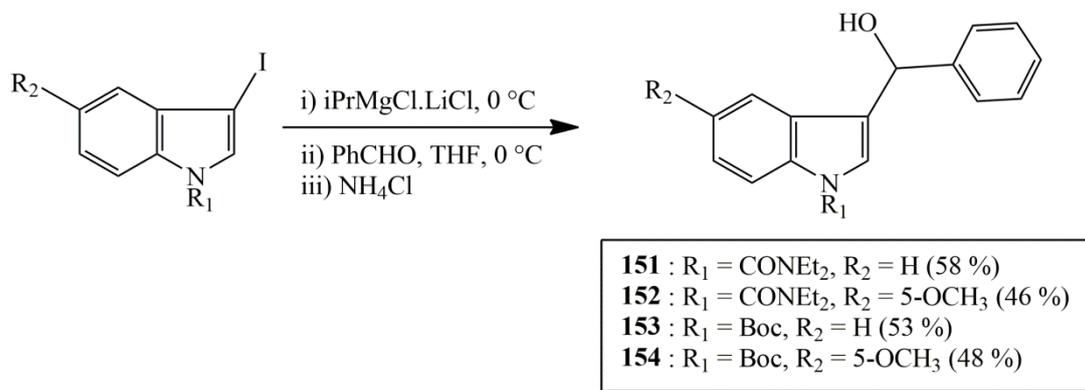


Figure 50 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction d'un réactif organomagnésien issu d'un 3-halogénoindole, sur un benzaldéhyde¹⁸³

2.2. Organolithiens :

Nous avons vu au paragraphe **II.B.1.a.1** que le (*N*-sulfonyl-1H-3-indolyl)(phényl)méthanol avait été préparé par Saulnier et Gribble¹⁷⁵ par traitement de l'organolithien issu du *N*-sulfonyl-3-iodoindole (échange halogène-métal par *t*-BuLi) avec le benzaldéhyde. Toutefois, la réaction doit être menée à -100 °C, car au-delà de cette température, le (*N*-phénylsulfonyl)-3-lithioindole a tendance à se réarranger en son isomère de position 2-lithioindole, thermodynamiquement plus

stable du fait d'une stabilisation par coordination du lithium (d'autres *N*-phénylsulfonyl)-3-lithioindoles ont également tendance à se décomposer par ouverture du cycle pyrrole). Amat et coll.¹⁸⁵ ont montré que le groupement TBDMS (*tert*-butyldiméthylsilyl), plus encombré que le groupement *N*-phénylsulfonyl, rendait l'organolithien intermédiaire correspondant (1-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-3-lithioindole) plus stable (stabilité restant relative bien-sûr) sans décomposition/réarrangement, même en le plaçant à température ambiante. Finalement, le carbinol correspondant a pu être préparé avec un rendement de 67 % par traitement de l'organolithien avec le benzaldéhyde (Fig. 51).

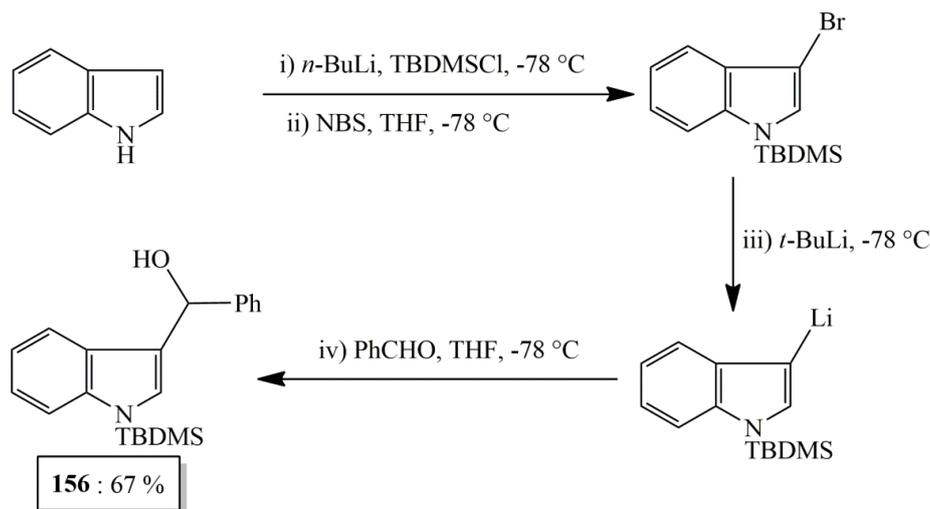


Figure 51 : Synthèse d'(1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction d'un réactif organolithien issu d'un 3-halogénoindole, sur un benzaldéhyde¹⁸⁵

3. Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction entre un indole et un benzaldéhyde en présence de base*

* Réactions décrites comme réactions de Friedel-Crafts par les auteurs correspondants. Nous avons choisi de les décrire séparément des réactions de couplage en conditions acides, qui seront donc décrites au paragraphe suivant (Paragraphe 4).

3.1. Réaction de Friedel-Crafts catalysée par un dérivé de guanidine

- Des conditions particulièrement simples ont été rapportées en 2009 par Guo et coll.¹⁸⁶ pour l'obtention de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols. En effet, ces composés peuvent être obtenus en mélangeant trois équivalents d'indole, deux équivalents de benzaldéhyde et des quantités catalytiques de tétraméthylguanidine, 20 mole % (TMG). L'eau est ajoutée en dernier et le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Cette technique a permis de préparer le carbinol issu de l'indole et du benzaldéhyde avec un rendement de 71 %, ainsi qu'une série d'autres composés rassemblés ci-après (rendements non précisés) (Fig. 52).

- Une méthode presque similaire à celle de Guo et coll été développée par Bandini et Sinisi pour la préparation cette fois de (fluorométhyl)(1*H*-3-indolyl)(phényl)méthanol.¹⁸⁷ Selon cette méthode, en traitant dans l'eau, à la température ambiante, deux équivalents d'indole avec un équivalent de di- ou trifluoroacétophénone, en présence de quantités catalytiques de *ter*-butyl-guanidine (*t*Bu-TMG) (2 mole %), il est possible de préparer le carbinol correspondant avec des rendements allant de 66 à 98 % en fonction de la nature des substituants (Fig. 52). Le couplage semble plus efficace à partir d'une 2,2,2-trifluoroacétophénone, que d'une 2,2-difluoroacétophénone.

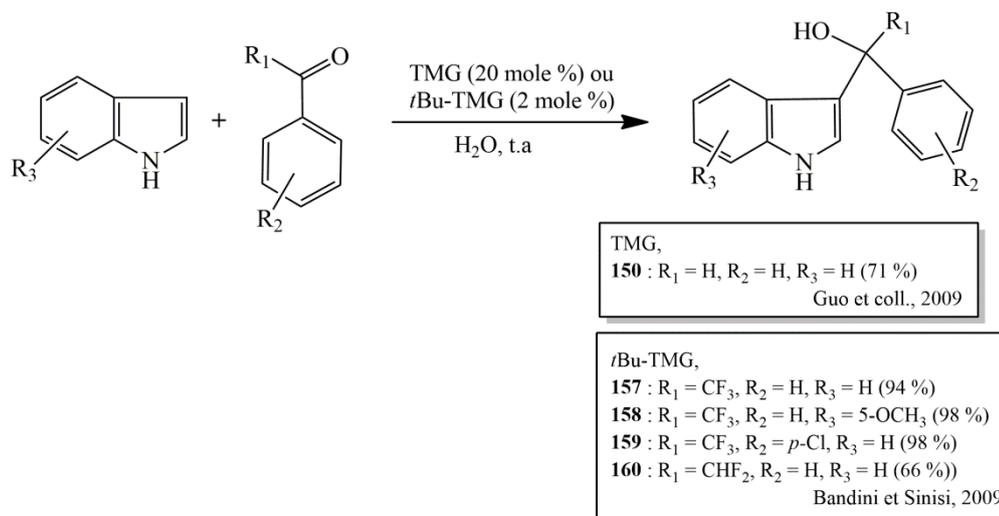


Figure 52 : Synthèse de (1*H*-3-indolyl)(phényl)méthanol en présence de catalyseur basique (TMG ou *t*Bu-TMG)^{186,187}

3.2. Réaction de Friedel-Crafts catalysée par un sel de césium

Par ailleurs, il a été démontré que le carbonate de césium (Cs₂CO₃), une base polyvalente, pouvait être utilisée comme catalyseur dans la préparation de phénylindolylméthanol.¹⁸⁸ Un mélange équimolaire d'indole et de benzaldéhyde, en présence d'un équivalent de Cs₂CO₃ dans le DMF à la température ambiante, permet d'obtenir le carbinol correspondant avec des rendements compris entre 30 et 85 % (Fig. 53).

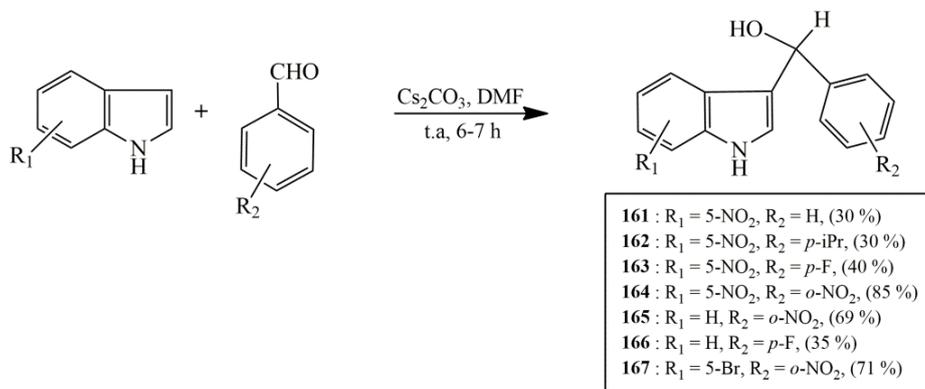


Figure 53 : Synthèse de phénylindolylméthanol diversément fonctionnalisés en présence de Cs₂CO₃¹⁸⁸

Remarque : La méthode de Guo et coll. (utilisant la TMG) et celle de Elayara (utilisant le Cs_2CO_3) ont récemment été utilisées avec succès par Zhuo et coll. en 2014¹⁸⁹ pour accéder à une série de (1*H*-3-indolyl)(phényl)méthanols avec des rendements de 80-90 %.

Nous verrons par la suite (voir paragraphe **II.B.1.b.3**) que ces composés, une fois transformés en éthers triméthylsilylés correspondants, par traitement avec le chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) en présence d'imidazole (Fig. 54), peuvent être engagés dans une alkylation de Friedel-Crafts énantiosélective permettant d'obtenir des PhédIMs asymétriques.

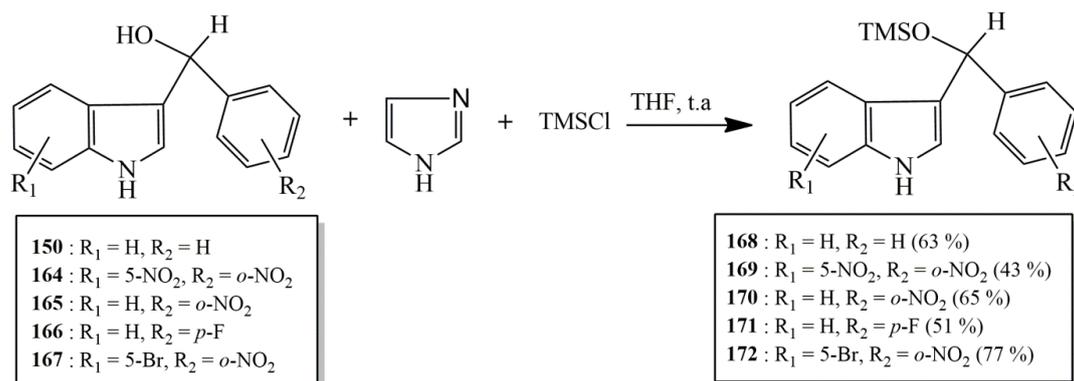


Figure 54 Synthèse des éthers de triméthylsilyle d'une série de (1*H*-3-indolyl)(phényl)méthanols ¹⁸⁹

4. Synthèse de carbinols par réaction de Friedel-Crafts d'un indole avec un carbonyle

4.1. Synthèse de carbinol par réaction d'hydroxyalkylation de Friedel et Crafts, d'un indole en présence de TMSOTf :

Downey et coll. ont récemment décrit une synthèse monotope de phénylindolylméthanols à partir de benzaldéhydes et d'indoles, en présence d'un acide de Lewis (conditions de Friedel-Crafts), et avec comme particularité, l'absence de formation de PhédIM. L'hydroxyalkylation doit être réalisée dans des conditions très précises pour éviter l'évolution vers les PhédIMs : utilisation le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) comme acide de Lewis, en présence de diisopropyléthylamine ; réaction menée dans l'éther diéthylique (CH_2Cl_2 n'empêche pas la formation de l'adduit) à -78 °C; arrêt de la réaction par ajout de pyridine, qui probablement agit en élevant le pH du milieu, mais aussi en limitant la formation d'espèces cationiques silylées (Fig. 55). Les intermédiaires 3-(1-silyloxyalkyl)indoliques formés étant peu stables, l'emploi du TBAF dans le THF permet la déprotection *in situ* de l'alcool et d'isoler directement le carbinol souhaité ¹⁹⁰.

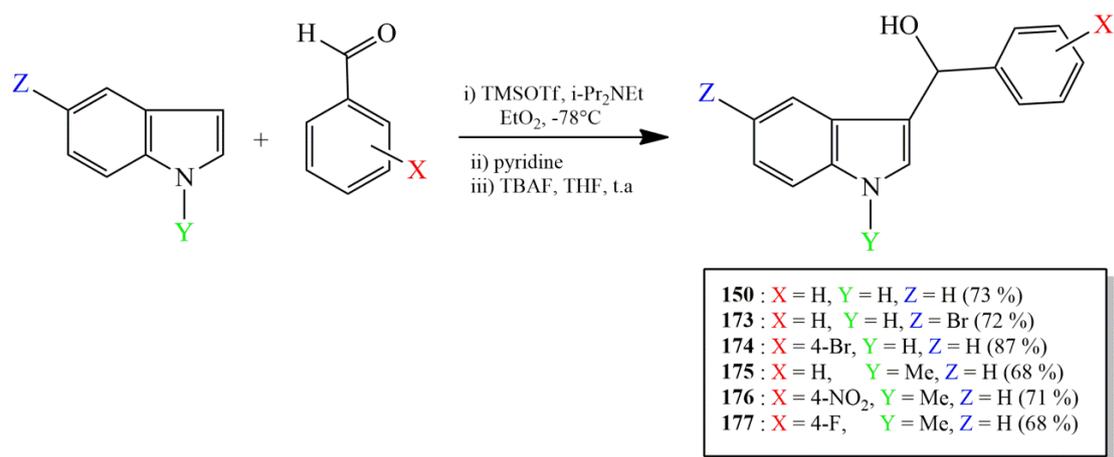


Figure 55 : Synthèse monotope de carbinols par hydroxyalkylation d'indoles ¹⁹⁰

Les auteurs ont également montré que les 3-(1-silyloxyalkyl)indoles intermédiaires tels que **178** étaient isolables (donc sans ajout de TBAF) (Fig. 56). Comme nous l'avons évoqué précédemment (cf Paragraphe 3.2), de tels éthers silylés avaient déjà été préparés auparavant par Zhuo et coll., mais par silylation du carbinol correspondant (Fig. 54) ¹⁸⁹.

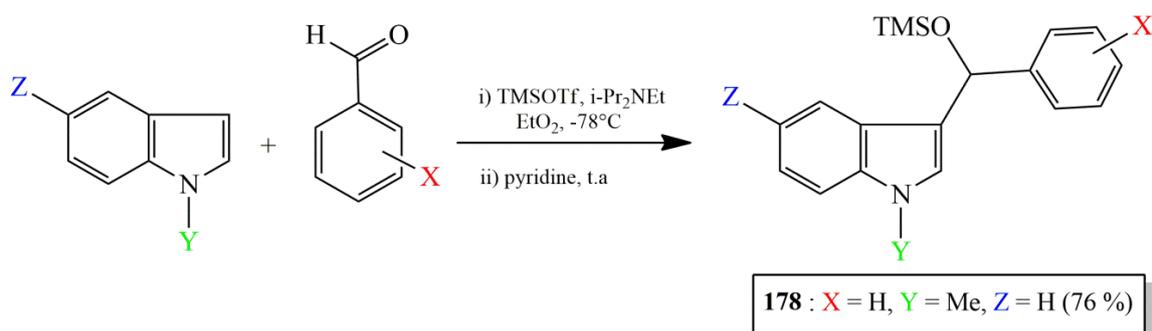


Figure 56 : Synthèse de 3-(1-silyloxyalkyl)indoles à partir de benzaldéhydes ¹⁹⁰

Remarque : De manière anecdotique, la condensation directe du benzaldéhyde sur un indole en présence d'un acide de Lewis, avec « arrêt » au stade carbinol, a été rapportée par Han et coll. ¹⁹¹ Toutefois, dans le cadre de l'étude il ne s'agissait que d'un intermédiaire réactionnel non désiré. Les auteurs en effet, cherchaient à optimiser les conditions de préparation de cyclohepta[b]indoles obtenus par réaction de cycloaddition [4+3] monotope à trois composants entre un indole, un benzaldéhyde et le cyclopentadiène, en présence de sels de terres rares. De plus, sa formation comme « seul produit de la réaction » n'est décrite qu'avec le *N*-méthyl-1*H*-indole et GaBr₃ catalytique (10 mole %) comme acide de Lewis.

4.2. Synthèse de carbinols asymétriques par arylation directe de trifluorométhylcétones en présence d'acide de Brønsted chiral

Nie et coll. ont réalisé la synthèse d'une série d'alcools tertiaires optiquement actifs par arylation avec un indole, de 2,2,2-trifluoroacétophénone, en présence d'un acide de Brønsted chiral comme catalyseur (un acide phosphorique chiral dérivé du BINOL (ou 1,1'-bi-2-naphtol) à 10 mole %, mais il n'est pas précisé s'il s'agit du *S*- ou du *R*-BINOL). Dans la majorité des cas, les excès énantiomériques sont excellents. Toutefois, il faut noter que la configuration absolue n'a été déterminée que pour un exemple d'alcool tertiaire et que, s'agissant de travaux préliminaires, les auteurs ne rapportent pas pour le moment la possibilité d'accéder aux énantiomères opposés. (Fig. 57)¹⁹².

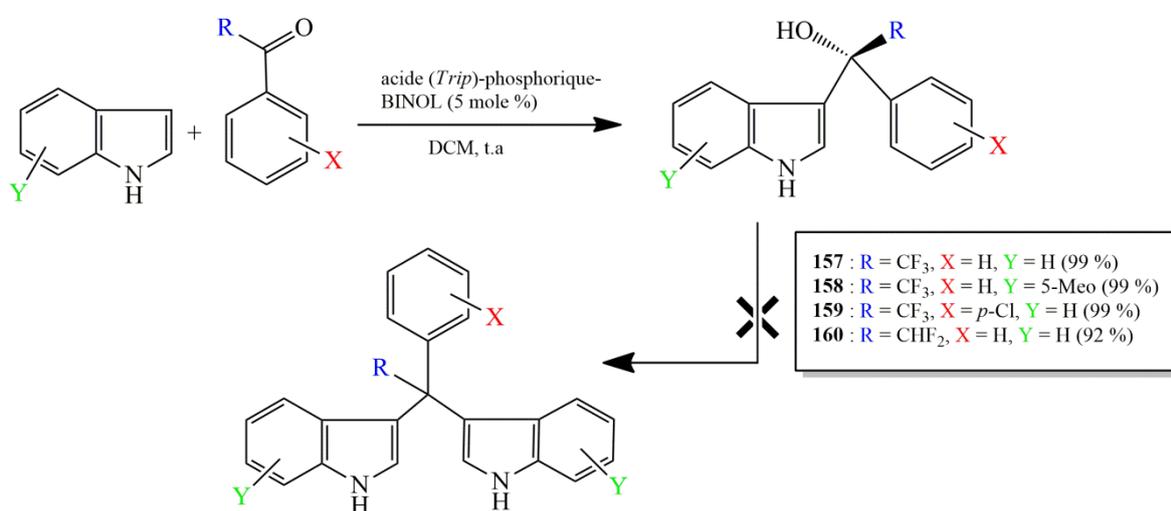


Figure 57 : Synthèse de carbinols tertiaires optiquement actifs par arylation de 2,2,2-trifluoroacétophénone en présence d'un acide phosphorique chiral¹⁹²

4.3. Synthèse de carbinols asymétriques à l'aide d'un catalyseur chiral dérivé de la quinine

Les résultats les plus intéressants sur l'obtention de carbinols chiraux en série (1*H*-3-indolyl)(phényl)méthanol, ont été rapportés par Li et coll.¹⁹³ En effet, ces auteurs ont étudié l'addition (= réaction de Friedel-Crafts) de dérivés carbonyles (en particulier des α -cétoesters et benzaldéhydes) sur des indoles, en présence de catalyseurs chiraux dérivés de la quinine. Il s'agit en l'occurrence de la 9-phénanthrénylquinine (PHNQ) et de la 9-phénanthrénylquinidine (PHNQd), qui permettent respectivement d'accéder à chacun des énantiomères comme nous le verrons ci-dessous (Fig. 58).

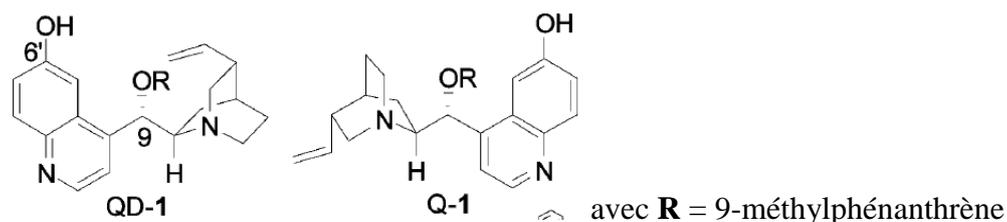
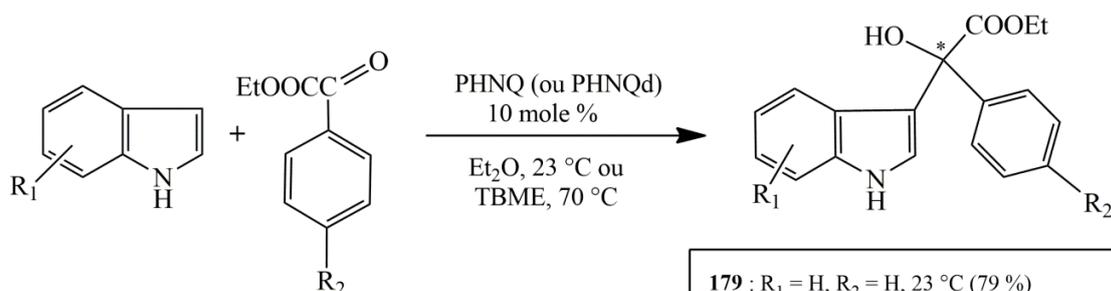


Figure 58 : Structure des ligands chiraux PHNQd (QD-1) et PHNQ (Q-1)¹⁹³

Ces derniers sont considérés comme des catalyseurs bi-fonctionnels, aux caractères à la fois basique et acide, susceptibles d'activer à la fois l'indole et le carbonyle.

Ainsi, un α -phénylcétoester (de formule générale : Ph-CO-COOEt) réagit avec un indole (2 équivalents), en présence de PHNQ ou de PHNQd (10 mole %) pour donner le carbinol chiral correspondant (Fig. 59). Chaque énantiomère peut être obtenu à partir d'un des ligands chiraux.



179 : R ₁ = H, R ₂ = H, 23 °C (79 %)
180 : R ₁ = H, R ₂ = CN, 23 °C (77 %)
181 : R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = CN, 23 °C (79 %)
182 : R ₁ = 6-OCH ₃ , R ₂ = CN, 23 °C (97 %)
183 : R ₁ = H, R ₂ = NO ₂ , 23 °C (92 %)
184 : R ₁ = H, R ₂ = H, 70 °C (92 %)
185 : R ₁ = H, R ₂ = OCH ₃ , 70 °C (77 %)
186 : R ₁ = 6-Cl, R ₂ = H, 70 °C (79 %)
187 : R ₁ = 6-OCH ₃ , R ₂ = H, 70 °C (92 %)

Figure 59 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols tertiaires optiquement actifs par réaction de Friedel-Crafts énantiosélective en présence de dérivés de la quinine comme ligands chiraux¹⁹³

Les meilleurs rendements et excès énantiomériques (*ee*) sont obtenus avec les cétoesters porteurs de groupements fortement électro-négatifs tels que -NO₂ et CN. Dans les autres cas, la réaction peut être réalisée en milieu concentré (10 M), toujours dans Et₂O, assurant d'excellents rendements et *ee*, mais avec des temps de réactions longs. La réaction peut alors être menée en milieu concentré et à 70 °C dans le TBME (*tert*-butylméthyléther), mais avec des *ee* légèrement inférieurs. Il faut noter que la configuration absolue du carbinol correspondant n'a été déterminée que pour un seul des composés, et ce par diffraction aux RX (R = Cl, R' = 4-CN-Ph-).

Par la suite, les auteurs ont étudié dans les mêmes conditions, l'addition d'un benzaldéhyde sur un indole. Dans ce cas, la formation d'une petite quantité de PhédIM symétrique est systématiquement observée (au maximum 5 % lorsque la réaction est menée à 23°C, mais un pourcentage supérieur à une température supérieure). Seuls cinq exemples ont été testés et sont rapportés dans la figure suivante (Fig. 60).

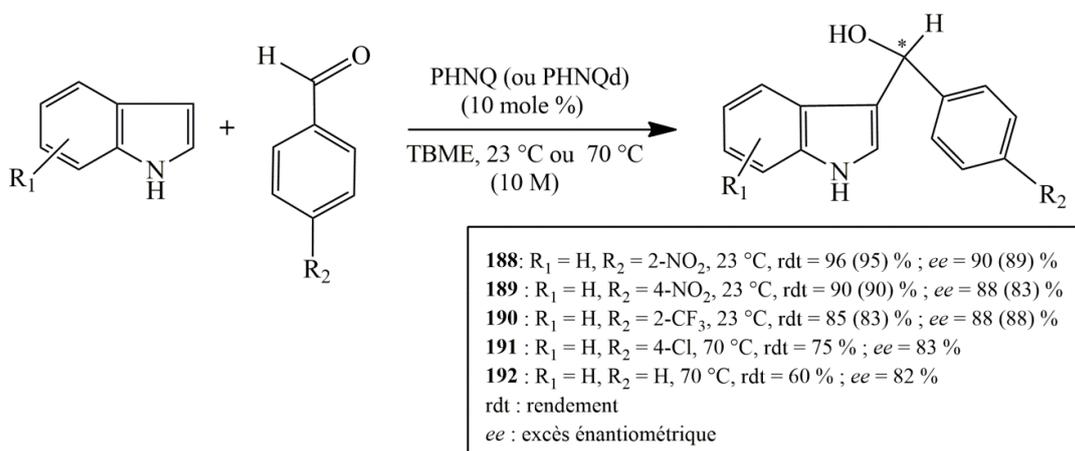


Figure 60 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols optiquement actifs par réaction de Friedel-Crafts énantiosélective en présence de dérivés de la quinone comme ligands chiraux¹⁹³

II.B.1.b- Méthodes de couplage de phényl-3-indolylméthanols avec des indoles

Les méthodes de couplages rapportées dans la littérature diffèrent généralement par leurs conditions réactionnelles notamment par la nature du catalyseur acide employé. Nous avons rassemblé ici les réactions menées sur des indolylphénylméthanols proprement dit, mais aussi sur leurs dérivés ou analogues tels que les éthers de triméthylsilyle correspondants (-OTMS) ou les (3-indolyl)méthanamines.

II.B.1.b.1- Réaction catalysée par le nitrate d'ammonium cérique (CAN)

Zeng et coll. ont mis au point des conditions réactionnelles pour la synthèse de PhédIMs non symétriques, basées sur l'utilisation de quantités catalytiques de nitrate d'ammonium cérique (CAN, *ceric ammonium nitrate*, en anglais) comme acide de Lewis (10 mole %), sous irradiation ultrasonique à la température ambiante.¹⁹⁴ Ces conditions marchent aussi bien avec des phénylindolylméthanols protégés, en l'occurrence par un groupement tosyle (Ts), qu'avec des phénylindolylméthanols non protégés (Fig. 61).

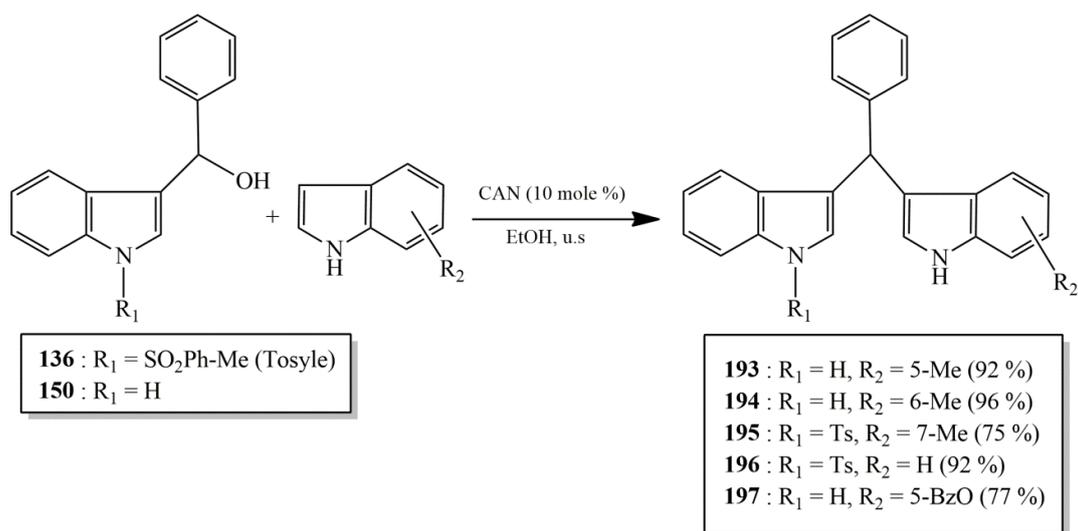


Figure 61 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par couplage de carbinols et d'indoles en présence de CAN ¹⁹⁴

II.B.1.b.2- Réaction catalysée par le réactif acide fluoroborique adsorbé sur silice (HBF₄-SiO₂)

Bandgar et coll. ont montré que l'acide de Brønsted HBF₄ adsorbé sur silice (HBF₄-SiO₂), utilisé en quantités catalytiques, était un réactif efficace pour préparer des PhédIMs symétriques et non symétriques en conditions sans solvant à la température ambiante (Fig. 62). Le protocole est considéré comme peu coûteux, car d'après les auteurs, le catalyseur peut être récupéré en fin de réaction et donc être réutilisé.¹⁹⁵ Comme dans le cas précédent du CAN, le couplage peut être réalisé à partir d'un indolylphénylcarbinol protégé ou non sur l'azote.

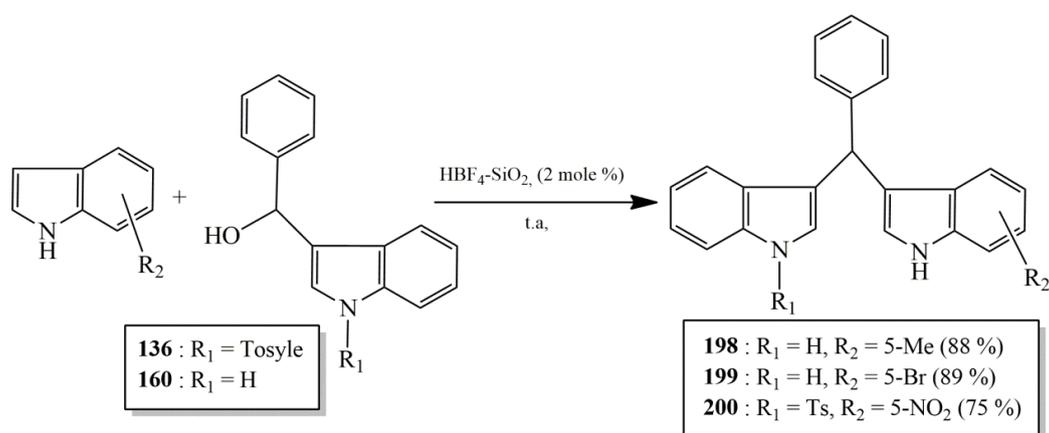


Figure 62 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par couplage de carbinols et d'indoles en présence du réactif acide HBF₄-SiO₂ ¹⁹⁵

II.B.1.b.3- Accès à des PhédIMs non symétriques asymétriques

Très peu de travaux ont été réalisés sur la synthèse de PhédIMs asymétriques (seulement deux rapportés à ce jour, en 2010 et 2014). Ceux-ci sont obtenus dans des conditions de couplage de type Friedel-Crafts, en présence d'un catalyseur acide chiral. Dans la publication de Zhuo et coll. (2014) que nous rapportons ci-dessous, la synthèse peut être réalisée à partir d'un carbinol, mais les conditions sont optimales à partir d'un éther de triméthylsilyle correspondant. Dans l'autre cas (travaux publiés en 2010), le composé de départ n'est pas un carbinol, mais un analogue, s'agissant de dérivés de type (3-indolyl)méthanamines.

- Réaction d'alkylation de Friedel-Crafts catalysée par un acide phosphorique chiral :

Sun et coll. ont rapporté une synthèse énantiosélective de PhédIMs asymétriques, par réaction d'alkylation de Friedel-Crafts énantiosélective à partir de (3-indolyl)méthanamines, en présence d'un catalyseur de type acide phosphorique chiral.¹⁹⁶ Le catalyseur de type acide de Brønsted chiral utilisé ici dérive du (*S*)-BINOL (Fig. 63).

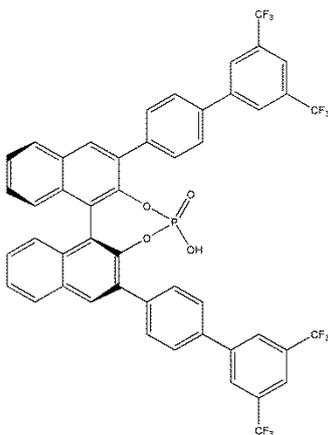
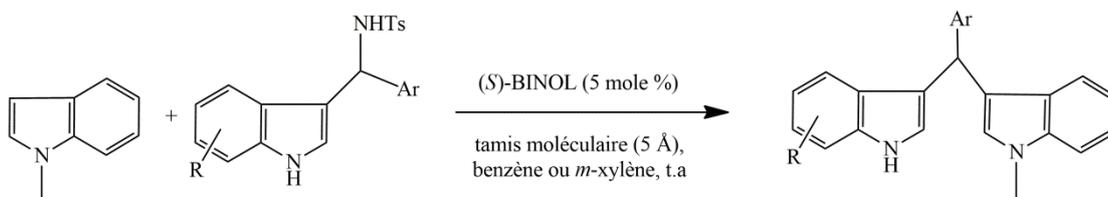


Figure 63 : Structure du catalyseur acide de Brønsted chiral utilisé pour la synthèse de PhédIMs asymétriques¹⁹⁶

L'alkylation énantiosélective du *N*-méthylindole est réalisée à température ambiante en présence du dérivé *N*-tosylé d'une (3-indolyl)méthanamine et de l'acide phosphorique chiral (à 5 mole %). De très bons rendements de couplage sont obtenus avec des groupements électrodonneurs positionnés sur l'indole ou sur le noyau phényle. Toutefois, les excès énantiomériques (*ee*) sont dans tous les cas assez modestes (en particulier en comparaison avec les résultats rapportés dans le paragraphe suivant) et la portée de la réaction n'a pas été étudiée avec d'autres indoles que le *N*-méthylindole (Fig. 64). Le mécanisme de la réaction, non précisé dans cette publication, sera également évoqué dans le paragraphe suivant.



201	: Ar = Ph, R = H, benzène, 10 h, rdt = 80 %, ee = 68 %
202	: Ar = <i>p</i> -MeOPh, R = H, benzène, 4 h, rdt = 95 %, ee = 61 %
203	: Ar = <i>p</i> -MePh, R = H, benzène, 4 h, rdt = 86 %, ee = 53 %
204	: Ar = <i>p</i> -BrPh, R = H, <i>m</i> -xylène, 52 h, rdt = 64 %, ee = 61 %
205	: Ar = Ph, R = 5-MeO, benzène, 8 h, rdt = 96 %, ee = 50 %
206	: Ar = Ph, R = 5-Me, benzène, 11 h, rdt = 95 %, ee = 59 %
207	: Ar = Ph, R = 5-Br, <i>m</i> -xylène, 4 h, rdt = 62 %, ee = 56 %
208	: Ar = Ph, R = 5-F, benzène, 8 h, rdt = 90 %, ee = 45 %
209	: Ar = Ph, R = 6-BnO, benzène, 14 h, rdt = 76 %, ee = 48 %
210	: Ar = Ph, R = 6-Br, <i>m</i> -xylène, 46 h, rdt = 61 %, ee = 61 %
	rdt : rendement
	ee : excès énantiométrique

Figure 64 : Synthèse énantiosélective de PhéDIMs par alkylation asymétrique en présence d'un acide phosphorique chiral. ¹⁹⁶

- Réaction d'alkylation de Friedel-Crafts catalysée par un acide imidodiphosphorique chiral :

Dans la continuité des travaux rapportés dans le paragraphe précédent, Zhuo et coll. ont récemment (2014) ¹⁸⁹ montré la supériorité d'un catalyseur acide chiral de type imidodiphosphorique pour l'accès à des PhéDIMs asymétriques par réaction d'alkylation de Friedel-Crafts énantiosélective. Le catalyseur utilisé dans cette étude a été préparé à partir de deux unités de (*R*)-BINOL et sa structure est rapportée ci-dessous (Fig. 65).

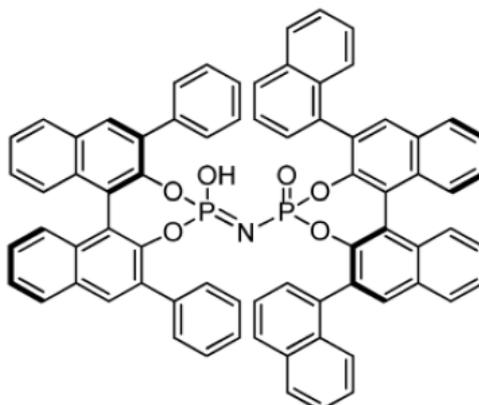


Figure 65 : Structure du catalyseur de type acide imidodiphosphorique chiral (AIPC) ¹⁸⁹

Même si la réaction d'alkylation peut être réalisée à partir d'un carbinol, les auteurs ont montré que de meilleurs rendements et *ee* étaient obtenus à partir des éthers de triméthylsilyle correspondants (ces composés seraient en l'occurrence plus stables ; leur synthèse a déjà été

évoquée dans le paragraphe **II.B.1.a.2**, Fig. 54). Dans les conditions optimisées, le couplage entre un *N*-méthylindole et l'éther silylé d'un phénylindolylméthanol est réalisé à 15°C en présence du catalyseur acide chiral (à la concentration de 1 mole %). Par rapport aux conditions développées par Sun et coll.¹⁹⁶ les rendements et *ee* s'avèrent bien supérieurs et surtout, la réaction a été ici testée pour divers schémas de substitution des noyaux aromatiques, à la fois sur l'indole et sur l'éther silylé (seuls des exemples significatifs sont présentés dans la figure 66). Toutefois, là encore, la portée de la réaction semble limitée au couplage des seuls *N*-méthylindoles.

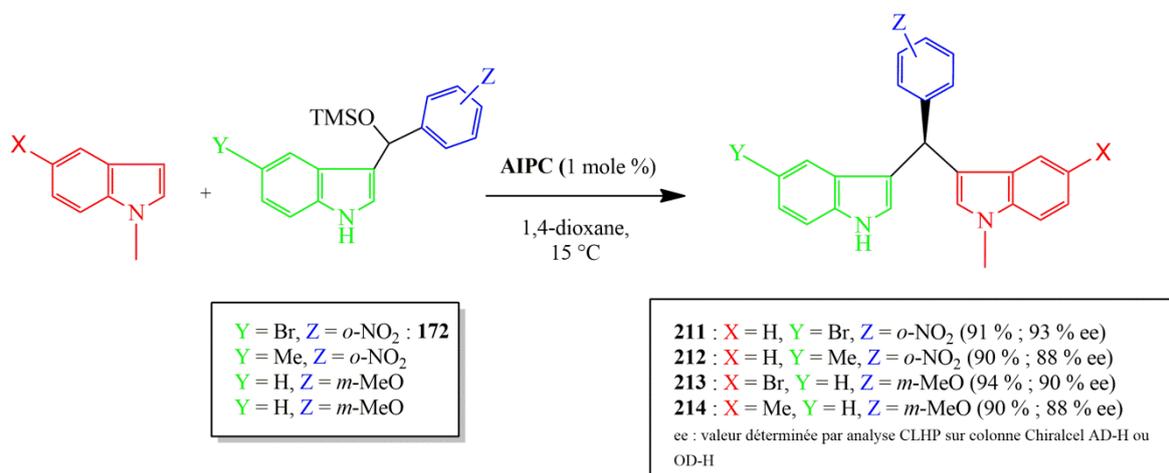


Figure 66 : Synthèse de PhÉDIMs asymétriques à partir de 3-(1-silyloxyalkyl)indoles et d'indoles, en présence d'un acide imidodiphosphorique chiral¹⁸⁹

Il faut noter que la configuration absolue du composé **212** a été déterminée par diffraction aux RX. Du point de vue du mécanisme, les auteurs proposent que le catalyseur acide favorise la « déshydratation » du 3-(1-silyloxyalkyl)indole et qu'il se forme une paire d'ions chirale stable entre le catalyseur et le cation de type indoléninium formé. La réaction avec le *N*-méthylindole peut donc procéder de manière stéréosélective (Fig. 67).

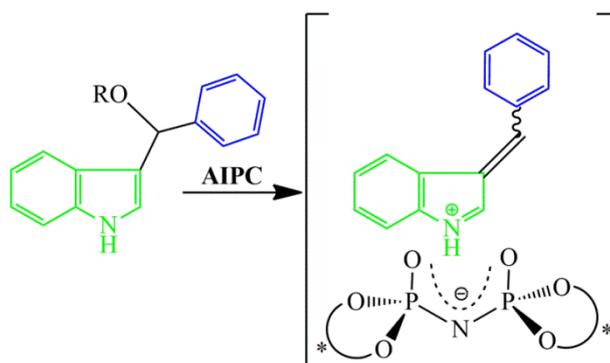


Figure 67 : Hypothèse de la formation d'une paire d'ions chirale.¹⁸⁹

II.B.2- Synthèse à partir d'acides indolyméthyl barbituriques

Une méthode très simple de synthèse de PhédIMs non symétriques a été développée par Deb et Bhuyan ^{197,198} via une réaction d'élimination-addition à partir d'un dérivé de type acide (3-indolyl)(phényl)méthyl barbiturique. Ce composé intermédiaire a été préparé en faisant réagir un mélange de quantités équimolaires d'un indole, de benzaldéhyde et d'acide *N,N*-diméthylbarbiturique en l'absence de solvant, par chauffage à 85 ou 95 °C (Fig. 68, étape [a]). Il faut noter qu'en plus du produit intermédiaire obtenu, il se forme un produit secondaire qui est un PhédIM symétrique. Des quantités équimolaires de l'intermédiaire et d'un indole sont chauffées à reflux dans un mélange éthanol-eau pour fournir le PhédIM non symétrique correspondant avec libération de l'acide *N,N*-diméthylbarbiturique (Fig. 68, étape [b]).

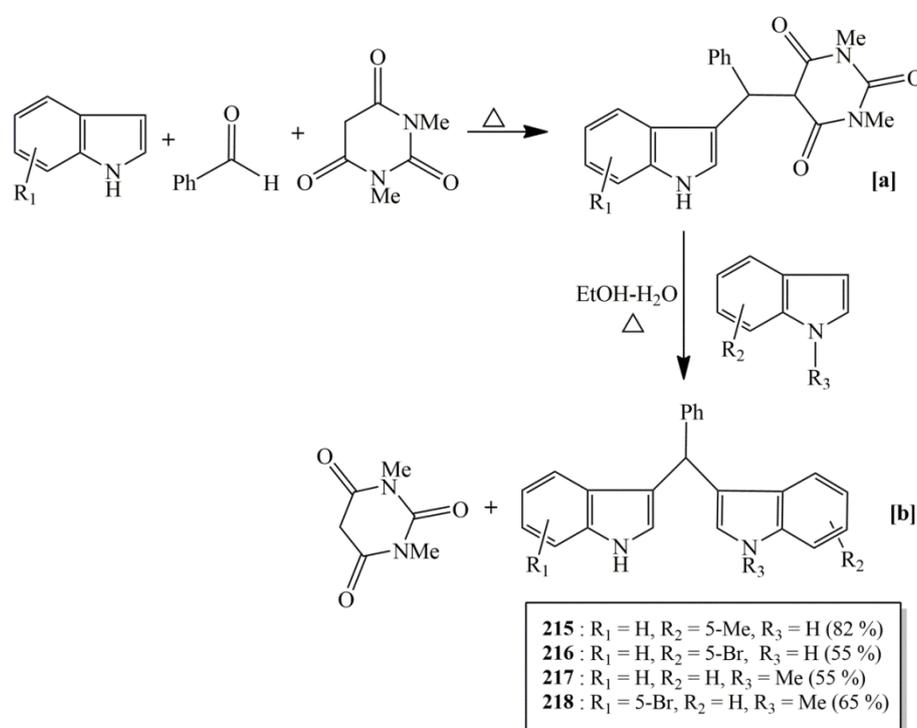


Figure 68 : Formation de PhédIMs non symétriques à partir de dérivés d'acide *N,N*-diméthylbarbiturique utilisés comme précurseurs ^{197,198}

II.B.3- Synthèse impliquant des dérivés indolyméthylés de l'acide de Meldrum

Les dérivés (3-indolyl)(phényl)méthylés de l'acide de Meldrum, dont la préparation et l'application par l'équipe d'Armstrong à la synthèse de PhédIMs symétriques ont déjà été présentées précédemment dans cette thèse (voir paragraphe II.A.3), ont également été exploités pour accéder à des PhédIMs non symétriques (Fig. 69). L'intermédiaire dérivé de l'acide de Meldrum subit une attaque nucléophile d'un *N*-méthylindole en présence du triflate de scandium

Sc(OTf)₃ comme acide de Lewis, pour former avec un rendement modeste le PhéDIM non symétrique correspondant ¹⁵⁷.

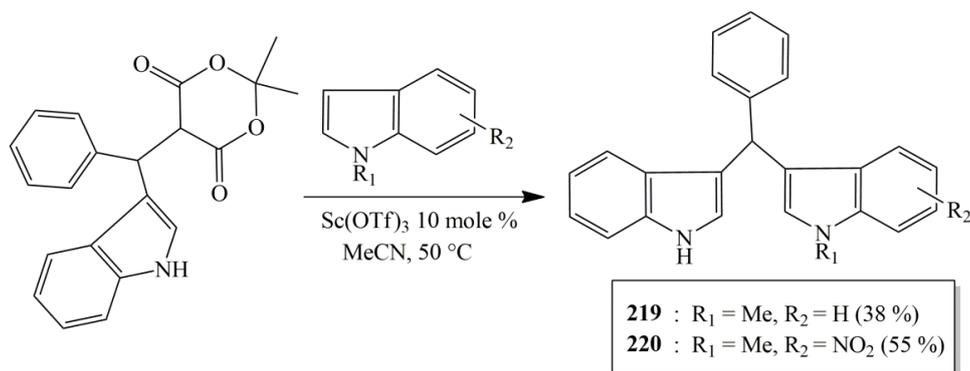


Figure 69 : Formation de PhéDIMs non symétriques à partir d'intermédiaires dérivés de l'acide de Meldrum ¹⁵⁷

II.B.4- Synthèse impliquant les indolylphthalides substitués

En réalisant la synthèse du 3-indolylphthalide **221** à partir de l'indole et de l'acide 2-formylbenzoïque en présence de InBr₃ comme acide de Lewis, Lin et coll. ont observé que le PhéDIM symétrique correspondant était également formé (Fig. 70) lorsqu'un excès d'indole (5 équivalents) était utilisé. ¹⁹⁹ En effet, une seconde réaction d'addition électrophile peut se produire entre le 3-indolylphthalide **221** formé et une autre unité d'indole présente dans le milieu réactionnel. Il faut noter que la préparation du composé **221** avait été initialement décrite par Noland et Johnson en 1960 ²⁰⁰.

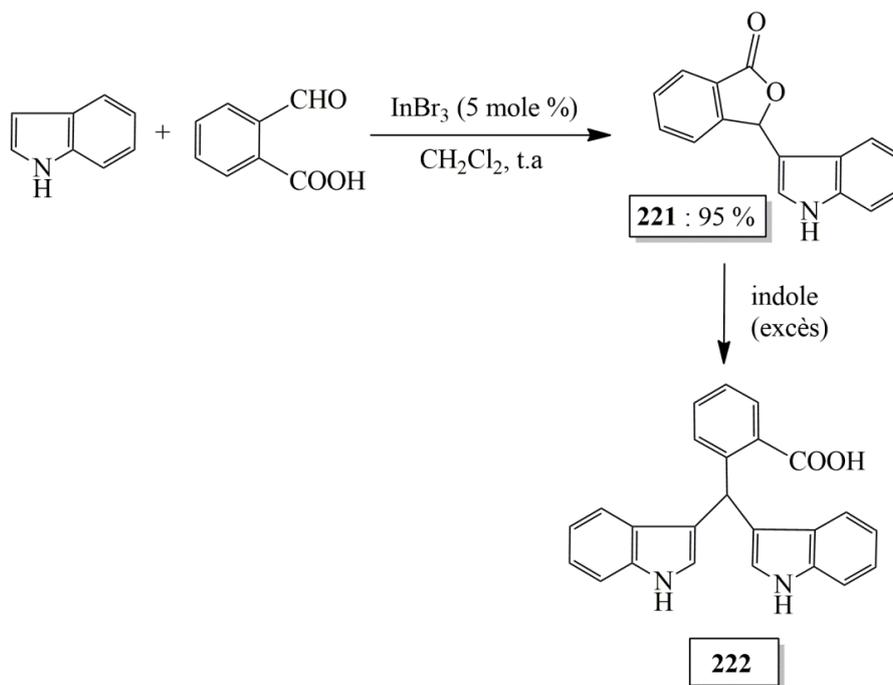


Figure 70 : Synthèse du 3-indolylphthalide 176 à partir de l'indole et de l'acide 2-formylbenzoïque ¹⁹⁹

À partir de ces observations, les auteurs ont exploité le potentiel synthétique des 3-indolylphthalides pour accéder à une série de PhédIMs non symétriques, par couplage de ces composés avec un indole en milieu aqueux en présence de InBr_3 . Les rendements sont tous supérieurs à 70 %, mais la portée de cette réaction est bien-sûr limitée à des dérivés substitués en position 2 du noyau phényle par un groupement acide carboxylique (Fig. 71).

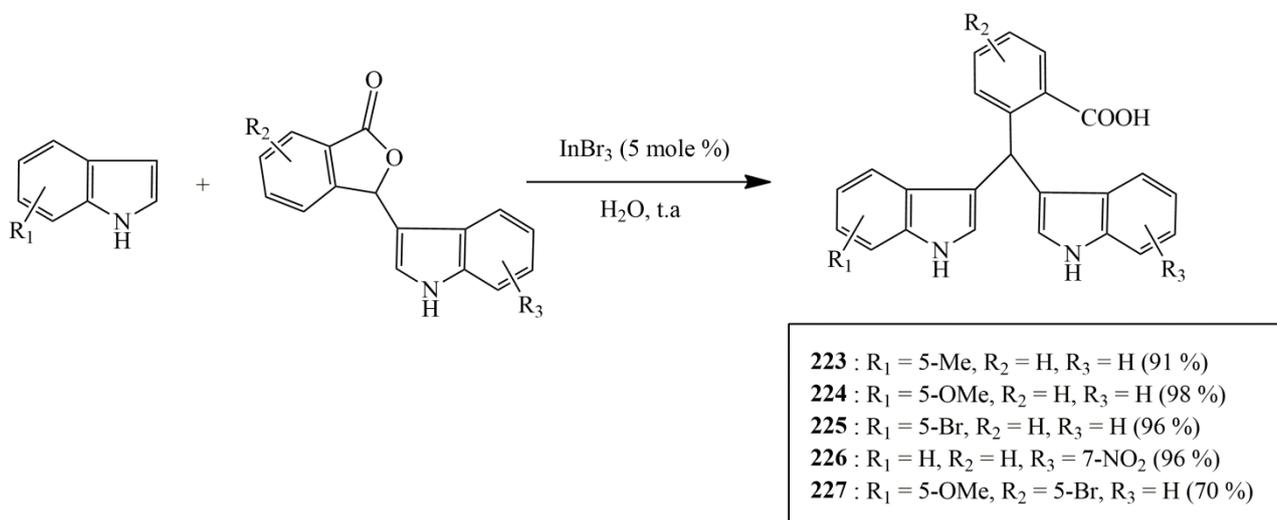


Figure 71 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par réaction d'addition d'indole sur un 3-indolylphthalide¹⁹⁹

III- Travaux personnels

III.A. Introduction : historique et objectifs

Le sujet de cette thèse, qui porte d'une part sur l'étude structurale approfondie des produits d'oxydation des PhédIMs (appelés PhédIMOX), et d'autre part, sur l'étude du mécanisme d'action pro-apoptotique de ces composés en rapport avec la protéine NR4A1, s'inscrit dans la continuité de précédents travaux réalisés au sein du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Paris.

En effet, c'est dans le contexte de travaux réalisés sur la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues indoliques de la combrétastatine A4 (un cis-stilbène d'origine naturelle aux propriétés antivasculaires par inhibition de la polymérisation de la tubuline du cytosquelette des cellules endothéliales des vaisseaux associés aux tumeurs), qu'ont été synthétisés pour la première fois au laboratoire les PhédIMs **230** et **231**¹⁷¹.

Ces composés ont alors été obtenus comme produits non souhaités (sous-produits) de la réaction de déprotection du groupement N-sulfonyle par KOH des composés respectifs **139** et **140** (Fig. 72). Ainsi, en plus de la déprotection attendue, il se produit une réaction de type rétro-

aldolisation par déprotonation de la fonction carbinol, ce qui entraîne la libération du 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et de l'1H-indole (soit du 6-méthoxy-1H-indole). La purification des produits réactionnels sur colonne de silice conduit in situ à la formation de chacun des PhédIMs symétriques, par condensation de l'unité indolique libérée avec le carbinol déprotégé, et catalysée par la silice.

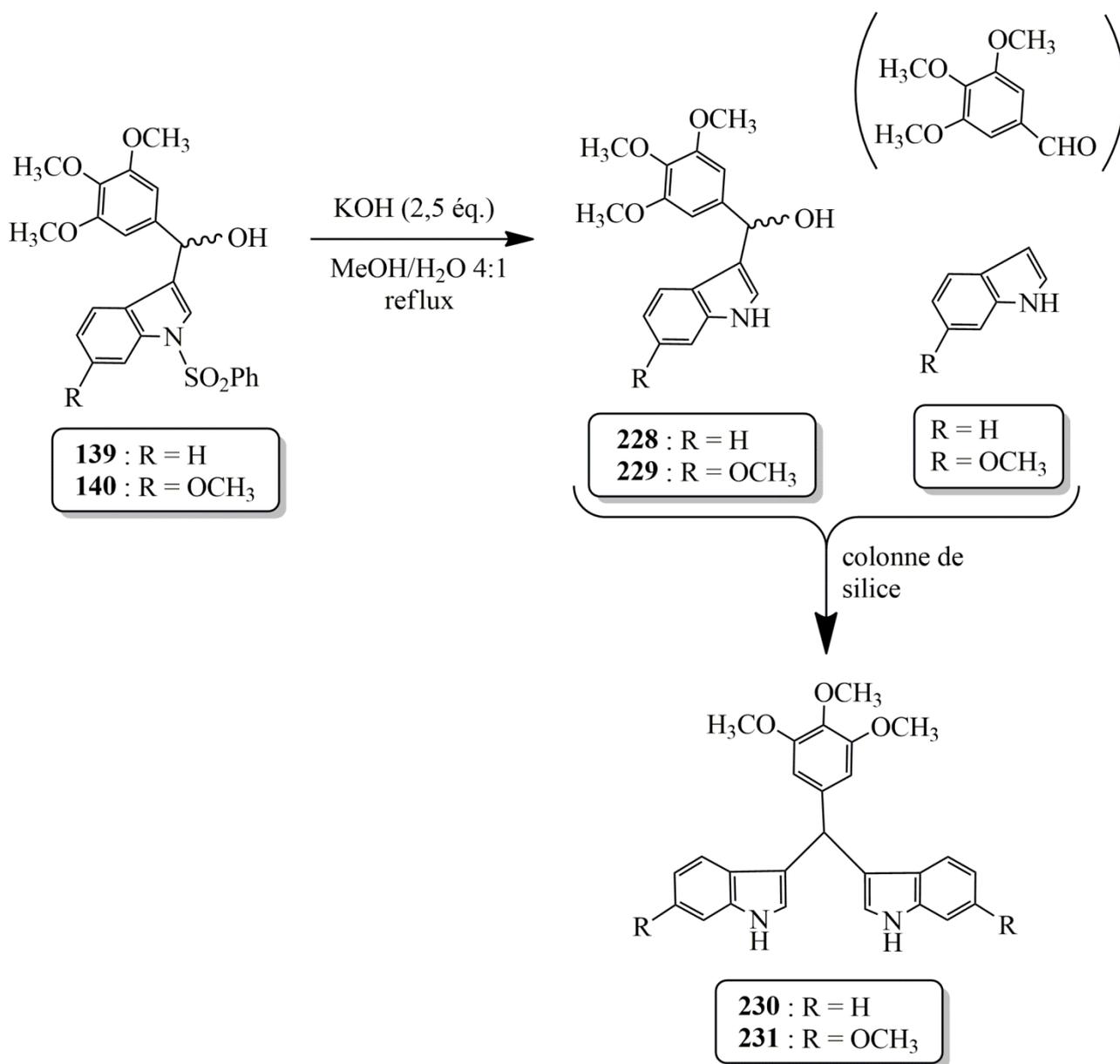


Figure 72 : Obtention inattendue des PhédIMs 1230 et 231 par tentative de déprotection de carbinols et purification sur gel de silice¹⁷¹

Une évaluation biologique de ces composés, qui sera rapportée avec plus de précisions dans le chapitre 3 de cette thèse, a montré que le composé **231** en particulier, était cytotoxique à une concentration submicromolaire sur des cellules de la lignée PC-3 (cellules humaines d'adénocarcinome de la prostate non hormono-dépendantes). Parallèlement à cette activité, une

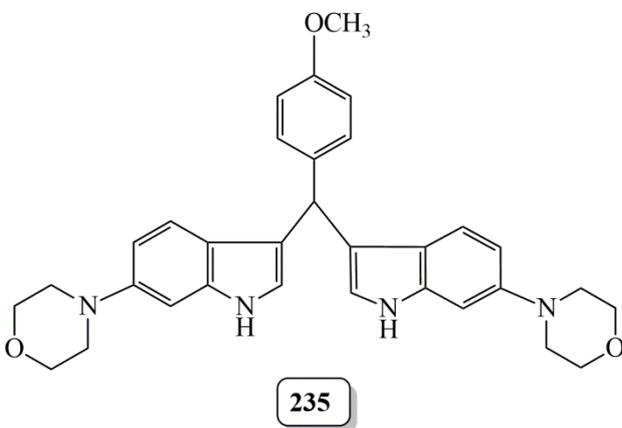
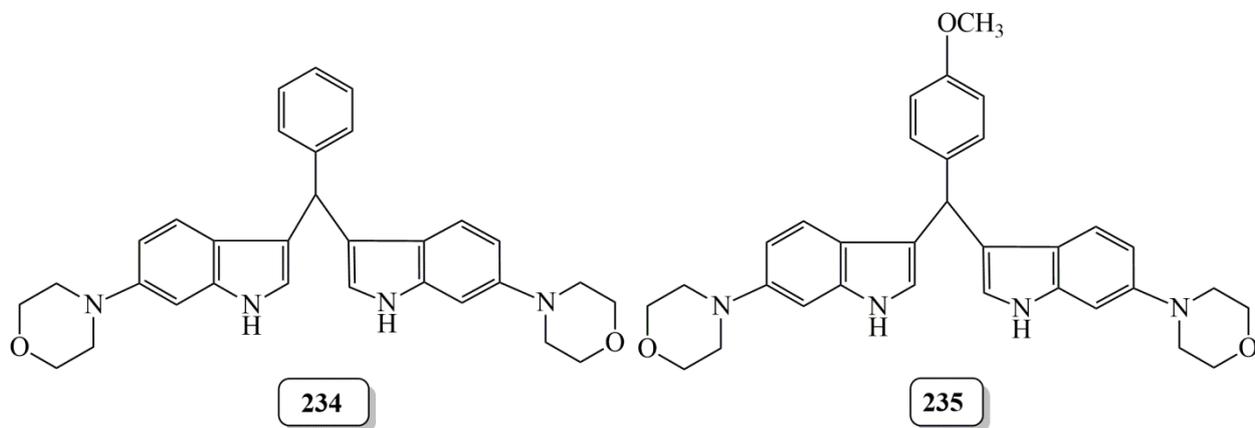
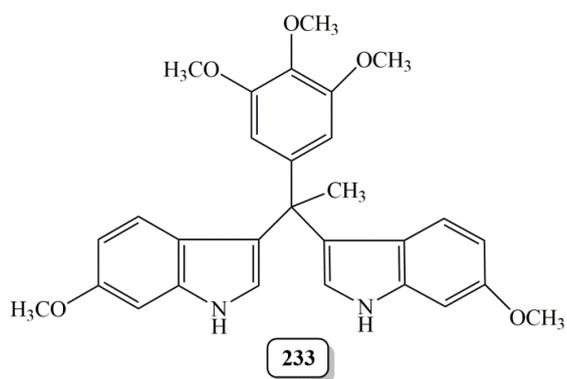
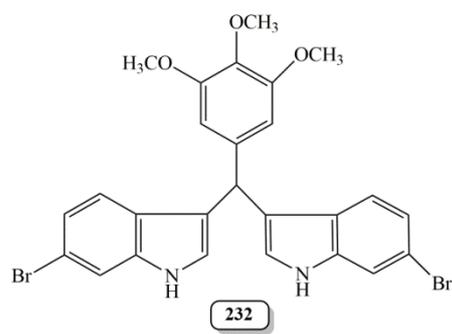
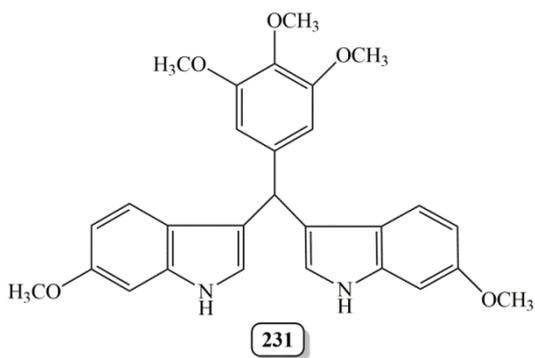
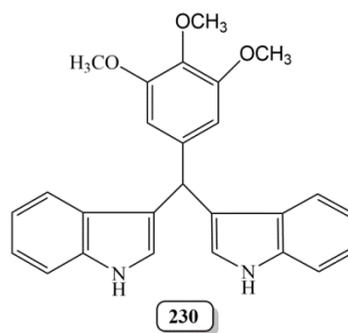
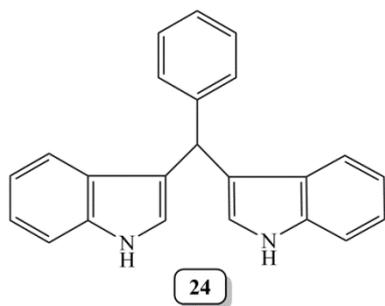
augmentation des niveaux d'expression de la protéine pro-apoptotique caspase-3 ont été constatés par *western-blot*. Par ailleurs, ce composé ne possède pas de propriétés inhibitrices de la polymérisation de la tubuline observées avec des composés indoliques monomériques de type 3-aroylindoles portant les motifs structuraux 3,4,5-triméthoxyphényle et 6-méthoxy-1*H*-indole ¹⁶⁷.

Comme nous l'avons déjà rapporté dans cette thèse, des PhédIMS, généralement simplement substitués, ont fait l'objet d'études pour des activités biologiques précises, parfois en rapport avec des effets pro-apoptotiques et en relation avec la protéine NR4A1. Les activités rapportées sont toutefois le plus souvent observées à des concentrations micromolaires. Par ailleurs un ligand connu de NR4A1, le TMPA ⁹⁹ (voir chapitre 3) possède une certaine analogie structurale avec le composé **231**, tous les deux disposant d'un noyau 3,4,5-triméthoxyphényle. La série de composés que nous avons préparée cible donc des analogues de **231**, simples ou modulés sur par la présence de groupement méthoxyle ou l'introduction de la morpholine en position 6 de l'indole (pour avoir des composés plus hydrophiles et donc plus solubles) ; le composé **24** était déjà décrit comme un ligand de NR4A1 ¹⁰³ et il nous semblait donc important de l'avoir dans la série pour « étalonner les résultats ».

Il faut noter que le composé **233** a été précédemment préparé au laboratoire dans le cadre du travail de thèse d'Université de M. A. Marelli ²⁰¹. Ce composé, analogue du composé **231** s'est avéré, de manière similaire à ce dernier, posséder des activités cytotoxiques sur des cellules humaines du cancer de la prostate (LnCaP) à des concentrations submicromolaires, et induire l'apoptose.

Sur la base de ces considérations, il nous a semblé intéressant d'étudier plus en avant les relations structure-activité pro-apoptotiques des PhédIMS, ainsi que leur mécanisme d'action en rapport avec la protéine NR4A1. L'étude du mécanisme d'action pro-apoptotique en rapport avec la protéine NR4A1 d'une petite bibliothèque de PhédIMS constituera l'essentiel des travaux personnels du chapitre 3. La synthèse des PhédIMS considérés comme des ligands potentiels de NR4A1 sera elle présentée dans le présent chapitre 2.

Les composés suivants ont été (re)synthétisés (tous sont des PhédIMS symétriques ; les composés **234** – **239** sont nouveaux) en vue de leur évaluation comme ligands potentiels de NR4A1 et comme composés à activité pro-apoptotique potentielle (Fig. 73) :



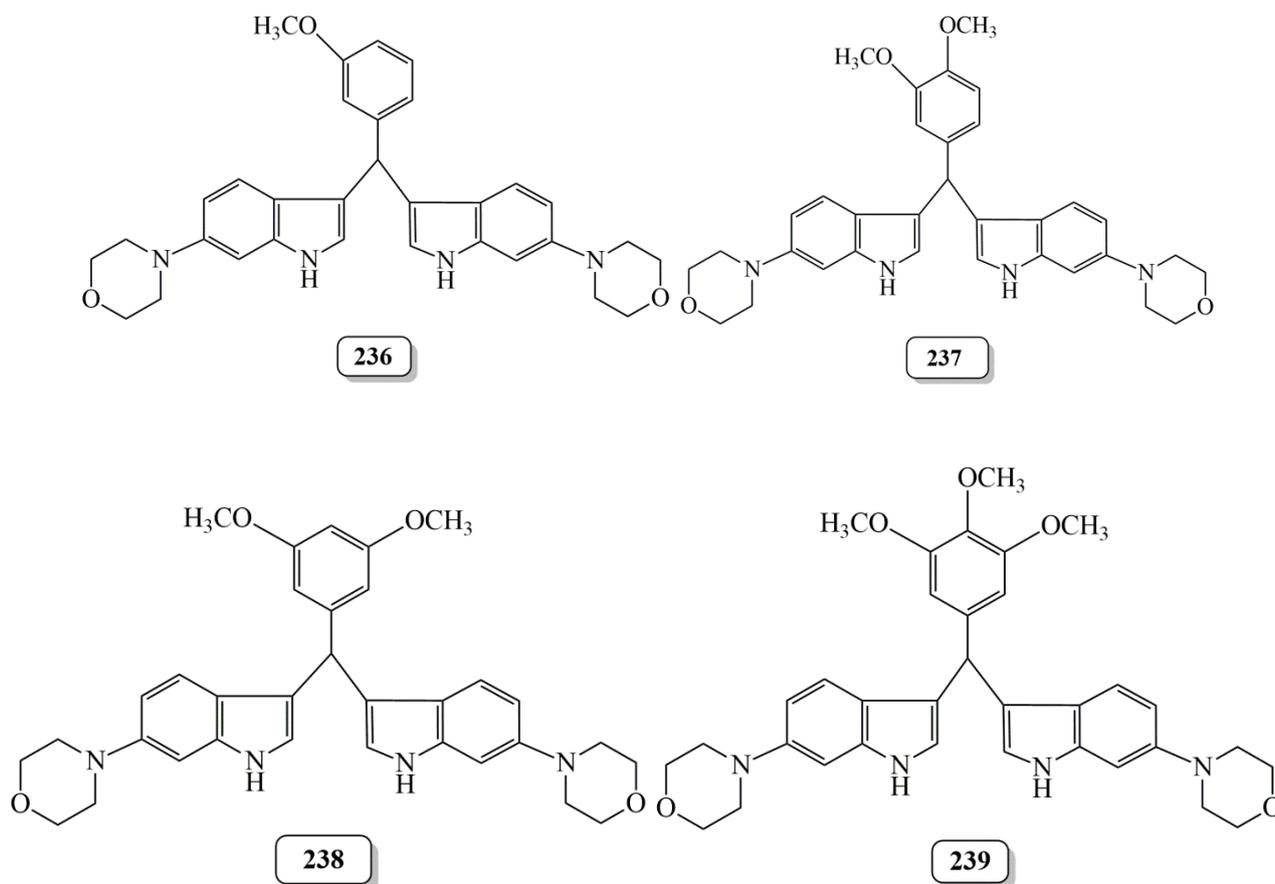
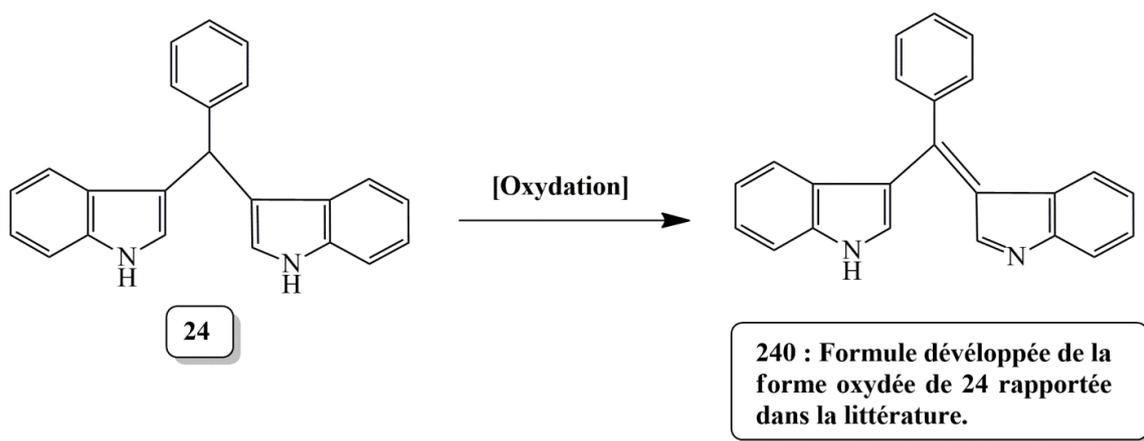


Figure 73 : Liste des Phédims préparés en vue de leur évaluation comme ligands potentiels de la protéine NR4A1 et comme composés à potentialité pro-apoptotique.

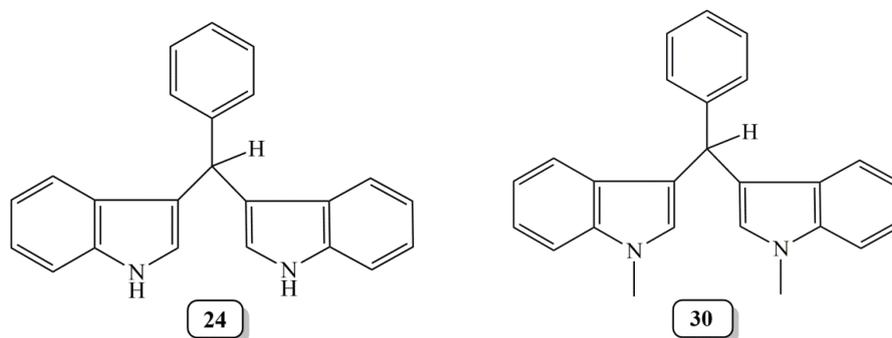
Nous présenterons également dans ce chapitre les résultats concernant l'étude structurale des produits d'oxydation des Phédims, appelés ici PhédimOx.

En effet, comme nous le détaillerons par la suite, nous avons constaté que les Phédims rapportés dans la littérature étaient toujours décrits comme des composés colorés (rose, marron... en fonction des schémas de substitution) contrairement à ce que leur structure laisse supposer (le carbone central C-1'' étant de nature sp^3 , les électrons π de chaque noyau (unités indoliques et phényle) ne sont pas délocalisés vers un autre noyau). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il se produisait une oxydation spontanée partielle des Phédims. Contrairement aux Phédims pour lesquels la littérature est abondante, les PhédimOx ont fait l'objet de peu de travaux et comme nous le verrons plus tard dans ce document, certaines données rapportées se sont avérées imprécises voire incorrectes.



Nous nous sommes donc donnés comme objectif de clarifier les données de la littérature et de déterminer sans ambiguïté la structure (en solution voire à l'état solide) des PhéDIMOX afin de pouvoir étudier plus tard leurs activités biologiques potentielles et définir des relations structure-activité dans cette série. Notons également que l'étude de ces composés intéresse également celle des PhéDIMs, puisque leur stabilité relative peut avoir une influence sur leurs activités biologiques et l'interprétation des résultats.

Ces travaux sont basés sur l'application de techniques spectrales (RMN, spectrométrie de masse...) appliquées à des produits isolés ou à des mélanges réactionnels (réaction d'oxydation « en tube »). Le PhéDIM-Ox non substitué **240**, issu par principe de l'oxydation du PhéDIM **24**, a été choisi comme modèle pour cette étude, qui a également nécessité de préparer les précurseurs **241** (PhéDIM non symétrique) et **30** (PhéDIM symétrique) suivants, afin qu'ils soient soumis à une réaction d'oxydation (Fig. 74) :



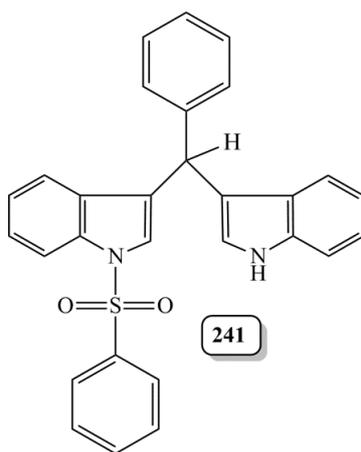
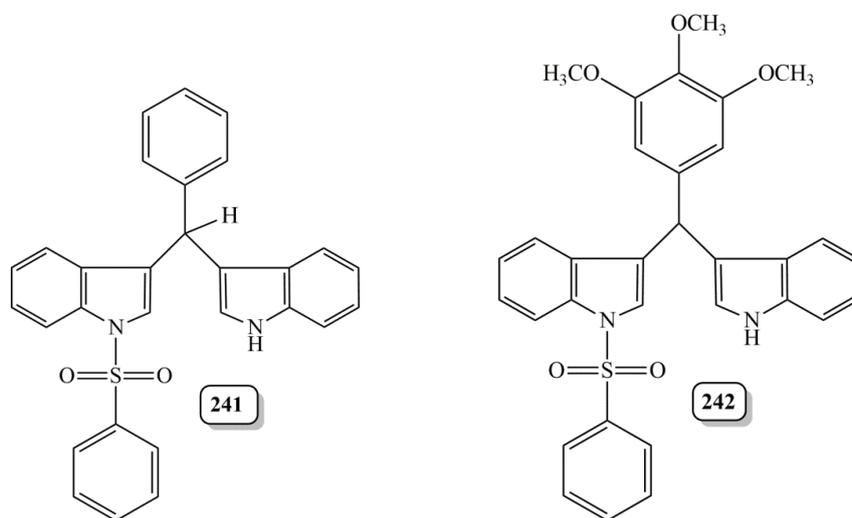


Figure 74 : Les PhéDIMs symétriques (24 et 30) et non symétrique (241) utilisés dans l'étude structurale des PhéDIMOx.

Le composé **241** est un nouveau PhéDIM non symétrique qui a été obtenu par couplage d'un carbinol et de l'*1H*-indole. Pour cela, des conditions de couplage originales ont été mises au point pour une réaction type et leur efficacité testée en faisant varier la nature de l'indole introduit lors du couplage. La série de composés suivants a ainsi pu être préparée (Fig. 75) :



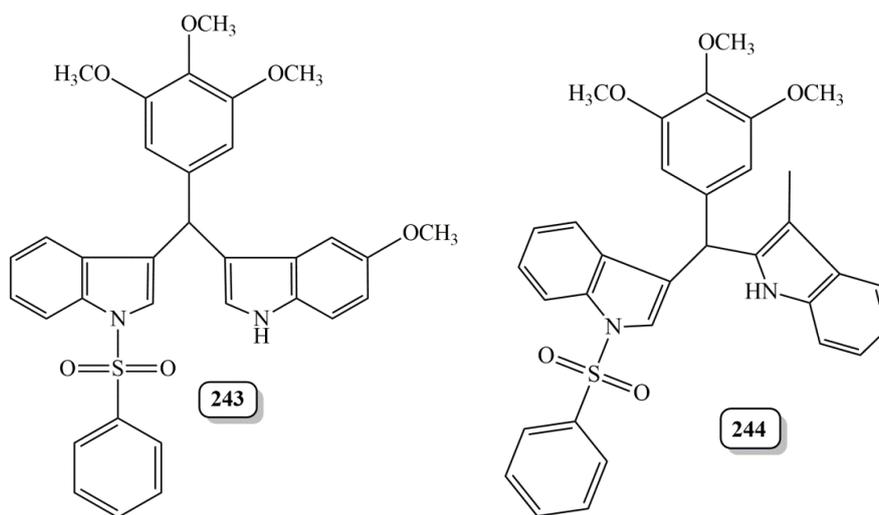


Figure 75 : Liste des PhédIMs non symétriques préparés.

En conclusion, nous présenterons dans une première partie la synthèse des différents PhédIMs préparés soit en vue de leur évaluation à la fois comme ligands potentiels de NR4A1 et comme composés à potentialité pro-apoptotiques et/ou en vue de l'étude structurale des PhédIMOX, qui sera quant à elle rapportée dans son intégralité dans la seconde partie de ce chapitre.

III.B- Synthèse des PhédIMs symétriques

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à la préparation des PhédIMs symétriques de formule générale suivante (Fig. 76).

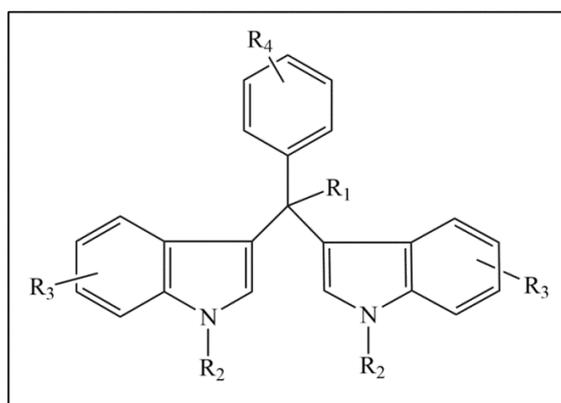


Figure 76 : Formule générale des PhédIMs symétriques synthétisés.

Parmi les voies de synthèse possibles évoquées dans la partie bibliographique de ce chapitre, la formation de ces PhédIMs symétriques a été envisagée par substitution électrophile aromatique

(SEAr) de l'indole en présence d'un carbonyle et d'un catalyseur acide. Il s'agit en effet de la méthode la plus couramment utilisée dans la littérature pour accéder à des PhédIMs symétriques. Concernant le choix des conditions de couplage, en particulier la nature du catalyseur acide utilisé (parmi les très nombreuses possibilités rapportées dans la littérature), celui-ci a été orienté sur la base des critères suivants : simplicité des conditions employées, disponibilité des réactifs, compatibilité avec certains substituants (exemple des méthoxyles pouvant être déprotégés en phénols par certains acides de Lewis halogénés), mais aussi rendements décrits. Certaines conditions s'avèrent par exemple plus efficaces avec des carbonyles ou plus rarement décrit, des indoles peu réactifs (exemple du couplage d'un indole avec une acétophénone comme carbonyle). D'une manière générale, malgré les très nombreuses publications décrivant des conditions de couplage, la plupart ne concernent que des carbonyles et indoles peu et simplement substitués et il a donc été nécessaire d'adapter les conditions retenues aux molécules ciblées.

À partir de ces considérations, nous pouvons distinguer 3 séries différentes :

- **Série 1 : PhédIMs symétriques obtenus par couplage d'un indole et d'un benzaldéhyde en présence de Montmorillonite K10**, et correspondant aux molécules : **24** ($R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$) ; **30** ($R_1 = R_3 = R_4 = H, R_2 = CH_3$) ; **230** ($R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = 3,4,5-(OCH_3)_3$), **231** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-OCH_3, R_4 = 3,4,5-(OCH_3)_3$) et **232** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-Br, R_4 = 3,4,5-(OCH_3)_3$).

- **Série 2 : PhédIMs symétriques dont l'unité indolique est substituée par une morpholine (couplage en présence de $BF_3 \cdot OEt_2$)**, et qui correspondent aux molécules : **234** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = H$) ; **235** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = 4-OCH_3$) ; **236** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = 3-OCH_3$) ; **237** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = 3,4-(OCH_3)_2$) ; **238** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = 3,5-(OCH_3)_2$) et **239** ($R_1 = R_2 = H, R_3 = 6-(N\text{-morpholino}), R_4 = 3,4,5-(OCH_3)_3$).

- **Série 3 : PhédIMs symétriques résultant du couplage d'un indole avec une acétophénone**, et correspondant aux molécules : **90** ($R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = R_4 = H$) et **233** ($R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = 6-OCH_3, R_4 = 3,4,5-(OCH_3)_3$).

III.B.1- Synthèse des PhédIMs symétriques de la Série 1

Pour la préparation des composés de cette série, nous avons choisi d'utiliser les conditions développées par Chakrabarty et coll.¹³⁶, en raison de leur simplicité de mise en œuvre et leur robustesse. Ces conditions, précédemment décrites dans le paragraphe **II.A.1.a.2** (cf p 44), consistent pour rappel, à adsorber sur de la Montmorillonite K10 le carbonyle et l'indole (2 g de MK10/ mmole d'indole) préalablement mis en solution dans du CH_2Cl_2 , le solvant étant ensuite

éaporé sous vide. Il s'agit d'un réactif peu couteux, mais qui doit être préalablement activé par chauffage une nuit à l'étuve à 100 °C. La réaction se produit à température ambiante, et donc dans des conditions sans solvant. Le PhéDIM formé est enfin isolé dans tous les cas par chromatographie sur colonne de silice.

Dans ces conditions, le PhéDIM non substitué **24** est obtenu avec un rendement de 88 %, la réaction étant menée à l'échelle de la centaine de mg (Fig. 77).

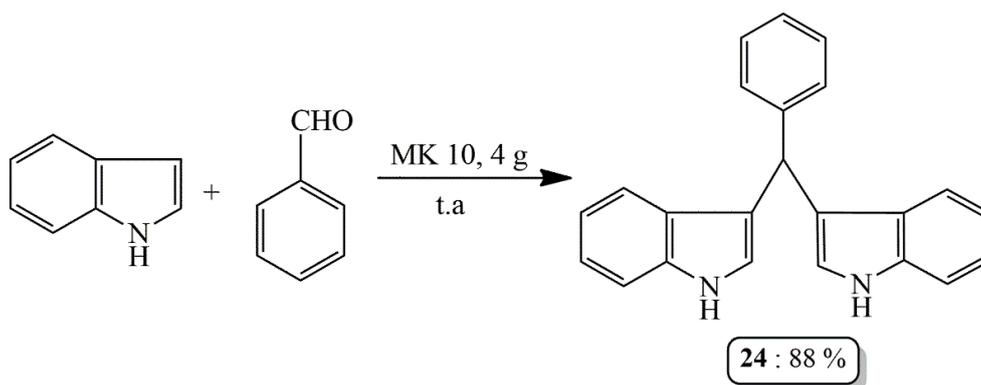


Figure 77 : Composé 24 obtenu par couplage d'indole et de benzaldéhyde en présence de MK10

Les autres composés de cette série ont pu être synthétisés dans les mêmes conditions avec les rendements respectifs précisés ci-après (Fig. 78) :

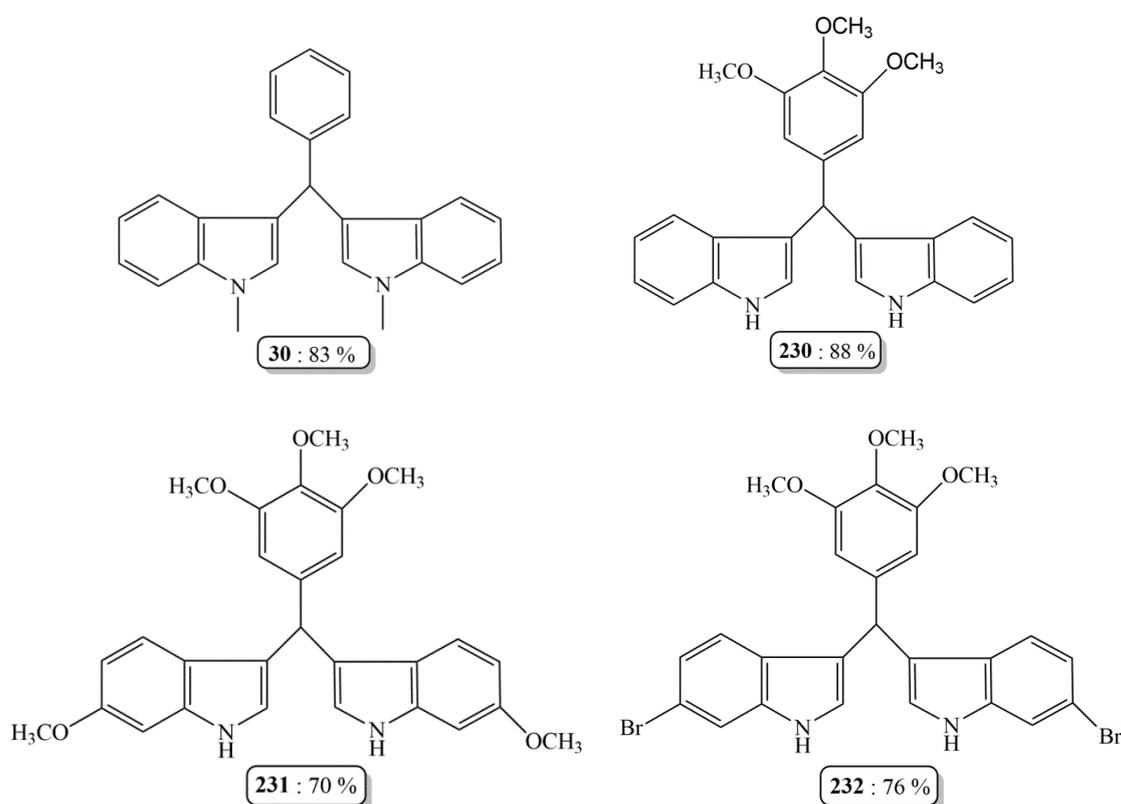


Figure 78 : Liste de composés synthétisés par la méthode de Chakrabarty et coll ¹³⁶.

On constate donc que la substitution du benzaldéhyde par des groupements méthoxyles électro-donneurs n'affecte pas le rendement de la réaction. Au contraire, la substitution de l'indole en position 6 par un brome et surtout un méthoxy entraîne une diminution du rendement de la réaction de couplage. Même si dans le cas présent d'une réaction avec un benzaldéhyde, les rendements restent tout à fait acceptables, nous verrons par la suite que la Montmorillonite K10 est un réactif peu efficace voire inefficace pour les cas de condensations indole-acétophénone et benzaldéhyde-indole substitué en 6 par un autre groupement fortement électro-donneur tel que la morpholine.

Cette faible réactivité des indoles substitués en 6 par un groupement électro-donneur pourrait s'expliquer simplement par des effets électroniques défavorables (Fig. 78). En effet, alors que dans la partie pyrrolique de la molécule, la densité électronique est plus importante sur l'azote et la position C-3 par délocalisation des électrons du doublet libre de l'azote, au contraire les effets mésomères donneurs (M+) du groupement méthoxy favorisent une densité électronique plus élevée sur les positions C3a et C-2 de ce même noyau. Il en résulte probablement des interactions répulsives entre charges partielles positionnées en C3a/C3 et C2/N, diminuant ainsi la réactivité de l'indole vis-à-vis des SEAr.

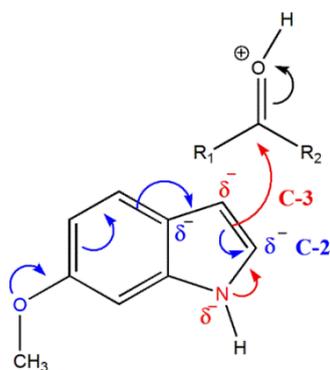


Figure 79 : Hypothèse d'interaction électronique défavorables pour expliquer la faible réactivité du 6-méthoxy-1H-indole vis-à-vis des SEAr.

Enfin, il est possible de préparer le composé **30** à partir du *N*-méthyl-1*H*-indole avec un rendement de 83 %. Au contraire, des essais de couplage menés avec le *N*-sulfonyl-1*H*-indole ont tous échoué (récupération complète de l'indole de départ), mettant en évidence que la substitution du proton indolique (NH) par le groupement *N*-sulfonyl diminuait la réactivité de la molécule, la rendant même inerte dans les conditions présentes (c'est-à-dire en présence de Montmorillonite K10) (Fig. 80).

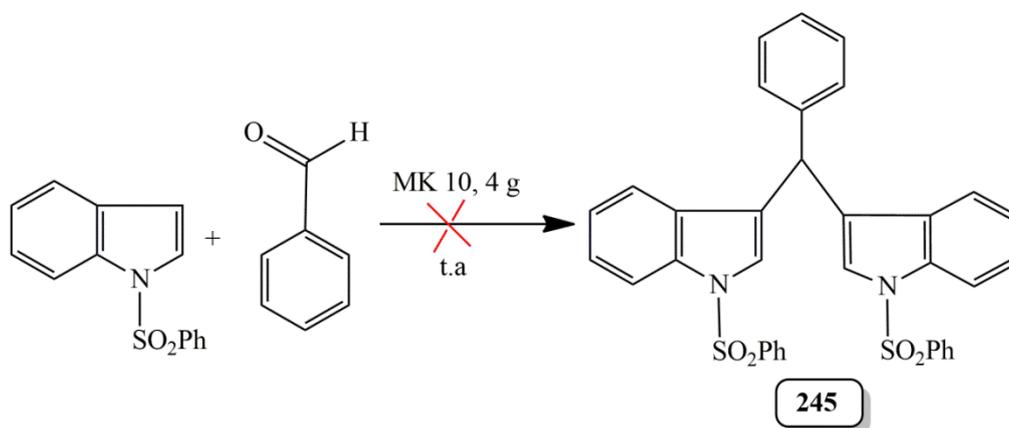
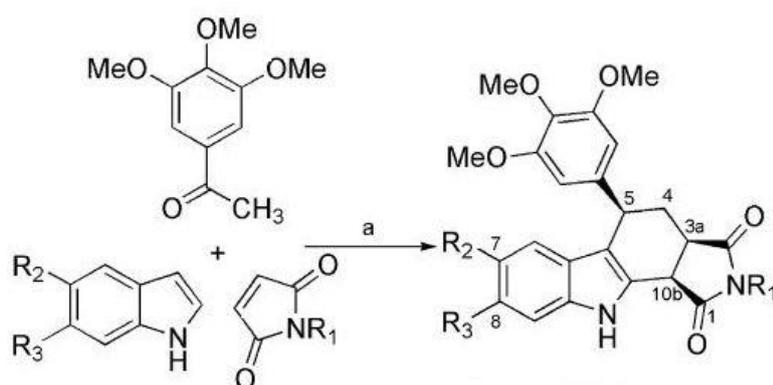


Figure 80 : Tentative de couplage du benzaldéhyde avec le N-sulfonyl-1H-indole

Remarque : Notons également que la faible réactivité du 6-méthoxy-1H-indole vis-à-vis des réactions électrophiles a déjà été constatée au cours de précédents travaux réalisés au laboratoire sur la chimie des indoles^{202,203}. En effet, lors de la préparation de 5-phénylpyrrolo[3,4-a]carbazole-1,3-diones par réaction de cycloaddition [4+2] monotopie à trois composants entre un indole, la (3,4,5-triméthoxy)acétophénone et le N-benzylmaléimide, en présence de quantités catalytiques d'HCl aq., une diminution importante du rendement de réaction était observée lorsqu'elle était menée avec le 6-méthoxy-1H-indole, à la place du 1H-indole, celui-ci passant alors de 57 à 24 %. Les PhédIMS correspondants à chaque indole (de série 3) faisaient partie des sous-produits identifiés dans le mélange réactionnel.



où $R_1 = \text{H, Bn}$; $R_2 = \text{NO}_2, \text{H}$; $R_3 = \text{OCH}_3$.

III.B.2- Synthèse des PhédIMS symétriques de la Série 2

Les PhédIMS symétriques de cette série sont caractérisés par la présence d'un groupement électro-donneur N-morpholino en position 6 de l'indole, et dont l'introduction est supposée augmenter l'hydrophilie globale des PhédIMS par rapport aux analogues 6-méthoxylés.

La synthèse de tous les composés de cette série a pu être réalisée également par couplage d'un indole avec un carbonyle. Les conditions choisies pour le couplage des composés de la série 1, utilisant la Montmorillonite K10, se sont toutefois avérées peu efficaces et de nouvelles conditions ont dû être mises au point en prenant comme modèle la molécule **234**. Celles-ci correspondent au couplage du benzaldéhyde avec le 6-(*N*-morpholino)-1*H*-indole non commercial, et dont la préparation est rapportée ci-après.

Par ailleurs, une stratégie alternative pour accéder à de tels composés a également été testée. Elle consiste à envisager une étape d'amination pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig sur un intermédiaire PhÉDIM symétrique bromé en position 6.

III.B.2.a- Synthèse du 6-(*N*-morpholino)-1*H*-indole **246**

L'indole **246** n'est pas commercial et sa préparation n'est décrite que dans des brevets. Dans tous les cas, sa synthèse est multi-étapes, réalisée à partir du 6-amino-1*H*-indole parfois protégé sur l'azote (alors acétylé), avec formation du cycle morpholine en utilisant un réactif dihalogéné tel que le bis-(2-bromoéthyl) éther, ou un équivalent^{204,205}.

Les conditions d'amination pallado-catalysée développées par l'équipe de S. Buchwald permettant l'introduction d'amines secondaires et d'anilines sur des indoles non protégés sur l'azote nous ont semblé une alternative intéressante pour accéder à l'indole **246**²⁰⁶. En effet, ces auteurs décrivent la synthèse avec un rendement de 90 %, du 5-(*N*-morpholino)-1*H*-indole directement à partir du 5-bromo-1*H*-indole. La réaction est réalisée dans le THF à 65°C, en présence du complexe au palladium (Pd₂ba₃) ou *tris*(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0) (à 1 mole %), du ligand stable à l'air DAVEPHOS ou 2-dicyclohexylphosphino-2'-(*N,N*-diméthylamino)biphényle (à 2,4 moles %) (Fig. 81) et de la base LiHMDS (2,2 équivalents).

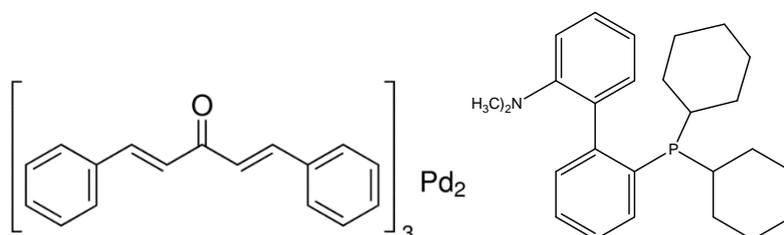


Figure 81 : Structures du complexe (Pd₂ba₃) (à gauche) et du ligand PhDAVEPHOS (à droite)

L'application de ces conditions au 6-bromo-1*H*-indole commercial, permet d'obtenir le composé souhaité **246** avec un bon rendement de 82 % (Fig. 82).

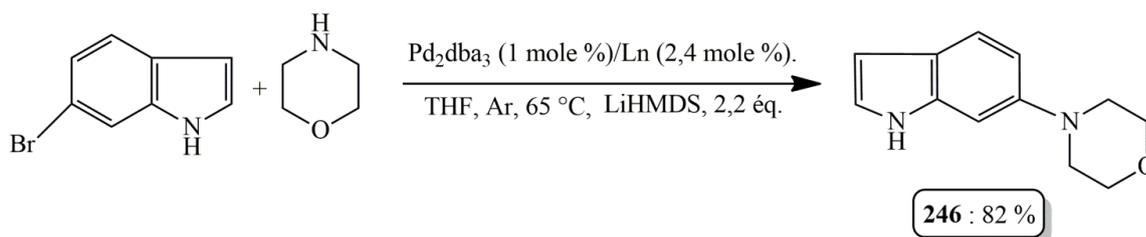


Figure 82 : Synthèse du 6-(N-morpholino)-1H-indole par amination de type Buchwald-Hartwig²⁰⁶

III.B.2.b- Mise au point des conditions de réaction pour la synthèse du composé 234

- Réaction catalysée par la Montmorillonite K10 ou par l'acide oxalique dihydraté :

Le point de départ de notre étude a donc été d'utiliser la Montmorillonite MK10 comme catalyseur acide pour le couplage du benzaldéhyde avec le 6-(N-morpholino)-1H-indole **246**. Dans ces conditions, le PhéDIM symétrique **234** est obtenu après purification avec un rendement très faible d'environ 5 % (Fig. 83).

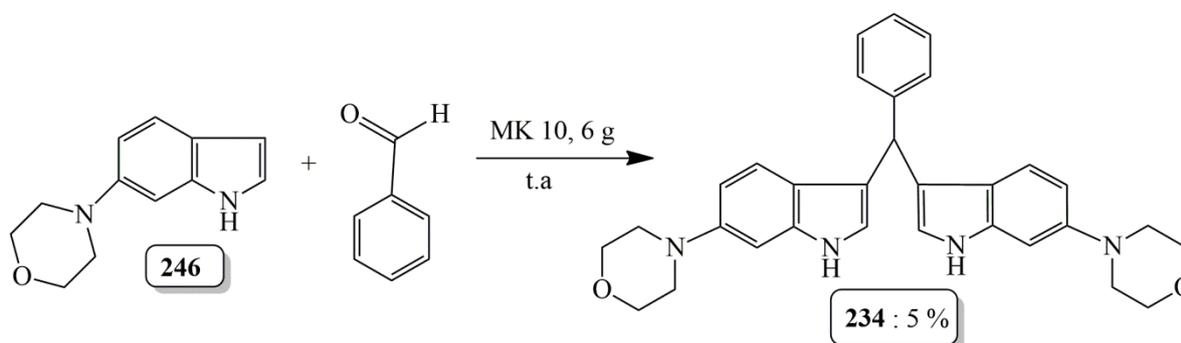


Figure 83 : Tentative de synthèse du composé 234 en présence de l'argile MK10

Une méthode alternative, qui avait été utilisée avec un succès (relatif) au laboratoire pour la préparation de PhéDIMs symétriques à partir d'un indole et d'une acétophénone (série **3**, voir le point **III.B.3** ci-après)²⁰⁷ a également été envisagée.

Il s'agit des conditions en transfert de phase développées par Ghorbani-Vaghei¹³⁰ et déjà présentées dans la partie bibliographique (entrée 4 du tableau 6, page 44). Le catalyseur acide utilisé est l'acide oxalique dihydraté (à 50 mole %) et l'agent de transfert de phase est le bromure de *N*-cétyl-*N,N,N*-triméthylammomiun (CTAB).

Dans ces conditions, même après 24 heures d'agitation, que ce soit en procédant à température ambiante (Essai 1) ou à 35 °C (Essai 2), les deux réactifs de départ sont retrouvés inchangés, sans aucune trace de formation du PhéDIM souhaité, même par analyse CCM.

Face à la faible réactivité de l'indole **246**, nous avons finalement opté pour le choix d'un acide de Lewis fort avec comme objectif d'augmenter le caractère électrophile du carbonyle complexé. La limite d'une telle approche est le risque de polymérisation de l'indole.

- Réaction catalysée par $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$:

Dans les conditions récemment développées par Swetha et coll.¹⁴⁸ (Voir entrée 11 du tableau 7, page 49) pour l'obtention des PhéDIMs, et qui utilisent $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en quantité stoechiométrique, le benzaldéhyde et le 6-(N-morpholino)-1H-indole **246** réagissent pour donner le composé **234**, mais avec un rendement de seulement 15 % (Tableau 9, entrée 1). L'utilisation de quantités catalytiques de l'acide de Lewis n'améliore pas le rendement, au contraire il diminue et est même nul avec 0,1 Eq de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Entrées 2 et 3). Le remplacement comme solvant de réaction du CH_2Cl_2 anhydre par le THF anhydre améliore significativement le rendement qui voit sa valeur doubler par rapport aux conditions standards (Tableau 9, Entrée 4). Ce résultat s'explique essentiellement par la meilleure solubilité des produits de départ dans ce solvant. Les conditions optimales consistent finalement à utiliser ce solvant, deux équivalents d'acide et à chauffer à 45°C. Le rendement atteint ainsi 52 %. Il faut enfin noter que, dans tous les cas (Entrées 1-6), il ne se produit pas de réactions secondaires de manière significative et que l'indole de départ n'ayant pas réagi est retrouvé intact après purification.

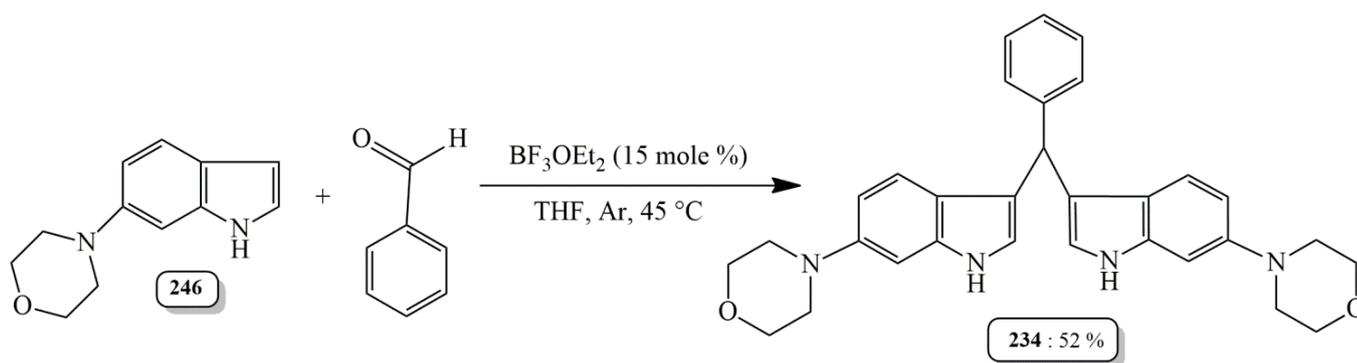
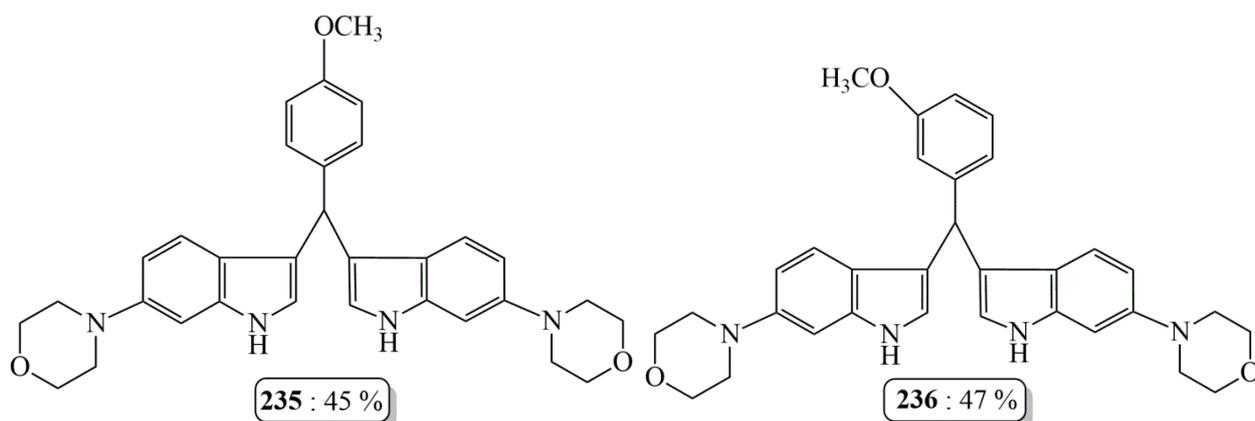


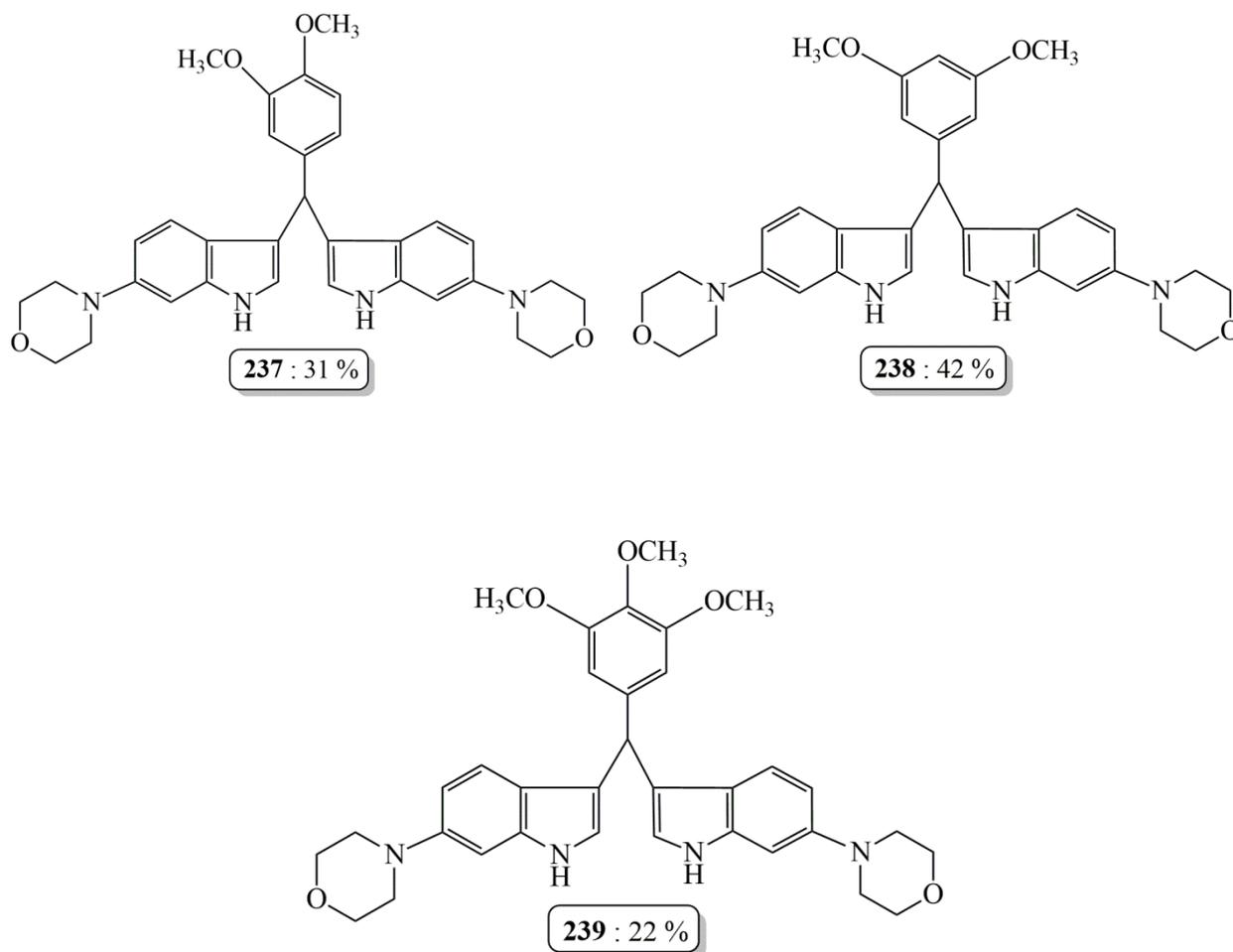
Tableau 9 : Optimisation des conditions de la synthèse de 234 en présence de BF₃.OEt₂

Entrée	Conditions réactionnelles	Durée	Rendement
1	BF ₃ .OEt ₂ (1 Eq*), CH ₂ Cl ₂ , t.a., Ar	1 h	15 %
2	BF ₃ .OEt ₂ (0,5 Eq), CH ₂ Cl ₂ , t.a., Ar	4 h	10 %
3	BF ₃ .OEt ₂ (0,1 Eq), CH ₂ Cl ₂ , t.a., Ar	4 h	0 %
4	BF ₃ .OEt ₂ (1 Eq), THF, t.a., Ar	4 h	33 %
5	BF ₃ .OEt ₂ (2 Eq), THF, 45 °C, Ar	4 h	52 %
6	BF ₃ .OEt ₂ (4 Eq), THF, 45 °C, Ar	4 h	41 %

* exprimé par rapport à l'indole ; t.a : température ambiante, Ar : argon

L'application de ces conditions optimisées aux benzaldéhydes suivants : 3- et/ou 4-méthoxybenzaldéhydes, 3,4- et 3,5-diméthoxybenzaldéhydes et 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde, a permis d'obtenir les PhédIMs correspondants **235** – **239** avec des rendements respectifs précisés ci-après. Le caractère électrophile du carbone de la fonction carbonyle (activé en présence de l'acide de Lewis) diminue proportionnellement avec le nombre de groupements méthoxyles présents, ce qui explique les valeurs des rendements obtenues, toutes inférieures à celle du couplage du benzaldéhyde simple. L'effet est d'autant plus prononcé que l'un des méthoxyles est en position para.





Identification structurale du composé 234 :

Etant donné qu'il s'agit d'un nouvel analogue de Phédim et le premier à être synthétisé dans la série 2, le composé **234** a été caractérisé et décrit à titre d'exemple. La structure de ce composé, ayant une masse molaire moléculaire de 492,25, a été identifiée par analyse de ses spectres de masse et RMN. Son spectre de masse obtenu grâce à l'ionisation par électronébuliseur (Electrospray ionization, ESI+W) indique un pic à m/z 493,2614 qui correspond à un ion adduit $[M+H]^+$. L'expérience RMN 1H a été réalisée dans l'acétone- d_6 et sur le spectre du proton, les deux triplets à 3,05 et 3,75 ppm correspondent aux protons du groupement morpholine (H1''-4'' et H2''-3''), le singlet à 5,78 ppm au proton H1''' du carbone central, les signaux situés entre 7,5 et 6,5 ppm correspondent aux protons (H4, H2'-6', H7, H5, et H2) des noyaux aromatiques indolique et phényle et le singlet à 9,70 ppm au proton H1 du NH (Fig. 84).

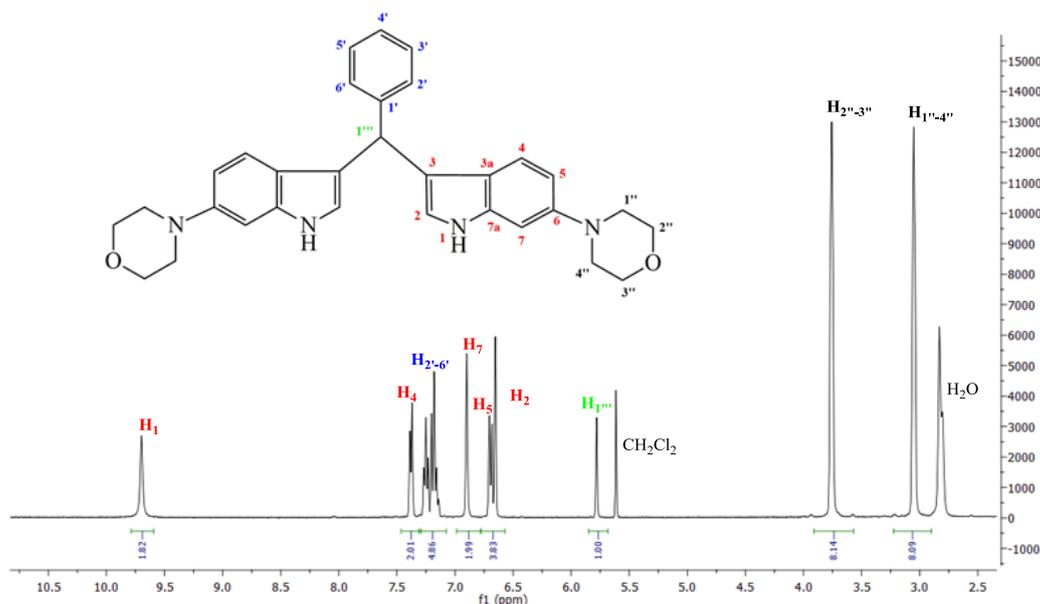


Figure 84 : Spectre RMN 1H (acétone-d6) du composé 234

III.B.2.c- Essai de préparation du composé 239 par amination de type Buchwald-Hartwig à partir du PhéDIM dibromé 232

A titre d'essai, les conditions d'amination pallado-catalysée ayant permis de préparer l'indole 246 sans étapes de protection-déprotection (voir point III.A.2.a)²⁰⁶ ont été appliquées au PhéDIM dibromé 232 -dont la synthèse a été présentée au point III.A.1.- afin d'essayer d'obtenir le PhéDIM 234. L'amination devant être réalisée sur deux positions, les quantités de morpholine introduites dans la réaction ont été doublées (2,4 Eq). Le produit attendu ne s'est pas formé, même au bout de 24 h de réaction et le composé de départ 232 a pu être récupéré après purification sur gel de silice. Faute de temps, et du fait du succès obtenu pour préparer Les PhéDIMs de la série 2 grâce à l'autre stratégie de synthèse (i.e. indole+benzaldéhyde), cette voie potentiellement intéressante a été abandonnée (Fig. 85).

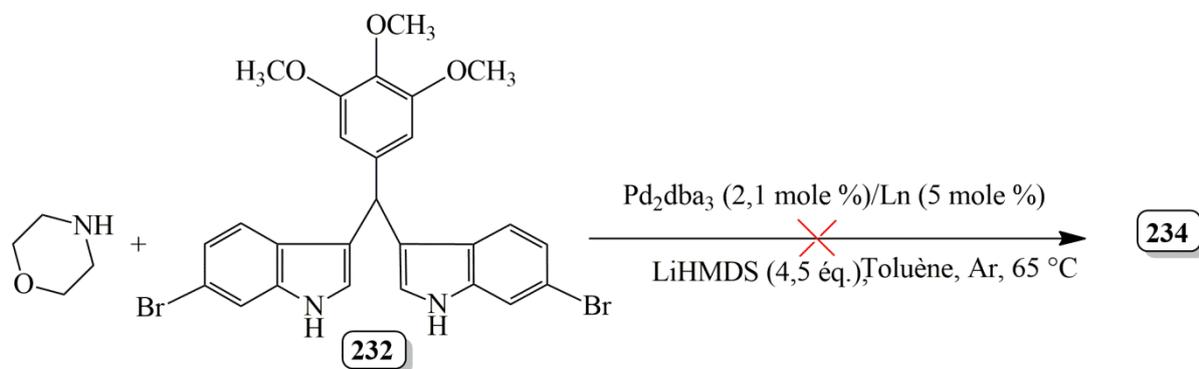


Figure 85 : Essai de préparation du composé 234 par amination pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig²⁰⁶.

III.B.3- Synthèse des PhédIMs de la série 3

III.B.3.a- Réactivité du composé 233

Les PhédIMs de cette série se caractérisent par la présence d'un groupement méthyle sur le carbone central tétrasubstitué (il s'agit à proprement parler de Phényldiindolyléthanes). Ces produits ne se colorent pas au contact de l'air et dans le cas de ceux préparés au laboratoire, restent incolores. L'explication de cette observation est que ces composés ne s'oxydent pas spontanément à l'air, contrairement aux PhédIMs trisubstitués sur le carbone central (voir le point III.C ci-dessous).

Du point de vue de leur préparation, il n'existe pas de méthode de portée générale et ils proviennent tous de la condensation en milieu acide d'un indole avec une acétophénone. Comme nous l'avons vu dans le chapitre dédié à la bibliographie, le nombre de composés et de conditions réactionnelles décrits sont relativement peu nombreux, en regard des PhédIMs trisubstitués sur le carbone central. Les composés sont souvent simplement substitués ou non substitués et les rendements de synthèse associés rarement bons. Ceci peut s'expliquer par une réactivité plus faible (liée à un caractère électrophile plus faible) du carbone du CO de l'acétophénone par rapport à celui du benzaldéhyde du fait des effets inducteurs donneurs du groupement méthyle, mais aussi de l'encombrement stérique qu'il génère. Il en résulte des réactions secondaires compétitives catalysées en milieu acide comme la polymérisation de l'indole²⁰⁸.

Également, des réactions secondaires inhérentes à la présence du méthyle doivent probablement se produire (Fig. 86). Par exemple, si l'accès aux PhédIMs nécessite la formation d'un cation indoléninium **b** par déshydratation de l'intermédiaire **a**, une déshydratation impliquant le méthyle peut conduire à un intermédiaire diénique réactif tel que **d**, pouvant lui-même conduire à d'autres sous-produits. La réaction d'un indole avec une acétophénone en milieu acide est en effet un moyen efficace de préparer de tels intermédiaires qui peuvent être directement engagés dans une réaction de cycloaddition en présence d'un diénophile (Voir la remarque à la fin du paragraphe III.A.1).

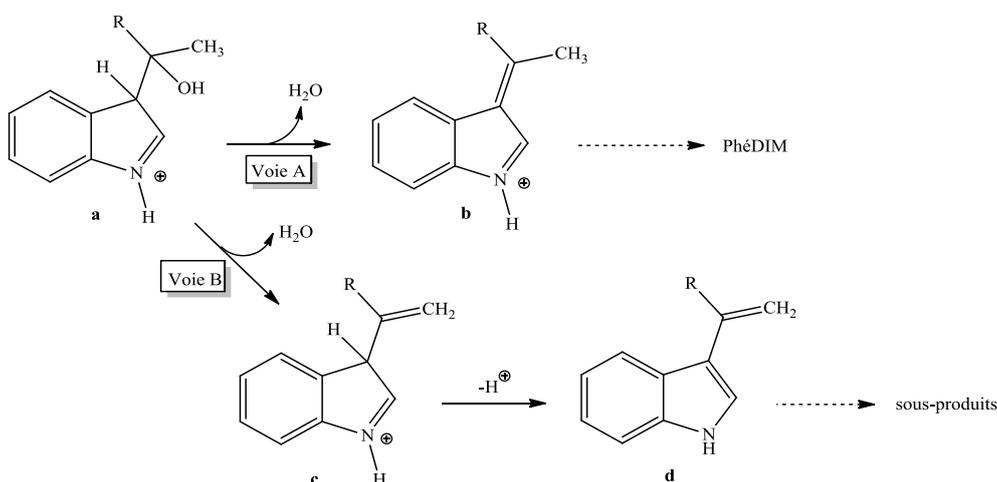
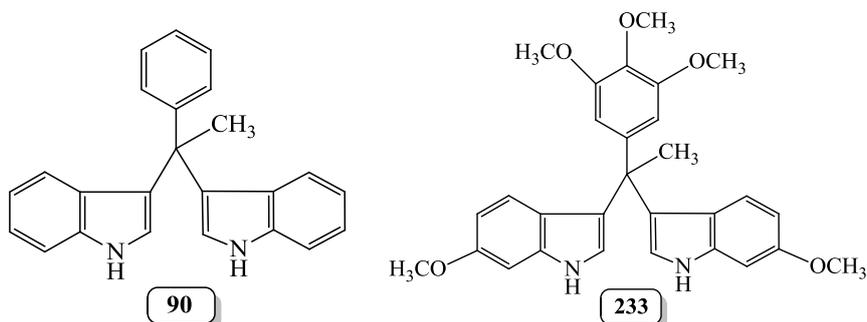


Figure 86 : Possibles réactions secondaires inhérentes à la présence du groupement méthyle

Nous avons déjà évoqué dans l'introduction de ce chapitre (paragraphe **III.A** page 86) que le composé **233** avait été précédemment préparé au laboratoire et qu'il présentait des activités biologiques similaires à celles observées pour son analogue non méthylé **231**. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'interaction potentielle du composé **233** avec la protéine NR4A1, d'autant plus qu'il peut être considéré comme un analogue de **231** non sujet à l'oxydation. Nous rapportons ici sa préparation, mais aussi celle d'un autre PhéDIM, le composé non substitué **90**.



III.B.3.b- Mise au point de conditions de réaction pour la synthèse du composé 233

- Réaction catalysée par l'acide oxalique dihydraté :

Lors des travaux précédents réalisés au laboratoire, le composé **233** avait été obtenu dans les conditions de transfert de phases déjà décrites au point **III.A.2.b** et utilisant l'acide oxalique dihydraté comme catalyseur acide^{130,207}, et ce avec un rendement de 42 %. Ces conditions se sont malheureusement avérées non reproductibles dans nos mains et le composé **233** n'a pu être obtenu qu'avec un rendement de 9 % à partir du 6-méthoxy-1*H*-indole et de la 3,4,5-triméthoxyacétophénone. Nous avons donc été amenés à chercher des conditions alternatives.

- Réaction catalysée par la Montmorillonite MK10 :

Malgré plusieurs tentatives, nous avons constaté que la Montmorillonite K10 (conditions déjà décrites au point III.A.1) était inefficace pour préparer le PhéDIM **233**. Dans tous les cas, il ne se produit aucune évolution, même au bout de 48 h et les deux réactifs de départ peuvent être récupérés inchangés après purification sur colonne de gel de silice.

- Réaction catalysée par l'acide molybdophosphorique ou phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}\cdot x\text{H}_2\text{O}$) :

Nous nous sommes intéressés en particulier aux conditions de réaction développées par Zolfigol et coll., utilisant comme catalyseur acide, l'hétéropolyacide phosphomolybdique (ou molybdophosphorique) en quantité catalytique (à 5 mole %) à température ambiante²⁰⁹. En effet, les auteurs ont montré que le couplage de deux unités de 1*H*-indole et de la *p*-méthoxyacétophénone (dont la réactivité se rapproche en partie de celle de la 3,4,5-triméthoxyacétophénone) dans ces conditions, conduisait au PhéDIM méthylé correspondant **91**, avec un rendement acceptable de 83 %.

En réalisant la réaction avec le 6-méthoxy-1*H*-indole et la 3,4,5-triméthoxyacétophénone à l'échelle de la dizaine de mg, on observe la formation du produit attendu **233**. Il se produit peu de dégradations, même au bout d'une semaine de réaction, mais il reste des quantités non négligeables des produits de départ. La purification finale est délicate et nécessite des chromatographies successives, ce qui permet d'expliquer un manque de reproductibilité et de mauvais rendements (rendements variables compris entre 4 et 20 %).

- Réaction catalysée par un acide phosphorique chiral dérivé du BINOL :

La préparation du PhéDIM symétrique **233** à l'aide d'un tel réactif peut sembler inappropriée, mais c'est en essayant d'obtenir initialement un carbinol chiral que nos essais nous ont conduit à l'obtention de **233**. Un tel composé pourrait en effet permettre d'accéder à des PhéDIMs non symétriques et asymétriques.

Ainsi, sur la base des travaux de Nie et coll.¹⁹², nous avons voulu vérifier si le carbinol **247** pouvait être obtenu par réaction du 6-méthoxy-1*H*-indole et de la 3,4,5-triméthoxyacétophénone, en présence d'un acide phosphorique chiral dérivé du BINOL, en l'occurrence dans notre cas, le (*R*)-phosphate (-)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyle (Fig. 87).

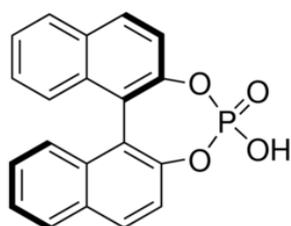


Figure 87 : Formule développée du (R)-phosphate (-)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyle

Nous n'avons pas constaté la formation du composé **247** dans ces conditions et cela peut sûrement s'expliquer par la plus faible réactivité d'une acétophénone par rapport à une *gem*-di- ou *gem*-trifluoroacétophénone, mais aussi la faible solubilité des produits de départ dans le CH₂Cl₂ (Fig. 88).

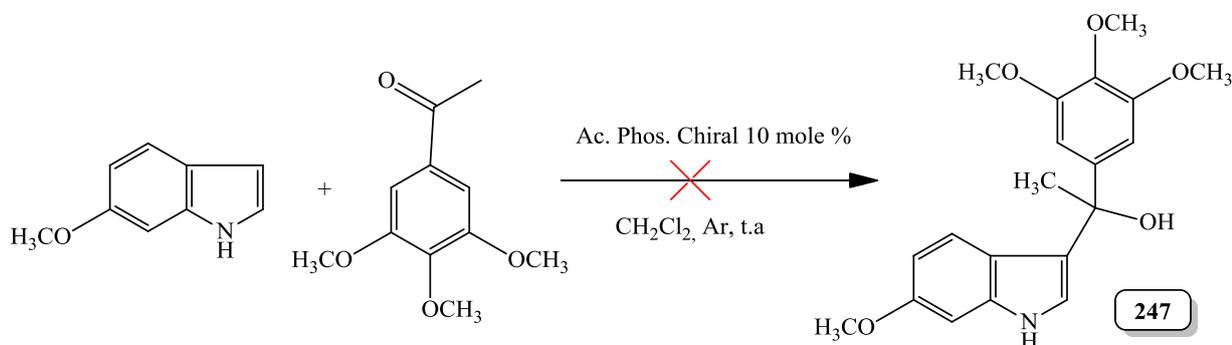


Figure 88 : Essai de synthèse du carbinol **247** en présence d'acide phosphorique chiral.

Faute de temps, nous n'avons pas poursuivi plus en avant cette étude sur les carbinols chiraux. Pour autant, l'acide phosphorique chiral étant peu coûteux, nous avons voulu tester son efficacité comme un acide de Brønsted classique en réalisant la réaction en présence d'eau.

Ainsi, en remplaçant simplement le dichlorométhane par l'éthanol à 96 % (ce qui constitue un meilleur solvant pour les produits de départ), nous avons pu obtenir le composé désiré **233** avec un rendement très moyen de 20 %. Toutefois, cela ne traduit pas le véritable rendement de la réaction puisque là aussi, la présence de plusieurs sous-produits non identifiés rend la purification du composé très délicate.

Ces conditions ont également été appliquées au mélange acétophénone/indole et après plusieurs purifications successives nécessaires, le PhéDIM **90** a été obtenu avec un rendement de seulement 5 % sur un seul essai (Fig. 89).

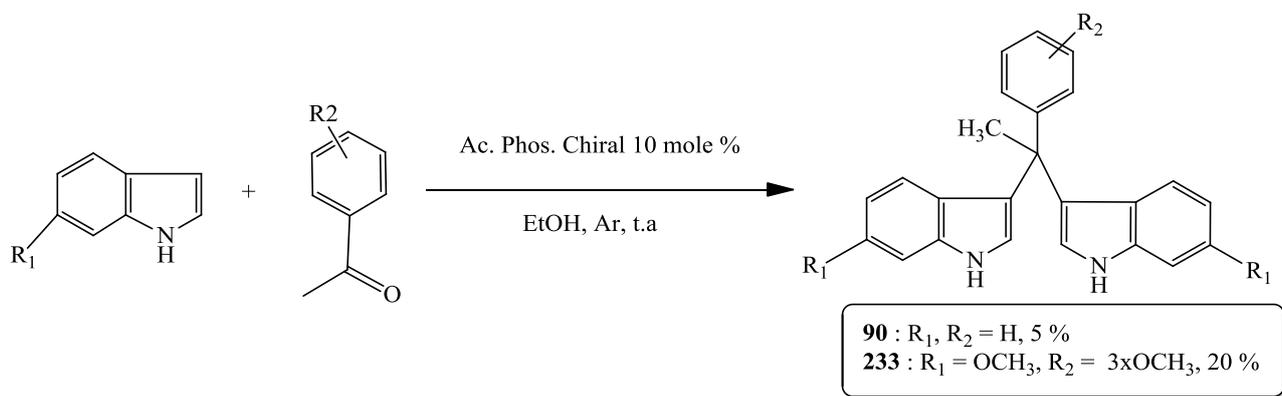
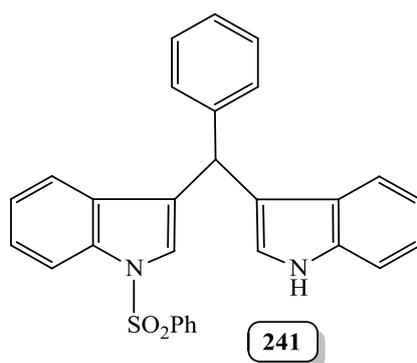


Figure 89 : Essai synthèse des composés **90** et **233** en présence d'acide phosphorique chiral dans l'éthanol.

III.C- Synthèse de PhédIMs non symétriques (série 4)

Les PhédIMs de cette série se caractérisent par la présence de deux unités indoliques distinctes. Un groupement protecteur de l'azote, comme dans le cas du *N*-sulfonyl-1*H*-indole, peut constituer la seule différence structurale. Tous les composés synthétisés sont en série racémique.

Parmi eux, le PhédIM **241**, dont la structure est présentée ci-dessous, est un composé nouveau important dans le cadre de l'étude de l'oxydation des PhédIMs en PhédIMOXs. Il a donc été nécessaire de mettre au point des conditions de synthèse efficaces de ce produit, permettant d'en obtenir des quantités suffisantes.



Vu l'expérience acquise lors de précédents travaux dans le laboratoire en matière de benzoylation d'indole, et des données disponibles de la littérature (cf **II.B**), la stratégie la plus adaptée pour accéder au composé **241** nous a semblé être celle dont l'étape clé est le couplage en milieu acide d'un indole et d'un phényl-3-indolylméthanol (cf **II.B.1**). Ce dernier, que nous appellerons souvent sous le terme simplifié de carbinol, peut être préparé en deux étapes à partir du *N*-sulfonyl-1*H*-indole, à savoir une acylation de Friedel-Crafts suivie d'une réduction de la

fonction carbonyle (Fig. 90). Cette stratégie est par ailleurs de portée générale et peut permettre ensuite l'accès à une grande diversité de PhédIMs non symétriques.

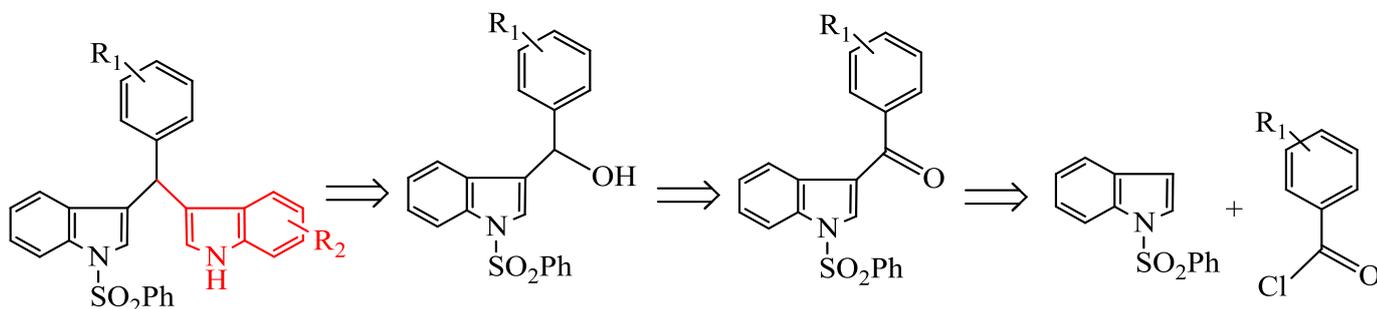
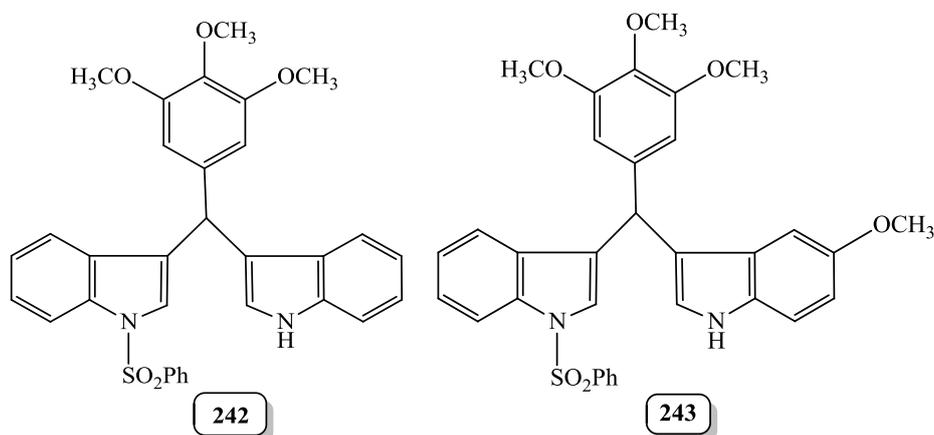
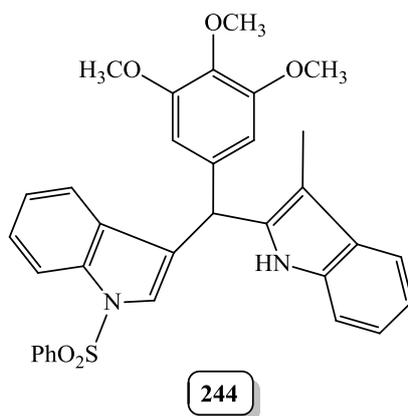


Figure 90 : Schéma de rétrosynthèse de PhédIMs non symétriques (241 : R₁ = R₂ = H).

Bien que le principal objectif était ici de préparer le PhédIM **241**, nous avons également cherché à mettre au point des conditions de couplage carbinol+indole compatibles avec des substituants sensibles aux conditions acides tels que les méthoxyles et donc susceptibles d'être appliquées à la préparation de PhédIMs plus complexes. La réaction entre le carbinol **139**¹⁶⁷, qui possède un noyau 3,4,5-triméthoxyphényle, et l'indole, et qui conduit au PhédIM **242**, a donc été choisie comme réaction modèle pour la mise a point des conditions de couplage (R₁ = H, R₂ = 3,4,5-(OCH₃)₃). L'autre intérêt de ce choix concerne l'analyse structurale du PhédIM obtenu. Le spectre RMN ¹H est en effet relativement simplifié vu que les protons aromatiques du noyau phényle apparaissent sous la forme d'un seul singulet intégrant pour deux protons (2H).

Les conditions mises au point, basées comme nous le verrons par la suite sur l'utilisation du chlorure de mésyle, ont été ensuite appliquées à la préparation de **241**, mais aussi à celle des nouveaux PhédIMs **243** et **244** afin d'en étudier sommairement la portée.





III.C.1- Etude des conditions de couplage du carbinol **139** avec l'indole

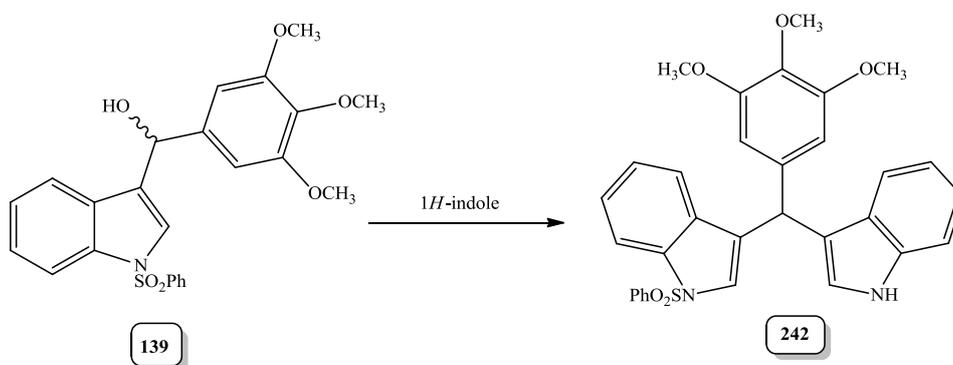


Figure 91 : Synthèse du composé **242**

III.C.1.a- Synthèse du phényl-3-indolylméthanol **139**

Comme nous l'avons évoqué dans la partie bibliographique de ce chapitre, le composé **139** a déjà été préparé au laboratoire ¹⁶⁷. Celui-ci a donc été synthétisé en deux étapes (acylation de Friedel-Crafts, suivie d'une réduction de la fonction carbonyle par NaBH_4) selon le protocole précédemment établi. Le *N*-(phénylsulfonyl)-1*H*-indole **248** réagit avec un léger excès (1,3 Eq.) de chlorure de l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, en présence d'un équivalent de chlorure d'aluminium (AlCl_3), afin d'obtenir la méthanonone **249** avec un rendement de 80 % (Fig. 92). La réaction est réalisée à température ambiante dans le dichlorométhane anhydre.

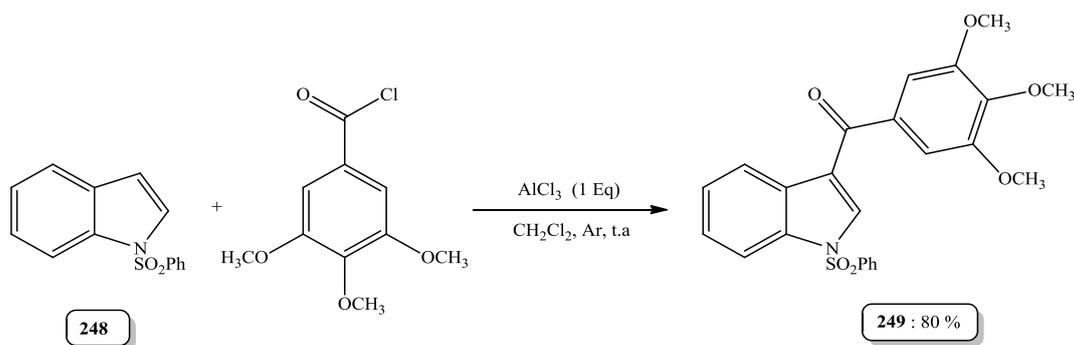


Figure 92 : Synthèse du composé 249

La réduction du composé **249** est ensuite réalisée en présence de deux équivalents de NaBH_4 , en solution dans le mélange MeOH/THF (20/1), à température ambiante et permet d'obtenir le phényl-3-indolylméthanol **140** avec un rendement de 68 % (Fig. 93). Il faut noter que le THF est utilisé comme co-solvant de la réaction car **249** est peu soluble dans le méthanol.

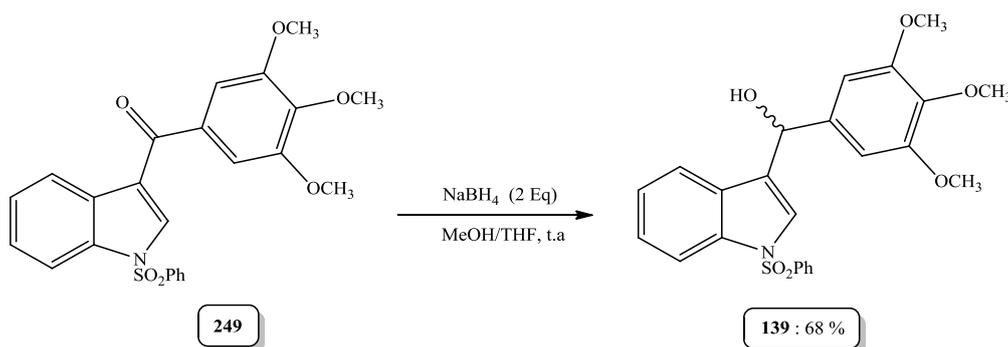


Figure 93 : Synthèse du carbinol 139

Remarque concernant le *N*-sulfonyl-1*H*-indole (248**) :**

Ce composé **248** est certes commercial, mais il a pu être facilement préparé à l'échelle du gramme dans des conditions de transfert de phase (Bu_4NHSO_4), à partir de l'indole, du chlorure de benzènesulfonyle, et en présence d'une base (NaOH) (Fig. 94) ²¹⁰.

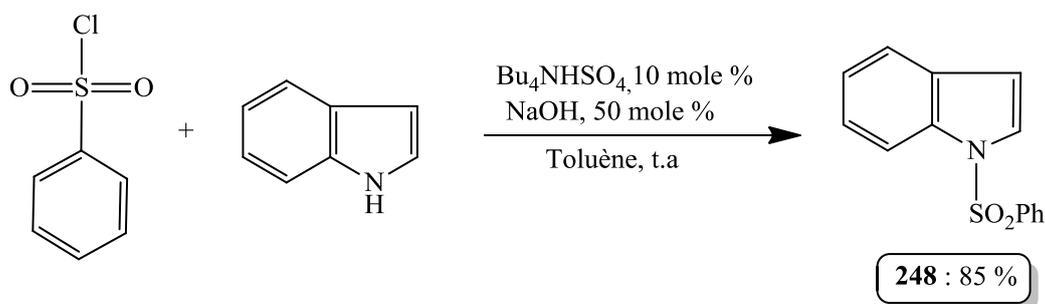


Figure 94 : Synthèse du N-phénylsulfonyl-1H-indole 248

III.C.1.b- Couplage de l'indole et du phényl-3-indolylméthanol 139

Le point de départ de notre étude a été d'appliquer les conditions déjà décrites par Zeng et coll¹⁹⁴, pour la préparation de PhéDIMs non symétriques à partir de carbinols et qui utilisent le CAN comme réactif de couplage (cf **II.B.1.b.1**). Mais les faibles rendements obtenus (voir ci-dessous) nous ont amené à rechercher d'autres solutions. Dans tous cas, nous avons cherché à faciliter la formation du cation indoléninium, intermédiaire supposé de la réaction de couplage et sur lequel réagit l'indole (Fig. 95). Plusieurs réactifs ont été testés, à savoir un acide de Lewis (SnCl_4), des acides protiques (acide méthanesulfonique, *p*-toluène sulfonate de pyridinium) et finalement le chlorure de mésyle ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$).

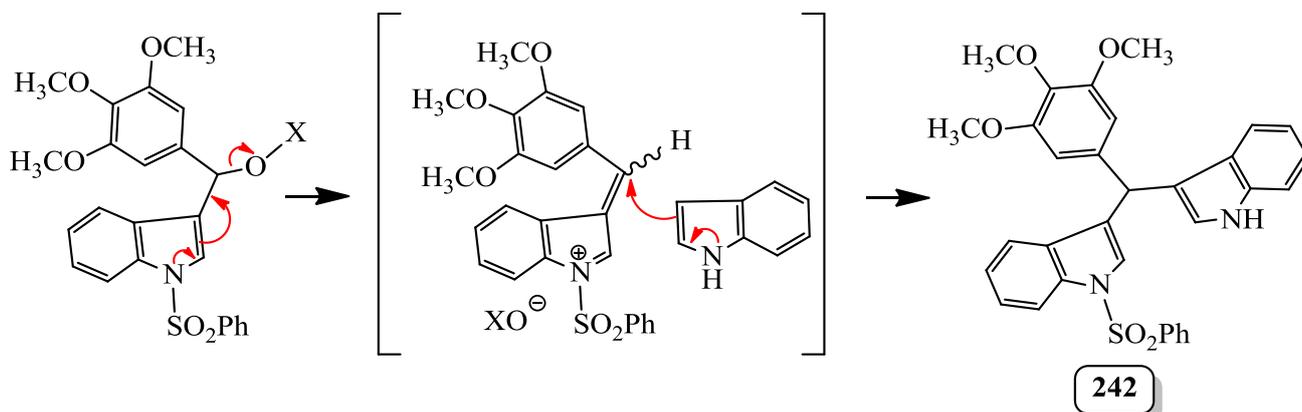


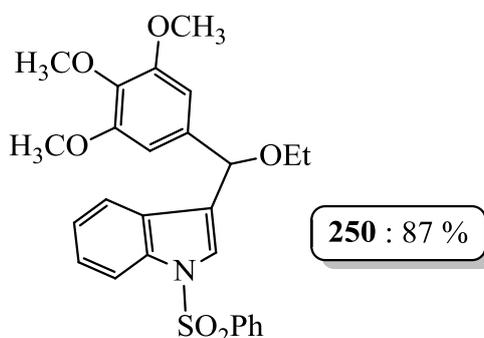
Figure 95 : Mécanisme réactionnel supposé de la formation du composé 242

● Conditions de couplage avec le nitrate d'ammonium cérique (CAN)

En utilisant le protocole expérimental décrit par l'équipe de X-F. Zheng. (0,1 éq. de CAN et sous ultrason),¹⁹⁴ la réaction étant menée à température ambiante dans l'éthanol anhydre, nous avons obtenu, au bout de 24 h de réaction, le composé attendu **242** avec un rendement très faible de

seulement 13 %. Celui-ci est donc de loin bien inférieur à ceux rapportés dans l'article pour des composés de structures proches. On note, de plus, que la réaction est très lente (peu de produit formé après 7 h d'agitation) et qu'il ne reste plus de carbinol de départ **139** à l'arrêt de la réaction. L'indole de départ est récupéré à environ 85 % et n'a donc pas réagi. On observe par contre la formation d'un produit secondaire majoritaire **250** qui peut être isolé.

Analysé par spectrométrie de masse (ionisation par électrospray ou ESI, cf partie expérimentale), on observe un ion m/z 504 correspondant à un adduit $[M+Na]^+$ d'un composé de masse 481. On remarque une différence de masse de 28 avec le carbinol de départ. L'analyse du spectre RMN du proton a finalement permis de déterminer la structure du composé **250**. Il s'agit probablement d'un adduit formé avec l'éthanol utilisé comme solvant de réaction. A partir de cette structure, le rendement de synthèse de ce produit secondaire à partir du carbinol **139** a été calculé et est égal à 87 %.



Ces résultats peuvent être en partie dus à la faible puissance de notre appareil ultrason qui est deux fois inférieure à celle de l'appareil décrit dans la publication. La réaction étant plus lente, la formation du dérivé secondaire **250** a pu être favorisée. Toutefois, les différentes étapes nécessaires au traitement du milieu réactionnel pourraient également contribuer au mauvais rendement obtenu. Alors, de nouvelles conditions ont été envisagées et sont présentées ci-après.

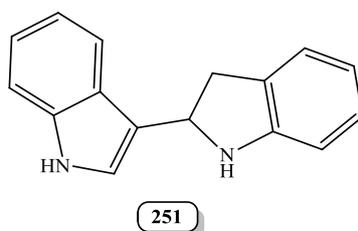
● *Conditions de couplage avec l'acide de Lewis SnCl₄*

Un essai a été réalisé avec du chlorure d'étain (IV), SnCl₄, un acide de Lewis également employé comme catalyseur dans la synthèse de PhéDIMs symétriques. Dans les conditions décrites dans la littérature, il est utilisé dans des conditions catalytiques (20 mole %), mais en chauffant à 80°C dans le 1,2-dichloroéthane²¹¹. Pour cet essai, nous avons choisi des conditions stoechiométriques, mais en se plaçant à 0 °C.

Un équivalent de SnCl₄ est donc ajouté dans le mélange réactionnel à 0°C contenant le carbinol **139**. La réaction est stoppée déjà après une heure d'agitation, suite à la disparition du

carbinol **139** de départ. Par rapport aux conditions précédentes, on observe sur plaque CCM de nombreuses taches et donc des phénomènes de dégradation plus importants. Le composé **139** peut être isolé avec un rendement de seulement 16 %.

Ce faible rendement s'explique par la formation parmi les sous-produits, d'une quantité non négligeable de 3-(1*H*-Indol-2-yl)-1*H*-indole **251** (rendement correspondant de 23 %) qui résulte de la dimérisation de deux unités indoliques en présence de SnCl₄.



La formation de ce composé n'est pas en soit une surprise puisque des travaux publiés précédemment au laboratoire ont montré que ce réactif constituait une alternative intéressante à HCl_{gaz} pour préparer ce dimère ²⁰⁸.

● *Conditions de couplage avec l'acide méthanesulfonique (ou acide méthylique)*

Nous avons ensuite employé un acide protique, l'acide méthylique (CH₃SO₃H) comme catalyseur. En employant cet acide, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait également conduire à la formation d'esters méthyliques (ou méthylates) du carbinol **139**, bons groupements partants, facilitant ainsi la formation du cation indoléninium intermédiaire et par conséquent l'attaque de l'indole.

Un équivalent d'acide méthylique, puis de l'indole sont successivement ajoutés à température ambiante à une solution du carbinol **139** dans CH₂Cl₂. La réaction est arrêtée rapidement (1h 30) suite à la disparition du carbinol de départ et le PhÉDIM **242** est isolé avec un rendement de seulement 25 %. Comme dans le cas précédent avec SnCl₄, de nombreux produits secondaires non identifiés sont formés, mais aussi une quantité importante du dimère indolique **251** (non quantifié car difficile à purifier).

● *Conditions de couplage avec le p-toluène sulfonate de pyridinium (PTSP)*

Malgré la légère augmentation du rendement constatée avec l'acide méthylique, cette méthode reste peu efficace, en particulier, à cause d'une polymérisation de l'indole dans des conditions acides fortes. Ce constat nous a donc conduits à utiliser un acide plus faible tel que le *p*-toluène sulfonate de pyridinium (PTSP).

Au composé **139**, dissout dans du dichlorométhane, sont ajoutés trois équivalents de PTSP. La réaction évolue très lentement et elle est stoppée au bout de 15 h. Le produit attendu **139** est obtenu avec un rendement moyen de 56 % après purification. Il faut noter que cette méthode s'est montrée plus efficace en terme de rendement que les deux précédentes, même si la formation de composés secondaires non identifiés est encore observée. Toutefois, la réaction est assez lente et non totale (après une nuit, une partie du carbinol de départ **139** n'a pas réagi).

● *Conditions de couplage avec le chlorure de mésyle (MsCl)*

Afin de limiter l'emploi d'un acide favorisant la polymérisation de l'indole et d'autres réactions secondaires, nous avons cette fois-ci envisagé de transformer *in situ* la fonction alcool du carbinol (**252**) en bon groupe partant tel que l'ester métylique. Le chlorure de mésyle (MsCl) est donc utilisé directement comme réactif de couplage. On peut alors imaginer que l'attaque nucléophile de l'indole se produira aussi bien sur le cation indoléninium dont la formation est favorisée, que directement sur le mésylate correspondant de **139** (Fig. 96).

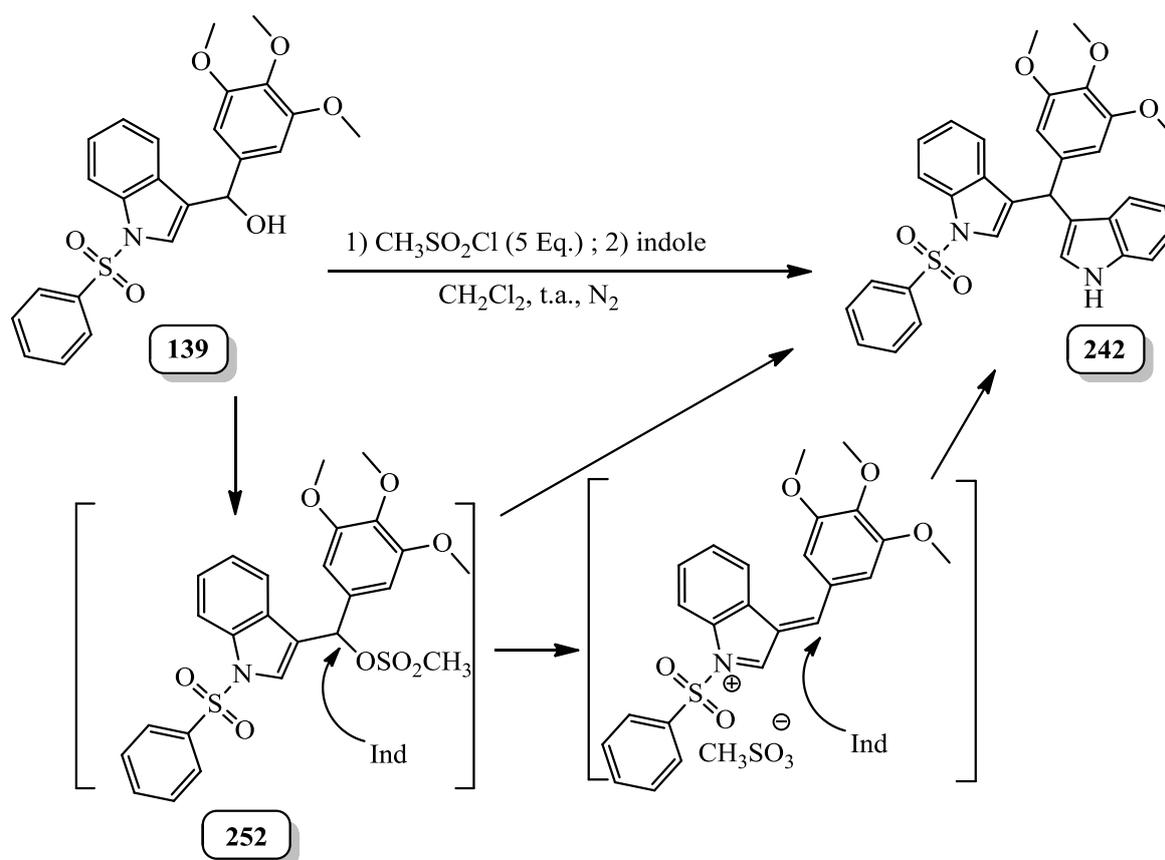


Figure 96 : Hypothèse d'activation du carbinol par le chlorure de mésyle.

Différents essais préliminaires ont été menés en faisant varier le nombre d'équivalents de chlorure de mésyle ajoutés. On observe bien la formation de **242**, mais il faut au moins deux

équivalents de $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$. Sur de petites quantités, on observe sur plaque CCM, une disparition totale du carbinol de départ **139** au bout de 3 heures avec 5 équivalents de chlorure de mésyle. Le composé **242** est alors isolé avec un rendement de 70 % après purification sur colonne de silice. Sur un autre essai, mené sur 100 mg de produit de départ, le rendement atteint 80 % en arrêtant la réaction au bout de 36 heures. La réaction n'est pas immédiate et il faut attendre deux heures pour voir apparaître le produit sur plaque. Le résultat obtenu est semblable si l'on additionne le chlorure de mésyle en une seule fois ou équivalent par équivalent toutes les heures.

En conclusion, dans ces conditions, la réaction est lente, mais de bons rendements de couplage sont obtenus. Le composé **242** est facile à purifier en l'absence de produits secondaires formés, malgré des temps de réaction importants (pas de dégradations).

Ces conditions seront donc retenues pour accéder au composé **241**. Avant d'aborder cette synthèse, nous rapportons ci-dessous la préparation des deux nouveaux PhédIMs non symétriques **243** et **244** par couplage du carbinol **139** avec respectivement le 5-méthoxy-1*H*-indole et le 3-méthyl-1*H*-indole (ou scatole). Ces résultats préliminaires nous ont permis de montrer que la portée de la réaction ne se limitait pas qu'au couplage de l'indole simple.

III.C.1.c- Couplage du phényl-3-indolylméthanol **139** avec le 5-méthoxy-1*H*-indole et le scatole (3-méthyl-1*H*-indole)

● Synthèse du PhédIM **243**.

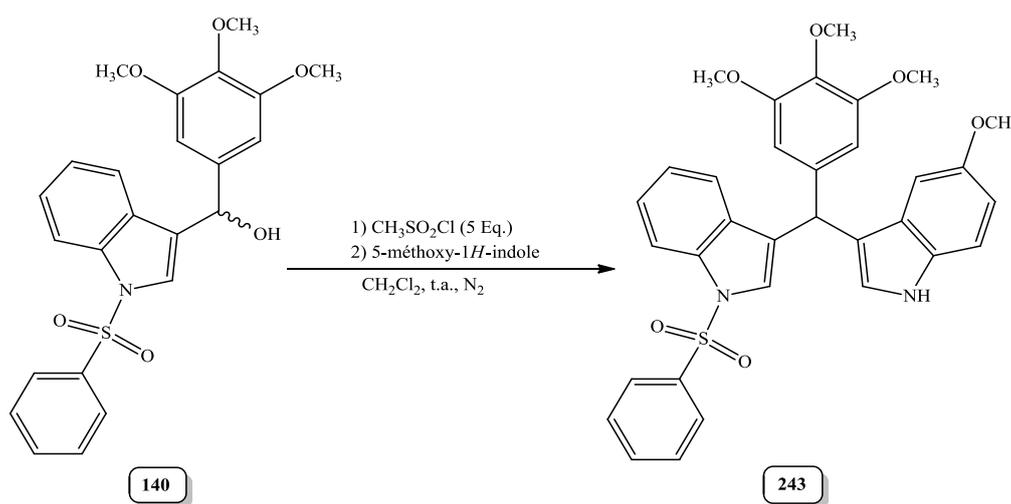


Figure 97 : Synthèse du composé **243**.

En utilisant la méthode de couplage décrite ci-dessus, le composé **243**, qui résulte du couplage du carbinol **139** avec le 5-méthoxy-1*H*-indole, a été obtenu avec un rendement similaire à celui du couplage de l'indole simple (78 %). Dans ce cas la réaction a aussi été arrêtée au bout de 36 heures.

Remarque :

A titre d'étude de faisabilité, nous avons étudié la déprotection du composé **243**. Si K_2CO_3 s'est avérée une base insuffisamment forte pour cliver le groupement *N*-sulfonyle, KOH à reflux dans un mélange MeOH/eau ²¹² permet d'obtenir le nouveau PhéDIM **253** de manière quasi-quantitative.

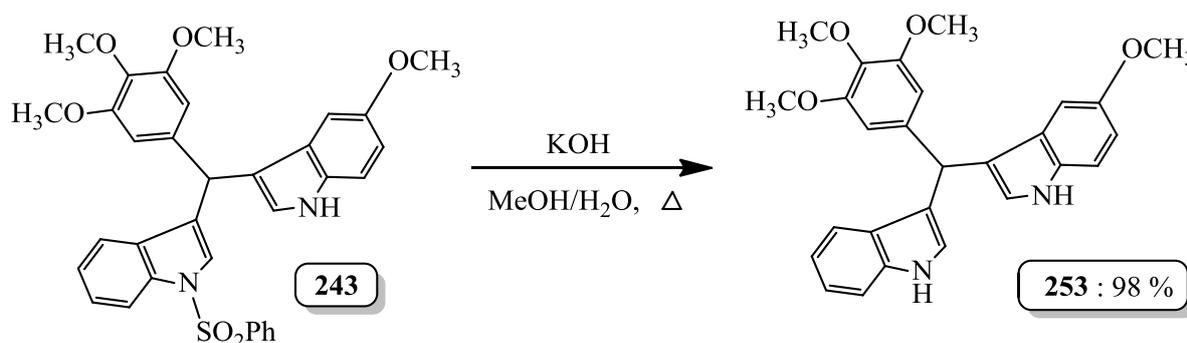


Figure 98 : Synthèse du composé **253**.

● Synthèse du PhéDIM **244**.

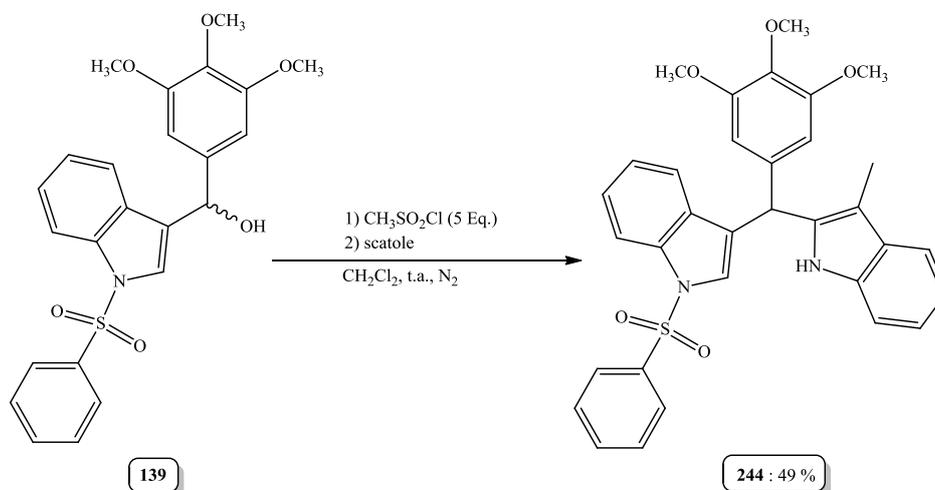


Figure 99 : Synthèse du composé **244**.

Le 3-méthyl-1*H*-indole ou scatole est un indole substitué en position 3 par un méthyle. Celui-ci réagit avec le carbinol **139**, en présence de chlorure de mésyle, pour former le composé **244** avec un rendement non optimisé de 49 % (la réaction a été arrêtée au bout 48 heures, alors qu'il restait encore du carbinol de départ). Elle est toutefois beaucoup plus lente que dans le cas de l'indole simple. Dans ce cas d'indole substitué en position 3, il se forme en effet tout d'abord un diindolylméthane intermédiaire de type 3,3' qui se réarrange ensuite en type 3,2' ²¹³.

III.C.2- Synthèse du PhéDIM 241

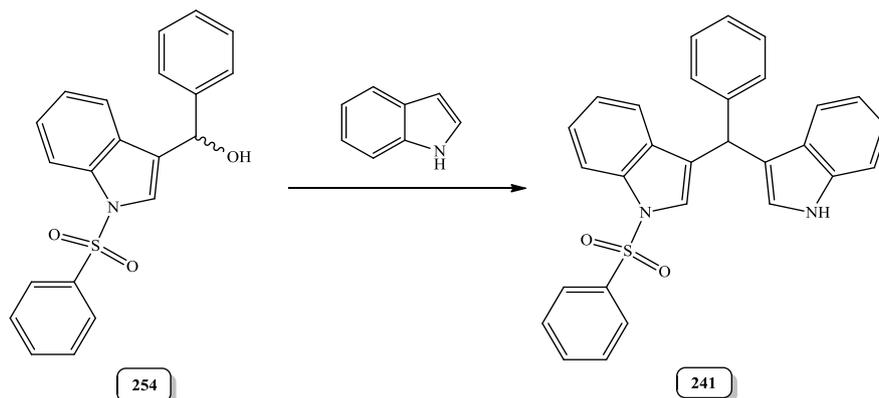


Figure 100 : Synthèse du composé **241**.

III.C.2.a- Synthèse du phényl-3-indolylméthanol **254**

Le carbinol **254** a été préparé dans les mêmes conditions que **139** (rendement de l'étape de benzylation du *N*-sulfonyl-1*H*-indole : 92 % ; rendement de l'étape de réduction par NaBH₄ : 91 %) (Fig. 101).

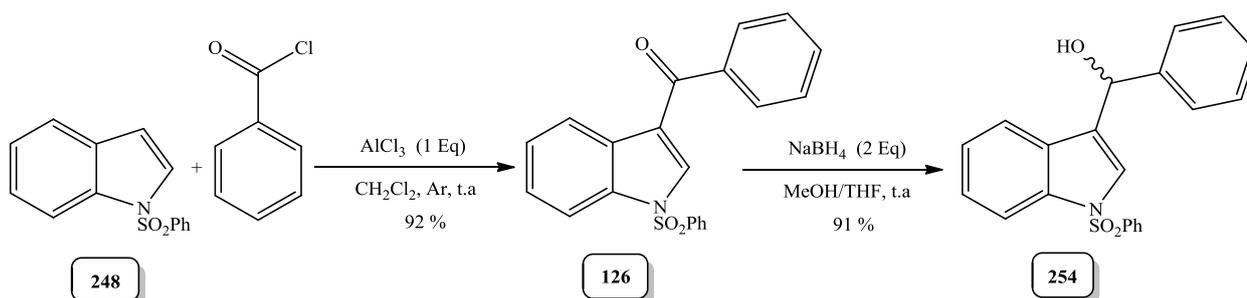


Figure 101 : Synthèse des composés **126** et **254**.

Il faut noter que la préparation de ces composés est déjà décrite dans la littérature (**126** : Ketcha and Gribble, 1985) ; **254** : Zhang et coll. 2014), il s'agit toutefois ici de la première synthèse rapportée de **254** par cette voie.

III.C.2.b- Couplage du phényl-3-indolylméthanol **254** avec l'indole

● Couplage en présence de MsCl seul.

En appliquant les conditions réactionnelles ayant permis la préparation des composés **242-244**, au couplage de l'indole et du carbinol **254**, nous avons été surpris de constater que le PhéDIM correspondant **241** n'était obtenu qu'avec un rendement très moyen de 30 % (Tableau 6, entrée 1).

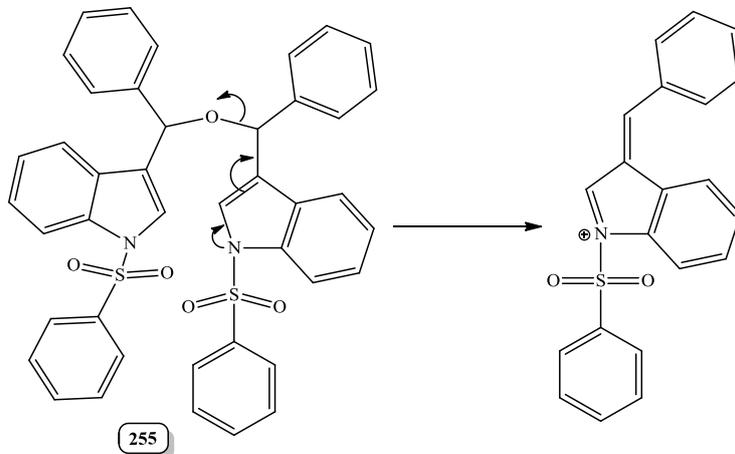
En suivant la réaction par CCM, on observe en effet dans ce cas l'apparition de plusieurs sous-produits qui en plus compliquent la purification du composé **241**. Parmi les produits secondaires formés nous avons pu isoler le composé majoritaire (**255**) (avec un rendement de 20 % par rapport au carbinol) afin d'en déterminer sa structure.

- Analyse structurale du composé 255 :

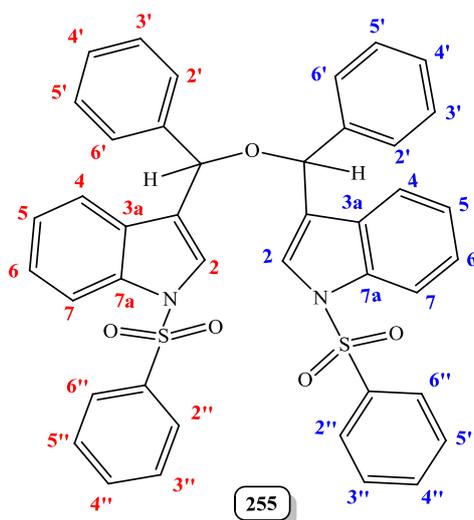
La structure du composé **255** a été déduite de l'analyse des spectres de masse et de RMN ^1H et ^{13}C . Le spectre de masse haute résolution obtenu par électrospray présente un ion à m/z 731,1638, ainsi qu'un ion à m/z 726,2079, correspondants respectivement aux adduits $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour une formule brute $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$.

Par rapport aux produits de départ de la réaction, nous proposons la formule développée suivante qui correspondrait à la condensation de deux unités du carbinol **254**.

La présence d'un ion à m/z 346,0897 $[\text{M}]^+$ correspondant à la formule $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{S}$ est en faveur de cette structure, puisqu'il proviendrait de **255** selon le schéma de fragmentation suivant :



Concernant les spectres RMN ^1H et ^{13}C , ceux-ci devraient être en théorie simplifiés du fait de l'existence d'un plan de symétrie dans la molécule. Les spectres enregistrés dans CDCl_3 (Fig. 103), se présentent toutefois de façon plus complexe qu'attendu, suggérant l'existence d'un nombre plus important de noyaux non équivalents dans la molécule.



Ainsi, on observe distinctement sur le spectre RMN ^1H des signaux correspondants à chacune des unités indoliques, mais aussi aux deux groupements *N*-phénylsulfonamides, avec l'ensemble des signaux correspondant à 32 protons. De même le spectre RMN ^{13}C présente de nombreux signaux « dédoublés », pour un total de 42 carbones (rappelons que dans chaque groupement phényle et *N*-phénylsulfonyles, du fait de la symétrie, les deux carbones C_2/C_6 , C_3/C_5 , $\text{C}_{2''}/\text{C}_{6''}$, $\text{C}_{3''}/\text{C}_{5''}$ résonnent classiquement aux mêmes déplacements chimiques respectifs). Nous avons interprété ces observations par l'existence probable d'une conformation bloquée (Fig. 102).

Par exemple, sur le spectre RMN ^1H , les deux singulets qui intègrent chacun pour un proton (s (1H)) à 7,54 et 7,41 ppm, correspondent aux deux protons indoliques H_2 et H_2' ; les deux doublets larges qui intègrent pour deux protons (dl (2H)) à 7,87 et 7,82 ppm correspondent aux protons $\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{6''}$ de deux *N*-phénylsulfonamides ($\text{H}_{2''}/\text{H}_{6''}$ // $\text{H}_{2'''}/\text{H}_{6'''}$). De même, il est observé un doublet 2H à 7,96 ppm, qui correspond à la superposition des deux signaux des protons indoliques H_7 et H_7' (sur le spectre HSQC, on constate en effet que ce signal corrèle avec deux carbones qui résonnent à 113,8 (C_7) et 113,7 (C_7') ppm).

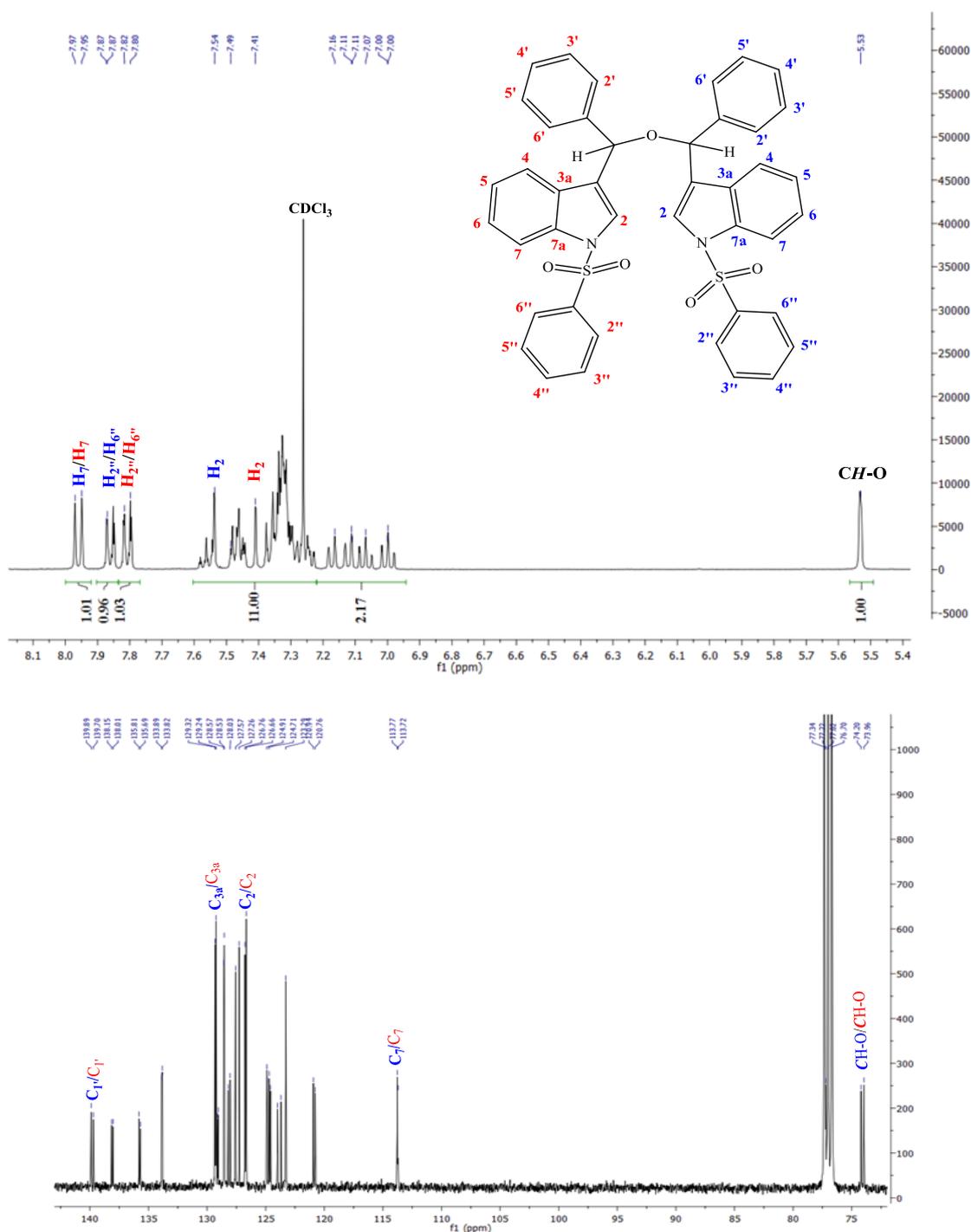


Figure 102 : Spectres de RMN (CDCl₃) ¹H (en haut) et ¹³C (en bas) du composé 255

Par ailleurs, certains signaux en particulier corroborent la structure proposée. Ainsi, les protons reliés au pont éther (**CH-O**) apparaissent sous la forme d'un singulet élargi (sl (2H)) au même déplacement chimique de 5,53 ppm (lorsque le spectre RMN ¹H est réalisé dans l'acétone-*d*₆, ils apparaissent sous la forme de deux sl (1H) à 5,74 et 5,77 ppm). L'analyse du spectre HSQC montre que ces signaux corrélient avec les carbones à 74,2 et 74,0 ppm qui correspondent donc aux **CH-O**. La position du pont éther est confirmée par l'existence sur le spectre HMBC de corrélations

caractéristiques entre les protons indoliques H_2/H_2 et chacun des carbones $CH-O$ qui résonnent à 74,2 et 74,0 ppm, mais aussi entre les protons $CH-O$ et les carbones C_2/C_2 (124,7 et 124,6 ppm), identifiés à l'aide du spectre HSQC par leur corrélation avec H_2 et H_2 , C_{3a}/C_{3a} (129,1 et 129,0 ppm), qui corrélient également avec H_7 et H_7) et $C_{1'}/C_{1'}$ (139,9 et 139,7 ppm).

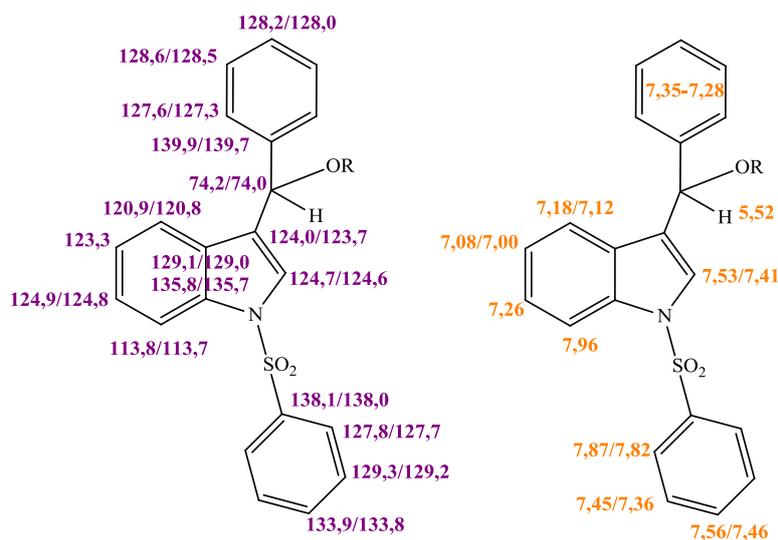


Figure 103 : Attribution des déplacements chimiques des signaux RMN 13C (à gauche) et 1H (à droite) (spectres enregistrés dans $CDCl_3$, à respectivement 100 et 400 MHz).

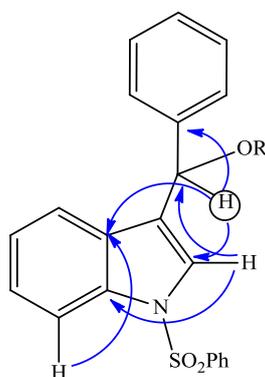
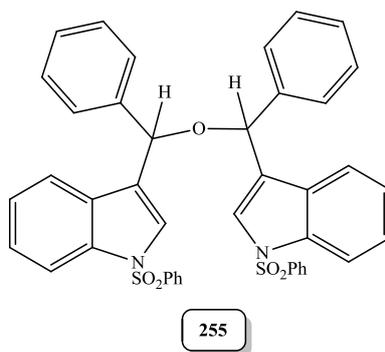


Figure 104 : Principales corrélations en HMBC du composé 255.

Au final, vu que de nombreux signaux sont superposés ou très proches, il faudrait enregistrer les spectres avec un appareil à champ plus élevé pour pouvoir attribuer chaque signal à chaque partie de la molécule. Des tentatives répétées de cristallisation du composé **255** se sont par ailleurs avérées infructueuses. Nous avons donc conclu que le composé **255**, dont la structure est présentée ci-dessous, était un dimère symétrique de deux unités de carbinol **254** de départ.



- Hypothèses sur le mécanisme de formation du composé 255 :

La formation du composé **255** résulte très probablement de l'attaque nucléophile de l'oxygène d'une unité de carbinol **254** sur le carbone benzylique C-1 du mésylate (ou du cation indolénium correspondant) formé à partir d'une autre unité carbinol. Cette réaction (Fig. 105, Voie A) est en compétition avec celle de l'indole qui conduit au PhéDIM attendu **241** (Fig. 105, Voie B).

Par rapport au mésylate/cation indolénium du carbinol **254**, le caractère électrophile du C-1 est plus prononcé en absence de groupements électro-donneurs sur le noyau phényle (-OCH₃) ce qui pourrait expliquer l'importance de la dimérisation dans un contexte de réaction lente avec l'indole (voir *III.B.1.b*). Par ailleurs, il est probable que le HCl libéré lors de la formation des mésylates joue un rôle catalytique dans cette réaction secondaire et provoque également la formation d'autres produits secondaires tels que ceux observés sur plaque CCM.

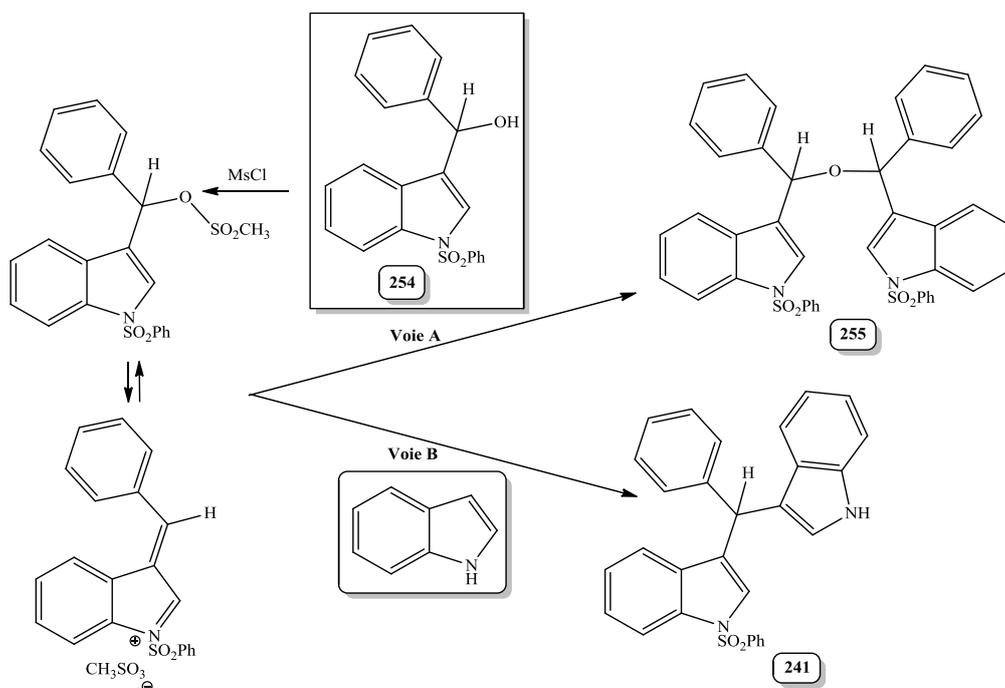


Figure 105 : Mécanisme hypothétique de formation du composé 255.

● Couplage en présence de MsCl et de Et₃N.

Nous avons montré que l'ajout de triéthylamine (Et₃N) en début de réaction augmente significativement le rendement de la réaction et limite la formation de produits secondaires tels que **255**. En effet dans les mêmes conditions que précédemment, mais en ajoutant cinq équivalents de Et₃N, le rendement de formation de **241** atteint 82 %, ce qui est tout à fait similaire au rendement observé pour la formation de **242** sans Et₃N (Tableau 10, entrée 2). Les quantités de réactifs peuvent être limitées à 2,5 équivalents sans variation notable du rendement (Tableau 6, entrée 3). Mais surtout, la cinétique de la réaction est fortement accélérée puisque la réaction n'évolue plus au bout d'une heure seulement (Tableau 6, entrée 4).

Tableau 10 : Conditions spécifiques mises au point pour l'obtention du composé 241

Entrée	Conditions réactionnelles	Durée	Rdt 241 (255)
1	MsCl (5 Eq.), t. a., sous azote	48 h	30 % (20 %)
2	MsCl (5 Eq.), TEA (5 Eq.), t. a., sous azote	2 h	82 % (traces)
3	MsCl (2,5 Eq.), TEA (2,5 Eq.), t. a., sous azote	2 h	78 % (traces)
4	MsCl (2,5 Eq.), TEA (2,5 Eq.), t. a., sous azote	1 h	80 % (traces)

Solvant de réaction : CH₂Cl₂ anhydre ; Rdt : rendement

- Hypothèses sur le rôle catalytique de Et₃N dans la formation du composé 241 :

L'utilisation du chlorure de mésyle seul était fondée sur le principe d'une activation électrophile, ce qui expliquait probablement la formation des produits secondaires. En ajoutant la Et₃N, qui possède à la fois un caractère basique et nucléophile, d'autres mécanismes sont mis en jeu (Fig. 107).

Tout d'abord, dans ces conditions, le rendement et la vitesse de formation de l'ester mésylé sont très probablement fortement augmentés, la Et₃N étant connue pour agir à la fois comme catalyseur basique, mais aussi par activation nucléophile dans les réactions d'estérification ^{214,215}.

Ensuite, celle-ci peut neutraliser le HCl formé, limitant certaines réactions secondaires telles que la polymérisation de l'indole. Enfin, il est probable qu'elle améliore le caractère nucléophile de l'indole par catalyse basique.

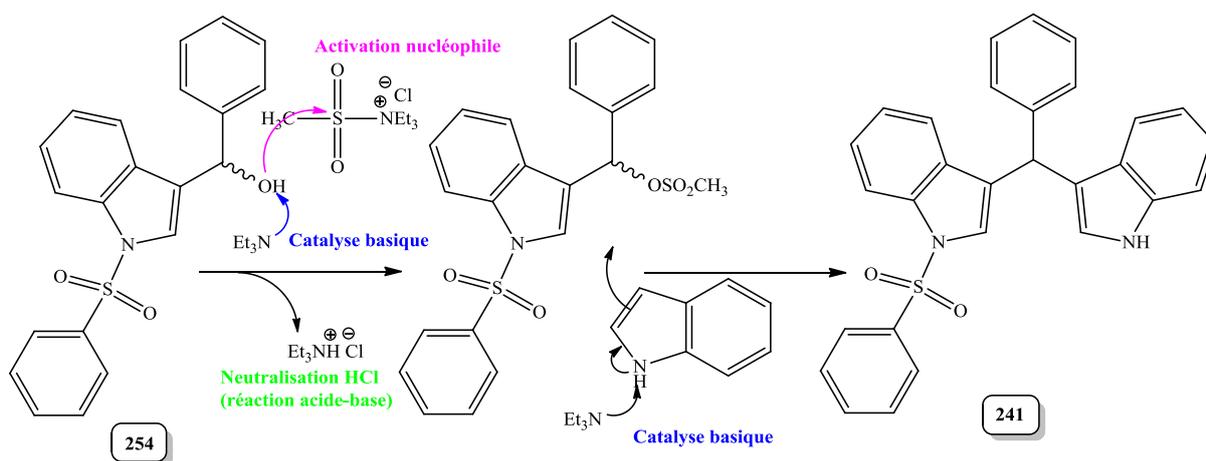


Figure 106 : Rôles catalytiques probables de la triéthylamine dans la réaction de couplage carbinol 254 / 1H-indole.

En conclusion, l'ajout de Et_3N améliore considérablement le rendement et la vitesse de formation de **241**. Il serait maintenant intéressant d'étudier plus en détail la portée de ces conditions « douces » pour la synthèse de PhédIMs non symétriques, en faisant varier la nature des substituants du carbinol et de l'indole.

III.D- Etude structurale des produits d'oxydation des PhédIMs ou PhédIMOX

Contrairement aux PhédIMs que nous avons abordés dans la première partie de ce chapitre, leurs produits d'oxydation font l'objet d'une littérature beaucoup moins abondante.

Nous rappellerons ici l'historique de leur découverte et les voies de synthèse décrites pour accéder à ces composés. Un point important concernera les aspects structuraux des PhédIMOX. En effet, depuis leur découverte comme produit de synthèse, il existe des imprécisions, voire des données erronées rapportées et reprises jusqu'à maintenant. C'est pourquoi les travaux personnels vont porter sur une clarification des données structurales déjà établies pour les PhédIMOX.

III.D.1- Etat des connaissances sur les PhédIMOX : aspects synthétiques et structuraux

- Emile Fisher et les rosindoles :

Dans la continuité de ses travaux sur les PhédIMs, puisqu'il est le premier à en rapporter la préparation (voir l'introduction de ce chapitre), Emil Fisher, accompagné de Philipp Wagner, publie en 1887 la première synthèse et description d'un PhédIMOX dans un article publié dans le journal *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* et intitulé « Ueber Rosindole »²¹⁶.

Cette fois, les auteurs remplacent le benzaldéhyde par du chlorure de benzoyle, qu'ils chauffent sur un bain-marie en présence de deux équivalents de 2-méthyl-1*H*-indole et de ZnCl₂. Ils obtiennent alors un « colorant rouge » qu'ils nomment « diméthylrosindole » et qui apparaît après cristallisation sous forme de cristaux verts irisés.

Le traitement par une base alcaline ou de l'ammoniaque libère la base correspondante se présentant sous la forme de cristaux prismatiques de couleur rouge-jaunâtre et dont les auteurs disent qu'il serait « probablement l'anhydride d'un carbinol », tout en proposant la structure présentée dans la figure suivante (Fig. 107). Le diméthylrosindole est donc le chlorhydrate correspondant de cette base.

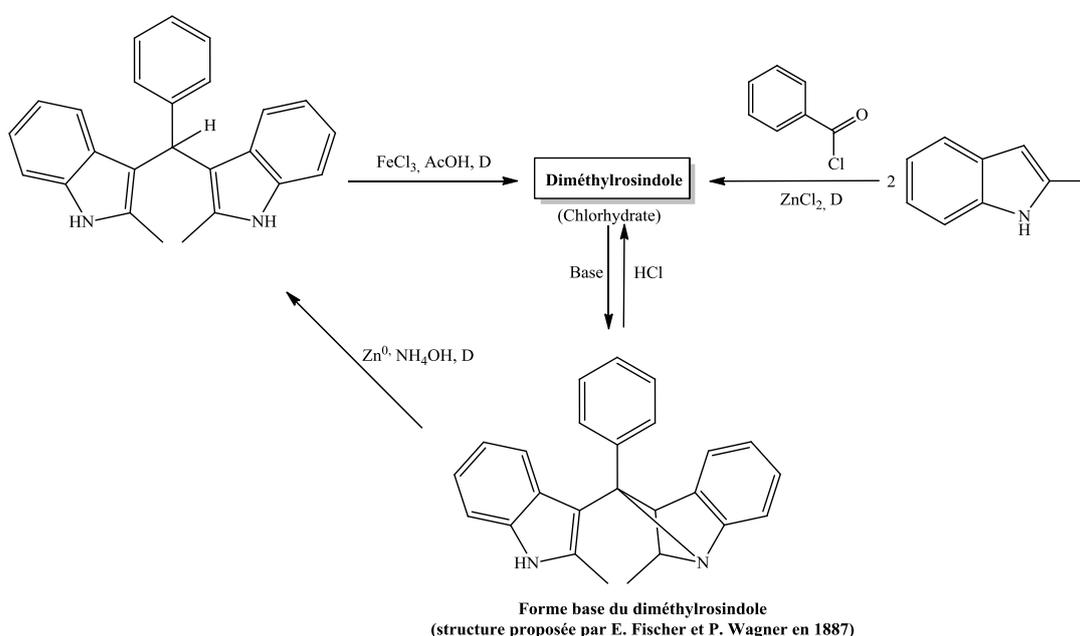
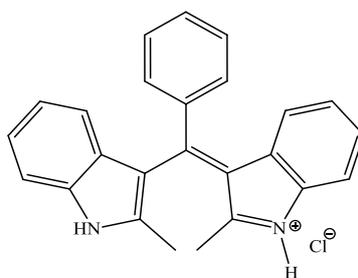


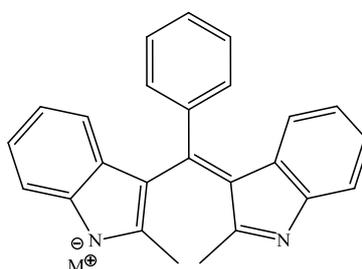
Figure 107 : Première synthèse d'un PhédIMOx, le diméthylrosindole par E. Fischer et P. Wagner ²¹⁶

Les auteurs montrent par ailleurs que la réduction de cette base par le zinc en présence de NH₄OH conduit au phényl-di-(2-méthylindolyl)-3-méthane (= PhédIM) « incolore » et qu'inversement, ce dernier peut être oxydé par FeCl₃ dans l'AcOH glacial afin d'obtenir le diméthylrosindole.

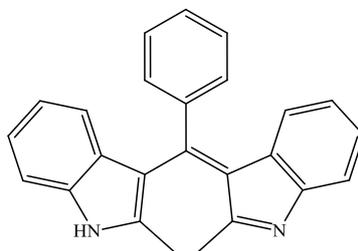
Concernant la structure du diméthylrosindole, celle-ci est décrite dès 1911 par W. König ^{217,218} sous la forme d'un sel d'indoléninium (chlorure pour le composé préparé par E. Fisher, mais aussi perchlorate) :



Nous dénommerons par la suite cette forme comme « iminium » ou « indolénium ». Notons que les auteurs suggèrent qu'en présence de base forte c'est un sel de structure suivante qui est formé^{218,219} :



Dès lors, la base correspondante du diméthylrosindole, sera décrite avec la structure de 3-méthylèneindolénine suivante, que nous appellerons plus simplement forme « imine »^{128,218,219}.



Cette forme « imine » sera systématiquement (à une exception près – voir ci-après) attribuée à tous les PhédIMOx décrits par la suite dans la littérature.

- Voies de synthèse des PhédIMOx :

Si l'on excepte la synthèse de Fischer et Wagner par réaction du chlorure de benzoyle sur le 2-méthyl-1*H*-indole (Fischer and Wagner, 1887), l'accès aux PhédIMOx est toujours réalisé *via* l'oxydation du PhédIM correspondant.

Contrairement aux conditions d'oxydation utilisées par ces auteurs qui sont en milieu fortement acide (FeCl₃, AcOH), et qui conduisent à la formation d'un chlorhydrate, les conditions les plus fréquemment utilisées dans la littérature sont « en milieu neutre » avec la DDQ (2,3-

dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) ou la TCQ (2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone) comme oxydant ^{220–224}. La réaction est le plus souvent menée dans CH₃CN comme solvant (Les principaux PhéDIMOX préparés par cette voie sont présentés dans la Figure 108).

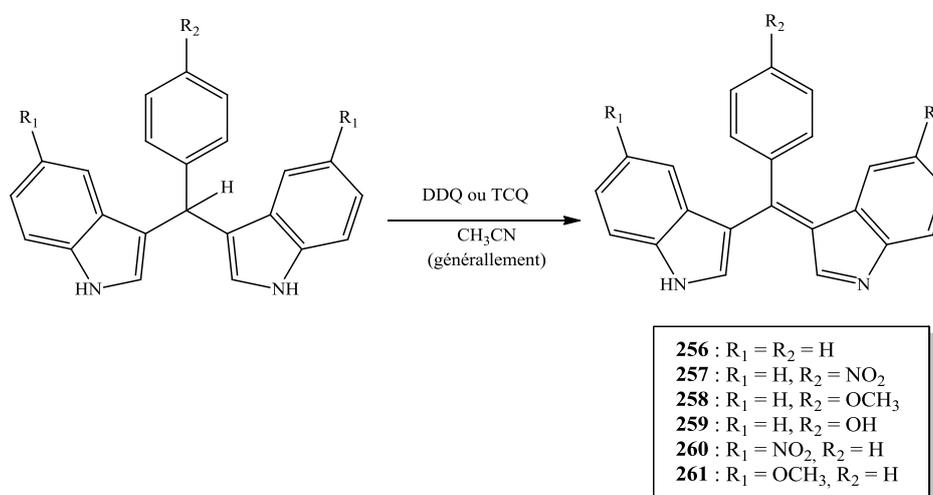


Figure 108 : Oxydation des PhéDIMs par la DDQ ou la TCQ

Ces oxydants sont généralement considérés comme des oxydants agissant soit par transfert d'hydrure ²²⁵, soit par transfert monoélectronique ²²⁶.

Par ailleurs, C. Silveira et coll. ²²⁷ ont montré que CeCl₃·7H₂O en présence d'air pouvait oxyder le PhéDIM **24** de manière quantitative (Fig. 109).

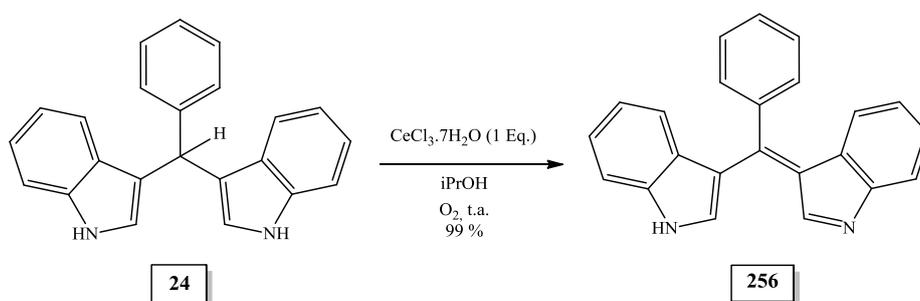


Figure 109 : Oxydation du PhéDIM 1 par CeCl₃·7H₂O ²²⁷

Cet acide de Lewis ayant déjà été utilisé par ces mêmes auteurs comme catalyseur recyclable pour la synthèse de PhéDIMs symétriques ²²⁸, ceux-ci ont mis au point des conditions de synthèse monotope de PhéDIMOX directement à partir d'un indole et d'un benzaldéhyde. Les conditions optimisées, considérées comme respectueuses de l'environnement, utilisent un équivalent de CeCl₃ anhydre dans l'isopropanol, à t.a., en conditions aérobies (voir schéma ci-dessous). La synthèse de plusieurs PhéDIMOX (**256**, **262–264**) par cette approche est ainsi rapportée. Dans ces conditions, la

condensation du *N*-méthyl-1*H*-indole avec la *p*-anisaldéhyde conduit au composé quaternarisé **265** avec un rendement de 91 % (Fig. 110).

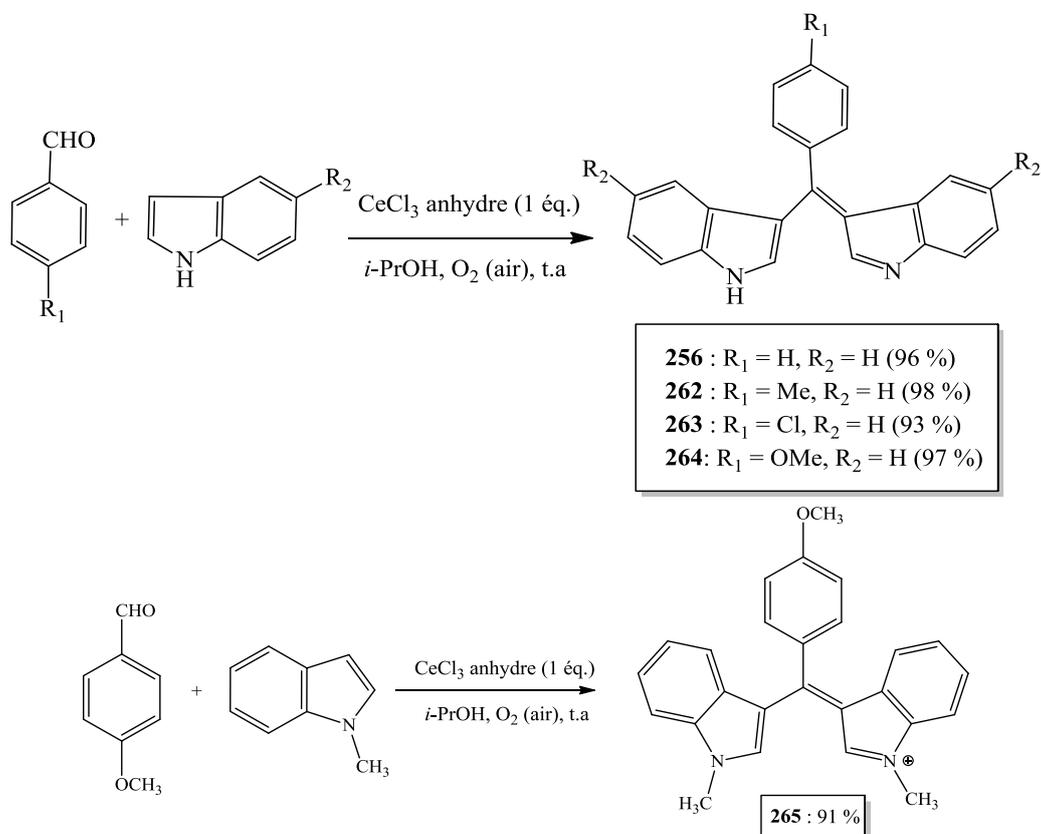


Figure 110 : Synthèse monotope des PhédIMOx **256** et **262-265** à partir des indoles et benzaldéhydes correspondants ²²⁷

Enfin, récemment (2014) une synthèse monotope séquentielle de PhédIMOx à partir de benzaldéhyde et d'indole a été rapportée par A. Khorshidi et coll ²²⁹. Deux équivalents d'indole et un équivalent de benzaldéhyde sont mis en réaction en présence d'oxynitrate de zirconium (IV) hydraté $ZrO(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (5 mole %) dans CH_3CN , à t.a. La DDQ (1,5 éq.) est ensuite ajoutée au mélange réactionnel 3 à 10 min après le début de la réaction. La préparation des 6 PhédIMOx **266-271** est ainsi décrite (voir figure 111 ci-dessous). Il faut noter que tous proviennent de la condensation du 2-méthyl-1*H*-indole et qu'il s'agit des seuls exemples de PhédIMOx décrits dans cette série, en plus bien-sûr de la base du diméthylrosindole décrite par Fischer et Wagner ²¹⁶.

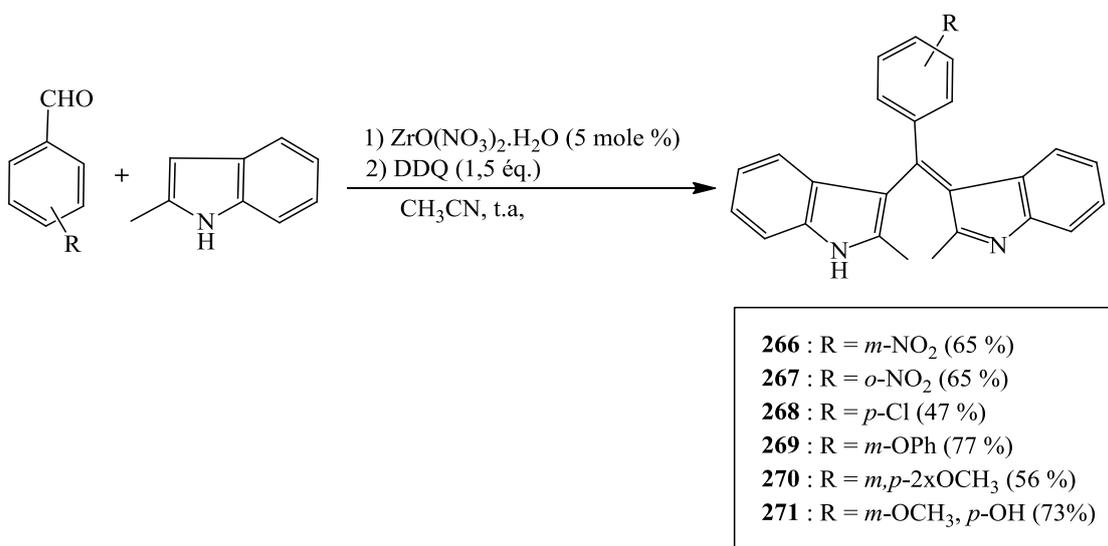


Figure 111 : Synthèse monotopie séquentielle des PhédIMOx 266-271 ²²⁹

- Intérêts des PhédIMOx pour la détection d'ions ou comme indicateurs de pH.

Les PhédIMOx décrits jusqu'à présents, sont utilisés comme indicateurs de pH (Fig. 112) ou chémosenseurs colorimétriques ou fluorescents d'ions métalliques notamment de métaux de transition (Co^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) ou d'ions halogénures (F^- , Br^- , Cl^-), perchlorate (ClO_4^-) acétate (CH_3COO^-), hydrogénosulfate (HSO_4^-) dihydrogénophosphate (H_2PO_4^-) et même d'acides tels que l'aspartate et le glutamate ^{220-224,229}.



Figure 112 : Exemple d'utilisation des PhédIMOx comme indicateur de pH ^{223,224,229}

- Ambiguïtés concernant la structure des PhédIMOx :

Si l'on réalise une observation détaillée des données RMN des parties expérimentales relatives aux PhédIMOx, ou bien de leurs spectres lorsqu'ils sont disponibles, on constate qu'il existe une divergence entre l'interprétation des données expérimentales et la structure proposée de

type « imine » (voir ci-dessus le terme). Nous verrons ci-dessous que ce constat ne s'adresse pas aux PhéDIMOX **266-271** issus de l'oxydation d'un 1,1-di(2'-méthyl-3'-indolyl)-1-phénylméthane (série 2-méthylée), mais dans l'état actuel des connaissances, aux PhéDIMOX non substitués en 2, y compris le composé *N*-méthylé **265** (voir page 128, figure 111).

Par exemple voici le cas représentatif du PhéDIMOX **256**. Ce composé est le plus simple de la série ; sa synthèse est celle la plus fréquemment rapportée dans la littérature et nous l'avons donc utilisé comme modèle pour la suite de nos travaux. L'interprétation du spectre RMN ^1H de ce composé (enregistré ici dans DMSO-*d*₆), et sur lequel nous reviendrons dans la partie sur les travaux personnels, n'est pas compatible avec la forme imine **256a** proposée par les auteurs, dans le cas présenté par Silveira et coll ²²⁷. Le nombre, la taille et la forme des signaux suggèrent au contraire pour ce composé une structure symétrique telle que **256b** (Fig. 113). On remarquera également que les signaux des NH ne sont pas visibles (ou rapportés vue l'échelle du spectre) sur ce spectre.

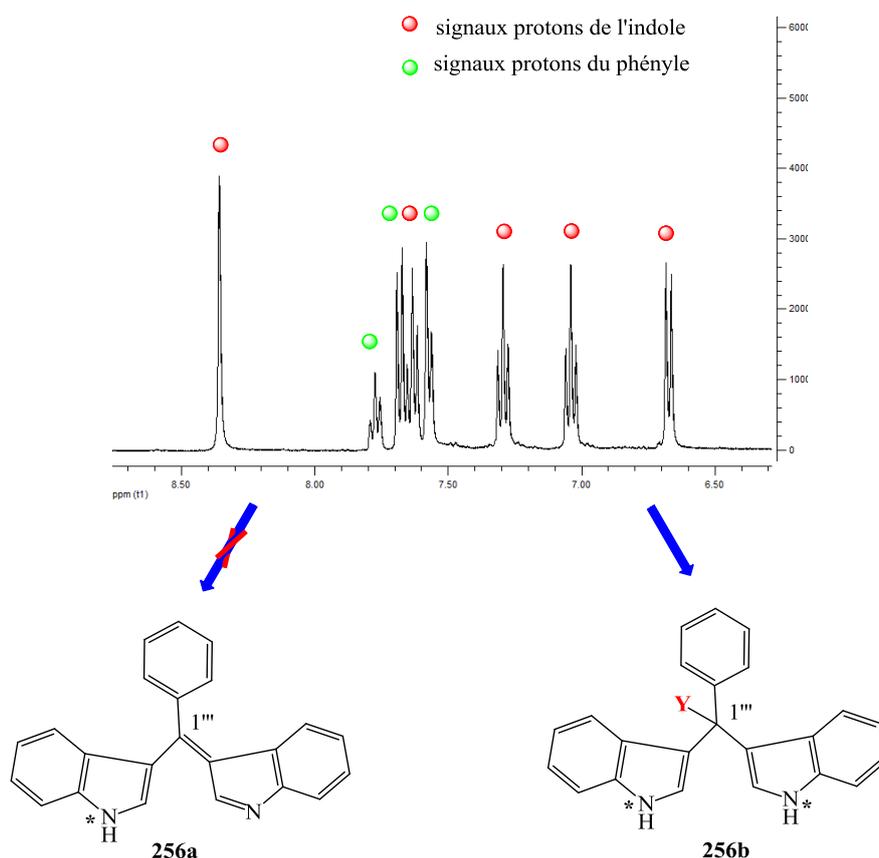


Figure 113 : Spectre RMN proton du composé **256** dans le DMSO-*d*₆ ²²⁷, (*) signal de NH non observé ; **256a** formule décrite dans la littérature et **256b** formule suggérée

Etonnamment, ces mêmes auteurs s'appuient pour leur détermination structurale sur la structure obtenue par diffraction aux RX de cristaux du composé **256** (Fig. 114), soit disant sous cette forme imine **256a** ... en omettant toutefois de préciser (sauf dans le « Supplementary

material ») qu'il s'agit en fait d'un chlorhydrate d'iminium (ou indoleninium) comme pouvaient l'être les rosindoles de Fischer.

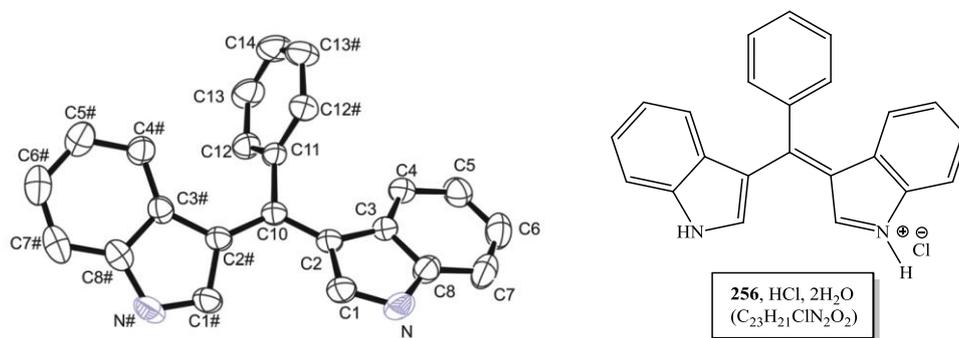


Figure 114 : Structure par diffraction aux RX du PhéDIMOX 256 (en réalité le chlorhydrate dihydraté) ²²⁷

Il existe donc clairement un doute sur la structure ou forme adoptée par les PhéDIMOX en solution d'une part, mais aussi à l'état solide.

Dans ce contexte, la publication de D. Gillespie et coll. (2002) est passée relativement inaperçue. Ces auteurs y rapportent en effet l'isolement d'un antibiotique appelé turbomycine B (Fig. 115) à partir d'une bibliothèque métagénomique d'ADN microbiens issus du sol et exprimés dans *Escherichia coli* ²³⁰.

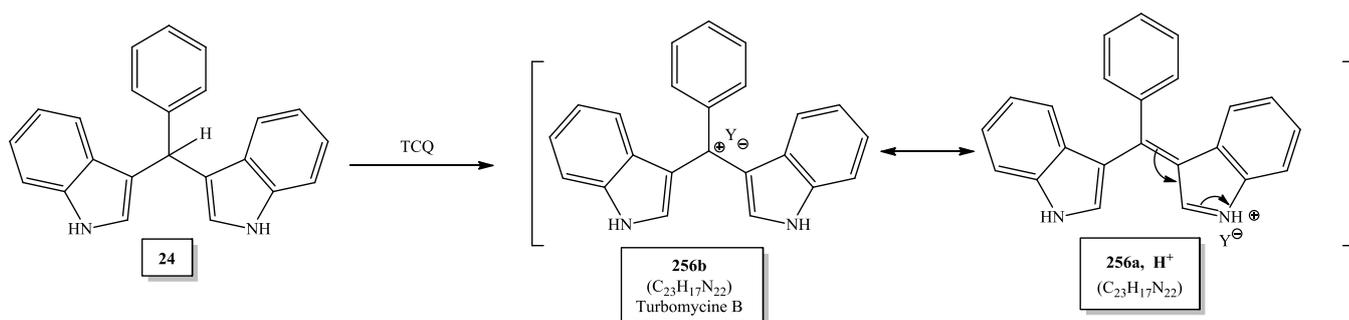


Figure 115 : Structure de la turbomycine B et synthèse de ce composé à partir de 24 ²³⁰.

La structure du composé a été établie sur la base de ses spectres RMN ¹H et ¹³C comme étant le triarylcation présenté sur la figure ci-dessus. Cette structure est compatible avec la forme symétrique **256b** évoquée précédemment. En outre, ce composé présente les mêmes caractéristiques spectrales que le produit d'oxydation du PhéDIM **24** par la TCQ ²³⁰.

Toutefois, la nature du contre-ion (Y) n'est pas précisée et une fois encore les auteurs n'observent pas les signaux correspondants aux NH sur le spectre RMN ^1H , mais les spectres sont enregistrés dans CD_3OD .

D'un point de vue formel on peut considérer ce cation triarylique (équivalent à **256b**) comme une forme de résonance du cation indoléninium (**256a**, H^+).

Ce composé n'est pas un artéfact, il a en effet été isolé ultérieurement (2010), ainsi que le PhéDIM **24**, d'une bactérie marine du genre *Vibrio* isolée à la surface du corail *Sinularia polydactyla* collecté dans la Mer Rouge ¹⁰².

La turbomycine B a par ailleurs été évaluée par D. Gillepsie et coll. pour ses activités antibiotiques potentielles sur un panel de microorganismes et présente au final un large spectre d'activité (les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ne sont pas précisées pour ce composé) (Fig. 116). La turbomycine B étant indéniablement un PhéDIMOX, il s'agit là - à notre connaissance - de la seule étude rapportant une activité biologique pour un composé de cette série.

Antibiotic activities of synthetic and natural turbomycins A and B				
Organism and strain	Growth inhibition ^a by:			
	Turbomycin A		Turbomycin B	
	Synthetic	Natural	Synthetic	Natural
Gram-negative bacteria				
<i>E. herbicola</i> IRQ	+	+	+	+
<i>E. coli</i> HS997	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>P. aeruginosa</i> 9020	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium LT2	+	+	+	+
Gram-positive bacteria				
<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i> 1003	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> BR151 pPL608	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> 4025	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 3001	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8P01	+	+	+	+
<i>S. griseus</i> 6501	+	+	+	+
Fungi or Protists				
<i>C. guilliermondii</i> Y001	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>P. ultimum</i> 1033	-	-	-	-
<i>F. solani</i> (f. sp. <i>glycine</i>) 90.1	-	-	-	-

^a +, 2- to 13-mm zone; +/-, 1-mm zone, -, no zone of inhibition.

Figure 116 : Activités antibiotiques de la turbomycine B (isolée vs synthétique) ²³⁰. Abréviations : G+ : *Erwinia (herbicola)*, E : *Escherichia (coli)*, P : *Pseudomonas*, S : *Salmonella* ; G- : B : *Bacillus*, E : *Enterococcus*, S : *Staphylococcus (aureus)*, S : *Streptococcus (pyogenes)*, *Streptomyces (griseus)* ; Champignons/levures : C : *Candida*, P : *Pythium*, F : *Fusarium*.

Remarque :

Nous avons rapporté précédemment les travaux de A. Khorshidi et coll. concernant une synthèse monotopie séquentielle de PhédIMOx à partir de benzaldéhyde et d'indole ²²⁹. Après analyse de ces travaux, et en particulier des données spectrales fournies (relevé, pas de spectres), il s'avère que les PhédIMOx **266-271**, issus de l'oxydation d'un 1,1-di(2'-méthyl-3'-indolyl)-1-phénylméthane par la DDQ, semblent eux bien se présenter en solution sous forme imine, de nombreux signaux RMN étant dissociés.

Aux vues de ces données, il nous a semblé intéressant de réaliser une étude structurale complémentaire en prenant le composé **256** comme modèle (composé représentatif, plusieurs fois décrits dans la littérature, avec des données spectrales disponibles), en distinguant l'état solide de l'état en solution. Des informations directes sur la structure de ce composé en solution ont pu être déduites à partir des spectres RMN ¹H et ¹³C réalisés dans des solvants appropriés. Nous nous sommes parallèlement intéressés à sa formation à partir du PhédIM **24** en réalisant un suivi de l'étape d'oxydation par RMN et spectrométrie de masse (SM). Des informations indirectes ont pu par ailleurs être obtenues à partir de l'analyse spectrale de deux PhédIMOx apparentés **272** et **273** (Fig. 117)*. Leur préparation à partir des PhédIMs correspondants respectifs **241** et **30** a là aussi été suivie directement par RMN et SM.

Enfin, nous avons étudié la structure de **256** à l'état solide, en réalisant des expériences d'analyse thermogravimétrique (TGA), associées à de l'imagerie microscopique.

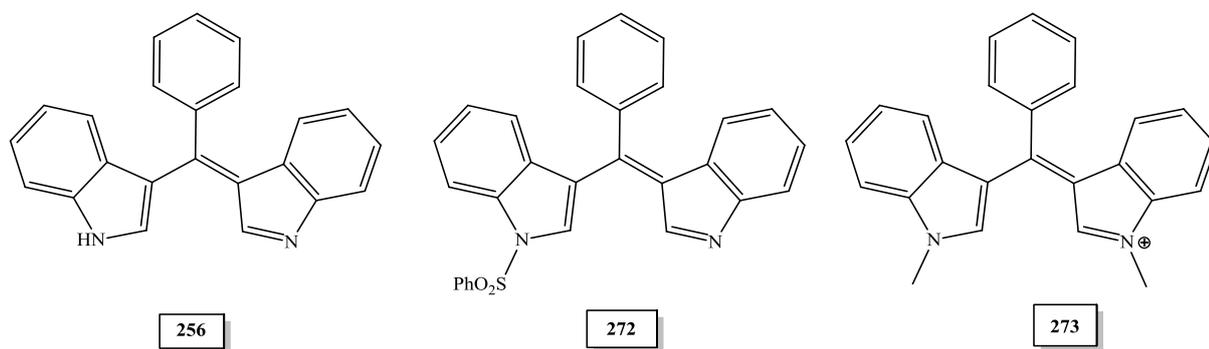


Figure 117 : Structure des deux PhédIMOx 272 et 273 apparentés à 256 (*représentation "admise" des structures au début de l'étude).

III.D.2- Analyse structurale du composé 256 en solution

III.D.2.a- Recoupement des différentes données de la littérature et hypothèse du carbinol

Comme nous l'avons précédemment rapporté dans le paragraphe III.D.1, la structure du PhédIMOx **256** est généralement décrite dans la littérature sous la forme imine **256a**, ou plus rarement sous la forme symétrique **256b** (en l'occurrence la forme carbocation décrite par Gillespie et coll., qui n'est autre que le composé naturel dénommé turbomycine B) ²³⁰.

Nous avons donc préparé le composé **256** et comparé ses données spectrales (RMN et SM) avec celles de la littérature.

L'oxydation du PhédIM **24** est réalisée en présence de DDQ (1,2 éq.) dans l'acétonitrile à température ambiante (Fig. 118). Il se forme un précipité qui est filtré et recristallisé dans l'éthanol 96 % (rendement final 48 %).

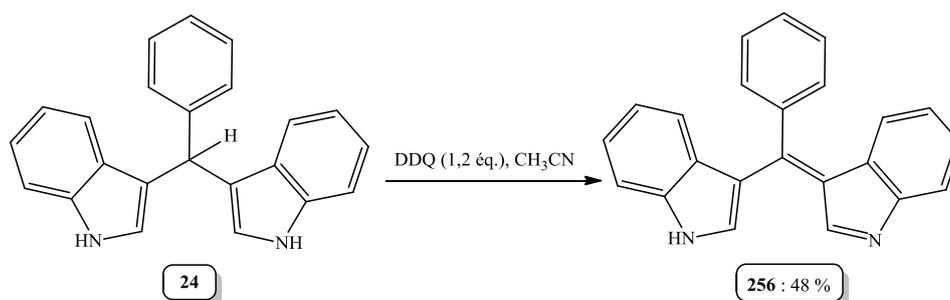


Figure 118 : Synthèse du PhédIMOx **256**.

Le spectre RMN ¹H de ce composé a été enregistré à la fois dans CD₃OD pour comparer les données avec celles obtenues pour la turbomycine B « naturelle » ou de synthèse ²³⁰, et dans le DMSO-*d*₆, afin de comparer les données avec celles par exemple récemment publiées de Silveira et coll. ou de He et coll. ^{220,227}. Les spectres étant tout à fait comparables, nous confirmons ainsi que la turbomycine B et le PhédIM **256** sont la même molécule et qu'elles adoptent la même structure symétrique en solution.

En outre, contrairement à ces auteurs nous observons sur le spectre RMN ¹H enregistré dans le DMSO-*d*₆ un signal large à 13,93 ppm intégrant pour 2H, échangeable par D₂O, pouvant donc être attribué aux deux protons NH. Toutefois, ce signal n'est pas visible lorsque le lot de DMSO-*d*₆ utilisé contient une proportion importante d'eau, probablement à cause de phénomènes d'échange chimique (la nature du solvant est également importante, puisque le signal est également non visible dans CD₃CN, même séché sur tamis).

En comparant le spectre de **256** avec celui du PhéDIM **24**, enregistrés tous les deux dans le DMSO-*d*₆, on constate par ailleurs que le signal des protons H_{2-2'} apparaît à 8,68 ppm (sl, 2H) contre 6,81 ppm (d, *J* = 2,4 Hz, 2H) dans le cas de **24**. Ce déplacement vers les champs faibles est bien-sûr corrélé avec la disparition du signal du CH méthanique qui résonne à 5,82 ppm (s, 1H). Le spectre de **256** comporte 9 types de signaux, contre 10 dans le cas de **24**, ce qui traduit bien l'existence d'une symétrie dans les deux molécules.

Ces signaux remarquables ont également été observés en utilisant le DMF-*d*₇ (à faible proportion en eau) comme solvant RMN et dans lequel le PhéDIMOX **256** est beaucoup plus soluble (24 mg/750 µl). Ainsi, les protons NH apparaissent sous la forme d'un singulet large intégrant pour 2H et résonnent à 14,14 ppm, alors que les H₂ apparaissent sous la forme d'un autre singulet large (2H) à 8,83 ppm (Fig. 119).

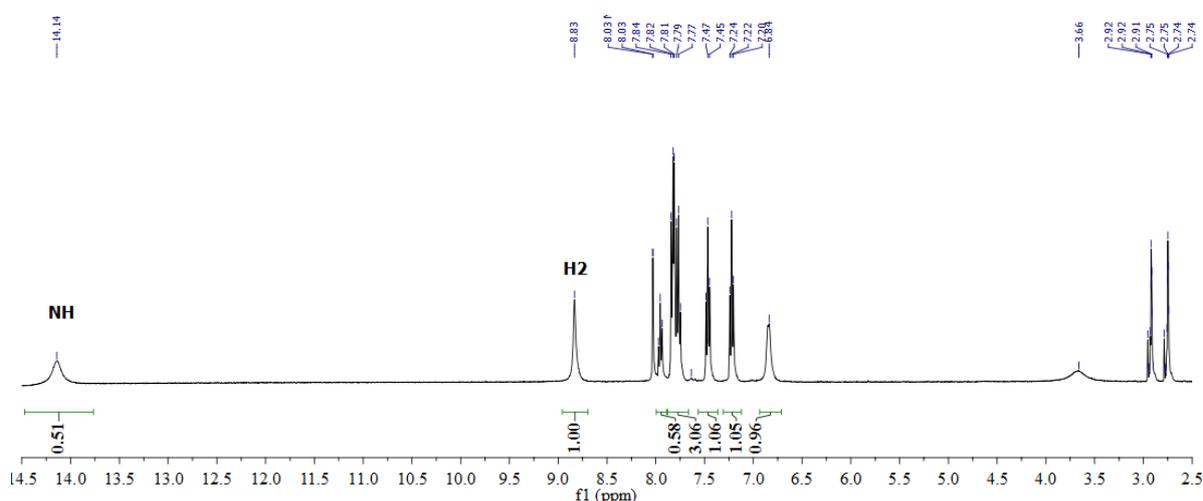


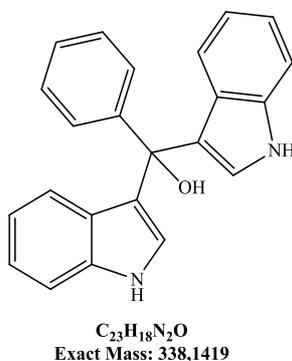
Figure 119 : Spectre de RMN du composé 256, enregistré dans DMF-*d*₇

Sur le spectre RMN ¹³C, qui ne comporte que 13 signaux, les signaux du carbone central et du C-2 sont fortement déblindés puisqu'ils apparaissent respectivement autour de 170 ppm (170,2 ppm dans DMSO-*d*₆ / 170,4 ppm dans DMF-*d*₇) et 148 ppm (148,1 ppm dans DMSO-*d*₆ / et 147,9 dans DMF-*d*₇). Il faut remarquer que le signal à 170 ppm est de faible intensité et nécessite un nombre important d'accumulations, probablement du fait d'une très mauvaise relaxation.

Par comparaison, le déplacement chimique du signal du carbone central est de 40,5 ppm sur le spectre ¹³C du PhéDIM **24** (DMSO-*d*₆)²³¹.

L'ensemble de ces données est compatible avec la structure proposée par Gillepsie et coll. pour la turbomyicine B. Toutefois, il n'est fait aucune précision de la nature du contre-ion associé au carbocation.

Vu les conditions de synthèse de **256**, l'absence de signaux RMN ^1H et ^{13}C laissant penser à l'existence d'adduits avec des réactifs ou solvants, et par analogie avec les travaux réalisés sur les sels de tris(indol-3-yl)méthylum ^{232,233}, nous avons émis l'hypothèse que ce composé était un carbinol plus ou moins dissocié, même si aucun signal relatif au groupement OH ne peut être directement observé (spectre RMN ^1H).



La réalisation de spectres ^1H à basse température (jusqu'à -41°C), (Voir annexes, figure 163a-g) n'a pas donné de résultats totalement probants (tel que l'apparition d'un signal OH bien distinct). À cette température la plus basse, on voit nettement un dédoublement des signaux et l'apparition d'une forme minoritaire (dans un rapport 75/25). Toutefois, même si certains signaux de la forme minoritaire sont superposés avec ceux de la forme majoritaire, ils sont toujours caractéristiques d'une forme présentant une symétrie. Il est probable qu'il s'agisse donc d'un rotamère. On constate également que le signal large à 3,57 ppm (à 20°C) résonne, à la température de -41°C , à 4,11 ppm et apparaît sous la forme d'un signal fin. Vu son δ , ce signal peut être attribué à H-O-D, mais le signal du carbinol pourrait se trouver superposé à ce signal par phénomène d'échange chimique (voir la conclusion ci-après).

L'analyse par spectrométrie de masse n'est pas plus informative, mais elle ne reflète pas non plus vraiment le comportement des molécules en solution. En effet, le spectre de masse ESI+ de ce composé présente un ion m/z 321 correspondant à la formule brute $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_2$ et décrit dans la littérature comme l'adduit $[\text{M}+\text{H}]^+$ ^{220,227}, mais qui peut aussi correspondre au carbocation triarylique (soit $[\text{M}-\text{OH}]^+$ selon l'hypothèse que **256** est un carbinol. Il s'agit de toute façon de deux formes mésomères ce qui les rend impossibles à distinguer. En mode ESI-, on observe un ion m/z 319 dont la formule possible est présentée ci-dessous (Fig. 120).

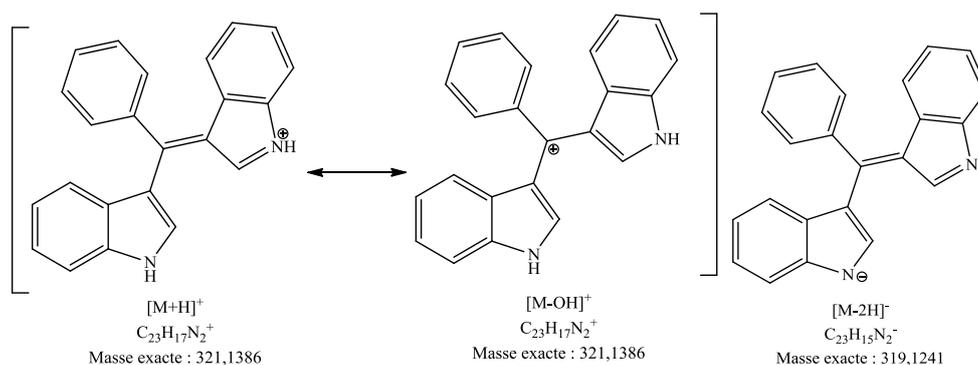


Figure 120 : Structures possibles des ions m/z 321 (ESI+) et 319 (ESI-).

Par ailleurs, l'analyse de l'échantillon en présence de D_2O permet d'observer en ESI+ un ion m/z 323 correspondant à l'échange de deux protons acides (formule : $[C_{23}H_{15}D_2N_2]^+$), tandis qu'en mode ESI-, l'ion m/z 319 reste inchangé, confirmant ainsi les structures proposées pour ces ions.

En conclusion même s'il est probable que **256** existe en solution sous la forme d'un carbinol, nous n'avons pas de preuves spectrales absolues de la présence de cette fonction. L'absence de signal clairement visible pour le -OH en RMN 1H est probablement là aussi due à un phénomène d'échange chimique, d'autant plus que la forme carbinol ne diffère de la forme imine que par l'addition d'une molécule d'eau et qu'il doit pouvoir se produire des échanges avec l'eau présente dans le solvant deutérié et par conséquent entraîner la coalescence des signaux.

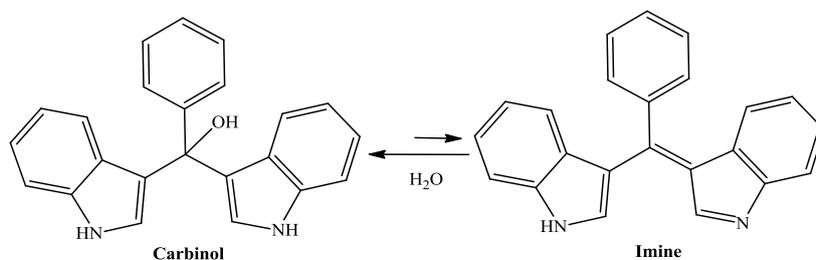


Figure 121 : Equilibre probable entre les formes carbinol et imine.

Comme nous le verrons ensuite, nous avons pu obtenir des preuves directes de l'existence d'une structure de type carbinol sur des dérivés de **256**, en cherchant à stabiliser le carbinol et/ou limiter les équilibres réactionnels avec l'eau environnante (dérivé mono *N*-sulfonylé ou *N,N'*-diméthylé).

Avant de présenter ces résultats, il sera fait une remarque concernant la coloration des PhéDIMs.

● Remarque concernant la coloration des PhédIMs.

Les PhédIMs sont toujours décrits dans la littérature comme des produits colorés alors qu'ils ne devraient pas l'être. Nous mêmes, ainsi que d'autres auparavant ¹²⁸ faisons la remarque que s'ils sont pour la plupart incolores au départ, ils deviennent rapidement colorés au contact de l'air, avec des teintes de jaune à marron en passant par le rouge en fonction des substitutions.

Même si la réponse peut sembler évidente, il n'est fait nullement mention dans la littérature d'une analyse du ou des produits de dégradation responsables de cette coloration.

Nous avons donc montré par analyse chromatographique et spectrale que la coloration du PhédIM **24** était bien due à la présence de PhédIMOX **256**. Ce composé peut être identifié par chromatographie sur couche mince (CCM) (Fig. 122) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Fig. 123) d'un échantillon provenant d'un lot fraîchement préparé de PhédIM **24**, par comparaison du R_f/t_R avec un témoin de PhédIMOX **256** synthétisé en présence de DDQ. La proportion de **256** est estimée dans ce cas inférieure à 0,9 % (mais aucune étude de stabilité n'a été mise en œuvre pour estimer la vitesse d'oxydation de **24**). Enfin, nous avons isolé par chromatographie sur colonne de silice la « substance rouge » en partant d'une quantité conséquente de PhédIM **24** et montré la parfaite correspondance des spectres RMN ¹H et de masse avec ceux de **256**.

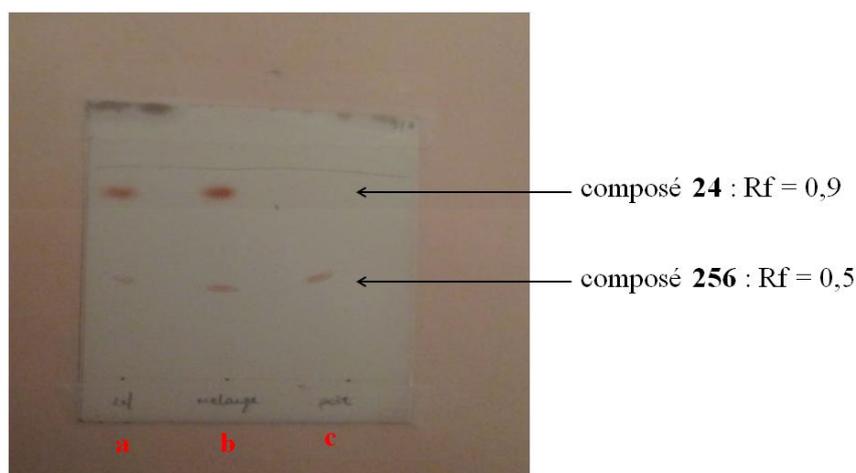


Figure 122 : CCM sur silice d'un échantillon de PhédIM **24**, ligne **a** : PhédIM **24** seul, ligne **b** : mélange **24** + **256**, ligne **c** : PhédIM oxydé **256** seul (R_f 0,5). Éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$: 9/1/0,01 (V/V/V). Observation sans révélation. La tache correspondant au PhédIM **24** (R_f 0,9) d'abord incolore devient elle aussi rouge après séchage de la plaque.

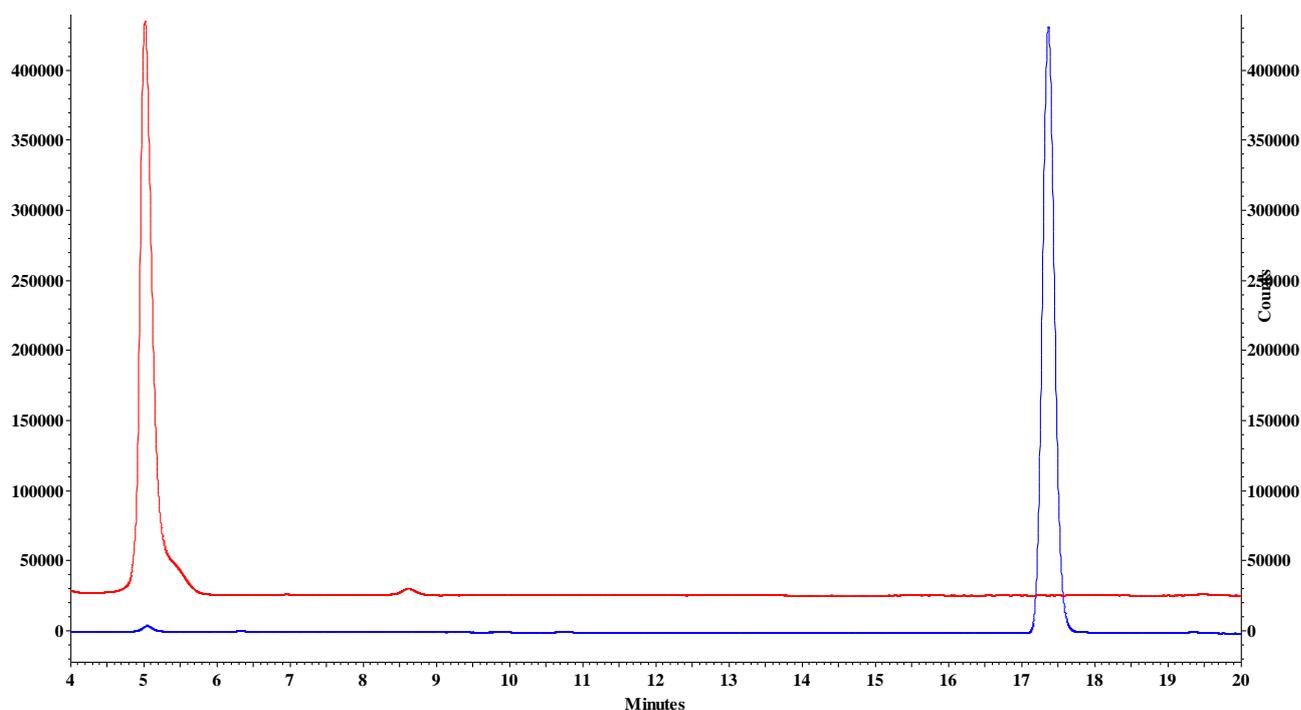
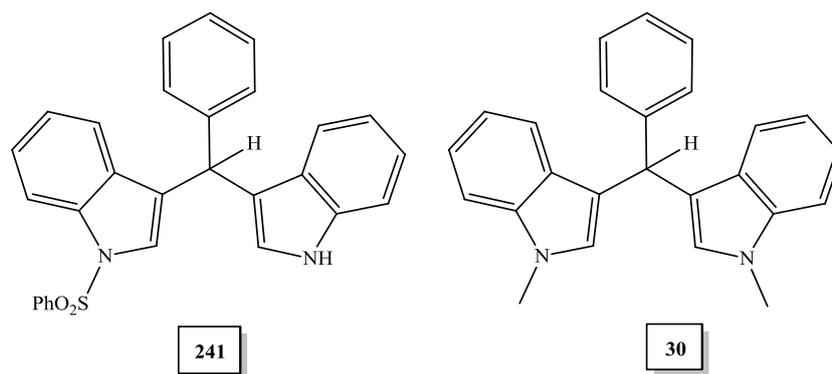


Figure 123 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé bleu : PhéDIM **24** ($t_R = 17,4$ min), tracé rouge : PhéDIMOx **256** ($t_R = 5,1$ min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient CH₃CN/TFA 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), c = 0,05 mg/mL, $\lambda = 292$ nm, 20° C, 20 μ l).

III.D.2.b Etude de l'oxydation des PhéDIMs **241** et **30**

Devant l'impossibilité de caractériser la fonction carbinol du PhéDIMOx **256**, nous avons étudié l'oxydation des PhéDIMs **241** et **30**, dont les structures sont rappelées ci-dessous, avec pour objectif de stabiliser et donc permettre de caractériser le carbinol supposé formé.



En effet, une fois l'oxydation réalisée, l'absence de proton indolique libre N-H devrait permettre de limiter les phénomènes d'équilibre avec l'eau et en quelque sorte la « piéger ».

III.D.2.b.1 Synthèse et étude structurale du PhéDIMOx 272 issu de l'oxydation du PhéDIM 241.

L'oxydation du PhéDIM **241** a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'obtention de **256** (1,2 éq. DDQ, CH₃CN, t.a.). En l'absence de précipité, le composé d'oxydation a dû être purifié par chromatographie sur colonne, soit en phase normale (voie A : silice), soit en phase inversée (voie B : silice greffée C18, en présence ou non d'acide trifluoroacétique (TFA) dans la phase mobile). Au final nous obtenons de faibles rendements liés au processus de purification (respectivement 10 %, (C18/TFA dans la phase mobile) et 5 % (C18/ pas de TFA dans la phase mobile)).

● Analyse du composé 272 par RMN :

Tout d'abord, il faut préciser que les observations réalisées sont globalement similaires quelques soient les solvants utilisés (*i.e.* CDCl₃, (CD₃)₂CO, DMSO-*d*₆ et CD₃CN). Vu les nombreuses conditions expérimentales testées et la complexité des résultats, seul sera rapporté ici l'essentiel de ces travaux.

Le spectre RMN ¹H du composé isolé par la voie A ou la voie B sans TFA apparaît dans tous les cas de solvants, comme un mélange d'un composé très majoritaire et de composés minoritaires. Les proportions du mélange évoluent dans le temps, le composé initialement majoritaire se transformant progressivement en ces composés initialement minoritaires.

Le composé initialement majoritaire dans le mélange a pu être identifié comme étant un carbinol (**272a**) en particulier du fait de la présence (exemple du spectre enregistré dans l'acétone-*d*₆) d'un signal 1H à **10,16** ppm correspondant au NH et d'un signal 1H facilement échangeable par D₂O résonnant à **5,14** ppm et correspondant au -OH (Fig. 124A). Ces signaux sont observés respectivement à un δ de **8,11** et **3,04** ppm dans CDCl₃ et de **9,21** et **4,24** ppm dans le cas de CD₃CN. La valeur du δ du carbone central est aussi caractéristique, puisque celui-ci résonne à 75,43 ppm sur le spectre ¹³C enregistré dans l'acétone-*d*₆. (Voir annexes, figure 164)

Concernant les produits initialement minoritaires, nous avons conclu qu'il s'agissait très probablement des formes « imine » et « indoléninium » (Fig. 124B) correspondantes.

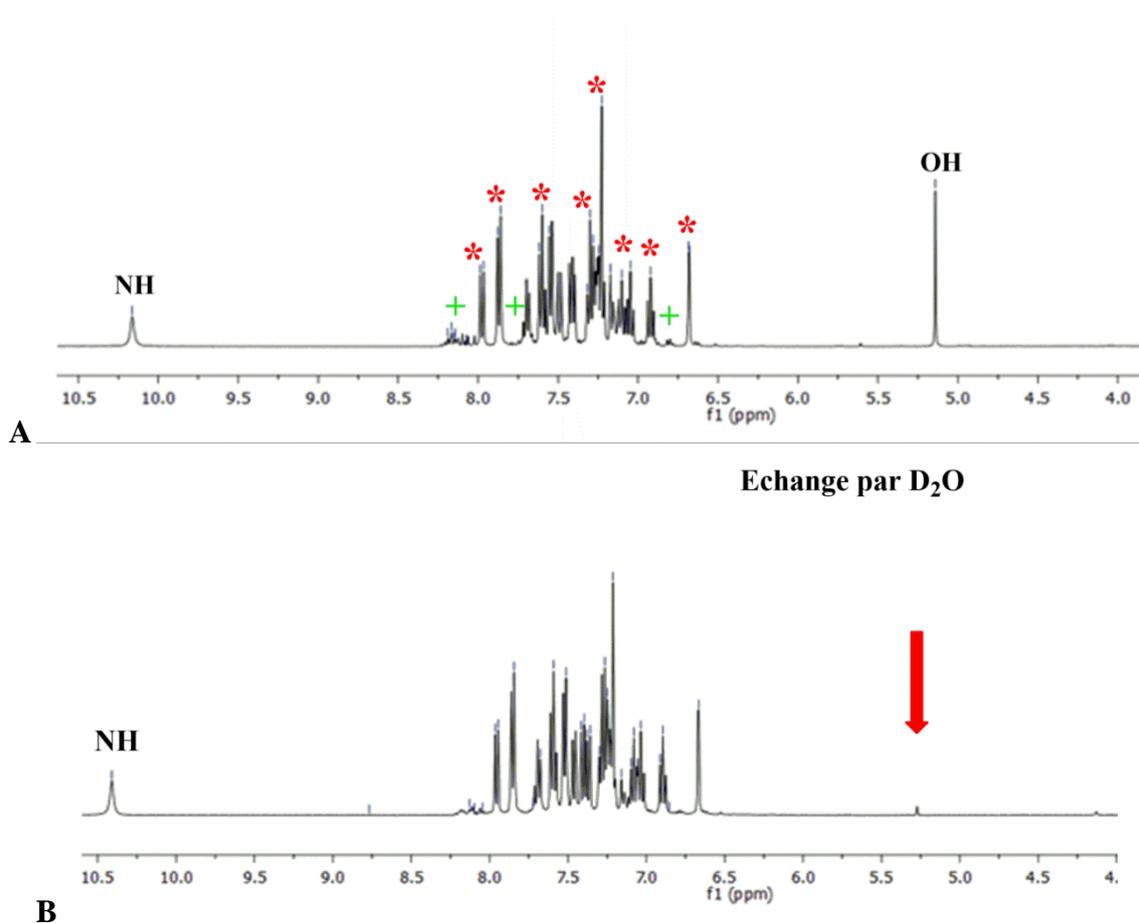


Figure 124 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, solvant : acetone- d_6) ; A) du mélange complexe obtenu après oxydation du 241 : *forme carbinol majoritaire, + formes « indolénium » et « imine » minoritaires. B) Mise en évidence de la forme carbinol 272a par échange par D_2O du signal $-\text{OH}$ à 5,14 ppm

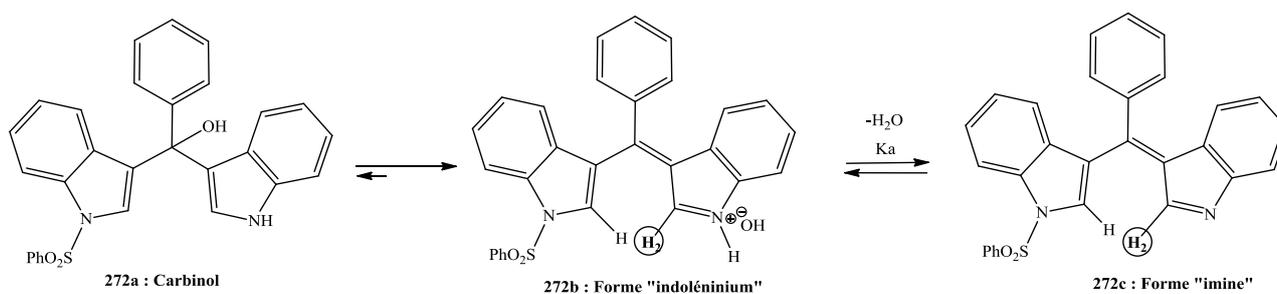


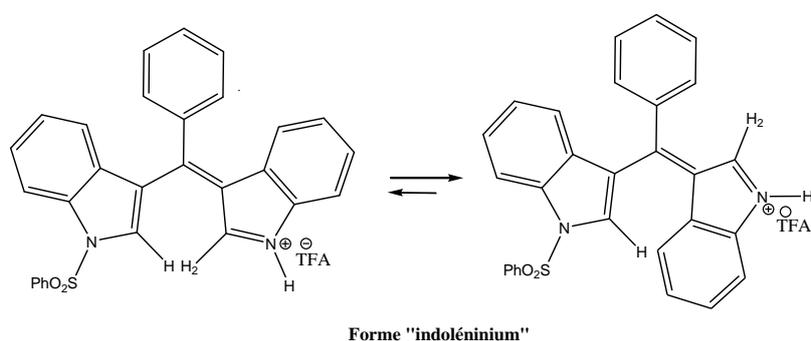
Figure 125 : Structures des formes carbinol, « imine » et « indolénium » du Phédimox 272.

En effet, même si les spectres des mélanges sont complexes à analyser, nous avons montré que l'existence de ces trois formes était liée et qu'il était possible de transformer ce mélange en la seule forme « indolénium ».

Ainsi, on constate au bout de 5 jours de conservation à t.a. que le spectre RMN ^1H (enregistré dans CDCl_3) est profondément modifié. L'ajout de TFA directement dans le tube RMN modifie à nouveau l'aspect du spectre. Les signaux du carbinol sont toujours majoritaires, mais on voit se détacher du reste du spectre deux signaux déblindés à un δ de respectivement 8,29 et 7,99 ppm.

Finalement, le contenu du tube a été évaporé et le résidu repris dans CDCl_3 . Le spectre obtenu ne présente plus aucun des signaux correspondants au carbinol et apparaissent nettement parmi tous les signaux deux singulets à respectivement **8,74** et **8,39** ppm (Voir annexes, figure 165-167). Ces deux signaux n'intègrent pas pour la même valeur (suivant les cas de 1 pour 0,9 à 1 pour 0,8). Nous avons interprété ces signaux comme étant ceux du proton H-2 de deux isomères de type « *cis-trans* » de l'indoléninium.

Ce spectre (aux proportions des signaux près) est strictement identique à celui obtenu dans le même solvant pour le composé purifié par chromatographie C18 en présence de TFA dans la phase mobile.



Lorsque le spectre de la « forme indoléninium » est enregistré dans CD_3CN , les signaux du H-2 apparaissent à respectivement 8,69 et 8,37 ppm (rapport 1 pour 1 observé dans deux expériences indépendantes). Dans ce cas, on peut également observer deux autres signaux d'apparence très similaires aux précédents, mais plus petits en taille, à savoir deux singulets de même intensité relative, à des δ de respectivement à 8,34 et 8,28 ppm (Voir annexes, figure 168). Par rapport aux protons H-2 de l'indoléninium leur *ratio* mesuré dans les deux expériences est de 0,2 et 0,5 pour 1. Nous avons conclu que ces signaux correspondaient probablement aux H-2 de la « forme imine », en équilibre avec la « forme indoléninium » *via* la constante d'acidité K_a .

Le lien existant entre ces trois formes a finalement été mis en évidence en réalisant la réaction d'oxydation directement en tube. Comme le montre le spectre présenté ci-après (Fig. 126), et enregistré au bout de 1 h, la réaction est totale et les quatre signaux précédemment citées sont clairement visibles, ainsi que ceux correspondant au carbinol. Cette expérience prouve également que les faibles rendements obtenus lors de la préparation du PhédIMOx sont liés à leur purification sur colonne.

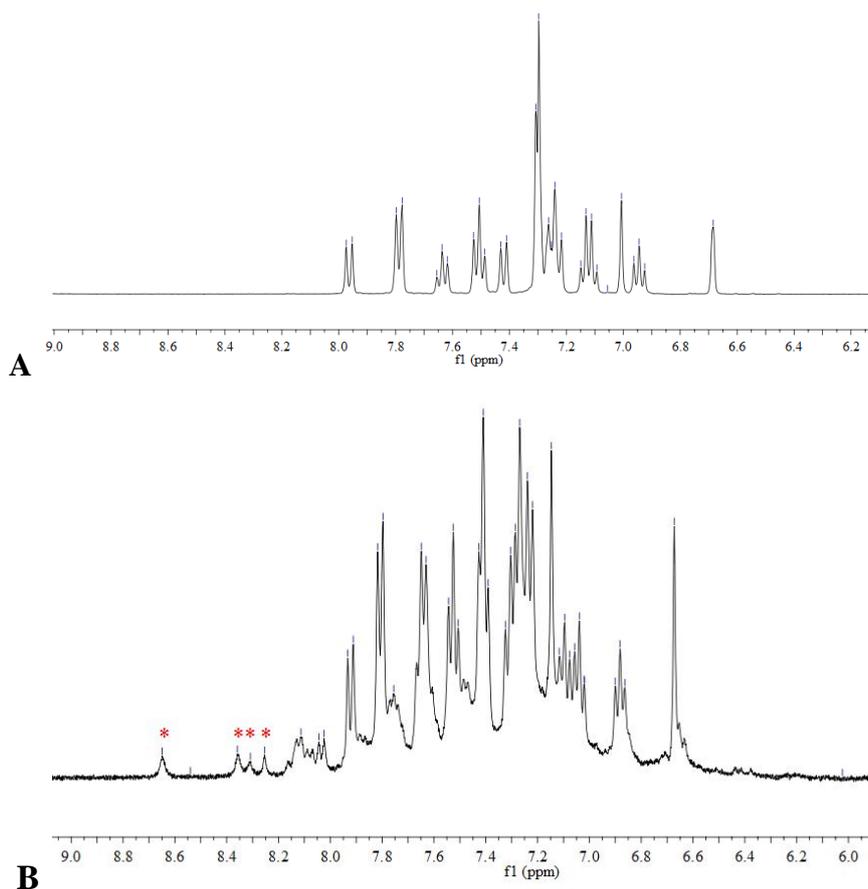


Figure 126 : A) Spectre RMN ^1H du composé 241 (400 MHz, solvant : CD_3CN) ; B) Réaction d'oxydation du PhéDIM 241 réalisée en tube RMN. Spectre ^1H (400 MHz, solvant : $\text{CD}_3\text{CN} + \text{D}_2\text{O}$). * : signaux correspondant aux formes « indoleninium » et « imine ».

Ces résultats semblent montrer que le carbinol est formé initialement au cours de la réaction et que dans le cas de ce PhéDIMOX monosulfonylé, il a tendance à se transformer par déshydratation en formes « indoléninium » et « imine », la première étant la forme protonée de la seconde (et donc en équilibre). Nous n'avons ainsi pas observé de réversibilité vers la forme carbinol par ajout d'eau ou de D_2O dans les expériences RMN.

● Informations fournies par l'analyse par la SM :

- Les spectre HRMS-ESI+ du PhéDIMOX monosulfonylé obtenu sous forme d'indoléninium de TFA ou bien en absence de TFA, sont tous les deux identiques et présentent comme pic de base un ion m/z 461,1317 (resp. 431,1318) correspondant à la formule $[\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]^+$. Dans ces conditions, aucun ion visible n'est caractéristique du carbinol. L'échange par D_2O entraîne dans les deux cas un écart de masse de 1 u.m.a. (m/z 462,1368 / 462,4362). Cette analyse ne permet donc pas non plus de différencier la « forme imine » de la « forme indoléninium ».

- Lorsque la réaction d'oxydation est suivie par SM (ESI+) aucun des ions observés ne permet encore une fois de caractériser le carbinol. En effet, deux ions principaux sont formés : celui à m/z 461 évoqué ci-dessus, mais aussi un ion à m/z 921 qui correspond à l'adduit $[2M+H]^+$, avec M de formule brute $C_{29}H_{20}N_2O_2S$ (c'est-à-dire celle de la « forme imine »).

On peut toutefois observer en mode ESI- un ion m/z 477 correspondant à l'adduit $[M-H]^-$ de formule brute $C_{29}H_{21}N_2O_3S$.

III.D.2.b.2- Synthèse et étude structurale du PhéDIMOx 273 issu de l'oxydation du PhéDIM 30.

Dans la continuité de l'étude menée sur le dérivé *N*-monosulfonylé, nous avons envisagé l'oxydation d'un PhéDIM ne possédant pas de NH indoliques libres. Lors de la présentation des travaux personnels sur la synthèse des PhéDIMs, nous avons rapporté que la synthèse du dérivé *N,N'*-disulfonylé **245** n'avait pas abouti, c'est pourquoi nous avons porté notre attention sur le PhéDIM *N,N'*-diméthylé **30**, dont la synthèse a été facilement réalisée (Voir paragraphe **III.B**).

L'oxydation de **30** a été effectuée en suivant le protocole standard. Tout comme dans le cas du PhéDIMOx **272**, le produit d'oxydation du PhéDIM **30** ne précipite/cristallise pas spontanément et nécessite donc d'être purifié par chromatographie sur colonne. Après de nombreux essais de phases stationnaires et mobiles, l'alumine s'est avérée le meilleur choix de phase stationnaire pour purifier ce composé particulièrement polaire, puisqu'il a été dans ces conditions possible d'isoler **273** avec un rendement moyen de 75 %.

● Analyse des données spectrales :

Contrairement au composé précédent monosulfonylé, ici le composé est unique (non en mélange) et stable.

Le spectre RMN du proton (enregistré dans l'acétone-*d*₆) est très similaire dans sa forme à celui du PhéDIMOx « référence » **256**. En particulier la zone des signaux aromatiques comprise entre 6,60 et 7,60 ppm, et qui correspond à 15 protons, ne présente que 8 types de signaux, ce qui est caractéristique d'une structure symétrique. Tous ces signaux sont facilement associés aux 5 protons benzéniques et aux 10 protons indoliques. En particulier les protons H-2 apparaissent sous la forme d'un singulet intégrant pour 2H (s (2H)) résonnant à une valeur assez faible de δ de 6,71 ppm.

Par ailleurs, le spectre présente un s (2H) à 3,74 ppm correspondant aux *N*-CH₃, mais surtout un signal échangeable par D₂O à 4,63 ppm (étonnamment, la valeur du δ du CH du PhédIM de départ est identique) compatible avec un carbinol (-OH). Par ailleurs, sur le spectre ¹³C, le carbone méthanique résonne à 74,77 ppm (Voir annexes, figure 169a-b). Sur la base de ces données spectrales RMN, la structure du PhédIMOx **273** peut sans ambiguïté être établie comme étant un carbinol (Fig. 127).

Les valeurs particulièrement basses (vers les champs forts) de δ observées pour certains signaux ¹H et ¹³C, tels que les H-2 et le carbone méthanique (pour rappel, le signal de H-2, ainsi que celui du carbone méthanique apparaissent à respectivement 8,68 ppm et 170,4 ppm dans les spectres ¹H et ¹³C correspondants du PhédIMOx **256** – enregistrés dans DMSO-*d*6) peuvent traduire un caractère sp³ prononcé du carbone méthanique associé à un caractère covalent de la liaison C-OH. Au contraire, pour les PhédIMOx avec des NH libres tel que **256**, le carbone central présenterait un caractère sp² important, et la liaison C-OH un caractère ionique prononcé.

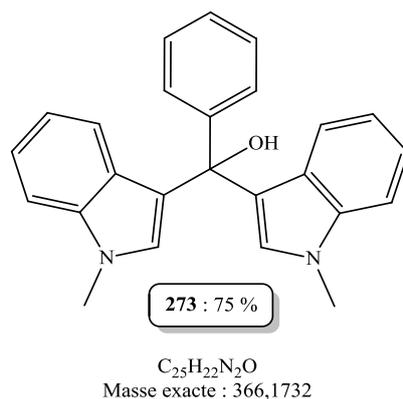
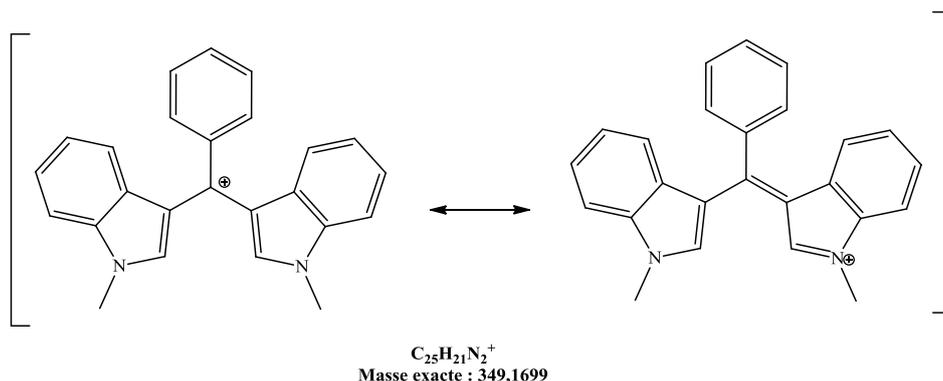


Figure 127 : Structure du PhédIMOx 273

Une telle structure est confirmée par le spectre de masse (ESI+) qui présente un ion m/z 389 correspondant à l'adduit de formule brute $[C_{25}H_{22}N_2NaO]^+$, même si le pic de base du spectre est l'ion m/z 349, qui correspond probablement à la perte d'un $[OH]^-$ et donc aux structures de types indoléninium ou carbocation triarylique de même formule brute $[C_{25}H_{21}N_2]^+$.



Enfin, il a été possible de réaliser une analyse par diffraction aux RX sur des cristaux de **273**, qui a permis de confirmer le caractère sp^3 du carbone méthanique (Fig. 128). De plus, cela montre que ce composé adopte la même structure à l'état solide comme en solution.

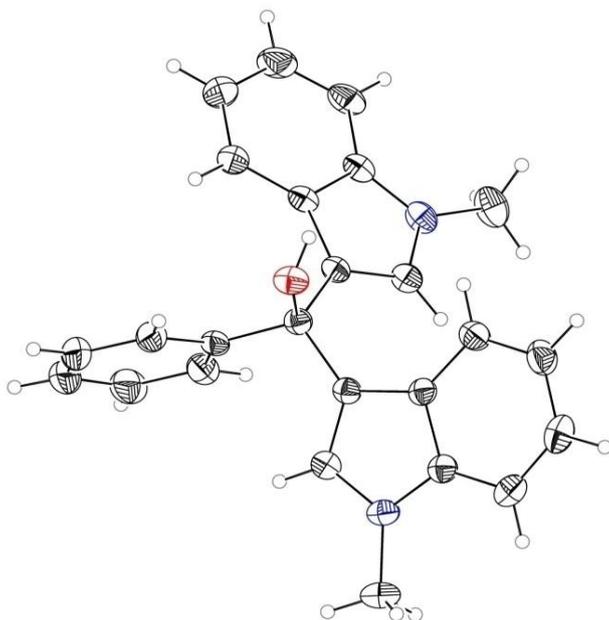
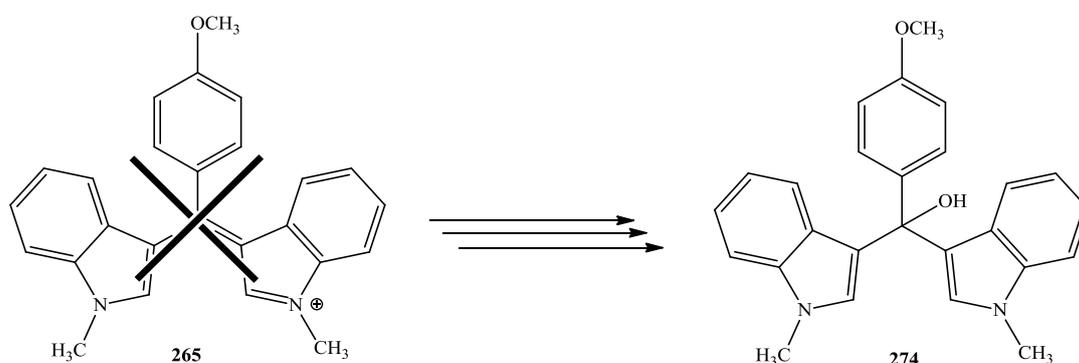


Figure 128 : Diagramme ORTEP du *N,N'*-diméthylPhéDIMOX **273** (Dr Pascale Lemoine, UPD)

Remarque :

Les résultats de nos travaux permettent de corriger certaines données inexactes de la littérature mentionnées précédemment dans cette thèse. En particulier, le composé **265** a été récemment décrit par Silveira et coll.²²⁷ (Voir § III.D) avec une structure de type indoléninium, qui n'est pas en adéquation avec les données expérimentales fournies. La formule de ce composé peut être dorénavant révisée en un carbinol symétrique.



En conclusion, en solution, l'oxydation des PhéDIMox conduit à un carbinol dont la stabilité et le caractère covalent de la liaison C-OH dépend des substituants. La structure des PhéDIMOx symétriques possédant des NH libres tel que le PhéDIM-ox **256** est donc très probablement plus proche d'un hydroxyde de triarylcarbocation associé à un caractère sp^2 prononcé du carbone central et une certaine labilité du groupement -OH (Fig. 129).

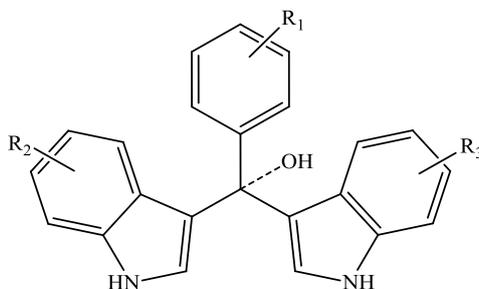


Figure 129 : Structure proposée pour les PhéDIMOx apparentés à 256.

III.D.3- Suivi de l'oxydation des PhéDIMs 24, 30 et 241 par RMN

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le paragraphe précédent dans le cas du composé **241**, nous avons réalisé les réactions d'oxydation des PhéDIMs **24**, **30** et **241** par la DDQ directement en tube RMN et suivi l'évolution de la réaction par RMN 1H . L'avantage de la DDQ, c'est qu'elle ne possède aucun proton dans sa structure. Le solvant de l'expérience est donc CD_3CN . Dans les trois cas, la conversion est totale au bout de 1 h de réaction (Voir annexes, figure 170-179).

Afin d'essayer de comprendre comment se formait le carbinol au cours de la réaction d'oxydation, nous nous sommes placés dans des conditions anhydres (ou tout du moins les plus anhydres possibles en sachant que pour des raisons de coût évidentes, la seule solution acceptable pour sécher un solvant deutérié était l'utilisation de tamis moléculaire).

Ainsi, les trois réactions ont été répétées, mais cette fois en utilisant CD_3CN séché sur tamis comme solvant.

A notre grande surprise, et nous l'avons donc confirmé sur plusieurs essais, l'oxydation est incomplète. Nous n'avons pas déterminé avec précision les taux de conversions, mais dans tous les cas la réaction n'évolue plus dans le temps et de plus le produit de départ demeure le composé majoritaire du mélange. Il est probable alors que le taux d'oxydation dépende de la teneur résiduelle en eau du solvant et il serait intéressant de mener une telle étude pour affiner cette découverte.

Quoi qu'il en soit, ce résultat signifie que l'eau intervient dès les premières étapes de l'oxydation et que le carbinol n'est probablement pas formé consécutivement à l'oxydation du

PhéDIM en PhéDIMOx « forme imine ». Ceci est d'autant plus probable que l'oxydation du PhéDIM *N*-sulfonylé **241** montre que le carbinol est majoritaire par rapport aux deux autres formes à la fin de l'étape d'oxydation, puis à tendance ensuite à « se déshydrater ».

L'hypothèse que nous pouvons formuler est que l'eau apporte une assistance nucléophile à l'arrachement de l'hydrure porté par le carbone méthanique par la DDQ (Fig. 130).

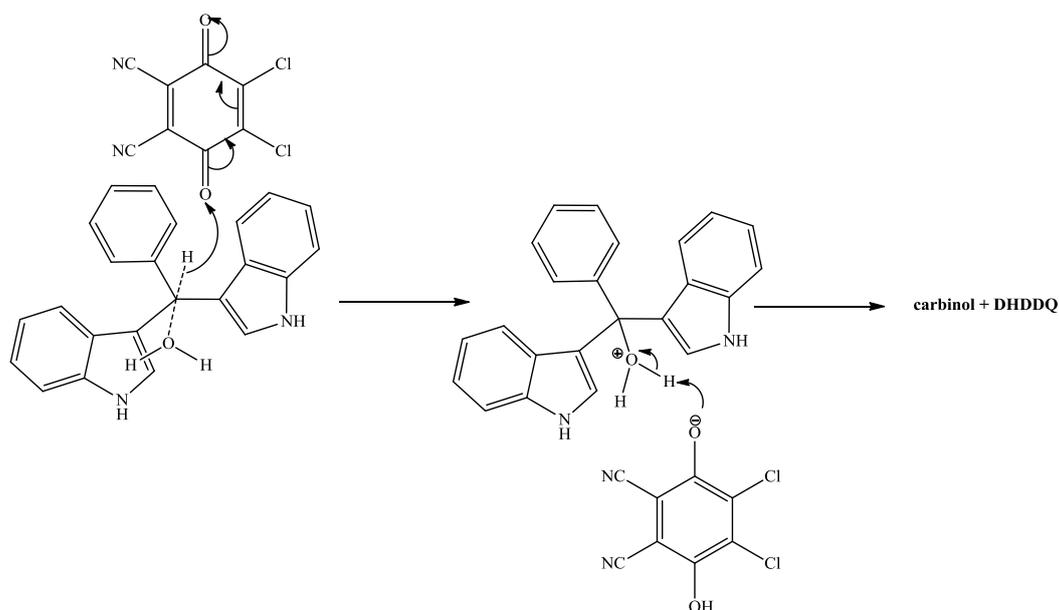


Figure 130 : Rôle supposé de l'eau dans le mécanisme d'oxydation des PhéDIMs par la DDQ.

Une des conséquences d'un tel mécanisme est que la forme « indoléninium » telle que décrite par E. Fisher proviendrait de la déshydratation du carbinol et surtout que les PhéDIMOx seraient principalement sous forme carbinol en solution, sauf si les formes « imine » et « indoléninium » correspondantes sont thermodynamiquement plus stables (en fonction des schémas de substitution).

III.D.4- Hypothèses sur la structure du composé **256** à l'état solide.

Après avoir apporté certains éléments de réponse à la question concernant la structure adoptée en solution par le PhéDIMOx **256** (et les PhéDIMOx apparentés), nous nous sommes également interrogés sur sa structure à l'état solide : est-il également sous forme de carbinol ?

Nous avons vu précédemment que le PhéDIMOx diméthylé y était, à l'état solide, sous forme de carbinol, comme l'a démontré l'analyse par diffraction aux RX. Dans le cas de **256**, Silveira et coll. ²²⁷ ont rapporté l'étude par diffraction aux RX de son chlorhydrate et non de la forme imine comme ils le mentionnaient. Il n'existe donc dans l'état actuel des connaissances, de données tangibles sur la structure de **256** obtenu dans des conditions neutres (ou en théorie à partir du

chlorhydrate, par traitement avec une base telle que l'ammoniaque). Malgré tous nos efforts, il n'a pas été possible d'obtenir des cristaux de **256**.

C'est pourquoi, en collaboration avec le Dr Yohann Corvis de l'« Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé » (UMR CNRS-Université Paris Descartes 8258 – Inserm U 1022) une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée en association avec une thermomicroscopie. Les résultats sont présentés dans la figure 131 ci-dessous.

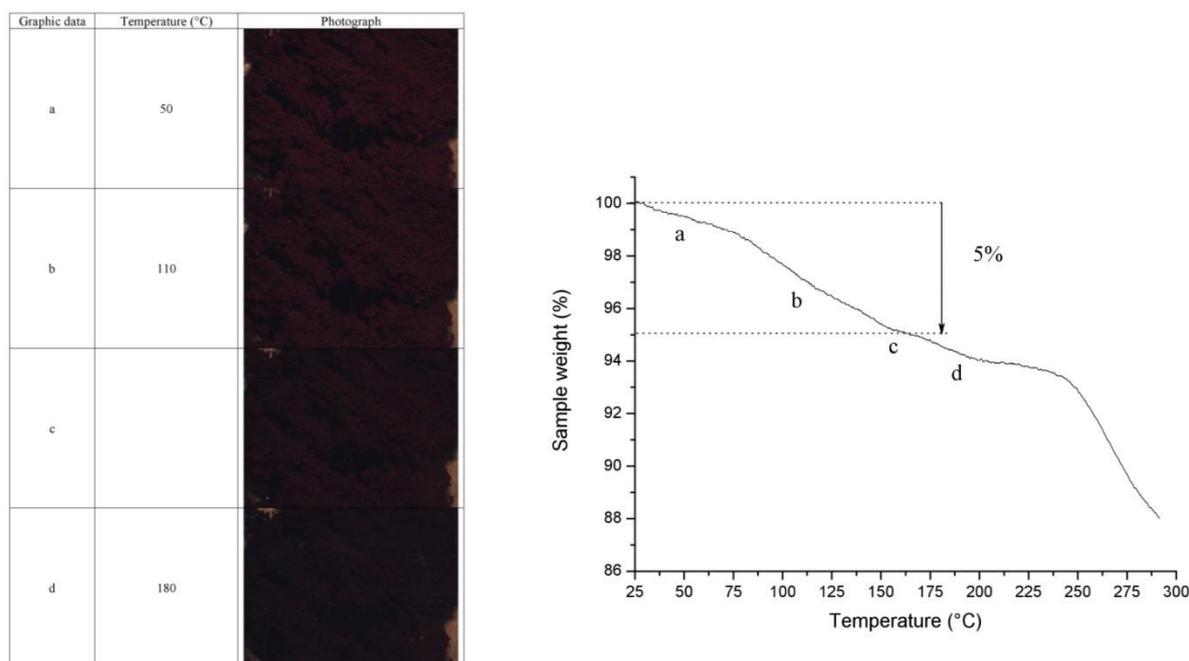


Figure 131 : Analyse thermogravimétrique par thermomicroscopie du composé 256 :

La thermogravimétrie permet d'étudier la perte de masse en fonction d'un gradient de température et est classiquement utilisée pour l'étude de l'état du solide en particulier pour mettre en évidence des hydrates et solvates. Cette analyse a été accompagnée par une thermomicroscopie (analyse indépendante) qui consiste à enregistrer des images d'un échantillon soumis à un gradient de température afin d'observer d'éventuels modifications dans son aspect.

La courbe de l'analyse TGA de **256** fait apparaître un net pallier entre 75°C et 150°C pendant lequel l'échantillon subit une perte de masse d'environ 5 %. L'aspect de la courbe fait penser qu'il ne s'agit pas d'humidité adsorbée, mais bien d'une perte constitutive. Ensuite, il se produit une perte de masse progressive mais significative (150-240°C), puis massive (>240°C), qui traduit finalement une décomposition du composé. L'observation des images de l'échantillon à des températures choisies parmi ces étapes (*i.e.* 50, 110, 150 et 180 °C), permet de constater que l'échantillon, d'abord rose cristallin devient progressivement amorphe (« matifie ») en certains

points qui se généralisent, devenant violet foncé ; au-delà du seuil de 150°C le composé se rétracte, se décompose progressivement en liquide noirâtre.

Il est intéressant de noter que 5 % correspond à une perte de masse correspondant à une molécule d'eau, ce qui pourrait laisser suggérer que le composé **256** est sous forme de carbinol à l'état solide.

De plus cette décomposition de la molécule pourrait expliquer que les résultats de l'analyse élémentaire sont systématiquement très en deçà des valeurs attendues pour tous les éléments dosés (ex. : C, 65,52 ; H, 3,20 ; N, 7,57 ; calculé pour C₂₃H₂₀N₂O : C, 81,15 ; H, 5,92 ; N, 8,23).

Remarque :

Même s'il ne s'agit pas du même composé, nos observations trouvent un certain écho dans celles faites par Fischer et Wagner sur la base du diméthylrosindole ²¹⁶.

Ces auteurs en effet rapportent « qu'il s'assombrit pendant le chauffage » et que « lorsqu'il est chauffé à 250 °C, il s'agglomère, change de couleur en même temps et fond complètement à 270 °C en un liquide foncé ». De l'analyse élémentaire ils disent que la teneur en carbone est trop faible et que « la base semble donc obstinément retenir l'eau et l'alcool ».

III.D.5- Synthèse des PhédIMOx 275 et 276

Deux autres PhédIMOx, analogues de **256** et issus de l'oxydation des PhédIMs **230** et **231** ont été préparés en vue de les inclure dans l'étude sur NR4A1 et les activités pro-apoptotiques potentielles des PhédIMs.

Le protocole déjà décrit a été employé pour préparer **275** et **276** et ces composés ont été purifiés de la même façon que **256**, à savoir par recristallisation dans l'éthanol (rendements respectifs, 55 et 45 %). Ces trois composés **256**, **275** et **276** constituent alors la **série 5** des produits synthétisés.

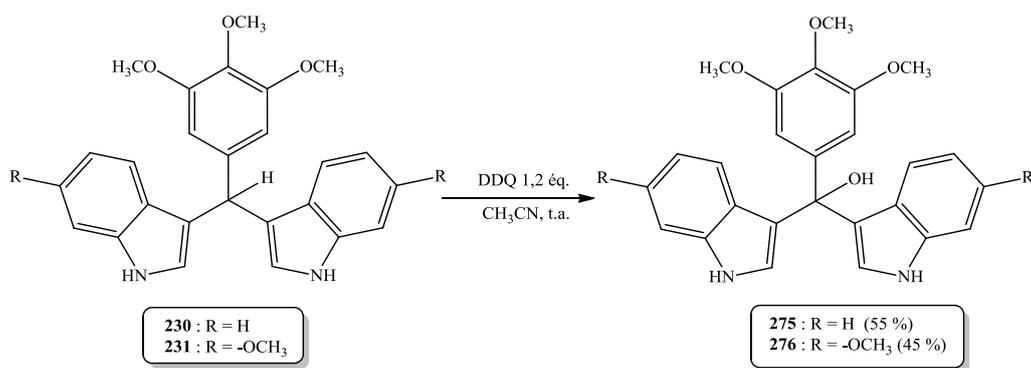


Figure 132 : Synthèse des composés **275** et **276** à partir respectivement de **230** et **231**

IV- Conclusion

Nous avons donc synthétisé des PhédIMs symétriques par des méthodes différentes. Parmi ces composés, nous avons sélectionné neuf composés (**24**, **230**, **231**, **234**, **235**, **236**, **237**, **238**, et **239**) pour les tester biologiquement.

Les PhédIMs non symétriques synthétisés (**241**, **242**, **243** et **244**) sont des nouveaux composés obtenus par une nouvelle méthode de synthèse que nous avons développés au sein du laboratoire.

La structure des PhédIMOx a été élucidée sans ambiguïté ; ils existent sous forme de carbinols (**272** et **273**) en solution et/ou à l'état solide et peuvent être vérifiées par spectrométrie de masse et par RMN. Nous avons montré que l'eau est nécessaire à l'oxydation des PhédIMs. Le PhédIMOx **256**, analysé par thermogravimétrie, se présenterait sous d'hydrate à l'état solide. Ainsi, les analogues oxydés **275** et **276** ont été préparés afin de les évaluer aussi leur activité.

**Chapitre 3 : Étude des interactions des PhéDIMs
avec la protéine cible NR4A1 – Évaluation
biologique des PhéDIMs comme agents pro-
apoptotiques**

I- Introduction

Comme vu au chapitre 1, la protéine NR4A1 est impliquée dans différents processus biologiques. Son rôle dans l'initiation de l'apoptose a été démontré. En réponse à un stimulus, ce récepteur nucléaire migre dans le cytoplasme et interagit à la surface de la membrane mitochondriale avec la protéine *Bcl-2*. Cette interaction engendre la cascade de caspases entraînant l'apoptose.^{32,33,36} De ce fait, la protéine NR4A1 est devenue une cible anticancéreuse potentielle très prometteuse. L'activation de la protéine NR4A1 dans les cellules cancéreuses *in vitro* par des agents bioactifs a été abondamment rapportée : différents ligands sont connus à ce jour ; on peut citer le 3,3-diindolylmethane, DIM (**3**) et ses dérivés^{103,105,106,114,234,235} ; la cytosporone B (**20**) et ses analogues comme l'éthyl 2-[2,3,4-trimethoxy-6-(1-octanoyl)phenyl] acétate, TMPA (**21**).⁹⁶⁻⁹⁹ Ces différents composés n'induisent pas les mêmes fonctions de la protéine NR4A1. Contrairement au composé **21** par exemple, certains dérivés de DIM amplifient l'export nucléaire de la protéine NR4A1 vers la mitochondrie et favorisent l'initiation de l'apoptose.¹¹² DIM et ses dérivés seraient donc une nouvelle classe d'éventuels agents anticancéreux.

Dans ce chapitre, nous nous proposons dans un premier temps de mettre en évidence l'interaction entre la protéine cible NR4A1 et les PhéDIMs que nous avons synthétisés afin de caractériser leurs modes de fixation éventuels. Dans le cadre de cette étude, nous nous limiterons au domaine C-terminal LBD (*Ligand-Binding Domain*) de la protéine NR4A1 en se référant aux travaux démontrant que le domaine de transactivation et le domaine de liaison à l'ADN de la protéine NR4A1 ne sont pas connus pour être responsable de la directe interaction de ce type de ligands (voir chapitre 1, § **III.B.1**). Par souci de concision, nous appellerons par la suite LBD-NR4A1, le domaine LBD de la protéine NR4A1. Pour analyser les interactions entre les PhéDIMs et la cible LBD-NR4A1, trois approches complémentaires ont été entreprises :

- étude par quenching de fluorescence afin de mettre en évidence les interactions éventuelles entre le LBD-NR4A1 et les PhéDIMs en solution ;
- approche computationnelle de *docking* pour modéliser *in silico* les interactions intermoléculaires entre le LBD-NR4A1 et les PhéDIM ;
- analyse structurale : des essais de cristallisation ont été réalisés pour déterminer les structures tridimensionnelles des complexes LBD-NR4A1/PhéDIM.

Dans un second temps, ce chapitre présentera les résultats d'activité biologique des PhéDIMs sur la prolifération de cellules et sur l'apoptose. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) à Gif-sur-Yvette.

II- Méthodes de mise en évidence et de caractérisation des interactions LBD NR4A1/PhéDIMs

Nous présenterons ici succinctement les trois approches utilisées dans le cadre de ce projet.

II.A- Quenching de fluorescence

II.A.1- Principe

Toute espèce moléculaire possède des états d'énergie propres. Lorsqu'un rayonnement matérialisé par un photon est absorbé, l'espèce moléculaire passe alors dans un état excité. La durée de vie de cet état excité est très courte. La fluorescence est un des processus de luminescence par lequel une molécule passe d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, en émettant de la lumière. La spectroscopie de fluorescence permet d'obtenir deux types de spectres :

- les spectres d'émission qui consistent à fixer une longueur d'onde d'excitation du rayonnement incident et effectuer un balayage de la longueur d'onde d'émission en mesurant l'intensité de fluorescence pour chaque longueur d'onde d'émission ;
- les spectres d'excitation obtenus en fixant une longueur d'onde d'émission et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation.

L'émission de fluorescence peut être diminuée voire même totalement éliminée du fait de l'interaction entre l'espèce moléculaire et les espèces environnantes. Il est possible de distinguer trois modes d'extinction de fluorescence en fonction du type d'interactions mis en jeu :

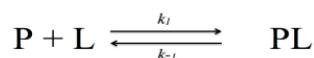
- l'extinction statique résultant de la formation d'un complexe non fluorescent entre des molécules à l'état fondamental ;
- l'extinction dynamique provenant d'une interaction entre le fluorophore et une molécule nommée « *quencher* » qui éteint la fluorescence ;
- l'extinction dite apparente correspondant à une atténuation de l'intensité due à l'augmentation en concentration d'une espèce qui absorbe fortement le rayonnement.

Ces phénomènes d'extinction de fluorescence (*quenching* en anglais) sont très importants sur le plan analytique. La technique de quenching de fluorescence est fondée sur l'analyse de l'extinction de fluorescence d'un échantillon par les conditions environnementales comme l'interaction avec des ligands. Cette technique permet potentiellement de révéler l'accessibilité des fluorophores aux agents d'extinction (*quenchers*) et de localiser les fluorophores au sein de la protéine ²³⁶. Nous l'utiliserons ici pour mettre en évidence l'interaction des complexes LBD-

NR4A1/PhéDIM et le cas échéant pour déterminer les constantes de dissociation (K_d) de ces complexes.

II.A.2- Détermination de la constante de dissociation K_d

Nous enregistrerons les spectres d'émission de nos échantillons à la longueur d'onde d'excitation de 297 nm. Le résidu tryptophane contient un hétérocycle indole qui lui confère des propriétés spectroscopiques d'absorption et de fluorescence à cette longueur d'onde. Notons que le LBD-NR4A1 possède deux résidus tryptophanes dont l'un est proche de la poche supposée de liaison du ligand ⁷⁹. La constante de dissociation K_d est par définition caractéristique de l'affinité d'un ligand pour une protéine. La fixation d'un ligand à la protéine suit la loi d'action de masse :



Avec **P** : protéine, **L** : ligand, **PL** : complexe protéine/ligand, k_1 et k_{-1} les constantes de vitesse d'association et de dissociation.

À l'équilibre, la constante de dissociation est définie par $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P][L]}{[PL]}$ (1)

Or $[P]_{\text{totale}} = [P] + [PL]$ et

$[L]_{\text{totale}} = [L] + [PL] \sim [L]$ car L est en large excès devant P ($[P]_{\text{totale}} \ll [L]_{\text{totale}}$)

La relation (1) devient : $K_d = \frac{([P]_{\text{totale}} - [PL]) \times [L]}{[PL]} \leftrightarrow \frac{[PL]}{[P]_{\text{totale}}} = \frac{[L]}{[L] + K_d}$ (2)

La relation (2) correspond à la fraction saturée de la protéine P. Si $[L] \approx K_d$, $[PL] = [P]_{\text{totale}} / 2$, alors, la moitié des sites de fixation dans la protéine sont occupés par le ligand L. Si $[L] \gg K_d$, $[PL] = [P]_{\text{totale}}$, alors, les sites de fixation dans la protéine sont tous occupés.

L'effet du *quenching* est observé par ajouts successifs d'une solution contenant le ligand dans une solution contenant de la protéine d'intérêt à une concentration donnée. Après chaque ajout, le mélange, soumis à une excitation à 297 nm, émet un spectre d'émission présentant un maximum d'intensité de fluorescence à la longueur d'onde maximale de 335 nm. On note F_0 et F , les intensités de fluorescence en absence et en présence de ligand. D'après l'équation de Stern Volmer ²³⁶, on obtient la relation (3) :

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_d[L]}$$

La constante de dissociation K_d est déterminée à partir des données obtenues au cours du titrage, c'est à dire suite à l'étude de l'intensité de fluorescence à 335 nm en fonction de la concentration du ligand. La valeur de K_d est déduite par un calcul de régression non linéaire à l'aide du logiciel Gnuplot.

II.B.- Docking moléculaire

Les méthodes de docking (amarrage moléculaire) s'attachent à prédire les interactions possibles lors de la formation de complexes moléculaires. En particulier, le docking permet la prédiction des meilleures orientations selon lesquelles deux molécules interagissent. Dans la conception de médicaments, l'usage du docking est souvent un moyen d'estimer et de sélectionner les pistes les plus prometteuses. Le rôle majeur tenu par cette approche dans la découverte de la molécule Raltegravir, un inhibiteur de l'intégrase du VIH autorisé sur le marché américain par la FDA en 2007^{237,238} illustre l'intérêt croissant de cette modélisation en pharmacologie.

Le docking repose sur l'hypothèse que les ligands formant des interactions favorables avec la protéine sont ceux présentant une affinité de liaison élevée. Ces interactions entre molécules sont non covalentes et incluent les interactions Van der Waals, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène. Les résultats du docking consistent le plus souvent en différentes orientations du ligand dans le site d'interaction ou au-delà du site d'interaction lorsque la zone de recherche comprend d'autres cavités ou des sites de surface. Ces configurations correspondant à plusieurs conformations favorables que le ligand peut adopter.

Il existe différents algorithmes de docking. Les méthodes de docking les plus rapides sont les méthodes dites de docking rigide où la protéine et le ligand sont structurellement figés. Avec l'amélioration des puissances de calcul, les méthodes de docking dites «semi-flexibles» où les partenaires d'interaction sont partiellement déformables (en général ligand flexible, protéine rigide) se sont imposés, car elles permettent d'obtenir des résultats plus précis. Le docking «semi-flexible» est constitué de deux étapes principales. La première, dite de docking, permet aux ligands testés d'explorer le site d'interaction de la protéine. Le ligand adopte plusieurs conformations possibles au cours de cette recherche, et le programme génère plusieurs configurations possibles d'amarrage du ligand dans la protéine et autour de la protéine. La deuxième étape, dite de *scoring*, permet d'évaluer les configurations rencontrées lors de la première étape. Cette étape comme son nom l'indique, donne lieu à un calcul de score pour classer les différentes configurations en cluster.

Plusieurs programmes de docking (Autodock, Surflex-Dock, Marvin Sketch, EADock...) ont été développés ces dix dernières années. Parmi ces programmes de docking, nous avons choisi l'EADock (*Evolutionary Algorithm for Docking*, en anglais) avec son interface web Swissdock car son utilisation simple et pratique est libre de droit.

II.B.1- La méthode de l'EADock ²³⁹

EADock effectue une exploration de l'espace des configurations pour générer et évaluer un grand nombre de liaisons potentielles. EADock est initialisé avec les coordonnées de référence de la protéine cible et celles du ligand et une liste d'angles dièdres libres.

Le champ de force, calculé avec l'algorithme CHARMM22, estime les énergies intramoléculaires du ligand et de la protéine lors de leur transition de l'état libre à leur état lié, puis estime les énergies intermoléculaires combinant le ligand et la protéine dans l'état lié. Les configurations protéine/ligand sont classées selon un système de score simple et rapide. Le score énergétique *Simplefitness* (*SF*) inclut les interactions électrostatiques et celles de Van Der Waals.

$$\text{Simple Fitness} = E_{intra}^{ligand} + E_{intra}^{protéine} + E_{inter}$$

avec E_{intra}^{ligand} , $E_{intra}^{protéine}$, E_{inter} respectivement l'énergie intramoléculaire du ligand, l'énergie intramoléculaire de la protéine et l'énergie d'interaction protéine/ligand.

Le score énergétique *SF* ne prend pas en compte l'effet du solvant connu pour avoir une contribution importante à l'énergie libre de liaison ²⁴⁰. Les clusters correspondant aux différents types de modes de liaison, sont ensuite classés par la seconde fonction score appelée *FullFitness* (*FF*) dont le calcul est plus lent et sélectif. Le score énergétique *FF* tient compte de l'effet de solvant et l'espace de recherche doit être ajustée en conséquence. Le score énergétique *FF* d'un cluster est calculé en moyennant 30 % des énergies efficaces les plus favorables de ses éléments afin de limiter le risque que quelques complexes ne pénalisent l'ensemble du cluster. Cette énergie efficace est définie comme la somme de l'énergie totale du système et de l'énergie de solvation :

$$\text{FullFitness} = E_{intra}^{ligand} + E_{intra}^{protéine} + E_{inter} + \Delta G_{\text{électrostatique,solv}} + \sigma\text{SASA}$$

L'énergie de solvation est composée de l'énergie électrostatique ($\Delta G_{\text{électrostatique,solv}}$) et des contributions non polaires considérées comme proportionnelles à l'aire de la surface accessible au solvant (σSASA).

II.B.2- Swissdock ²⁴¹

SwissDock est une interface web dédiée au docking des petites molécules à des protéines cibles (<http://www.swissdock.ch/>). Il est basé sur le programme EADock DSS. La structure de la protéine, ainsi que le modèle du ligand, sont chargés grâce à l'interface web de SwissDock (Fig. 133). La protéine cible est sélectionnée soit en spécifiant son code PDB (Protein Data Bank), (<http://www.rcsb.org/pdb/>) soit en téléchargeant un fichier de sa structure (A) ; la sélection du ligand est faite en indiquant son identifiant de la base de données ZINC (<http://zinc.docking.org>) ou en téléchargeant un fichier de sa structure (B). Les calculs, coûteux en temps, sont effectués le serveur de SwissDock (C). Le temps d'attente du résultat n'est toutefois pas explicité par les auteurs de l'EADock. Selon notre observation, il semble compris entre 2 et 8 h. Une fois le calcul réalisé, un message électronique avec un lien internet avertit l'utilisateur. Les résultats du docking s'affichent sur la page web de SwissDock. La structure du complexe en 3D peut être visualisée et les clusters sont classés avec leurs scores énergétiques respectifs *Fulfitness* (FF) (Fig. 134).

The screenshot shows the SwissDock web interface with three main sections: 'Target selection', 'Ligand selection', and 'Description'. Section A (Target selection) has a search box and a 'Search' button, with a note 'ie. PDB code, protein name, sequence, or URL'. Section B (Ligand selection) has a search box and a 'Search' button, with a note 'ie. ZINC.AC, ligand name or category (like scaffolds or sidechains), or URL'. Section C (Description) has a 'Job name (required):' field, an 'E-mail address (optional):' field, a 'Show extra parameters' link, and a 'Start Docking' button.

Figure 133 : Constitution du jeu de données de docking via l'interface SwissDock

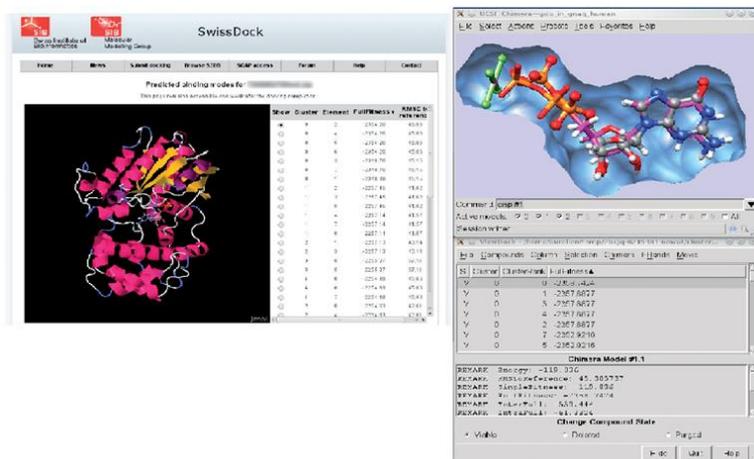


Figure 134 : Visualisation d'un résultat de docking via l'interface web Swissdock

Ces résultats peuvent être redirigés vers le logiciel de visualisation et d'intégration Chimera de l'USCF (Université de Californie, San Francisco). Chimera a été ici préféré pour son utilisation pratique et son traitement plus approfondi (notamment une visualisation des liaisons hydrogènes, les surfaces hydrophobes, etc.).

II.C- La cristallogénèse

Un cristal est un objet périodique composé d'éléments répétés de façon ordonnée dans tout son volume. La cristallogénèse consiste à trouver les conditions qui vont permettre à la protéine d'intérêt de précipiter de façon ordonnée lors de son passage de l'état soluble à l'état solide. C'est l'étape la plus incertaine et souvent la plus limitante. Il n'existe pas de règle stricte pour accéder directement à ces conditions. La croissance cristalline va dépendre des propriétés intrinsèques de chaque protéine et il faut donc procéder par tâtonnement jusqu'à l'obtention des premiers signes cristallins. Ces signes seront par la suite affinés afin d'aboutir à une condition où la protéine va former un réseau tridimensionnel suffisamment important pour l'obtention de cristaux de plus grandes dimensions et utilisables pour l'expérience de diffraction aux rayons X.

La cristallisation des macromolécules biologiques est régie par les mêmes lois thermodynamiques que celles qui gouvernent la cristallisation des petites molécules organiques. La formation d'un cristal comprend les étapes suivantes : la sursaturation, la nucléation, la croissance cristalline (Fig. 135). Pour que l'empilement cristallin se forme, les interactions entre le solvant et la protéine doivent diminuer au profit d'interactions protéine-protéine non covalentes. Les paramètres favorisant ces interactions et sur lesquels on peut jouer sont nombreux. On peut moduler la concentration initiale de la protéine mais on peut également faire varier les paramètres de l'expérience comme la température, la force ionique, le pH, la présence d'agents précipitants ou d'additifs ²⁴².

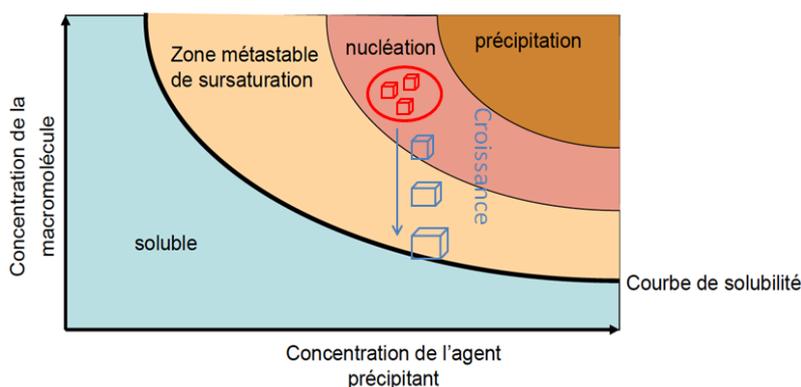


Figure 135 : Étapes de la cristallogénèse : sursaturation, nucléation et croissance cristalline

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées en cristallographie ; la méthode de diffusion de vapeur est la technique la plus employée pour la cristallisation des protéines. Elle repose sur l'équilibration entre une goutte constituée de la solution de la protéine d'intérêt et d'une solution de précipitation et un réservoir contenant un grand volume de la solution de précipitation ^{242,243}. Le

dispositif est fermé hermétiquement, de sorte à produire une diffusion de vapeur entre la goutte et le réservoir. Un déplacement d'équilibre se produit généralement par évaporation d'eau de la goutte vers le réservoir puisque ce dernier possède une concentration en agent précipitant plus importante. Ce phénomène entraîne finalement la diminution du volume de la goutte, augmentant alors la concentration de la protéine et de l'agent précipitant. Au cours de cette équilibration, on peut, dans certains cas favorables, se trouver dans une condition donnant naissance à des cristaux. En pratique, on peut suspendre la goutte sur une lamelle retournée au-dessus du réservoir dans le cas de la méthode de la goutte suspendue ou alors la déposer dans un puits sur la paroi du réservoir dans le cas de la goutte assise (Fig. 136).

La méthode de diffusion de vapeur a été employée pour effectuer des tests de cristallisation de LBD-NR4A1 et de co-cristallisation de LBD-NR4A1 avec différents PhéDIM. Dans le cadre nos travaux de recherche, ces deux dispositifs expérimentaux ont été employés pour réaliser des boîtes de cristallisation.

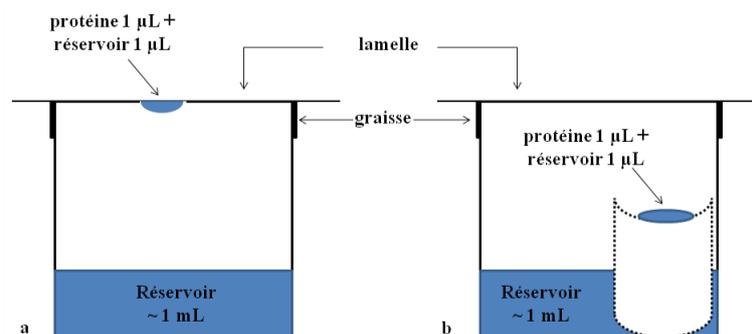


Figure 136 : Technique de diffusion en phase vapeur (a) dispositif de goutte suspendue (b) dispositif de goutte assise

Pour qu'une structure résolue ait un intérêt au niveau biologique, il est primordial que la macromolécule soit cristallisée dans des conditions physico-chimiques (températures, pH, pression, etc.) où elle garde son activité biologique.²⁴²

III- Travaux antérieurs

La protéine NR4A1 est un récepteur nucléaire orphelin, c'est-à-dire que son ligand physiologique n'est pas identifié à ce jour. L'analyse structurale du domaine de liaison de ligand (LBD) suggère une poche de liaison du ligand au voisinage des hélices H5, H6 et H7 pouvant être bloquée par les chaînes latérales de six résidus : F405, L409, L443, F446, F478 et W481 (Fig. 137)

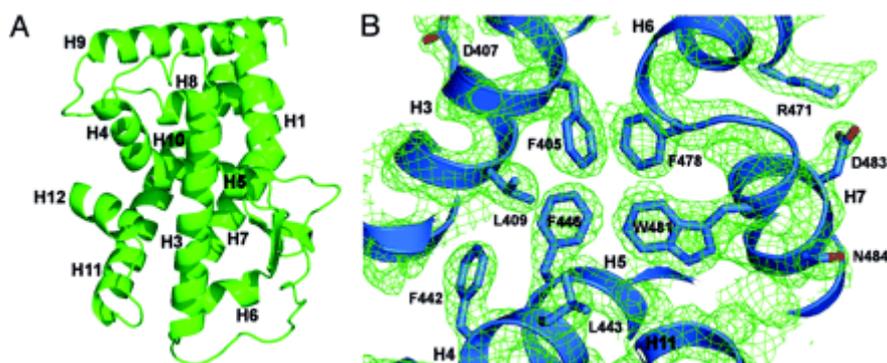


Figure 137 : (A) Structure de LBD-NR4A1; (B) Poche de liaison bloquée du domaine LBD. L'espace disponible est complètement bloqué par des résidus aromatiques et hydrophobes. Ces résidus sont strictement conservés dans la sous-famille NR4 (Flaig et coll. 2005)

Lanig et coll. ont réalisé en 2015 une étude de dynamique moléculaire de LBD de la protéine NR4A1²⁴⁴ et proposé une nouvelle poche de liaison éventuelle pour le ligand physiologique proche du domaine *N*-terminal et des hélices H1 et H9 impliquant les résidus L337, P470, C503 et P515. Par des études de docking moléculaire, ces auteurs ont montré que des composés comme le PhéDIM **25** pouvaient interagir dans cette poche de liaison (Fig. 138)

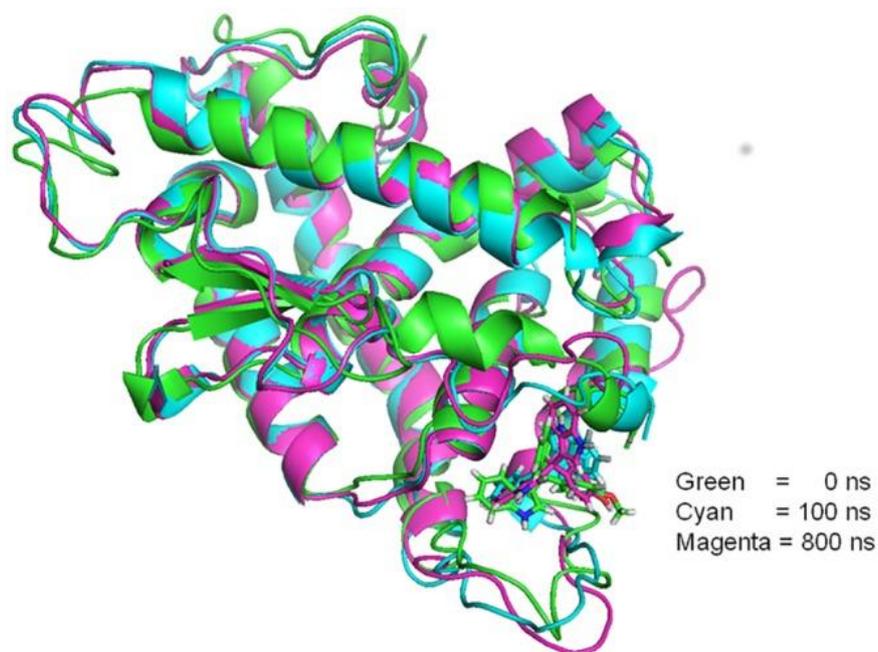


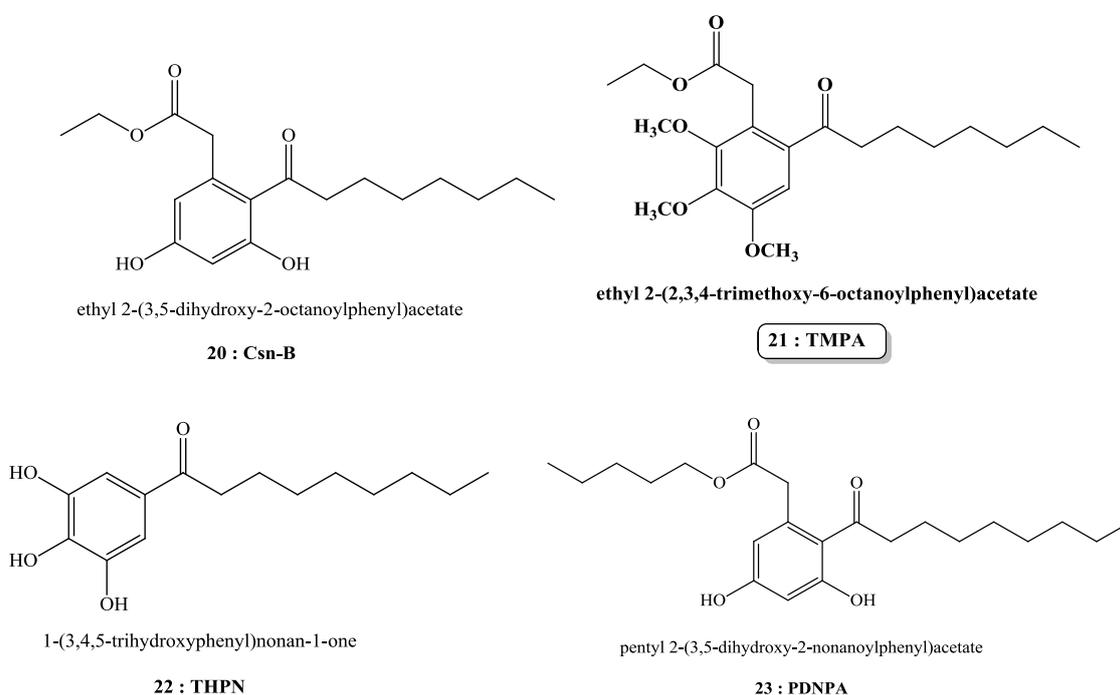
Figure 138 : Image représentative issue de la simulation de dynamique moléculaire du bis-indole à l'intérieur de la nouvelle poche de liaison (cyan, après 100 ns; magenta, après 800 ns), ajusté à partir de la géométrie du complexe NR4A1/bis-indole docké (vert)²⁴⁴

Durant cette dernière décennie, plusieurs travaux sur les molécules interagissant avec le domaine de liaison de ligand (LBD) de NR4A1 ont été publiés (Andey et coll., 2013; Cho et coll., 2007; Hedrick et coll., 2015; Lee et coll., 2010, 2014; Zhan et coll., 2008). Nous reportons dans cet état des lieux deux groupes de molécules de synthèse : la cytosporone B et ses analogues ainsi que

les PhéDIMs para-substitués. Pour ces deux classes de composés, les interactions avec LBD-NR4A1 ont été mises en évidence par quenching de fluorescence et les caractérisations structurales analysées par docking moléculaire, dichroïsme circulaire et/ou cristallisation.

III.A- Interaction entre NR4A1 et la Cytosporone B ou ses analogues

La cytosporone B (**20**) est un produit naturel isolé de *Cytospora* sp. CR200 et de *Dothiollera* sp. HTF3²⁴⁵. Sa synthèse totale, effectuée à partir du 1-bromo-3,5-diméthoxybenzène, a été reportée par Huang et coll. en 2010 (figure 7)²⁴⁶. En 2008, Wu et son l'équipe ont montré que la Csn-B était un agoniste naturel de NR4A1 interagissant spécifiquement avec son domaine LBD⁹⁸. Cette équipe synthétisa alors une série d'analogues de Csn-B. Après avoir réalisé la relation structure-activité de ces composés, l'importance des groupements hydroxyle phénolique, ester et la chaîne latérale acyle du pharmacophore Csn-B a été suggéré dans l'interaction avec la protéine NR4A1²⁴⁷. D'autres analogues ont été synthétisés dont TMPA (**21**), THPN (**22**) et PDNPA (**23**) (Fig. 139) et sont même présentés comme des pistes thérapeutiques prometteuses dans le traitement du cancer ou du diabète^{96,97,99}.



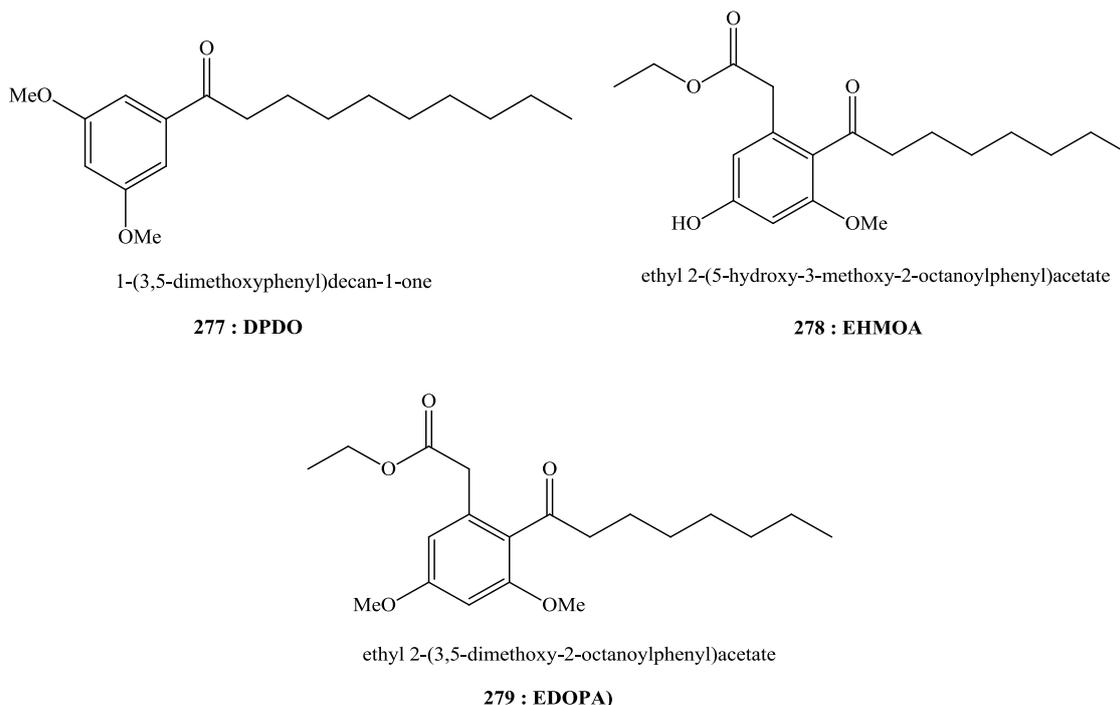


Figure 139 : La cytosporone-B (Csn-B) et ses analogues

III.A.1- Mise en évidence de l'interaction NR4A1 - Csn-B

Zhan et coll. ont mis en évidence par quenching de fluorescence l'interaction spécifique du LBD de NR4A1 avec la Csn-B (**20**). Quand la protéine NR4A1 est incubée avec des quantités croissantes de Csn-B, l'intensité de fluorescence à 336 nm suite à une excitation photonique fixée à 297 nm diminue progressivement. L'extinction de fluorescence ne peut être uniquement associée à l'effet dilution et correspond à l'interaction LBD-NR4A1/Csn-B. La constante de dissociation entre LBD-NR4A1 et Csn-B a été déterminée : $K_d = 1,91 \mu\text{M}$. Parallèlement, il a été montré que la Csn-B n'interagit pas avec le domaine de liaison de l'ADN (DBD). L'implication du résidu Y453 du LBD dans l'interaction LBD-NR4A1/Csn-B a été de plus démontrée de par l'utilisation du mutant Y453A du LBD de NR4A1. Ce résidu Y453, bien conservé dans une poche du domaine de LBD NR4A1, joue un rôle déterminant dans la liaison de la Csn-B avec NR4A1 ⁹⁸. Selon ces auteurs, cette poche de liaison du ligand est différente de celle décrite par Flaig et coll. pour tous les membres de la famille NR4A ⁷⁹.

III.A.2- Caractérisation structurale de l'interaction NR4A1 - Csn-B

Pour caractériser l'interaction LBD-NR4A1/Csn-B, les mêmes auteurs, en utilisant le dichroïsme circulaire (CD) montrèrent que la Csn-B induisait un changement conformationnel de la protéine NR4A1. Aucun changement conformationnel n'a été observé pour le DBD et lors de

l'utilisation du mutant Y453A⁹⁸. Des expériences de docking moléculaire ont été effectuées à partir de la structure cristallographique du LBD de NR4A1 (code PDB 2QW4) et le modèle de Csn-B. le résultat de docking est présenté ci-dessous (Fig. 140). La modélisation révèle que Y453 est situé à la surface du LBD et stabilise par liaison hydrogène la Csn-B (2,47 Å)^{98,248}. Aucune structure cristallographique du complexe NR4A1 – Csn-B n'a été rapportée à ce jour.

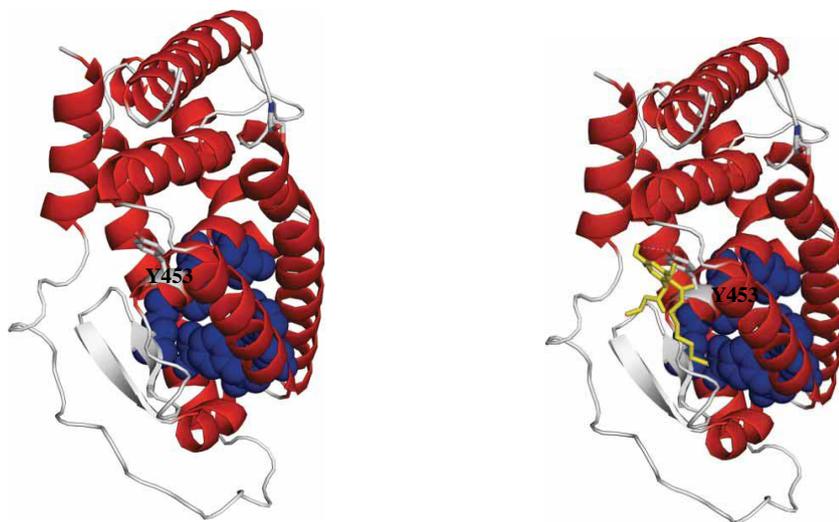


Figure 140 : Résultat de docking de Csn-B avec la structure LBD de NR4A1 (à gauche LBD seul et à droite, le complexe LBD-Csn-B) (adapté de Zhan et coll., 2008)⁹⁸

III.A.3- Activité biologique de la Csn-B

À l'aide de tests d'activité luciférase chez des lignées cellulaires du cancer gastrique, Q. Wu et son équipe ont montré que la Csn-B peut stimuler l'activité transactivationnelle de NR4A1. Les concentrations efficaces 50 % (EC₅₀) de Csn-B pour le récepteur NR4A1 et son domaine LBD seul sont évaluées respectivement à $2,78.10^{-10}$ M et $1,15.10^{-10}$ M. Ces données indiquent que Csn-B cible le domaine LBD de NR4A1 de façon sélective⁹⁸.

Rappelons que l'une des fonctions attribuées à NR4A1 est son implication dans l'augmentation de la concentration du glucose dans le sang par amélioration de l'expression de gène néoglucogénique (glucose-6 phosphate, Glc6Pase)⁹⁵. Cette équipe a montré que l'administration de Csn-B chez modèle murin C57 de type sauvage et de type Nr4a1^{-/-} augmentait de façon significative le taux de glucose de 3,2 à 11,4 mM et de 3,7 à 5,8 mM respectivement. Ce qui permet de confirmer que Csn-B influence la néoglucogénèse *via* son interaction avec NR4A1⁹⁸.

Il a été montré aussi que Csn-B était capable d'induire l'apoptose des lignées BGC-823 *in vitro* en activant NR4A1 (63,5 % des cellules traitées avec Csn-B sont mortes par apoptose), mais qu'elle ne pouvait pas induire seule l'apoptose des cellules BGC-523. Pour étayer l'effet

apoptotique de Csn-B *via* son interaction avec NR4A1, son activité anticancéreuse a été étudiée à travers des tests d'inhibition de la prolifération cellulaire (MTT) et de régression de la tumeur dans un modèle de xéno greffe chez la souris. Csn-B inhibe plus de 70 % des lignées cellulaires humaines BGC-823 (cancer gastrique) et SW620 (cancer du colon) mais, elle a un effet plutôt modéré sur les lignées cellulaires humaines H1299 (cancer du poumon) et HepG2 (tumeur du foie), avec moins de 40 % de cellules inhibées. L'effet antitumoral a été mis en évidence par administration de Csn-B chez des souris nues ayant reçu au préalable des injections sous-cutanée de cellules BGC-823. Csn-B réduit le taux de croissance de tumeurs xéno greffées ⁹⁸.

En 2013, en s'appuyant sur les travaux de Q. Wu et son équipe, Xia et coll. ont montré que Csn-B et l'analogue EHMOA (Fig. 139), induisait l'exportation nucléaire de NR4A1 et l'apoptose des lignées cancéreuses H460 du poumon tandis que le dérivé EDOPA (Fig. 139) était inactif. Sur la base de ces résultats, il a été supposé que le groupement hydroxyle en position 3 (3-OH) est plus important que celui en position 5 (5-OH) dans l'induction de l'apoptose ²⁴⁸. La présence du groupement OH sur le phényle semble importante pour la bioactivité de Csn-B mais, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, d'autres dérivés Csn-B ne possédant pas de groupement OH sont tout aussi biologiquement actifs.

III.A.4- Les analogues de Csn-B interagissant avec NR4A1

Les interactions entre le domaine LBD de NR4A1 et les analogues de Csn-B : TMPA (**21**), THPN (**22**), PDNPA (**23**) (Fig. 139) ont été mises en évidence par des expériences de quenching de fluorescence. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tab. 11). Les K_d sont de l'ordre de 10^{-7} M. Cela suggère une affinité légèrement plus importante de ces composés pour NR4A1 que Csn-B (facteur de 3 à 10) ^{96,97,99}.

Tableau 11 : Les valeurs de K_d obtenus par quenching de fluorescence

Analogues Csn-B	Domaine de liaison	Constante de dissociation, K_d (μ M)
21 : TMPA	His-LBD-NR4A1	$0,25 \pm 0,06$
22 : THPN	His-LBD-NR4A1	$0,27 \pm 0,03$
23 : PDNPA	His-LBD-NR4A1	$0,60 \pm 0,05$

Par ailleurs, Xia et coll. ont étudié l'interaction entre le domaine LBD et les composés Csn-B (**20**), EHMOA (**278**) et EDOPA (**279**) par spectroscopie RMN ¹H. Sur les spectres RMN, il apparaît

deux singulets entre 5,85 et 6,35 ppm correspondant aux deux protons 4-H et 6-H du noyau aromatique des molécules. En présence du domaine LBD, ces singulets disparaissent sur les spectres des composés EHMOA et Csn-B mais restent intenses sur celui de EDOPA. Ce résultat indique que le LBD de la protéine NR4A1 interagit avec Csn-B et EHMOA tandis que son association avec EDOPA est faible, voire inexistante. Une analyse de modélisation structurale par docking de ces trois composés a été réalisée à partir de la structure PDB (code 2QW4) du LBD. Selon ces auteurs, EHOMA adopterait la même position que la Csn-B au sein du LBD (Fig. 141). Ils suggèrent par exemple que les liaisons hydrogènes (à 2,74 Å et 2,66 Å) stabilisant l'interaction se forment entre le OH phénolique du résidu Y122 - qui correspond après modification de numérotation au résidu Y453 - et les atomes d'oxygène du groupement méthoxy et du groupement 3-OH de EHMOA ²⁴⁸.

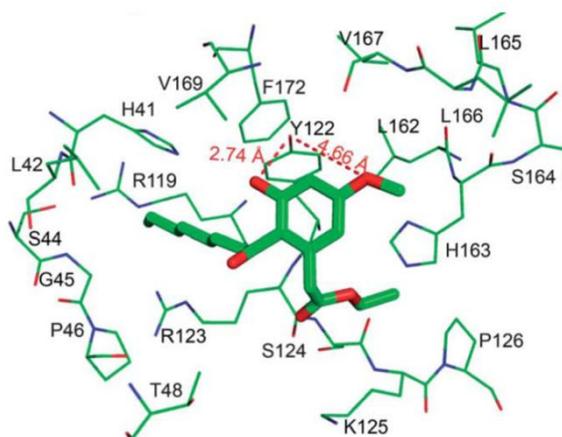


Figure 141 : Résultat de docking d'EHMOA (en vert) et LBD (représenté par les résidus) avec deux liaisons hydrogène (2,74 Å et 4,66 Å) ²⁴⁸

À ce jour, les structures cristallographiques de complexes LBD-NR4A/ligand1 rapportées sont celles avec le TMPA (**21**), le THPN (**22**), le PDNPA (**23**) et le DPDO (**277**) ^{96,97,99} et ces dernières sont présentées respectivement Fig. 10 ; 11 et 12.

La structure du complexe TMPA-NR4A1, suite à des expériences de co-cristallisation, a été déterminée avec une résolution de 2,20 Å. Elle a révélé deux sites de fixation (A et B) au sein du LBD (Fig. 142a). Le site A correspond à une cavité formée par les hélices 4, 11 et 12. Le site B est sur la face opposée, de dimension similaire et formé au voisinage des hélices 1, 5, 7 et 8. Les deux sites se situent à la surface du domaine LBD de la protéine NR4A1 et non dans une poche de liaison profonde comme reporté pour les autres récepteurs nucléaires. TMPA se fixe selon deux modes différents sur ces deux sites. Sur le site A, les chaînes latérales des résidus R515 et E445 interagissent avec le groupement carboxyle du TMPA stabilisé par liaisons hydrogène faisant intervenir des molécules d'eau. Les atomes d'oxygène des trois groupements 3-méthoxy

interagissent avec la chaîne peptidique de l'hélice H12 et la chaîne latérale du résidu T595. Sur le site B, l'oxygène du carbonyle de TMPA forme une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de K456 et l'atome d'oxygène du 3-méthoxyyle avec la chaîne latérale H372. Le groupement carboxyle de TMPA est impliqué dans une interaction avec l'oxygène du carbonyle de R450 médiée par une molécule d'eau. Les résidus Y453, L492 et V498 fournissent un environnement hydrophobique au TMPA (Fig. 142b)⁹⁹.

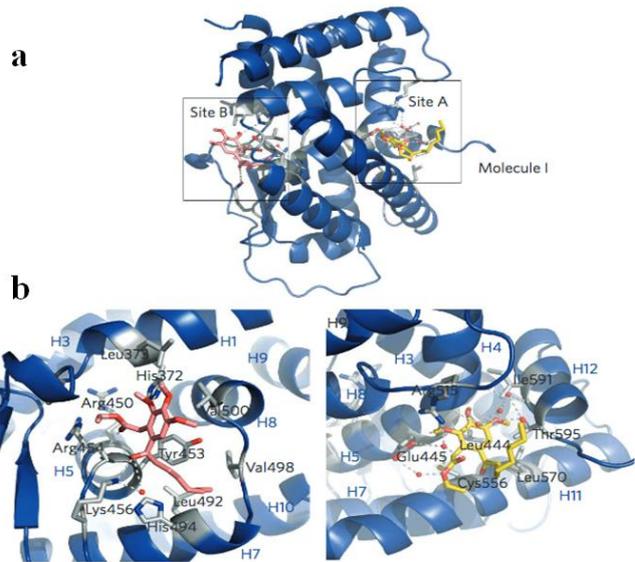


Figure 142 : Mode de liaison du TMPA (21) au domaine LBD de NR4A1 avec la mise en évidence de deux sites de fixation A et B, (a) localisation sur la structure cristallographique des sites A et B (b) Zoom du mode de fixation sur les deux sites (code PDB 3V3Q) (Zhan et coll., 2015)

Le complexe LBD-THPN a été obtenu par trempage du ligand (*soaking*) dans les gouttes contenant au préalable déjà des cristaux de l'apoenzyme LBD-NR4A1. Deux structures cristallographiques ont été déterminées avec deux conformations différentes : structure I et II (Fig. 11a). THPN a été identifié uniquement au sein d'un site de la structure I, aux voisinages des résidus E445, R563, L556 et L559 (aucune liaison hydrogène n'a été mentionnée). Ce site de liaison correspond au site A trouvé pour le ligand TMPA. THPN induirait un changement de conformation de LBD qui comme nous le verrons au paragraphe suivant (III.A.4) serait nécessaire à l'interaction de NR4A1 avec un gène pro-apoptique, Nix. Par contre, dans la structure II, le rétrécissement de la cavité du même site A, empêcherait THPN de s'y ajuster (Fig. 143a). Il a été montré que le dérivé DPDO pouvait se fixer sur le même site A (Fig. 143b) mais, qu'il n'entraînait pas de changement de conformation⁹⁷.

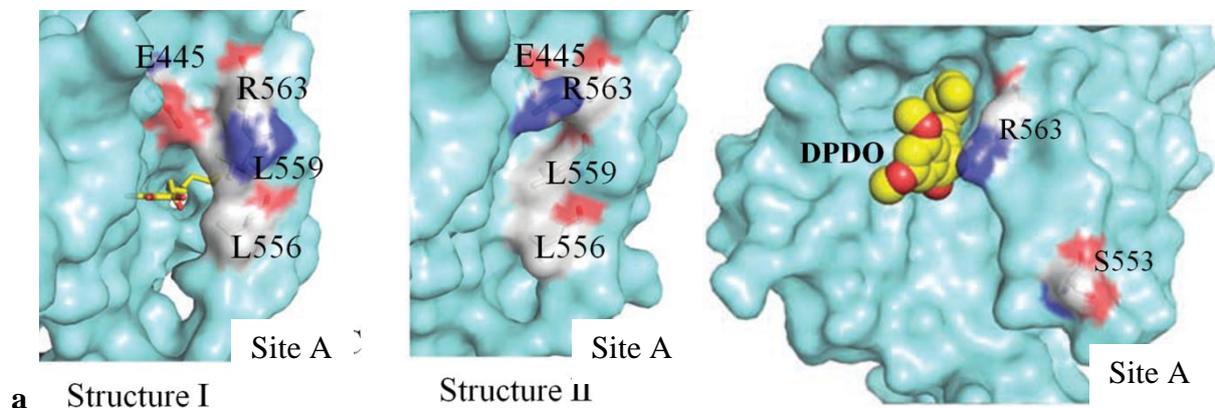


Figure 143 : Structures cristallographiques des complexes (a) Site de fixation du THPN avec le domaine LBD de NR4A1 (site occupé : structure I ; site vide : structure II) (b) Mode de fixation du DPDO au niveau du même site de fixation (codes PDB, 4KZI, 4JGV)⁹⁷

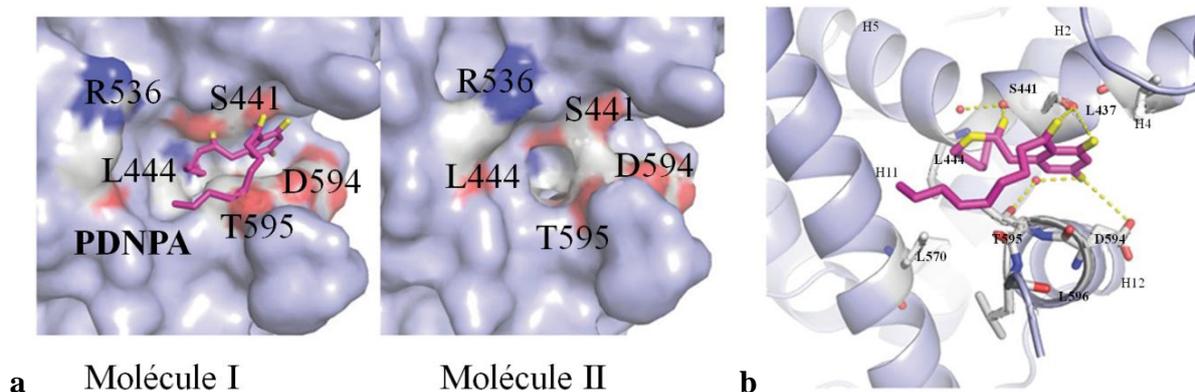


Figure 144 : Structures cristallographiques du complexe LBD-PDNPA (molécule I et II), chacune avec une conformation distincte (code PDB 3V3E)⁹⁶

La cristallisation du complexe LBD-PDNPA, tout comme le complexe LBD-THPN, a été effectuée par trempage de PDNPA avec l'apoenzyme NR4A1 cristallisée. La structure du complexe présente deux conformations distinctes. PDNPA se lie uniquement à la molécule I avec une conformation plus ouverte que celle reportée pour la molécule II (Fig. 144a). La structure cristallographique montre que le site de liaison du PDNPA est situé dans la même cavité superficielle que pour celle décrite pour TMPA (site A). Elle est formée ici par les hélices H4, H5, H11 et H12 et interagit avec les résidus L437, S441 et D594. Les résidus L444, L570, et L596 forme un environnement plus hydrophobique pour les chaînes alcanes de l'ester et le groupement acyle du composé (Fig. 144b)⁹⁶.

III.A.5- Analogues de Csn-B impliqués dans des processus biologiques

Les analogues de Csn-B présentent des activités biologiques d'intérêt thérapeutique (anticancéreuses, anti-inflammatoires, etc.). Selon les voies de signalisations, ces composés sont soit des antagonistes, soit des agonistes du récepteur NR4A1.

TMPA agirait en tant qu'antagoniste de NR4A1 dans la régulation de l'homéostasie du glucose. L'enzyme LKB1 joue un rôle important dans ce processus en régulant l'activité de la kinase cytosolique AMPK α . NRA41 en se liant à LKB1 dans le noyau, séquestre ce partenaire, et ainsi atténue l'activation de AMPK α dans le cytoplasme. Cette fonction de NR4A1 est réduite par l'action du TMPA. En effet, TMPA interagit avec la protéine NR4A1 de façon

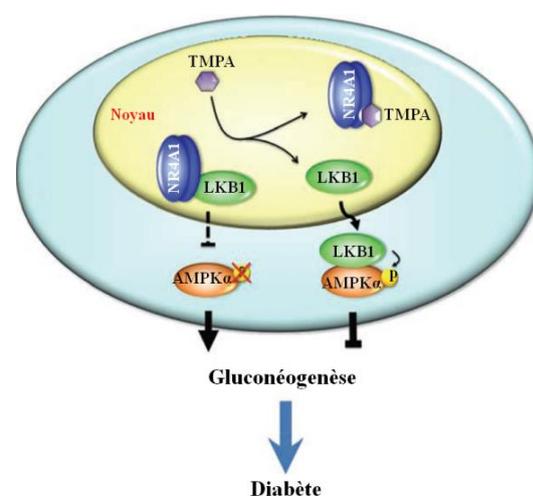


Figure 145 Modèle proposé pour illustrer la régulation de AMPK α par l'interaction NR4A1-LKB1 et les fonctions possibles de TMPA dans la régulation de la gluconéogenèse (Zhan et coll., 2012)

compétitive dans le noyau en se liant au moins à l'un des deux sites de fixation du LBD. Il en résulte une libération de LKB1 non lié dans le cytoplasme alors accessible pour interagir avec AMPK α . Ceci entraîne une régulation de la gluconéogenèse et donc une baisse du taux de glucose, mis en évidence par exemple chez la souris atteinte de diabète de type II (Fig. 145)⁹⁹.

Le sepsis, caractérisant une réponse inflammatoire, est une des principales causes de mortalité par infection. NR4A1 améliore la résistance au lipopolysaccharide (LPS) en inhibant l'activité NF- κ B et en supprimant la production aberrante de cytokines. NR4A1 s'associe directement avec la protéine p65 pour bloquer sa liaison avec NF- κ B. Cependant, cette fonction de NR4A1 est contrée par la phosphorylation de NR4A1 par la protéine p38 α , elle-même activée par LPS. C'est l'intervention de PDNPA en se liant de façon compétitive au domaine LBD de NR4A1 et ainsi en empêchant l'interaction NR4A1-p38 α , qui restore la suppression de la réponse hyper-inflammatoire (Fig. 146)⁹⁶.

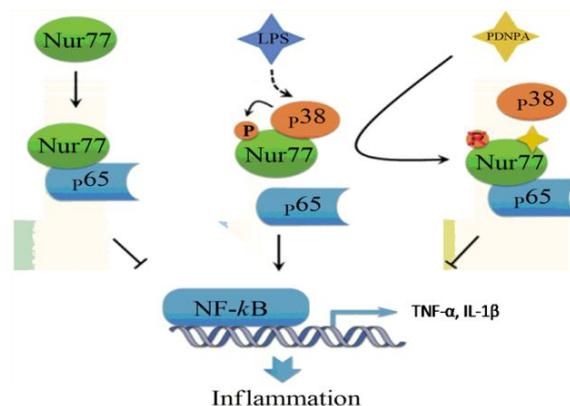


Figure 146 : Illustration du rôle régulateur de Nur77 (NR4A1) dans l'activité de NF- κ B, phosphorylation de Nur77 par p38, l'antagonisme de PDNPA de l'interaction Nur77-p38⁹⁶

L'autophagie ou autophagocytose, processus connu pour fournir des nutriments nécessaire à la survie des cellules en cas de carence, est aussi liée à la mort cellulaire. La protéine NR4A1 a été identifiée comme une cible spécifique pour l'induction de la mort cellulaire autophagique par voie de signalisation mitochondriale. Stimulé d'abord par THPN, NR4A1 est transporté par Nix du cytoplasme jusqu'à la mitochondrie. Ensuite, la protéine NR4A1 est transloquée de la membrane extérieure à la membrane interne mitochondriale grâce aux canaux des protéines TOMM40 et TOMM70 (*Translocase of outer mitochondrial membrane*, en anglais). Ceci engendre une perturbation du potentiel membranaire (ddp électrique en ions de part et d'autre de la membrane) et donc une induction de l'autophagie dans les cellules cancéreuses de mélanome humaines A375 par exemple⁹⁷.

Pour conclure cette partie de l'état des lieux, on peut constater que les analogues de Csn-B présentés ci-dessus, excepté EDOPA, interagissent au niveau des mêmes sites de fixation du

domaine LBD de NR4A1. Ces domaines d'interaction se révèlent être distinct de la poche de liaison connue pour les autres récepteurs nucléaires. La différence d'affinité constatée entre EDOPA et EHMOA illustre l'importance des liaisons hydrogène stabilisant l'interaction LBD-NR4A1/ligand (pour rappel : il s'agit de composés identiques à l'exception d'un groupement hydroxyle (EHMOA) remplacé par un groupement méthoxyle (EDOPA)). Le mode de fixation proposée pour la Csn-B par modélisation est retrouvé dans les structures cristallographiques LBD-NR4A1/ligand. Bien qu'au niveau des mêmes sites de fixation, les modes de liaisons des différents ligands (résidus impliqués, liaisons hydrogène formées) sont distincts. En se basant sur les valeurs de constantes de dissociation de ces différents complexes LBD-NR4A1/ligand, les affinités pour LBD-NR4A1 de l'ensemble de ces ligands restent toutefois très proches. La conclusion au sujet du rôle majeur du résidu Y453 dans l'interaction LBD-NR4A1/Csn-B ne peut être étendue aux analogues de la Csn-B. La différence de mode d'interactions semble induire une différence d'activité biologique de ces dérivés de Csn-B. Les composés TMPA et PDNPA se lient sur le même site de fixation, mais la légère différence de leur mode de liaison semble suffisante pour induire des activités biologiques différentes. Comme rapporté ci-dessus, la Csn-B et ses analogues influencent directement les interactions entre NR4A1 et ses partenaires d'interactions dans un nouveau paradigme qui est distinct du domaine de liaison connue des récepteurs nucléaires^{96,249}.

III.B- Interactions entre NR4A1 et les PhédIMs para-substitués

À côtés du composé **20** (Csn-B) et ses composés aromatiques analogues, émergent d'autres types de molécules aromatiques tels que les PhédIMs dont certains ont une activité inhibitrice ou inductrice démontrée vis-à-vis de la protéine NR4A1 *in vivo* au sein des lignées cellulaires cancéreuses^{103,105,106,110,113,114,234,235}. La caractérisation des interactions physiques entre les PhédIMs et le domaine LBD-NR4A1 pourrait ouvrir une nouvelle voie dans la recherche des nouvelles molécules bioactives interagissant avec le récepteur NR4A1.

Les premiers travaux publiés, et à notre connaissance les seuls à ce jour, portés sur les interactions NR4A1-PhédIMs ont été réalisés par de l'équipe de S. Safe en 2014. Leurs PhédIMs de synthèse sont constitués deux unités indoliques et un groupement phényle ayant un substituant en position *para* (*p*-PhédIMs) (Fig. 147).

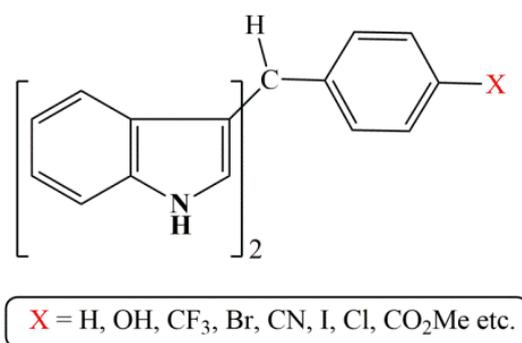


Figure 147 : Formule générale des *p*-PhéDIMs

Ces auteurs ont mis en évidence l'interaction LBD-NR4A1/ *p*-PhéDIMs par quenching de fluorescence et caractérisé les énergies de liaison par expérience de docking avec la structure LBD de NR4A1 (code PDB 1YJE)²³⁵. Leurs résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous (Tab. 12). Les valeurs des constantes de dissociation (K_d) sont comprises entre 0,1 et 0,71 μM et les *p*-PhéDIMs ont une affinité significative pour le domaine LBD de NR4A1.

Tableau 12 : Valeurs des constantes de dissociation LBD-NR4A1/*p*-PhéDIM et résultats de docking associés²³⁵

	Valeur du K_d (μM)	Energies de liaison (kcal/mol)
24 : <i>p</i> -H-PhéDIM	0,71	-55,9
26 : <i>p</i> -OH-PhéDIM	0,11	-86,2
27 : <i>p</i> -CO ₂ Me-PhéDIM	0,25	-58,0
36 : <i>p</i> -Br-PhéDIM	0,41	-52,1
74 : <i>p</i> -Cl-PhéDIM	0,48	-52,8
76 : <i>p</i> -I-PhéDIM	0,13	-76,9
79 : <i>p</i> -CN-PhéDIM	0,26	-75,3
81 : <i>p</i> -CF ₃ -PhéDIM	0,1	-54,3

La prédiction du docking indique que le domaine LBD de NR4A1 est capable de s'accommoder des huit *p*-PhéDIMs (Tab. 2) dont la majorité aurait une orientation similaire à celle observée pour *p*-OH-PhéDIM (Figure 16). Cette orientation montre des interactions au niveau du site A décrit précédemment et impliquant des liaisons hydrogène avec les résidus E445 et H516, des

interactions π -cation avec le résidu R515. La figure 148 présente l'orientation préférentielle de la majorité de ces composés (cas du **26**). Le composé **24** adopterait une autre orientation où le groupement phényle est dirigé vers l'extérieur tout en restant au sein du site A.

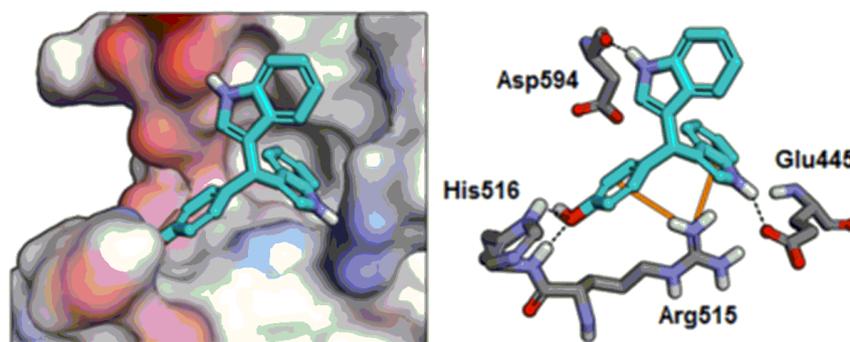


Figure 148 : Illustration des résultats de docking pour l'étude de l'interaction de *p*-OH-PhéDIM avec le LBD de NR4A1

IV- Travaux personnels

IV.A- Étude d'interaction de PhéDIMs avec la cible potentielle NR4A1

Le composé **24** ne possédant pas de substituant sur les noyaux aromatiques a été choisi comme base élémentaire pour notre étude d'interaction avec la protéine NR4A1. Nous avons étendu nos travaux aux autres séries chimiques que nous avons synthétisées (voir chapitre 2, travaux personnels) à savoir la série 1 (**24**, **230**, et **231**), la série 2 (**234** à **239**), la série 5 (**256**, **275** et **276**) ; tous ces composés sont inspirés du modèle symétrique de PhéDIM étudié couramment dans la littérature²³⁵.

Notre choix de composés pour entreprendre cette étude a également été dépendant de la solubilité de ces derniers dans les conditions de stabilité de la protéine His-LBD-NR4A1 produite (tampon aqueux, pH 7-8) mais également dépendant pour des raisons techniques (le méthanol est proscrit pour les expériences de quenching de fluorescence).

IV.A.1- Expression et production du domaine d'intérêt de NR4A1, le LBD

IV.A.1.a- Expression du domaine LBD de NR4A1 avec l'étiquette 6xHis

- Tests d'expression

Afin de déterminer la faisabilité et les conditions optimales d'expression de la protéine d'intérêt, des tests d'expression en petit volume ont été réalisés. La transformation du vecteur pET21 a(+) après insertion du plasmide *LBD-NR4A1* a été réalisée avec deux souches différentes de *E. coli* (BL21 (DE3) ou Rosetta (DE3) chimio-compétentes). Rappelons que la construction plasmidique *LBD-NR4A1* avec la souche bactérienne BL21 est pourvue d'un gène de résistance à l'ampicilline ; la souche Rosetta (DE3), d'un gène de résistance au chloramphénicol. Selon le mode opératoire décrit dans la partie expérimentale, à partir des clones obtenus par transformation, des tests d'expression ont été effectués dans différentes conditions de températures (18°C, 28°C, 37°C). Deux milieux de culture ont été comparés : le milieu LB et le milieu 2YT. L'induction de l'expression se fait par ajout d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Différentes concentrations d'IPTG ont été envisagées. L'ensemble de ces paramètres est regroupé dans le tableau 13 ci-après.

Tableau 13 : Différentes conditions d'expression de His-LBD-NR4A1 dans les souches Rosetta (DE3) et BL21 (DE3)

Température d'incubation (°C)	18	18	28	28	37	37
IPTG (mM)	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Numéro de tube (Rosetta (DE3))	1	2	3	4	5	6
Numéro de tube (BL21 (DE3))	7	8	9	10	11	12

La densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nm de chaque condition a été mesurée à différents temps et est représentée dans le tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 : Tests d'expression : Mesures de DO avant et après induction à l'IPTG. Pour la pré-culture issue des souches Rosetta2 (fond jaune), les six tubes, contenant 10 mL de LB sont numérotés de 1a à 6a, et les six tubes contenant 10 mL de 2YT sont numérotés de 1b à 6b. Pour la pré-culture issue des souches BL21 (DE3) (fond vert), six tubes, contenant 10 mL de LB sont numérotés de 7a à 12a, et six tubes contenant 10 mL de 2YT sont numérotés de 7b à 12b.

a) Échantillons non induits (Ni)

	En milieu LB		En milieu 2YT	
Ni	1a	7a	1b	7b
DO	0,65	0,75	0,56	0,67

b) Échantillons induits

En milieu LB	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a
DO	1,15	1,2	2,65	2,55	1,85	1,75	1,4	1,5	2,85	2,7	2,25	2,05
En milieu 2YT	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b	11b	12b
DO	0.95	1.1	1.94	1.9	1.4	1.5	1.15	1.25	2.65	2.1	1.8	1.65

En bleu : les conditions optimales ; en bleu gras : les conditions retenues

Après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE), une bande située entre 25 et 35 kDa, plus ou moins marquée selon les conditions, apparaît (Fig. 149). Cette bande correspond à notre protéine d'intérêt His-LBD-NR4A1 dont le poids moléculaire est de 29 kDa. Ce résultat a été confirmé par spectroscopie de masse.

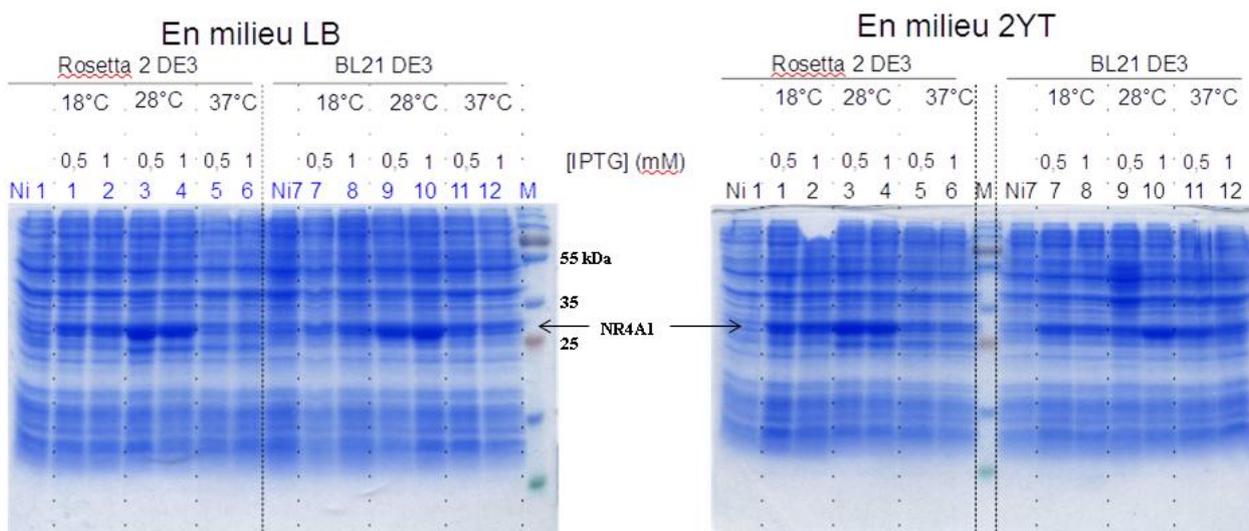


Figure 149 : Gels SDS-PAGE de tests d'expression de His-LBD-NR4A1 dans de différentes conditions (M : marqueur ; pour les autres intitulés se référer au tableau 13)

La bande observée est logiquement très peu marquée dans les échantillons non induits par l'IPTG (Ni1 en Rosetta DE3 et Ni7 en BL21) et apparaît nettement après induction à l'IPTG (0,5 ou 1 mM au final) (Fig. 149). Les bandes correspondant aux échantillons 4 (en LB), et 10 (en 2YT) sont plus marquées et indiquent que l'expression de la protéine d'intérêt est meilleure dans ces conditions-là c'est-à-dire à 28 °C avec induction à l'IPTG (1 mM). À la suite de ces résultats, pour optimiser le rendement de production, il a été décidé que les cultures visant à exprimer notre protéine His-LBD-NR4A1 seront réalisées avec les souches *E. coli* BL21 (DE3) dans le milieu LB et l'induction sera effectuée avec une solution d'IPTG à 1 mM au final à 28 °C pendant 3 h sous agitation.

- Expression de la protéine d'intérêt His-LBD-NR4A1 en grand volume

Pour réaliser les études d'interaction entre His-LBD-NR4A1 et ses ligands potentiels (PhéDIMs) par quenching de fluorescence et pour réaliser des essais de cristallisation, la quantité de solution protéique concentrée pure est le facteur limitant. Pour cela, il a fallu exprimer la protéine en grands volumes. Nous avons réalisé l'expression de la protéine d'intérêt dans des farnbachs de 3L contenant 1 L de culture suivant les conditions optimales énoncées. L'expression de la protéine a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE. Tout comme pour le test d'expression en petit volume, une bande marquée correspondant à l'expression de His-LBD-NR4A1 apparaît clairement, après induction, entre 25 et 35 kDa.

IV.A.1.b- Purification de la protéine : lyse cellulaire et chromatographie

Une culture de souche BL21 (DE3) a été au préalable préparée selon le protocole décrit ci-dessus. Une lyse de cette culture BL21 (DE3), a été effectuée par sonication (à la fréquence ultrasonique). Le lysat cellulaire, après une centrifugation, est purifié dans un premier temps par chromatographie d'affinité (voir partie expérimentale) sur une colonne Ni-NTA. (Complexe nickel-acide nitrilotriacétique). L'étiquette poly-histidines a une forte affinité pour le Ni-NTA. La protéine, étiquetée 6-histidine (His-LBD-NR4A1), est affiné à la colonne par son interaction entre son motif 6-histidine avec les ions nickel de la résine. Après lavage des protéines et débris cellulaires non retenus, la protéine d'intérêt est éluée avec une solution concentrée d'imidazole qui est plus affine au nickel que la protéine. Des échantillons des fractions obtenues sont analysés par électrophorèse SDS-PAGE dont le gel est présenté ci-après (Fig. 150). Les trois premières éluions (E1, E2 et E3) semblent contenir plus de 95 % de la protéine et peu de contaminants.

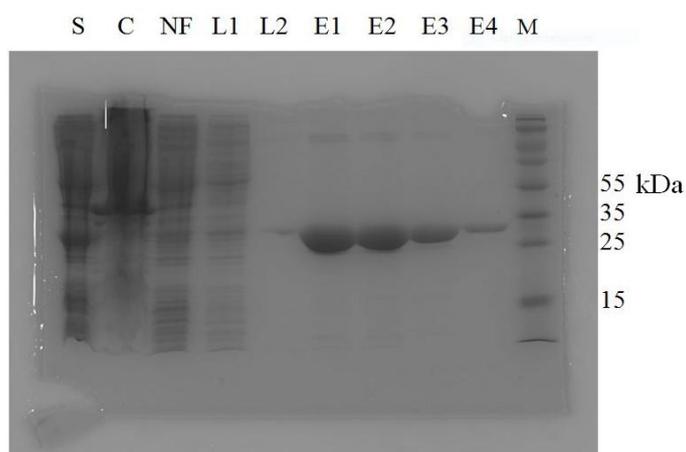


Figure 150 : Gel SDS-PAGE après chromatographie d'affinité de NR4A1 sur colonne de Ni-NTA (Piste 1 : Surnageant (S), Piste 2 : Culot (C), Piste 3 : non fixé (NF), Piste 4 : Lavage1 (L1), Piste 5 : Lavage2 (L2), Piste 6 : Eluant 1 (E1), Piste 7 : Eluant 2 (E2), Piste 8 : Eluant 3 (E3), Piste 9 : Eluant 4 (E4), Piste 10 : Marqueur (M))

Les premières fractions d'éluion sont donc rassemblées, concentrées jusqu'à un volume compris entre 5 et 10 ml, puis purifiées à nouveau par chromatographie d'exclusion, technique servant à séparer les protéines selon leur volume hydrodynamique. Sur le chromatogramme obtenu apparaissent trois pics distincts (Fig. 151a). Le premier pic (fraction 11 à 16) semble être dû à un contaminant non déterminé. Le second pic (fraction 29 à 34) pourrait être un homo-dimère de la protéine attendue. Le troisième pic très intense, (fraction 41 à 50) correspond, à notre protéine His-LBD-NR4A1. Une analyse par électrophorèse SDS-PAGE permet de confirmer ces résultats et de vérifier la pureté de la protéine (Fig. 151b). Le rendement de près de 15 mg par litre de culture étant important, pour privilégier la pureté, nous avons le plus souvent gardé uniquement la fraction E1 avec chromatographie d'affinité pour la deuxième étape de purification. Nous avons pour nos essais

de cristallisation et de quenching de fluorescence choisi uniquement de garder typiquement les fractions de 43 à 48. Elles sont rassemblées puis concentrées à façon.

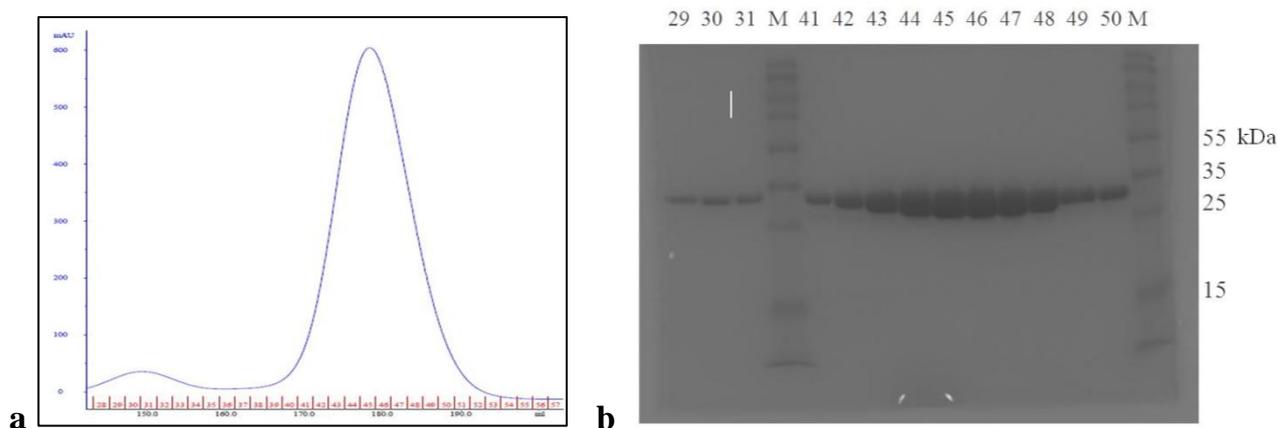


Figure 151 : (a) Chromatogramme (Zoom sur les deux derniers pics ; de la fraction 29 à 50) et (b) Gel SDS-PAGE associé de His-LBD-NR4A1 après l'étape de purification par gel filtration

IV.A.2- Mesure de l'affinité entre la protéine His-LBD-NR4A1 et les composés PhéDIMs

L'interaction entre les PhéDIMs synthétisés par nos soins et le domaine de liaison de ligand de NR4A1 a été déterminée par quenching de fluorescence. Lorsqu'elle est soumise à une excitation de longueur d'onde 297 nm, la protéine His-LBD-NR4A1 présente une bande de fluorescence dont l'intensité maximale est à 335 nm. Cette bande de fluorescence, rappelons-le, est due à la présence de résidus tryptophanes (W420 et W482) au sein de His-LBD-NR4A1. On peut noter que l'un de ces résidus tryptophanes (W482) est à proximité du site de fixation hypothétique (incluant Y453). À la même longueur d'onde d'excitation 297 nm, les PhéDIMs ainsi que les autres substances en solution (DMSO etc.) n'émettent aucune fluorescence. Chaque expérience de quenching de fluorescence a été répétée 3 fois dans des conditions thermostatées 20°C. Les spectres de fluorescence sont enregistrés dans le domaine de longueur d'onde compris entre 300 et 360 nm. Par effet de dilution (Fig. 152a), on constate une diminution de l'intensité de fluorescence pour $\lambda_{\max} = 335$ nm. Avec l'ajout de PhéDIM (Fig. 152b), on constate une amplification de cette diminution de l'intensité de fluorescence à $\lambda_{\max} = 335$ nm qui ne peut s'expliquer uniquement par l'effet de dilution. Cette forte baisse de l'intensité de fluorescence démontre l'interaction entre PhéDIM et le domaine LBD de NR4A1.

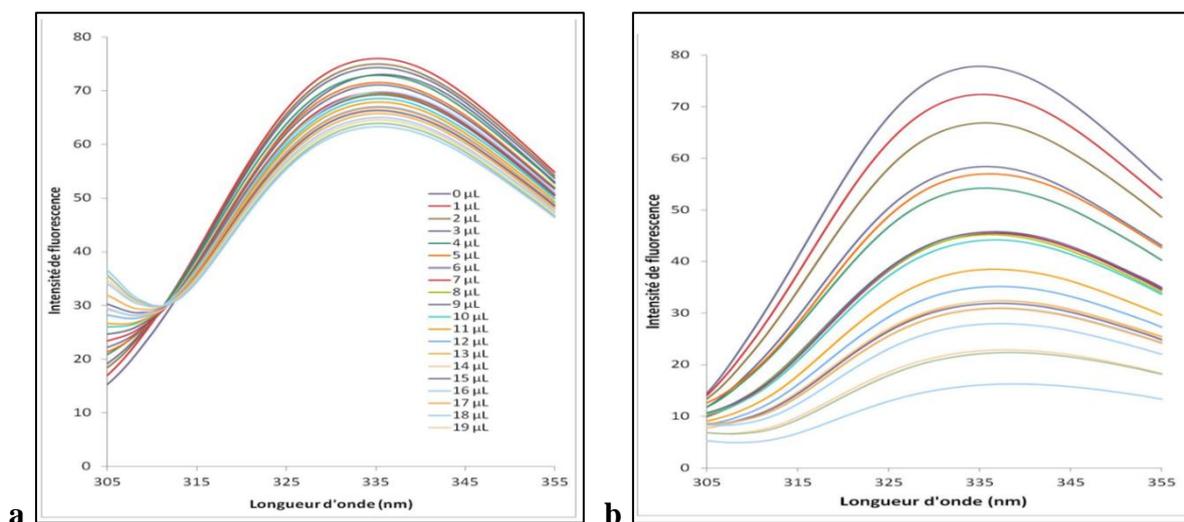


Figure 152: Courbes d'intensités de fluorescence : a) Baisses d'intensités dues à l'effet de dilution obtenues par ajouts successifs de 1 µL (en rouge) à 19 µL (en bleu clair) de solution aqueuses (5 % DMSO), b) Baisses d'intensités amplifiées dues à l'effet de ligand obtenues par ajouts successifs de 1 µL (en rouge) à 19 µL (en bleu clair) de solution de DIM-3 (5 % DMSO)

Pour estimer l'affinité de liaison de chaque PhéDIM, les valeurs des intensités de fluorescence ont été moyennées et normalisées. Les valeurs des constantes de dissociations K_d respectives ont été déduites à l'aide du logiciel Gnuplot et sont consignées dans le tableau ci-contre (Tab. 15).

Tableau 15 : Valeurs des constantes de dissociations K_d de PhéDIMs

PhéDIMs	Constante de dissociation K_d (μM)
24	$2,42 \pm 0,45$
Série 1	230 non déterminée
231	$3,71 \pm 0,62$
234	$3,77 \pm 0,51$
235	$2,83 \pm 0,39$
Série 2	236 $4,44 \pm 0,57$
236	$3,68 \pm 0,54$
238	$3,45 \pm 0,53$
239	$3,41 \pm 0,51$
256	$11,56 \pm 1,45$
Série 5	275 $6,21 \pm 0,88$
276	$5,29 \pm 0,80$

Les valeurs de K_d des complexes PhédIM/His-LBD-NR4A1 sont de l'ordre grandeur du micromolaire. Ces valeurs suggèrent une bonne affinité de liaison entre nos PhédIMs testés et le domaine LBD de NR4A1. Les séries 1 et 2 présentent des valeurs de K_d autour de 3 μM . Les composés de la série 1 se lient mieux au domaine His-LBD-NR4A1 que leurs analogues oxydés de la série 5. Dans la série 5, les composés **275** et **276** sont plus affins avec His-LBD-NR4A1 que **256**.

Précisons que la constante de dissociation du complexe **230**/His-LBD-NR4A1 n'a pas pu être déterminée malgré l'observation d'une diminution significative de l'intensité de fluorescence à 335 nm. D'autre part, l'interaction du composé **275** avec His-LBD-NR4A1 a pu être quantifiée quant à elle. Le composé **230** a été ré-analysé par RMN ^1H et IR et les spectres obtenus n'indiquent pas d'autres pics supplémentaires pouvant correspondre à un produit de dégradation. L'hypothèse d'une dégradation de **230** a donc été écartée. La non détermination du K_d du complexe **230** / His-LBD-NR4A1 s'explique sans doute par le manque de solubilité du **230** dans ces conditions expérimentales induisant une hétérogénéité des mesures d'intensité de fluorescence.

Les valeurs de K_d des complexes PhédIMs /His-LBD-NR4A1 que nous reportons ici sont du même ordre de grandeur que celle rapportée dans la littérature pour la Csn-B ($K_d = 1,91 \mu\text{M}$)⁹⁸ mais semblent 10 fois moins affins que celles trouvées pour les *para*-PhédIMs (Safe et coll., 2014). Toutefois, ce dernier résultat est à relativiser car nous trouvons une valeur de K_d pour **24** de $2,42 \pm 0,45 \mu\text{M}$ alors que pour ce même composé l'équipe de Safe propose quant à elle une valeur de K_d de $0,71 \mu\text{M}$ à 25 °C.

Les composés de la série 1 ont des K_d très voisins l'un de l'autre malgré la présence de groupements méthoxyles sur les noyaux aromatiques du **231**. Xia et coll. avaient reporté une différence importante d'affinité entre les composés EHMOA (**278**) et EDOPA (**279**) alors que ces deux composés ne diffèrent que par un groupement hydroxyle de **278** remplacé par un groupement méthoxyle pour **279**²⁴⁸. Cette spécificité n'est pas présente pour nos composés. L'ancrage des ligands au sein du His-LBD-NR4A1 n'est pas ici réduit par l'ajout de groupements méthoxyles en position 3', 4' et 5' du noyau phénylique. Ce constat est retrouvé si l'on compare les valeurs de K_d entre la série 1 et 2 : les six composés de la série 2 ont des constantes de dissociation quasi similaires à celles de la série 1 et ces valeurs laissent supposer que ni les groupements *N*-morpholino introduits sur les indoles pour améliorer la solubilité de ces composés, ni les groupements méthoxyles présents sur le groupement phényle, n'influencent l'interaction avec la His-LBD-NR4A1.

Cette étude démontre que les PhédIMs testés (à l'exception de **230** dont le mode d'interaction n'a pas pu être quantifié) interagissent avec le domaine His-LBD de NR4A1. Ces ligands pourraient

éventuellement jouer un rôle d'activateur ou de désactivateur du récepteur nucléaire NR4A1 lors de processus biologiques dans lesquels est impliqué ce dernier.

IV.A.3- Analyse et comparaison des modes de fixation prédictibles

Pour comprendre les modes de liaison de PhédIMs synthétisés et d'analogues de Csn-B sur le domaine LBD de NR4A1, des expériences de docking moléculaire ont été réalisées en utilisant le serveur web SwissDock^{239,241}. Pour chaque ligand, nous avons réalisé un calcul de docking par l'algorithme EADock. Le programme analyse les différentes modes de liaisons de docking proposées, et calcule un score énergétique pour chacun de ces modes. En se basant sur le score énergétique généré, nous avons choisi les meilleures orientations de docking.

Ces expériences ont été effectuées avec la structure cristallographique connue du LBD sans ligand de NR4A1 (code PDB : 2QW4, chaîne B). Cette structure a été choisie car déjà utilisée pour l'analyse de l'interaction entre NR4A1 et la Csn-B, un agoniste connu du récepteur NR4A1 et pour celle réalisée avec les PhédIMs²³⁵. Il faut rappeler que trois sites de liaison du LBD dont un par simulation de dynamique moléculaire ont été identifiés.^{96,99,244} Afin d'éviter un biais d'échantillonnage, les tests de docking ont été menés en prenant en compte la totalité du domaine LBD de la protéine et non une région spécifique de la protéine comme la poche de liaison. Pour valider notre analyse, le docking de LBD-NR4A1 avec la Csn-B a été réalisé avec Swisdock (déjà réalisés avec le logiciel Autodock par Zhang et coll.) et nous avons entrepris de faire également ceux avec les composés TMPA, le THPN et le PDNPA dont les structures cristallographiques sont connues.

Nous n'avons pas testé ici l'ensemble des PhédIMs que nous avons synthétisé car l'analyse par quenching de fluorescence a montré des modes d'interaction peu sensibles aux groupements ajoutés vis à vis du domaine LBD de NR4A1. Nous avons donc choisi des représentants de la série 1 et 2. Nous avons également voulu étudier l'interaction potentielle du PhédIM **230** par docking pour montrer qu'il peut potentiellement être un ligand de NR4A1 et cela malgré les résultats non concluants obtenus lors des expériences de quenching de fluorescence. Les composés de la série 5, quant à eux, n'ont pas été retenus pour l'analyse de docking car, comme nous l'avons exposé plus haut (chapitre 2), leur structure reste évasive.

IV.A.3.a- Sites de fixation privilégiés des molécules

Le docking de **21** a donné lieu à la détection de clusters d'orientation bien spécifiques sur les sites A et B décrit dans la structure cristallographique. L'énergie moyenne de liaison entre **21** et LBD-NR4A1 est de -7.15 Kcal/mol pour le premier cluster en position site B, contre -6.44 Kcal/mol pour le premier cluster en position site A. Ce résultat de docking est en accord avec la structure

cristallographique de **21**/LBDNR4A1 qui présente le ligand au sein de ces deux sites. Des résultats similaires ont été obtenus pour le docking de LBD NR4A1 en présence des composés **22** et **23**. Les ligands au sein des deux sites A et B ont des énergies moyennes de liaisons beaucoup plus élevées en valeur absolue que toutes autres orientations détectées. Le mode de fixation au domaine LBD proposé et l'orientation des ligands **20**, **21**, **22** et **23** que nous avons obtenus par docking sont en accord avec l'ensemble des résultats antérieurs. Ce résultat préliminaire nous a permis de valider notre mode opératoire.

Les énergies les plus favorables obtenues après chaque expérience de docking correspondent à une fixation des PhédIMs sur l'un des deux sites du LBD de la protéine NR4A1 (Fig. 153a) Ces sites correspondent à ceux décrit par Zhan et coll., à savoir les sites A et B (voir figure 142). Les poches de liaison éventuelles décrites par Flaig et coll. en 2005 et par Lanig et coll. par dynamique moléculaire²⁴⁴ ne semblent pas interagir avec les PhédIMs. Le mode de fixation et l'orientation des PhédIMs ont été obtenus et une représentation surfacique d'hydrophobicité des résidus de la structure du LBD est présentée (Fig. 153b).

Tout comme la Csn-B, la plupart des composés PhédIMs (**24**, **231**, **234**, **235**, **236**, **237**, et **238**) se fixent majoritairement préférentiellement sur le site B. Seuls les composés **230** et **239** s'ajustent prioritairement dans la cavité du site A (Tab. 16). Cette exception pour ces deux composés est aussi retrouvée pour le docking du composé **26** décrit par Safe et coll. Ceci nous a confortés dans notre approche de docking.

Tableau 16 : Energie de liaison de la meilleure orientation proposée par le docking pour chaque PhédIM étudié

Ligands	Énergie de liaison (kcal/mol)	
	Site A	Site B
24	—	-6,88
230	-7,08	—
231	—	-7,60
234	—	-7,94
235	—	-8,07
236	—	-7,93
237	—	-7,99
238	—	-7,85
239	-8,47	—

Tous ces composés adoptent une orientation dans laquelle le groupement phényle est légèrement orienté vers l'extérieur de la cavité de la poche de liaison (Fig. 154). Cette orientation est, comme nous le verrons par la suite, plus favorable à la formation de liaison hydrogène entre les amines des indoles et les résidus environnants de chacun des sites mentionnés.

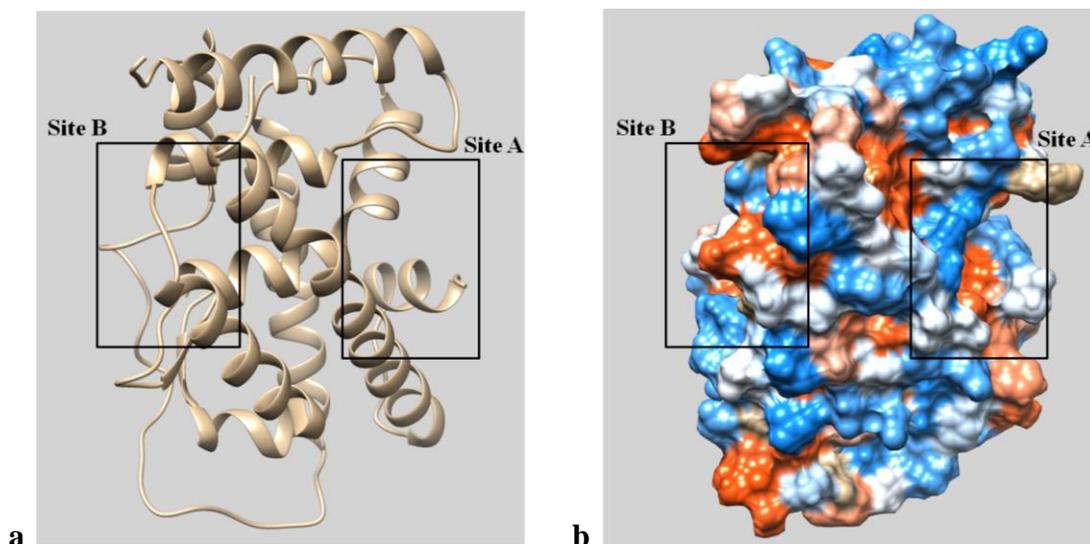


Figure 153 : Images du domaine LBD-NR4A1 présentées : a) sous la forme d'hélices, b) en surface d'hydrophobicité avec la mise en évidence des sites de fixation A et B.

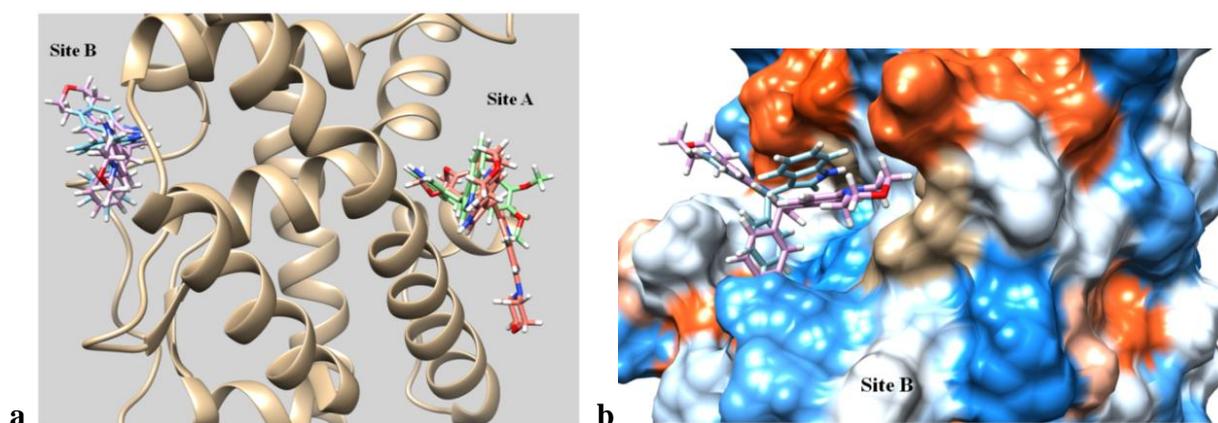


Figure 154 : Images de docking : a) mode de fixation de 24 (bleu), 234 (violet) sur le site A, et de 230 et 239 sur les sites B du LBD-NR4A1, b) Orientation de 24 (bleu) et de 234 (violet) dans la cavité du site B.

IV.A.3.b- Scores énergétiques et analyses des liaisons hydrogène

Les résultats du docking, comprenant le meilleur score *Fullfitness* (*FF*) de chaque composé pour l'apo-protéine LBD-NR4A1, sont résumés dans le tableau 17. Les valeurs du meilleur score

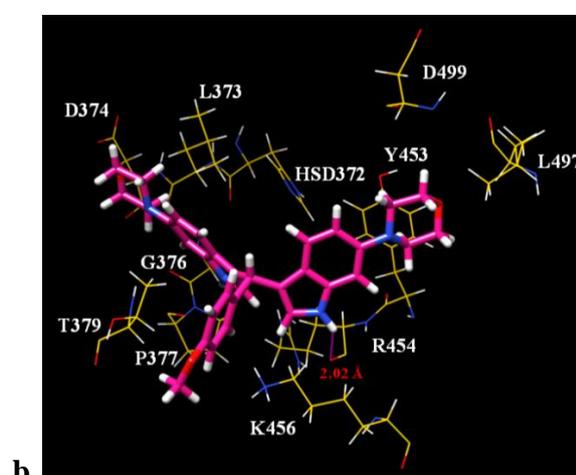
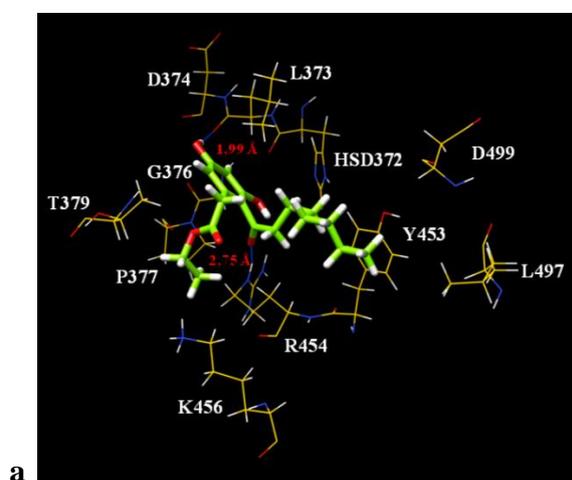
FF (entre -1258,06 et -1162,33 kcal/mol) des PhéDIMs et des analogues de Csn-B, montrent un mode de liaison du même ordre de grandeur que celui décrit pour Csn-B et ses trois analogues. Ces scores énergétiques *FF* montrent donc que tous ces composés se fixent efficacement au LBD et parfois par de notables liaisons hydrogène. Les composés de la série 1 et 2 ont des scores énergétiques *FF* similaires, ce qui appuie une fois encore les résultats de quenching de fluorescence obtenus précédemment.

La position ayant le meilleur score *FF* avec la Csn-B suggère la formation de deux liaisons hydrogène (liaisons H), l'une entre le groupement hydroxyle 5-OH (2,75 Å) et l'atome oxygène de la chaîne latérale du résidu L373 (1,99 Å), l'autre entre l'atome d'oxygène du groupement carbonyle (C=O) et le résidu R454 (Fig. 23 a). Un mode similaire de stabilisation par liaison hydrogène est proposé pour les composés **235** et **237** : l'atome d'oxygène de la chaîne latérale de R454 est impliqué dans une liaison hydrogène avec l'amine (NH) de l'un des indoles des composés **235** (2,02 Å) et **237** (2,43 Å). L'atome d'oxygène de la chaîne latérale de L373 forme une liaison hydrogène avec l'amine de l'une des noyaux indoliques de **24** (2,22 Å), **234** (2,5 Å) et **236** (2 Å). Nous pouvons relever que, d'une part, les molécules **20**, **235** et **237** ont en commun une liaison hydrogène qu'ils forment avec le résidu R454, et d'autre part, **20**, **24**, **234** et **235** forment une liaison hydrogène avec le même résidu L373 (Fig. 155). Ces résultats sont en accord avec la modélisation moléculaire de **20** avec NR4A1 décrite antérieurement où le composé **20** a été localisé dans la poche de liaison non loin du résidu Y453⁹⁸. L'implication de Y453 pour stabiliser **20** au sein du site de fixation est ici relative. Le résidu Y453 n'est pas impliqué par liaison hydrogène à la stabilisation du ligand.

Tableau 17 : Résultats du docking de PhéDIMs (série 1 en vert ; série 2 : en jaune) et d'analogues Csn-B avec LBD de NR4A1

Composé	Score <i>FF</i> (kcal/mol)	Atomes du composé	Résidus (Acide aminés)	Liaison H (Å)
20	- 1320,12	O de C=O	NH de R454	2,75
		H de OH	O de L373	1,99
21	- 1281,30	O de COC	NH de R554	2,77
			NH de R554	2,36
22	- 1295,32	H de OH	O de E445	2,64
		H de OH	O de S441	2,06

23	- 1353,48	H de OH	O de D499	2,07
		H de OH	O de D499	2,06
24	- 1258,06	H de NH	O de L373	2,22
		H de NH	O de G376	2,20
230	- 1227,34	H de NH	O de E445	1,99
231	- 1222,43	O de C=O	NH de R554	2,99
		O de C=O	NH de R554	2,68
		H de NH	O de V542	1,91
234	- 1196,99	H de NH	O de L373	2,49
235	- 1194,76	H de NH	O de R454	2,02
236	- 1192,25	H de NH	O de G376	2,19
237	- 1174,59	H de NH	O de L373	2
		H de NH	O de G376	2,18
238	- 1193,30	H de NH	O de R454	2,43
		H de NH	O de P377	2,4
239	- 1162,33	H de NH	O de T567	1,99
		H de NH	O de T595	1,75



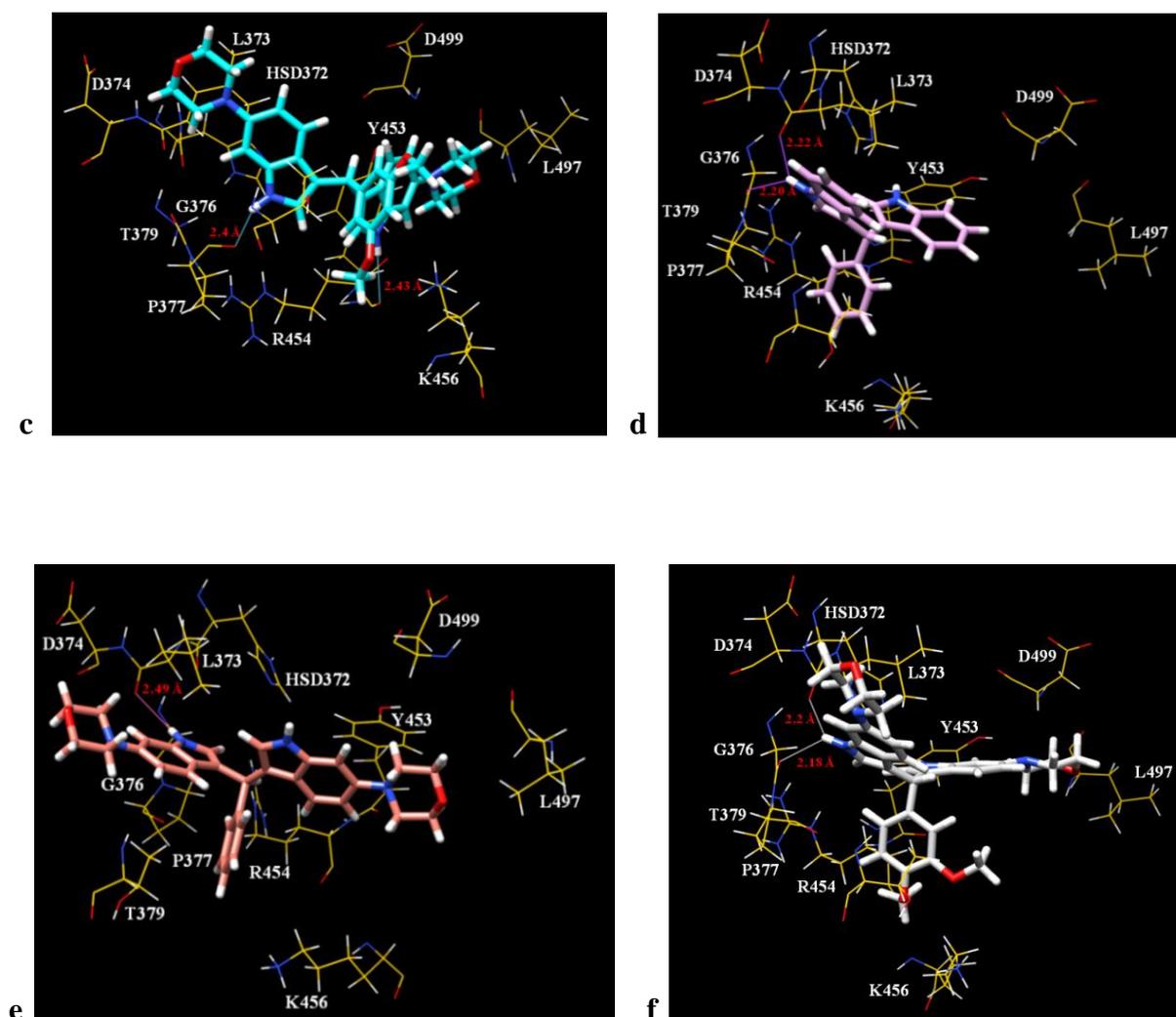


Figure 155: Captures d'image de docking au niveau du site A : a) 20 (vert) ; b) 235 (rose foncé) ; c) 238 (bleu) ; d) 24 (violet) ; e) 234 (rose claire) ; f) 237. Chaque composé interagissant au moins avec les résidus R454, L373 ou G376 par liaison hydrogène.

Le résidu R554 interagit aussi bien avec l'atome d'oxygène (COC) du groupement ester de **21** (TMPA) avec formation de deux liaisons hydrogène (2,36 Å et 2,77 Å) qu'avec l'atome d'oxygène (COC) du groupement méthoxyle de **231** (2,99 Å et 2,68 Å) (Fig. 156). R554 se trouve au niveau du site A. Dans la structure cristallographique du complexe TMPA-LBD, le ligand TMPA, considéré comme un antagoniste de NR4A1, a été identifié sur les deux sites A et B.

Les groupements hydroxyle 3-OH de THPN (**22**) et l'amine NH de **231** ont une interaction commune par liaison hydrogène, respectivement de 2,64 Å et 1,99 Å, avec le résidu E445. Ces données sont corroborées par la structure cristallographique du complexe THPN-LBD au sein duquel THPN a été identifié à proximité des résidus E445, R563, L556 et L559 (site A).

Les amines des deux indoles de **239** interagissent par liaison hydrogène respectivement avec les résidus T567 (1,989 Å) et T595 (1,753 Å). Ces résidus sont à proximité du résidu D594 qui est

impliqué dans une liaison hydrogène avec PDNPA dans la structure cristallographique du complexe PDNPA.

Nos résultats suggèrent que les PhéDIMs mentionnés ci-dessus se fixent probablement de façon privilégiée sur les mêmes sites de liaison que les analogues de **20** et ces interactions sont stabilisées par des liaisons hydrogène communes ou différentes.

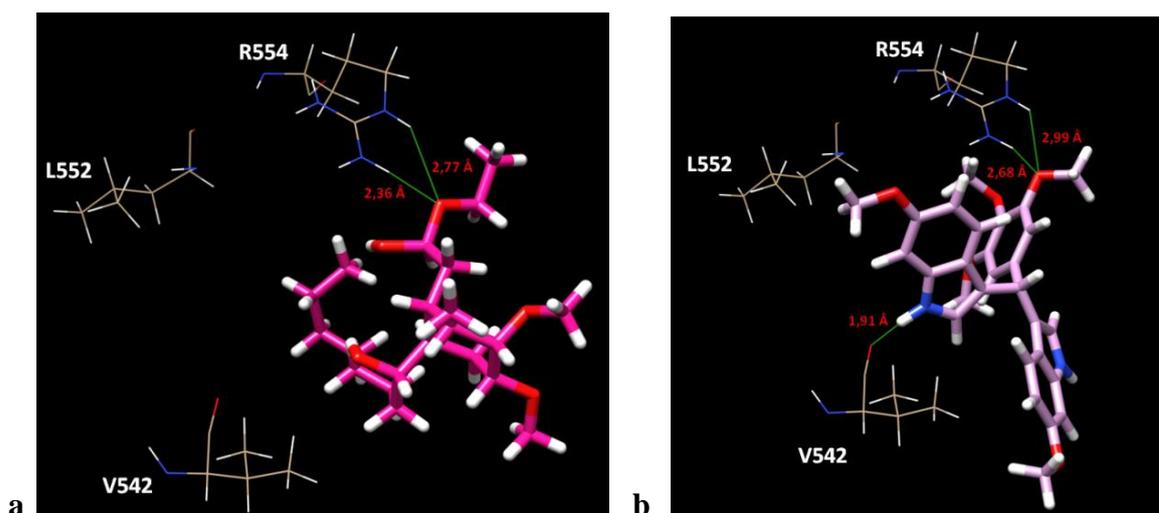


Figure 156 : Images de docking : a) **21** et b) **231**, tous deux formant deux liaisons hydrogène avec le résidu **R554**.

Sur la base des résultats de docking, on peut observer que les composés **24**, **234**, **235**, **237**, et **238** sont localisés aux voisinages des résidus **G376**, **T374**, **Y453** et **R454**. Ces résidus fournissent un environnement plus hydrophile pour les unités indoliques de ces composés. D'où, il est important de ne pas protéger les deux fonctions NH (ou au moins l'une des deux fonctions). En plus des interactions de liaisons H avec un ou plusieurs résidus, ces molécules se « logent » entre des hélices où des résidus peuvent former un environ plus ou moins hydrophobe.

IV.A.4- Étude Structurale : Cristallogénèse

En parallèle de nos études de quenching de fluorescence et de docking moléculaire nous avons réalisé des essais de cristallisation du domaine LBD de NR4A1 avec les PhéDIMs de synthèse pour déterminer leur structure cristallographique. Pour atteindre cet objectif, deux stratégies ont été menées : des tests de co-cristallisation à partir de solutions protéiques contenant un PhéDIM ; et des tests de cristallisation de la protéine seule puis après obtention de cristaux de l'apoenzyme, ajout du ligand d'intérêt (trempage).

Ces deux stratégies ont été menées en premier lieu par des criblages robotisés qui avaient pour but d'estimer les conditions de cristallisation les plus favorables, puis en se référant aux conditions de cristallisation décrites dans les travaux antérieurs.

IV.A.4.a- Premier criblage robotisé de l'apoenzyme NR4A1

Des tests de cristallisation ont été entrepris en utilisant en premier lieu les kits QIAJEN the JCSG Core Suite (384 conditions différentes dites « classiques »). Ces kits sont utilisés pour des cribles larges des conditions de cristallisation de protéines. Ces kits permettent de tester une large gamme de tampons à pH variés (4,5 à 10,1), différents sels ou additifs et de nombreux agents précipitants. Ce criblage avec le robot a été réalisé avec quatre boîtes de cristallisation de 96 puits à trois cupules. Dans chaque cupule, est déposé une goutte contenant de la solution protéique His-LBD-NR4A1 de concentration $C_p = 5$ ou 7 mg/ml et tous les additifs sont présents à une concentration 10 fois plus importante que celle de la protéine. Parmi les 1200 gouttes de cristallisation, seules trois pistes cristallines sont apparues lors du temps d'observation (J+1 à J+15). Dans le tableau ci-dessous, sont présentées les conditions dans lesquelles des « pistes cristallines » ont été obtenues (Tab. 18).

Tableau 18 : Conditions ayant donné des pistes cristallines après criblage au robot

Boîte	Puits	[His-LBD] (mg/mL)	Tampon	Précipitant	Sel
JCSG1	C12	7	pH 6,9	20 % PEG-3350	0,2 M SCN ⁻
JCSG3	B1	5 et 7	0,1 M Tris-HCl pH 8, 5	20 % PEG-8000	0,2 M MgCl ₂
JCSG3	D7	5 et 7	0,1 M HEPES pH 7	20 % PEG-6000	1 M LiCl

IV.A.4.b- Optimisation manuelle des conditions de cristallisation de l'apoenzyme NR4A1

À partir des conditions qui nous semblaient être les plus prometteuses (JCSG3 : puits B1 et D7), nous avons décidé de préparer des boîtes de cristallisation manuellement. Les paramètres d'optimisation pris en considération furent :

- gradient de pH (6,5 à 9) ;
- gradient de concentration de Tris-HCl ou de HEPES (25 à 150 mM) ;
- gradient de concentration de PEG-8000 ou de PEG-6000 (12 à 25 %).

Cette optimisation manuelle, à partir d'une solution protéique de concentration initiale de protéine de 5 ou 7 mg/ml, a permis d'obtenir des cristaux dans certaines conditions qui sont répertoriées dans le tableau 19. Les cristaux obtenus étaient de forme cubique de largeur avoisinant 150 microns (Fig. 157). Les cristaux ont été transférés dans une solution cryo-protectrice à l'aide d'une boucle. Cette solution est composée de la liqueur-mère supplémentée de l'agent cryo-protecteur (glycérol ou éthylène glycol 10 %). Le cristal est brièvement trempé dans la solution cryo-protectrice et alors congelé dans de l'azote liquide pour une utilisation ultérieure. La première étude de diffraction des rayons X a été réalisée sur la ligne de lumière PROXIMA1 du synchrotron Soleil (Saint Aubin, France). Le faible pouvoir diffractant de ces cristaux ($> 5\text{-}6 \text{ \AA}$ au mieux) n'a pas permis la résolution de structure cristallographique. Des essais de cristallisation dans les mêmes conditions que celles qui avaient permis l'obtention de cristaux de His-LBD-NR4A1, ont été réalisées pour reproduire des cristaux mais sans succès : aucun cristal n'a été obtenu lors de ces tests.

Tableau 19 : Conditions d'optimisation permettant d'obtenir des cristaux

Boîte	Puits	[His-LBD] (mg/mL)	Tampon	Précipitant	Sel
n° 2	D2	5	0,1 M Tris-HCl pH 7,5	20 % PEG-8000	0,2 M MgCl ₂
n° 6	A5	7	0,1 M Tris-HCl pH 7,5	22 % PEG-8000	0,2 M MgCl ₂
n° 6	B5	7	0,1 M Tris-HCl pH 8	22 % PEG-8000	0,2 M MgCl ₂
n° 6	C5	7	0,1 M Tris-HCl pH 8,5	22 % PEG-8000	0,2 M MgCl ₂
n° 7	Tous	5 et 7	0,1 M HEPES pH 7	14 % PEG-6000	0,5 à 1,25 M LiCl

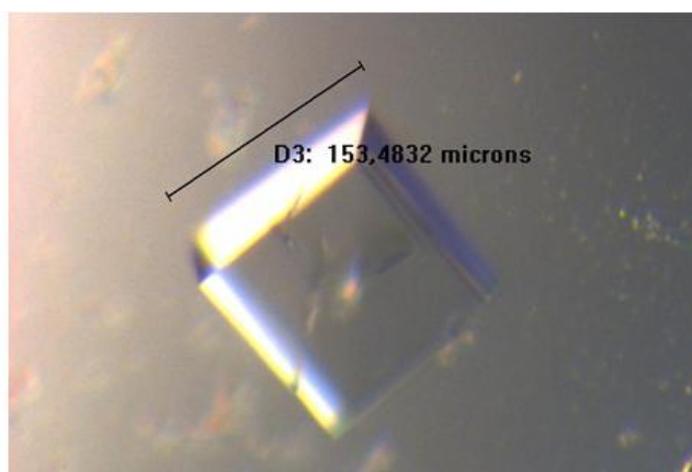


Figure 157 : Monocristal de la boîte 2, puits D2

IV.A.4.c- Deuxième criblage robotisé : essai de cristallisation de l'enzyme NR4A1 seule ou en présence de ligand (30 ou 231)

Nous avons effectué un criblage robotisé de quatre boîtes de cristallisation : deux contenant des solutions standards de cristallisation HAMPTON *Crystal Screen* et deux autres contenant des solutions standards HAMPTON *Index*. Plus de 200 conditions de cristallisation ont ainsi été testées. Dans chacune des cupules ont été placées des gouttes contenant respectivement :

- de solution protéique de concentration de 3 mg/mL,
- de solution protéique de concentration de 5 mg/mL.
- de solution protéique à 5 mg/mL incubée avec 15 mg/mL de **20** ou **231**.

Parmi les 1200 gouttes de cristallisation, aucun cristal n'a été observé.

IV.A.4.d- Essai de cristallisation de l'enzyme NR4A1 seule ou en présence du ligand 231 selon les conditions de cristallisation décrites dans la littérature.

Nous avons envisagé de reproduire les conditions de cristallisation décrites pour le domaine LBD de NR4A1 dans la littérature^{96,97,99} lors de nouveaux essais de cristallisation. Les conditions de cristallisation pour le complexe HisLBD-NR4A1 / TMPA décrites étaient les suivantes : pour l'obtention de cristaux de l'apoenzyme, la goutte est constituée d'un mélange 1 : 1 (v/v) de solution protéique LBD à 7 mg/ml avec de la solution du réservoir (100 mM citrate de sodium, pH 4.2, and PEG6000 à 7 %) ; pour l'obtention de cristaux de complexe LBD/TMPA, LBD et TMPA était mélangé dans un rapport molaire de 1:10 et la co-cristallisation était réalisée dans des conditions similaires à celles décrites pour l'apoenzyme excepté l'addition de 5% de DMSO dans le réservoir.

Cinq boîtes de cristallisation de 24 conditions ont été préparées avec deux gouttes par puits. La solution protéique de la première goutte correspondait à une solution de His-LBD-NR4A1 seule ($C_p = 7$ mg/mL) ; alors que la solution protéique de la deuxième goutte correspondait à un mélange His-LBD-NR4A1 /DIM3 dans un rapport molaire 1 :10 ($C_p = 7$ mg/mL). Chaque goutte au final était formée d'un mélange 1 : 1 (v/v) solution protéique / réservoir avec la solution réservoir constituée de PEG-6000 ou PEG 4000 et de citrate de sodium (0, 1 M). Les paramètres d'optimisation pris en considération furent :

- gradient de pH (3 à 6) ;
- gradient de concentration de PEG-6000 ou de PEG-4000 (4 à 30 %).

Des pistes cristallines sont apparues rapidement (J+1) et seulement dans les gouttes contenant le mélange HisLBD-NR4A1/DIM3. Il s'agissait d'agrégats de petits cristaux avec une coloration

rougeâtre (Fig. 158), difficilement exploitable. Il a été supposé qu'il s'agissait probablement de cristaux de mauvaise qualité de DIM3 seul. Les conditions de ces pistes sont indiquées dans le tableau 9. Mais en augmentant le temps d'observation (J+3 à J+5), on a pu observer l'apparition de «microcristaux» bipyramidaux qui pourraient correspondre à la protéine et qui apparaissaient dans les 2 gouttes d'un même puits. La taille de ces cristaux n'excédait toutefois pas les 20 microns.

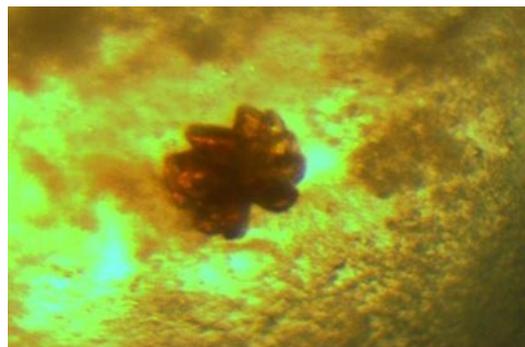


Figure 158 : Agrégat de «microcristaux» formés dans la goutte du puits A3 de la boîte 3'

Tableau 20 : Conditions d'optimisation de cristallisation de His-LBD –NR4A1

Boîte	Puits	[His-LBD] (mg/mL)	Tampon	Précipitant
n° 3'	A3	7	0,1 M citrate pH 4	15 % PEG-6000
n° 3'	A6	7	0,1 M citrate de sodium pH 5	15 % PEG-6000
n° 4'	B2	7	0,1 M citrate de sodium pH 3,63	20 % PEG-4000
n° 4'	B4	7	0,1 M citrate de sodium pH 4,25	22 % PEG-4000
n° 4'	B6	7	0,1 M citrate de sodium pH 5	14 % PEG-4000

Afin d'obtenir des cristaux bipyramides de tailles suffisantes pour mener à bien des expériences de diffraction des rayons X, nous avons été amenés à modifier différents paramètres. Tout en utilisant les tampons de citrate de sodium, l'agent précipitant PEG-6000 ou PEG-4000, nous avons augmenté dans un premier temps la concentration de His-LBD-NR4A1 ($C_p = 10$ à 16 mg/mL) au sein de la solution protéique constituant les gouttes. Nous avons testé également d'autres PhéDIMs plus solubles (235, 239...) et envisagé différents rapports molaires pour le mélange initial protéique His-LBD-NR4A1 / PhéDIM (ratio 1 : 5 à 1 : 10). Au total plus de 20 boîtes ont été préparées dans cette phase d'optimisation (boîtes 001 à 021).

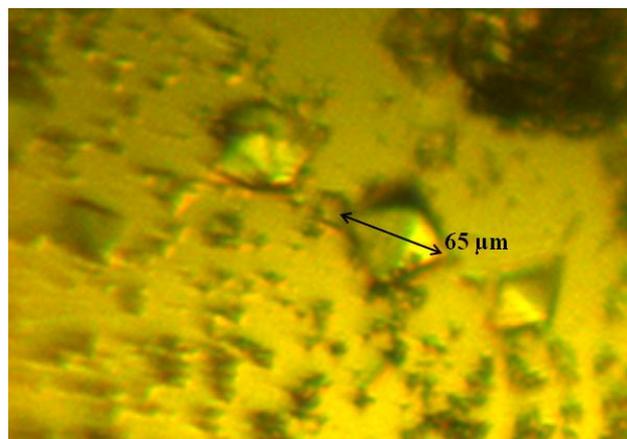


Figure 159 : Vue microscopique des cristaux bipyramidaux obtenus en présence de citrate de sodium avec une concentration plus grande de protéine (boîte 002, puits D2)

Plusieurs cristaux bipyramides se sont formés et ont été observés par microscopie avec des tailles allant de 30 à 70 μm (Fig. 159), et souvent dans des gouttes contenant un ligand potentiel.

Les conditions où ces cristaux ont été obtenus sont résumées dans le tableau ci-contre (Tab. 21).

Tableau 21 : Conditions d'optimisation par augmentation de la concentration de His-LBD-NR4A1

Boîte	Puits	[His-LBD] (mg/mL)	PhéDIM (ratio molaire)	Tampon	Précipitant
n° 001	D2	14,5	---	0,1 M citrate de sodium pH 3,03	5 % PEG-4000
n° 002	D1	14,5	---	0,1 M citrate de sodium pH 4,63	4 % PEG-4000
n° 002	D2	14,5	MpDIM3 (1 :10)	0,1 M citrate de sodium pH 4,63	5 % PEG-4000
n° 002	D6	14,5	MpDIM3 (1:10)	0,1 M citrate de sodium pH 4,63	9 % PEG-4000
n° 005	C1	14,5	---	0,1 M citrate de sodium pH 4,23	4 % PEG-6000
n° 008	C3	11,85	---	0,1 M citrate de sodium pH 4,6	6 % PEG-4000
n° 014	B4	16	MpDM1a (1:10)	0,1 M citrate de sodium pH 4,63	4 % PEG-4000

Les cristaux, généralement de dimension 30 x 50 μm , ont été montés sur des boucles, trempés dans une solution cryoprotectrice et congelés dans l'azote liquide à $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une analyse de diffraction des rayons X. Différents cryo-protectants ont été testés (glycérol 10 %, éthylène glycol 10 %). Plusieurs études de diffraction des rayons X ont été réalisées sur la ligne de lumière PROXIMA2 du synchrotron Soleil (Saint Aubin, France) dont la spécificité microfocus était adaptée à la taille de nos cristaux. Le faible pouvoir diffractant de nos échantillons ($< 5\text{-}9\text{ \AA}$) n'a pas, là encore, permis la résolution de structure cristallographique.

Nous avons ensuite été amenés à tester différents additifs. Tout en persévérant à utiliser les tampons de citrate de sodium, les agents précipitants PEG-6000 ou PEG-4000, nous avons apporté quelques modifications aux conditions précédentes au niveau de la constitution de la solution du réservoir. Différents ajouts d'additifs à divers pourcentages ont été testés dont notamment du glycérol ou du ZnSO_4 . Nous nous sommes focalisés à ce stade sur l'optimisation de la taille des cristaux de His-LBD-NR4A1 seul, tout envisageant de réaliser par la suite le trempage de cristaux de la protéine dans des solutions de PhéDIM. Ces dernières modifications ont été très fructueuses

car les cristaux obtenus présentaient des tailles 5 fois plus grandes que celles des conditions précédentes (largeur comprise entre 100 et 200 μm) (Fig. 160). L'ajout de glycérol en modifiant les interactions protéines/solvant, s'est révélé être déterminant pour optimiser la taille des cristaux. Le glycérol forme des liaisons hydrogènes avec l'eau entraînant une diminution de la couche d'hydratation ce qui favorise la formation des contacts cristallin. Les solutions de puits dans lesquelles l'aspect des cristaux a semblé le plus prometteur sont indiquées dans le tableau 22.

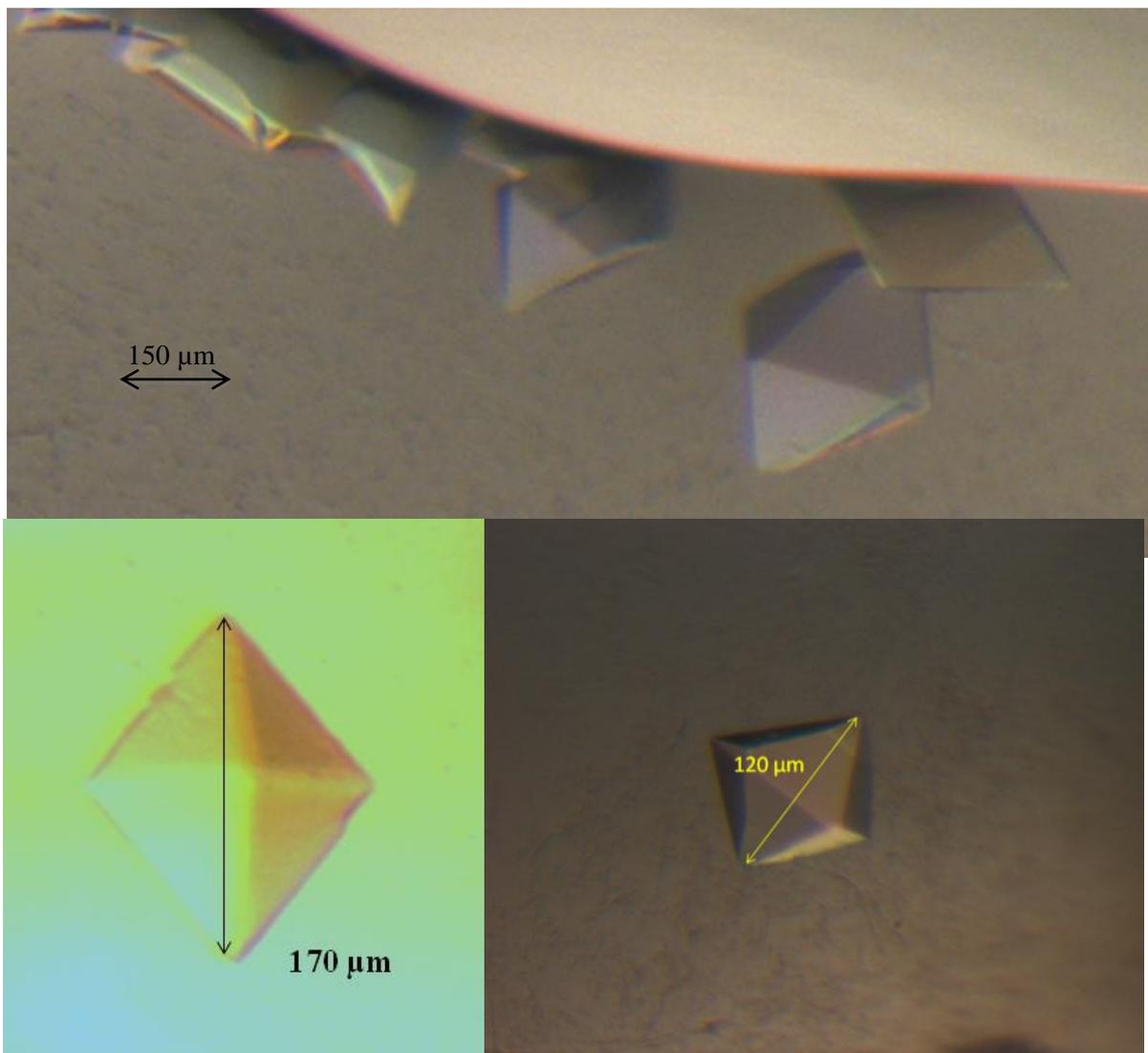


Figure 160 : Vue microscopique de cristaux bipyramidaux de l'apo-enzyme His-LBD-NR4A1 formés après une amélioration des conditions d'optimisation par ajout d'additifs dans les réservoirs. (Boîte 2, b6 ; boîte 6, puits b2 et c3)

Tableau 22 : Conditions optimales de cristallisation de His-LBD-NR4A1 en présence d'additifs tels que le glycérol et de ZnSO₄ dans les réservoirs, ayant favorisé la formation de cristaux de taille plus grande.

Boîte	Puits	[His-LBD] (mg/mL)	Tampon	Précipitant	additif
Patnur2	A4	15	0,1 M citrate de sodium pH 3,4	12,5 % PEG-4000	10 ⁻³ M ZnSO ₄
Patnur2	A5	15	0,1 M citrate de sodium pH 3,4	15 % PEG-4000	10 ⁻³ M ZnSO ₄
Patnur2	B5	15	0,1 M citrate de sodium pH 3,9	15 % PEG-4000	10 ⁻³ M ZnSO ₄
Patnur2	B6	15	0,1 M citrate de sodium pH 3,9	17,5 % PEG-4000	10 ⁻³ M ZnSO ₄
Patnur3	D1	15	0,1 M citrate de sodium pH 4,2	7,5 % PEG-4000	20 % glycérol
Patnur4	B2	15	0,1 M citrate de sodium pH 4,2	5 % PEG-4000	20 % glycérol
Patnur4	D6	15	0,1 M citrate de sodium pH 4,7	5 % PEG-4000	40 % glycérol
Patnur5	C3	15	0,1 M citrate de sodium pH 4,2	7,5 % PEG-4000	25 % glycérol
Patnur5	C4	15	0,1 M citrate de sodium pH 4,2	7,5 % PEG-4000	30 % glycérol
Patnur6	C3	15	0,1 M citrate de sodium pH 3,9	20 % PEG-4000	10 ⁻³ M ZnSO ₄

Après avoir testé le pouvoir diffractant (résolution 3 Å) de ces cristaux de HisLBDNR4A1 seule sur la ligne de lumière PROXIMA1 du synchrotron Soleil (Saint Aubin, France) des essais de trempage ont été réalisés pour faire diffuser au sein de ces cristaux de His-LBD-NR4A1 les ligands **231** ou **239**. Les trempages ont été faits en transférant le cristal natif à l'aide d'une boucle dans la solution de trempage. La solution de trempage est de la liqueur-mère supplémentée par 10 mM solution de PhéDIM. La dégradation liée à la précipitation de **231** dans ces conditions expérimentales nous a conduit à n'étudier que la diffusion de **239**. La durée de trempage typique varie entre 10 min et 1h, temps pendant lequel le cristal est observé, afin d'arrêter le trempage en cas de dégradation visible. Des temps de trempage plus longs (18h) ont été testés du fait de la stabilité apparente des cristaux en présence de **239**. Du part la présence de glycérol dans l'échantillon, l'étape de cryoprotection n'a pas été jugée nécessaire. Parmi le lot d'échantillons testés sur la ligne de lumière PROXIMA 1 du synchrotron Soleil (Saint Aubin, France), 4 jeux de données, correspondant à un temps de trempage de 18h, avec des résolutions comprises entre 2 et 3 Å ont été collectés à 100 K. La ligne possède un détecteur grande surface (PILATUS 6M). Les 4

jeux de données ont été intégrés à l'aide du logiciel XDS^{250,251} et les paramètres de maille et les statistiques de collection de données sont reportés dans le tableau 23. Le remplacement moléculaire a été réalisé avec le logiciel CCP4²⁵² en utilisant la structure PDB 4JGV modifiée comme modèle (le ligand THPN a été omis pour l'élaboration du template). La construction manuelle et l'ajustement structural ont été réalisés avec le logiciel Coot²⁵³ à l'aide des programmes de la suite CCP4.

Tableau 23 : Les différents paramètres cristallographiques après traitement des jeux de données obtenus par diffraction aux rayons des cristaux de l'apo-enzyme LBD-NR4A1

	Jeu 1	Jeu 2	Jeu 3	Jeu 4
Résolution range (Å)	48.05 - 2,88	48.65 - 2,16	47,92 - 2,36	48,42 - 2,73
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètre de maille $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 74,58 Å b = 76,94 Å c = 109,12 Å	a = 77,09 Å b = 77,09 Å c = 107,45 Å	a = 75,48 Å b = 75,48 Å c = 108,34 Å	a = 76,42 Å b = 76,42 Å c = 107,71 Å
Nombre de réflexions totales	114773	374660	201970	32791
Nombre de réflexions uniques	14658	24139	13465	8956
Redondance	7,8	15,5	15,0	14,8
Complétude	99,8 %	99,3 %	99,7 %	99,7 %
R_{merge}	0,10	0,07	0,12	0,11
Moyenne I/σ(I)	15,15	17,8	31,52	27,33

Durant l'indexation, le logiciel détermine plusieurs possibilités de systèmes cristallins et de paramètres de maille compatibles avec la position de tâches de diffraction. Les différents paramètres de maille proposés sont classés en fonction d'une pénalité évaluant la qualité de la prédiction de paramètres de mailles. Plus la pénalité est faible, plus les paramètres de mailles correspondent aux données expérimentales. Le réseau est choisi selon deux critères : la valeur de la pénalité et parmi les solutions de faible pénalité, celle qui a la plus haute symétrie.

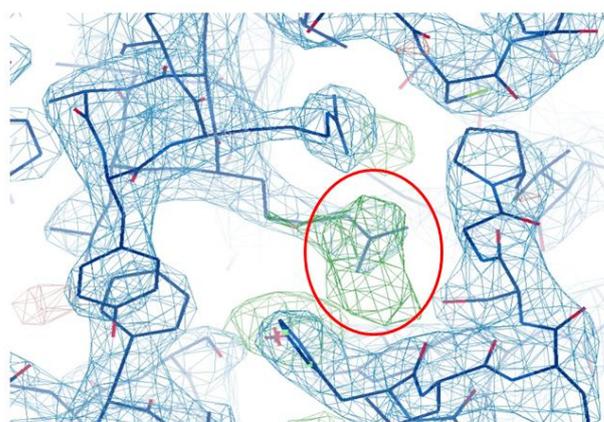


Figure 161 : Carte de densité électronique du site A de His-LBD-NR4A1 (bleue) révélant la présence de glycérol en son sein (vert entouré en rouge)

En conclusion, le traitement des jeux de données a permis de confirmer que nous avons bel et bien la structure cristallographique de l'apo-enzyme de NR4A1 dans deux groupes d'espaces différents orthorhombique et hexagonal ($P2_12_12_1$ et $P4_12_12_1$). Aucun ligand n'est observé au sein de ces structures cristallographiques déterminées. Le glycérol a diffusé au niveau du site de liaison A de la protéine (Fig. 161) et empêcherait l'arrivée du ligand Mp-DIM3. Des travaux complémentaires de co-cristallisation et de trempage sont en cours de réalisation au laboratoire pour tester d'autres cristaux.

IV.B- Évaluation biologique

IV.B.1- Méthodes employées pour les tests in vitro

Les 12 composés évalués lors des tests d'interaction (**séries 1, 2 et 5**), ont été choisis pour l'évaluation biologique. De plus, le composé méthylé **233**, antérieurement synthétisé et ayant montré une activité cytotoxique et pro-apoptotique servira de référence positive pour cette évaluation. Il n'est pas d'ailleurs sensible à l'oxydation et peut être considéré comme stable.

L'évaluation biologique a consisté dans un premier temps à mesurer l'activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses humaines. Dans un second temps, l'activité pro-apoptotique a été évaluée en choisissant les composés présentant les résultats sur les tests de cytotoxicité les plus encourageants.

Les deux types de tests biologiques ont été réalisés par la *Plateforme de criblage des cibles biologiques (CIBI)*, sous la direction de Monsieur Jérôme BIGNON à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS, Gif-sur-Yvette. Les détails de ces deux tests seront présentés ci-dessous.

IV.B.1.a- Évaluation de l'activité sur la viabilité et la prolifération des cellules humaines

L'évaluation de l'activité des 13 molécules a été effectuée sur la viabilité et la prolifération de quatre lignées cellulaires : HT-29 (cancer du côlon), Mia Paca-2 (cancer du pancréas), MCF-7 (cancer du sein), PC-3 (cancer de la prostate), à l'aide du test CellTiter96® Aqueous One Solution (Promega). Ce test permet de déterminer par colorimétrie le nombre de cellules vivantes. Le CellTiter96® Aqueous One Solution est un kit de 96 puits qui contiennent un sel de tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium ; MTS] et d'un agent de couplage d'électrons (l'éthosulfate de phénazine, PES ou le méthosulfate de phénazine, PMS). Ce dernier lorsqu'il est combiné avec le MTS permet de former une solution stable.

Le test est basé sur la réduction de sel de tétrazolium (ici MTS) en formazan par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes (Fig. 162). Le formazan est un produit qui possède une absorbance maximale à 490 nm.

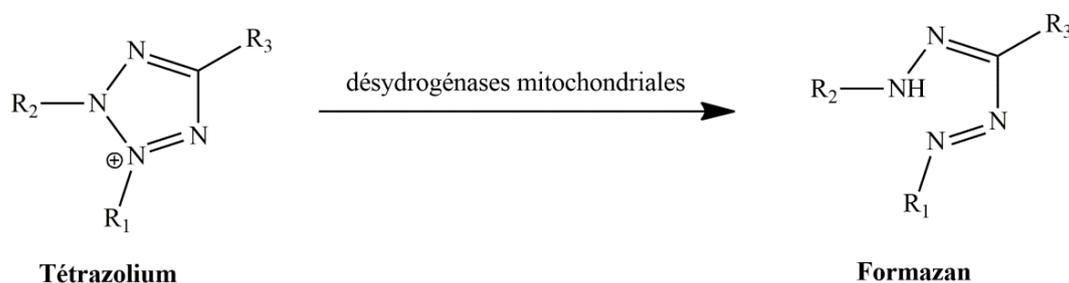


Figure 162 : Réduction de sel de tétrazolium en formazan

Les 13 composés ont été testés à des concentrations de 100 μM à 0,5 μM (10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-5} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-7}$ M) sur les quatre lignées cellulaires. La durée d'exposition est de 48 h. La concentration inhibitrice de la viabilité cellulaire de 50 % (CI_{50}) pour chaque composé est exprimée en μM .

IV.B.1.b- Évaluation de l'activité pro-apoptotique des cellules cancéreuses

Pour évaluer les effets pro-apoptotiques sur les cellules cancéreuses humaines, les composés ont été testés de 3 à 5 concentrations en triplicata en mesurant l'activité des caspases 3 et 7 à l'aide du kit Apo-ONE® Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega). Le kit Apo-One Homogenous Caspase-3/7 comporte les réactifs profluorescents nécessaires permettant une mesure rapide et sensible des activités des caspases-3 et -7.

IV.B.2- Résultats et discussion

Tout d'abord, les résultats des tests de cytotoxicité des 12 composés seront présentés, puis ils seront analysés en fonction de la présence ou non de substituants (méthoxy ou morpholino) sur les noyaux aromatiques dans chaque série. Ensuite, les effets cytotoxiques observés sur les quatre lignées cellulaires seront comparés pour l'ensemble des composés testés. Enfin, nous présenterons et interpréterons les résultats de l'activité pro-apoptotique en la liant, si possible, aux tests de cytotoxicité.

IV.B.2.a- Effets cytotoxiques des trois séries de composés sur les quatre lignées cellulaires

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 24 ci-dessous. Les valeurs moyennes de CI_{50} sont comprises entre 0,4 et 100 μM . Ces valeurs de CI_{50} peuvent considérablement varier d'une lignée à l'autre ou d'une série à l'autre.

Le composé **233***, utilisé dans cette évaluation biologique comme référence, possède les activités cytotoxiques les plus intéressantes de l'ordre du micromolaire au submicromolaire suivant les lignées cellulaires.

Dans la série 1, correspondant aux PhédIMs symétriques non substitués sur l'indole par un groupement *N*-Morpholino, (en vert), les composés ne présentent pas d'activité cytotoxique qu'ils soient substitués ou non sur le groupement phényle. Seul le composé **231**, substitué en position 6 sur l'indole par un groupement OCH_3 s'avère actif sur les cellules cancéreuses Mia Paca-2 ($8 \pm 0,5 \mu M$) alors que pour **24** et **230**, les CI_{50} sont proches de 100 μM sur les quatre lignées. Il n'a pas été possible de confirmer les résultats antérieurement obtenus au laboratoire pour **230** et surtout pour **231**. En effet, lors de leur synthèse fortuite initiale, les cytotoxicités de ces deux composés **230** et **231** avaient été ciblées sur des cellules de mélanome murin B16 (CI_{50} respectives de 34,0 et 0,75 μM), ainsi que sur des cellules humaines de cancer de la prostate PC-3 (CI_{50} respectives de 22,6 et 0,221 μM) et LnCaP (CI_{50} respectives de 4,84 et 0,423 μM).

Dans la série 2 dont les composés sont tous substitués en 6 par une morpholine, les différences structurales concernent le nombre et les positions des groupements OCH_3 substituant la partie phénylique. Deux composés se distinguent. Le composé **234**, dépourvu de substituants sur le noyau phényle, présente une très bonne activité sur toutes les quatre lignées cellulaires de l'ordre du submicromolaire au micromolaire. Le composé **235** présentant un substituant méthoxyle en *para* sur le noyau phényle se montre dépourvu de cytotoxicité sur l'ensemble des lignées. Ceci est en désaccord avec les travaux de Safe sur le composé **25** qui est substitué en *para* sur le noyau phényle par un groupement méthoxyle¹⁰⁹. La présence d'un substituant méthoxyle en *méta* (**236**) est aussi défavorable mais dans une moindre mesure que dans le cas de sa présence en *para*. D'une manière générale, les CI_{50} obtenues sur les lignées HT-29 et PC-3 sont comparables quelques soient les composés de la série 2 évalués et la lignée cellulaire Mia Paca-2 reste la plus sensible à ces composés.

La série 5 est constituée des trois PhédIMOX (**256**, **275** et **276**) correspondants respectivement aux PhédIMs (**30**, **230** et **231**) de la série 1. Ces composés par rapport à leurs analogues non oxydés, retrouvent une activité cytotoxique (ils sont en moyenne de 5 à 10 fois plus

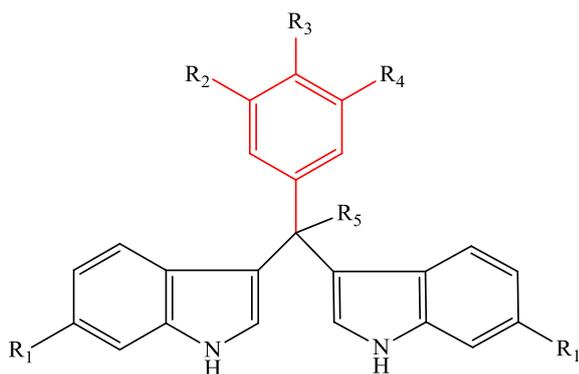
actifs sur les quatre lignées). Cependant, le composé **276**, trisubstitué sur le phényle reste peu ou pas actif sur les lignées HT29 et PC-3.

Il faut rappeler que les PhéDIMs oxydés ont été étudiés jusque là principalement comme des chémo-senseurs colorimétriques ou des capteurs chimiques de métaux de transition^{220–223,229}. Nos résultats montrent que les PhéDIMs oxydés, pourraient aussi être de potentiels agents cytotoxiques.

En conclusion, pour les composés non substitués sur l'indole (série 1), aucune activité cytotoxique n'est observée, que le noyau phénylique soit ou non substitué. Seule, la substitution en position 6 sur l'indole permet de retrouver un peu d'activité sur une seule lignée, la lignée Mia Paca-2.

Les composés substitués en 6 par une morpholine (série 2), perdent leur activité par substitution sur le phényle, sur la lignée cellulaire Mia Paca-2, conservant une sensibilité plus importante. Les composés oxydés sont d'une manière générale plus cytotoxiques que les composés de départ sur les trois exemples synthétisés et évalués.

L'effet d'une substitution du pont méthane par un méthyle augmente nettement la cytotoxicité d'un facteur 100 ou bien ne s'agit-il que d'une stabilité accrue.



- 24** : R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ = H,
- 230** : R₁ = H ; R₂, R₃, R₄ = OCH₃ ; R₅ = H,
- 231** : R₁, R₂, R₃, R₄ = OCH₃ ; R₅ = H,
- 234** : R₁ = morpholino ; R₂, R₃, R₄, R₅ = H,
- 235** : R₁ = morpholino ; R₂, R₄, R₅ = H ; R₃ = OCH₃,
- 236** : R₁ = morpholino ; R₂, R₃, R₅ = H ; R₄ = OCH₃,
- 237** : R₁ = morpholino ; R₂, R₅ = H ; R₃, R₄ = OCH₃,
- 238** : R₁ = morpholino ; R₃, R₅ = H ; R₂, R₄ = OCH₃,
- 239** : R₁ = morpholino ; R₂, R₃, R₄ = OCH₃ ; R₅ = H,
- 256** : R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ = OH,
- 275** : R₁ = H ; R₂, R₃, R₄ = OCH₃ ; R₅ = OH,
- 276** : R₁, R₂, R₃, R₄ = OCH₃ ; R₅ = OH,
- 233*** : R₁, R₂, R₃, R₄ = OCH₃, R₅ = CH₃

NB : Les structures avec R₅ = OH ont été déduites de l'étude structurale présentée dans le chapitre 2.

Tableau 24 : Résultats de l'activité cytotoxique de PhédIMs de synthèse sur les cellules cancéreuses humaines

		Concentration inhibitrice, CI ₅₀ (μM)			
	Composés	HT-29	Mia Paca-2	MCF-7	PC-3
Série 1	24	> 100	91 ± 3	> 100	> 100
	230	> 100	98 ± 1,5	> 100	> 100
	231	72 ± 4	8 ± 0,5	50 ± 0,4	> 100
Série 2	234	0,6 ± 0,02	0,9 ± 0,05	1,6 ± 0,3	8 ± 2
	235	> 100	> 100	> 100	> 100
	236	50 ± 0,2	5 ± 1	> 100	55 ± 3
	237	> 100	> 100	17 ± 0,1	> 100
	238	> 100	6 ± 1	93 ± 1	> 100
	239	> 100	3 ± 0,1	43 ± 0,6	> 100
Série 5	256	10,3 ± 2	10 ± 3	47 ± 0,1	20 ± 1
	275	26 ± 2	8 ± 0,9	27 ± 0,5	25 ± 3
	276	91 ± 3	13 ± 1,6	26 ± 0,9	80 ± 3
Référence ²⁰⁷	233*	0,6 ± 0,01	0,4 ± 0,7	1,6 ± 0,1	1 ± 0,1

Les composés **231**, **239** et **233*** possèdent tous une similarité structurale avec leur noyau triméthoxyphényle. Les tests de cytotoxicité sur les cellules Mia Paca-2 ont montré que la présence d'un groupement morpholine (**239**) en position 6 des indoles ne modifie pas l'activité cytotoxique par rapport à la présence d'un groupement méthoxyle en cette même position (**231**) (3 μM vs 8 μM). Le composé **233**, ayant un groupement méthyle sur le carbone central (C-1'''), a présenté une meilleure activité cytotoxique comparée à celle de son analogue **231** (0,4 μM vs 8 μM).

Tableau 25 : Valeurs de la CI₅₀ des composés actifs sur les cellules Mia Paca-2

	Série 1	Série 2				Série 5			Référence
Lignées	231	234	236	238	239	256	275	276	233
Mia Paca-2 (CI ₅₀ , μM)	8 ± 0,5	0,9 ± 0,05	5 ± 1	6 ± 1	3 ± 0,1	10 ± 3	8 ± 0,9	13 ± 1,6	0,4 ± 0,7

En résumé, l'introduction d'un groupement *N*-morpholino sur les indoles qui a pour effet d'augmenter l'hydrophilie des composés semble améliorer les activités cytotoxiques des PhédIMs.

Les résultats obtenus montrent que, sur l'ensemble des trois séries testées (excepté les composés **236** et **237** qui sont substitués en *para* ou en *mé*ta et *para*), la majorité des composés sont actifs sur les cellules cancéreuses Mia Paca-2 du pancréas (Tab. 25). Les valeurs de concentration inhibitrice (CI₅₀) obtenues sont du même ordre de grandeur que celles des PhédIMs *para* substitués rapportées couramment dans la littérature^{103,105,108,110–113}. Nous avons donc décidé de choisir ces neuf composés (**231**, **234**, **236**, **238**, **239**, **256**, **275**, **276** et **233***) pour étudier leur activité pro-apoptotique sur ces cellules Mia Paca-2.

IV.B.2.b- Effets pro-apoptotiques des composés PhédIMs sur les cellules Mia Paca-2

Pour les composés **234** (aux concentrations 1, 5 et 10 μM), **236** (aux concentrations 5, 25 et 50 μM) et **233*** (aux concentrations 10, 50 et 100 μM), aucune activité pro-apoptotique n'a été détectée et aucune mort cellulaire n'a été observée, ce qui ne correspond pas aux résultats de cytotoxicité précédemment obtenus. L'activité pro-apoptotique de **239** n'est observable qu'au delà de la concentration de 100 μM.

Pour les composés **256**, **275** et **276**, on observe après 24 h une induction de l'apoptose à une concentration proche de la CI₅₀ et une mortalité importante aux concentrations plus élevées qui ne nous permet plus de mesurer une activité pro-apoptotique (Tab. 26).

Tableau 26 : Résultats de l'activité pro-apoptotique des PhéDIMs de synthèse sur les cellules cancéreuses Mia Paca-2

		Concentration en μM				
Composé		1	5	10	50	100
Série 1	231	-	$36,8 \pm 0,7$	$66,9 \pm 5,5$	$36,9 \pm 10$	-
Série 2	236	-	-	$68 \pm 6,4$	$20,8 \pm 3,2$	$31,4 \pm 3,7$
	239	-	-	-	-	$28,1 \pm 5,8$
Série 5	256		$23,2 \pm 9,5$	$109,2 \pm 1,8$	ND	ND
	275	$29,5 \pm 0,3$	$67,6 \pm 3,1$	$158,9 \pm 14,8$	ND	ND
	276	$46,7 \pm 14,2$	$98 \pm 22,7$	$58,9 \pm 2$	ND	ND

ND : non déterminée car les cellules sont mortes.

En conclusion, ces résultats préliminaires de détermination de l'activité pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses Mia Paca-2 n'ont pas permis d'établir clairement une corrélation entre l'activité cytotoxique de ces composés et l'activité pro-apoptotique. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que les composés **230**, **231** et **233** se sont avérés antérieurement pro-apoptotiques, soit en activant des caspases (mise en évidence par le colorant spécifique Hoechst)²⁰⁷, soit en induisant la caspase-3 en particulier (230 et 230 par western blot) aux mêmes concentrations que celles bloquant la croissance cellulaire. D'autres tests devront donc être réalisés pour confirmer ou infirmer ces résultats préliminaires.

V- Conclusion

Nous avons montré par les tests d'interaction de fluorescence que les composés des trois séries (à l'exception de **230**) étudiées avaient une affinité relativement intéressante (constante de dissociation de l'ordre du micromolaire) avec le domaine His-LBD de NR4A1 et donc pourraient se interagir avec ce récepteur nucléaire impliqué dans l'apoptose.

L'analyse du mode de fixation par docking moléculaire corrobore cette affinité entre les PhéDIMs et le domaine LBD-NR4A1 avec l'obtention de scores énergétiques proches de celles de ses analogues de la Csn-B (**20**, **21**, **22** et **23**). Cette expérience *in silico*, nous a permis de montrer que la fonction amine (NH) des indoles et l'atome d'oxygène du groupement méthoxyle du phényle forment des liaisons hydrogène avec les résidus de NR4A1 et donc peuvent jouer un rôle important de stabilisation dans la formation du complexe PhéDIM-NR4A1 en fonction du site de fixation A ou B.

Après plusieurs essais de cristallisation, nous avons pu obtenir des cristaux de meilleures qualités de l'apoenzyme LBD-NR4A1 et sa structure cristallographique a été déterminée par diffraction aux rayons X avec une résolution de l'ordre de 2 Å. Des tests préliminaires réalisés avec le composé **234** par la technique de trempage (soaking) se sont avérés pour le moment peu concluants. D'autres conditions d'optimisation de trempage (ou encore de co-cristallisation) doivent être envisagées afin d'obtenir de cristaux de qualité du complexe ligand-apoenzyme.

Les tests de cytotoxicité de l'ensemble des trois séries, seul le composé **234** (possédant un groupement *N*-morpholino sur les indoles et non substitué sur le noyau phényle) s'est avéré actif avec une concentration inhibitrice (CI₅₀) de l'ordre du **submicromolaire** sur l'ensemble des cellules cancéreuses testées. Toutefois, les composés **231**, **236**, **239**, **256**, **275** et **276** présentent une activité cytotoxique de l'ordre du micromolaire sur les cellules cancéreuses humaines Mia-Paca-2 du pancréas. Concernant l'activité pro-apoptotique, les premiers tests mesurant l'activité des caspases - 3 et -7 se sont avérés inefficaces pour les PhéDIMs (**234**, **231**, **236**, **239**, **256**, **275** et **276**) qui sont plutôt cytotoxiques sur les lignées cellulaires Mia Paca-2.

Conclusion générale

En résumé, au cours de ces travaux de thèse, j'ai réalisé la synthèse de onze PhéDIMs symétriques dont cinq (**24**, **30**, **230**, **231** et **232**) en présence de Montmorillonite MK10, et 6 (**234-239**) en présence de diéthyléthérate de trifluorure de bore (BF₃OEt₂). À cette liste nous pouvons ajouter désormais trois autres PhéDIMs (**256**, **273**, **275** et **276**) qui sont issus de l'oxydation en présence de DDQ respectivement de **24**, **30**, **230** et **231** et qui se présentent sous forme de carbinols en solution et/ou d'hydrates à l'état solide.

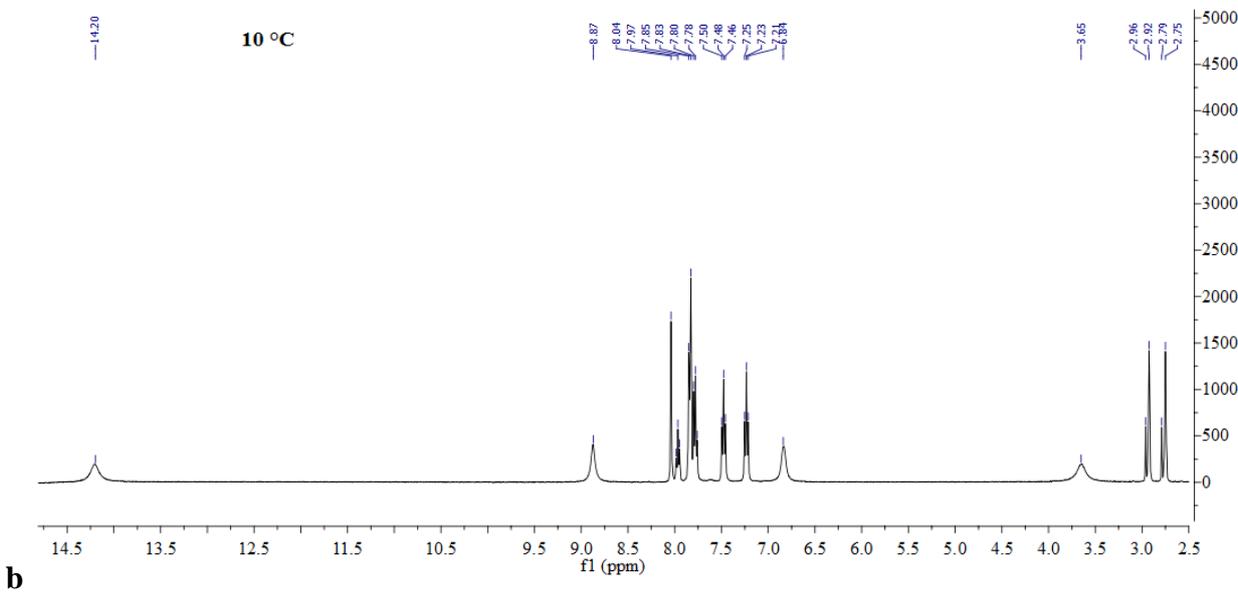
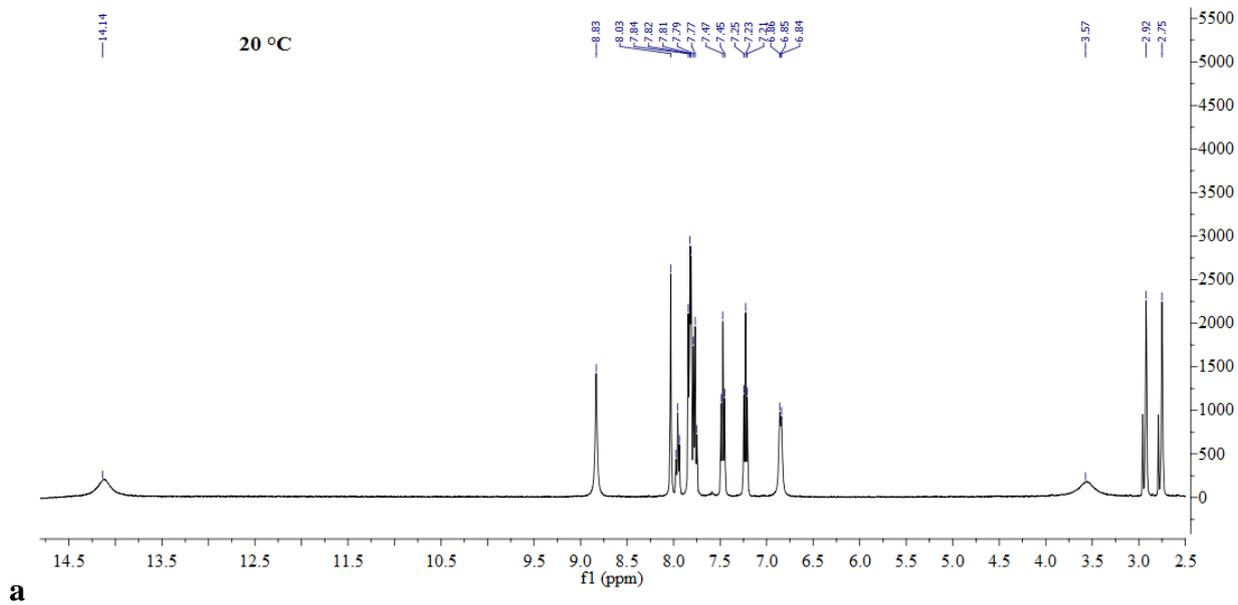
Six PhéDIMs non symétriques ont été synthétisés également : **241**, **242**, **243**, **244** (par couplage en présence de chlorure de mésyle), **253** (par déprotection au KOH du **243**) et **272** par oxydation à la DDQ du composé **241**.

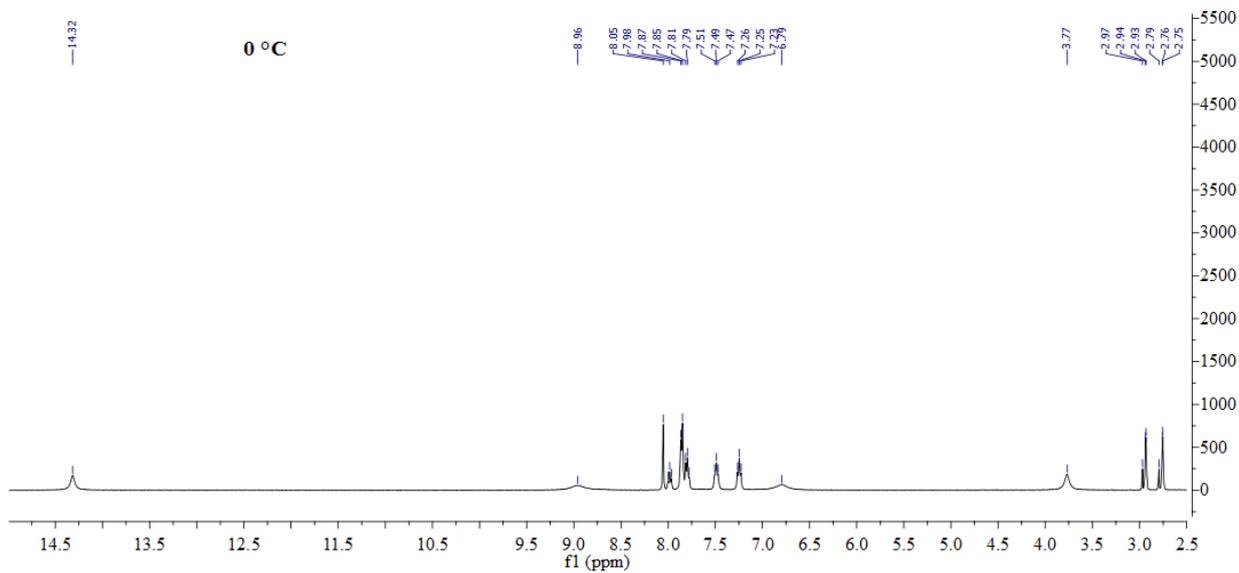
Par ailleurs, nous avons par quenching de fluorescence mis en évidence les interactions entre le domaine de His-LBD de NR4A1 et les composés symétriques **24**, **231**, **234**, **235**, **236**, **237**, **238**, **239**, **256**, **275** et **276** avec des constantes de dissociation moyennes (*K_d*) qui sont de l'ordre du micromolaire.

Les expériences de docking comportant le meilleur score (*Fullfitness*) des composés PhéDIMs pour la structure cristallographique du LBD-NR4A1 permettent confirmer leur affinité pour ce domaine. De plus, les modes de fixation prédisent qu'ils se fixent majoritairement sur le site B du LBD-NR4A1 en formant des liaisons hydrogène avec les résidus. L'obtention de la structure cristallographique du complexe PhéDIM-NR4A1 pourrait à l'avenir confirmer ou infirmer cette prédiction du docking.

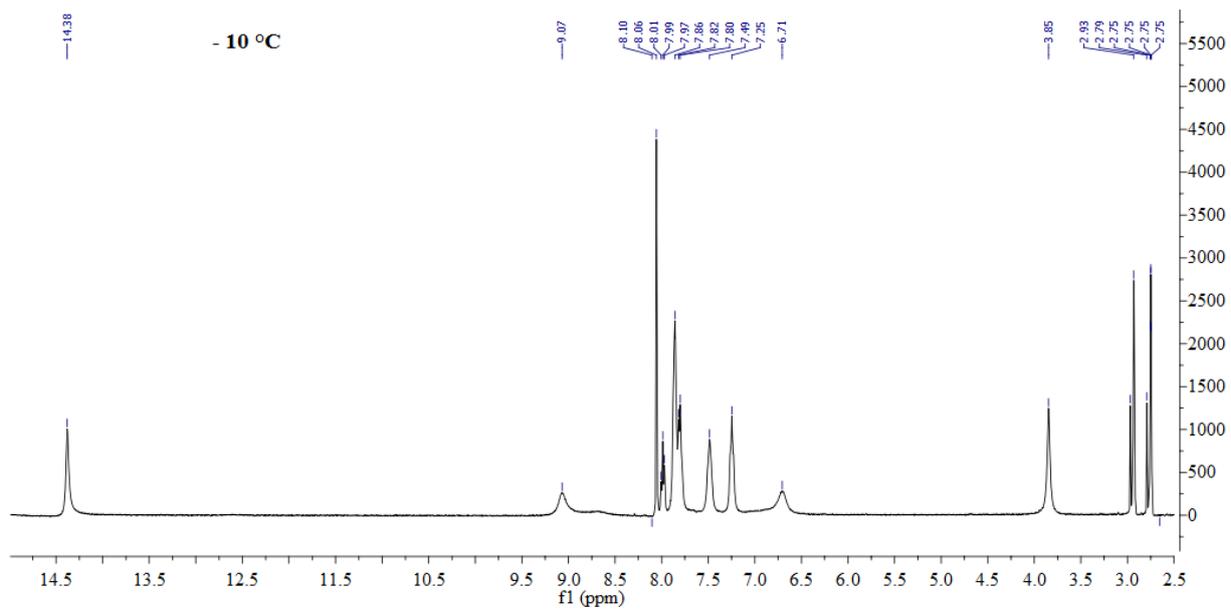
En terme d'évaluation biologique, les composés **231**, **234**, **236**, **239**, **256**, **275** et **276** se sont avérés actifs sur les cellules cancéreuses humaines Mia Paca-2 du pancréas. Le plus actif de tous ces composés est le **234** avec une concentration inhibitrice de l'ordre du submicromolaire. Ce dernier présente une activité cytotoxique du même ordre de grandeur sur les lignées cellulaires HT-29 et MCF-7 du cancer respectivement poumon et du sein. Toutefois, l'activité pro-apoptotique de l'ensemble de ces composés, mesurée par l'activation des caspases-3 et -7, ne donne pas de résultats probants. D'autres tests biologiques sont envisagés afin de clarifier ces données.

Annexes

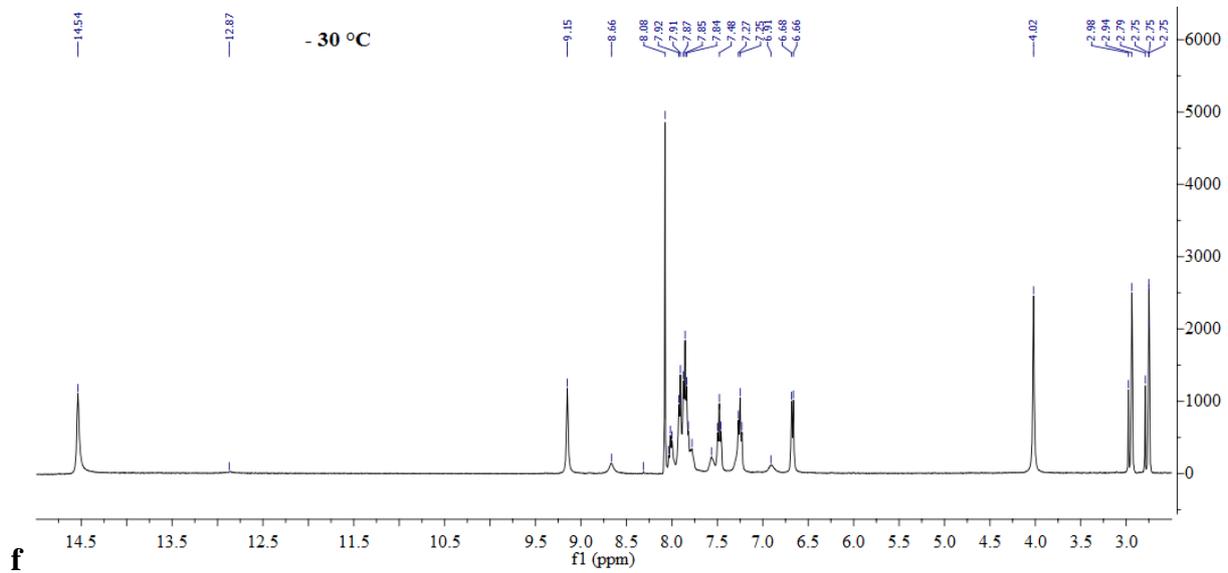
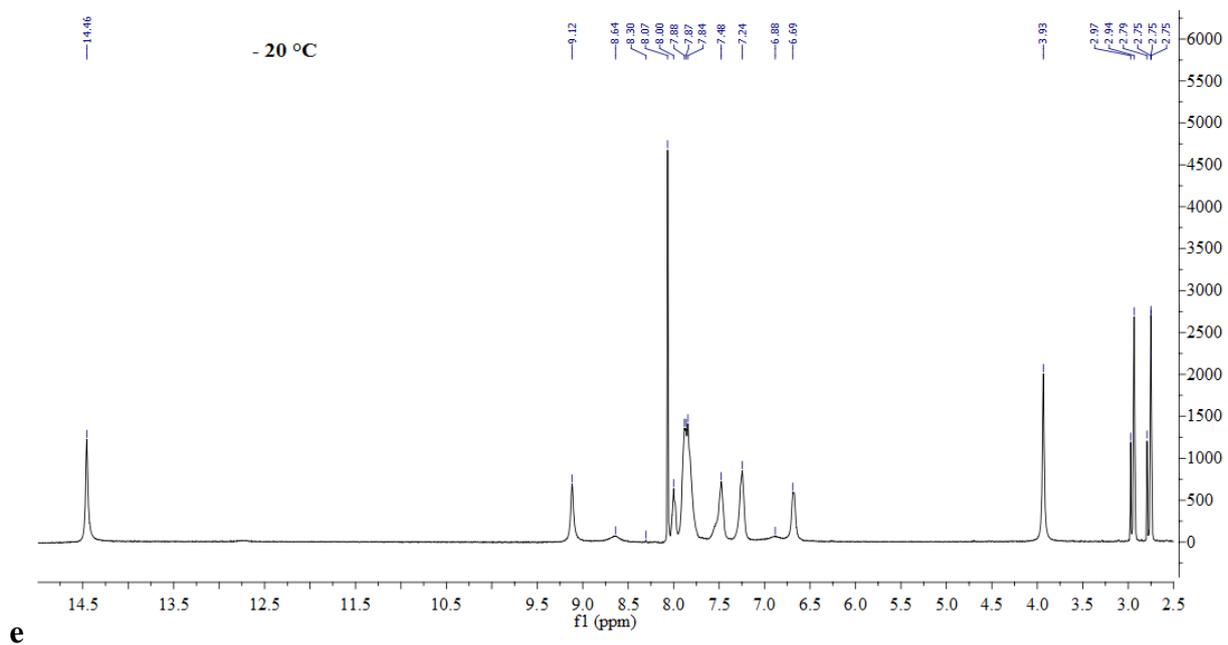


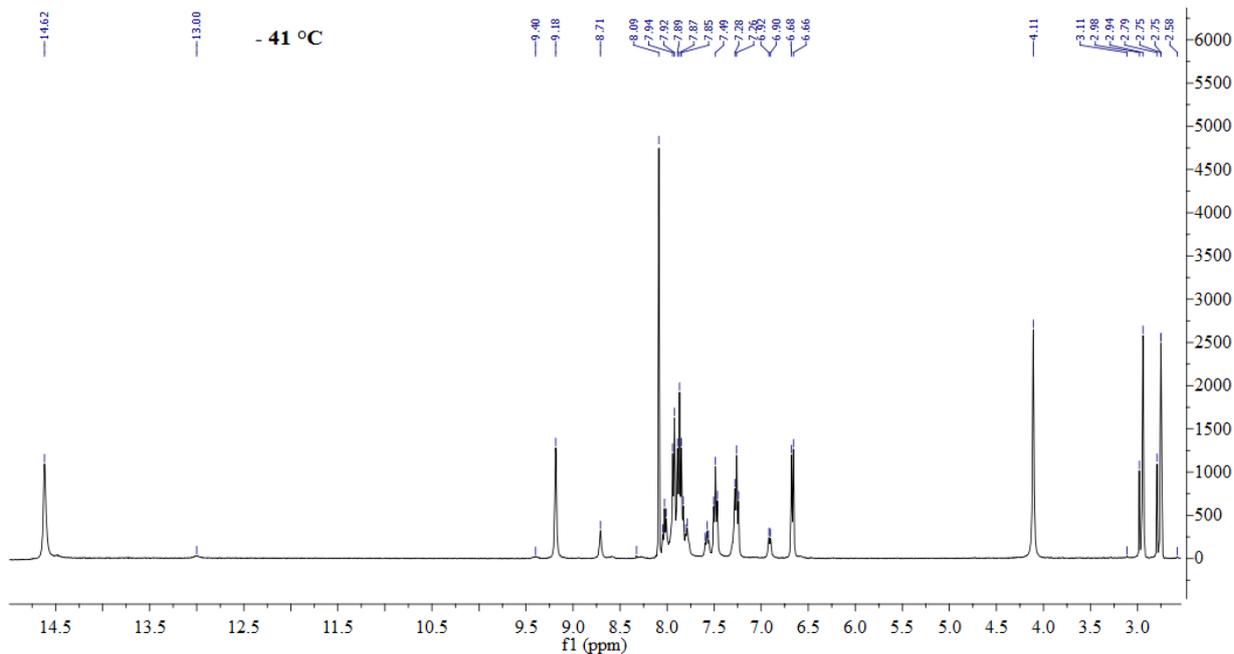


c



d





08

Figure 163 : Spectres RMN ^1H (400 Hz, solvant : $\text{DMF-}d_7$) du composé 256 obtenu en baissant la température progressivement de 20 °C (a) à - 41 °C (g).

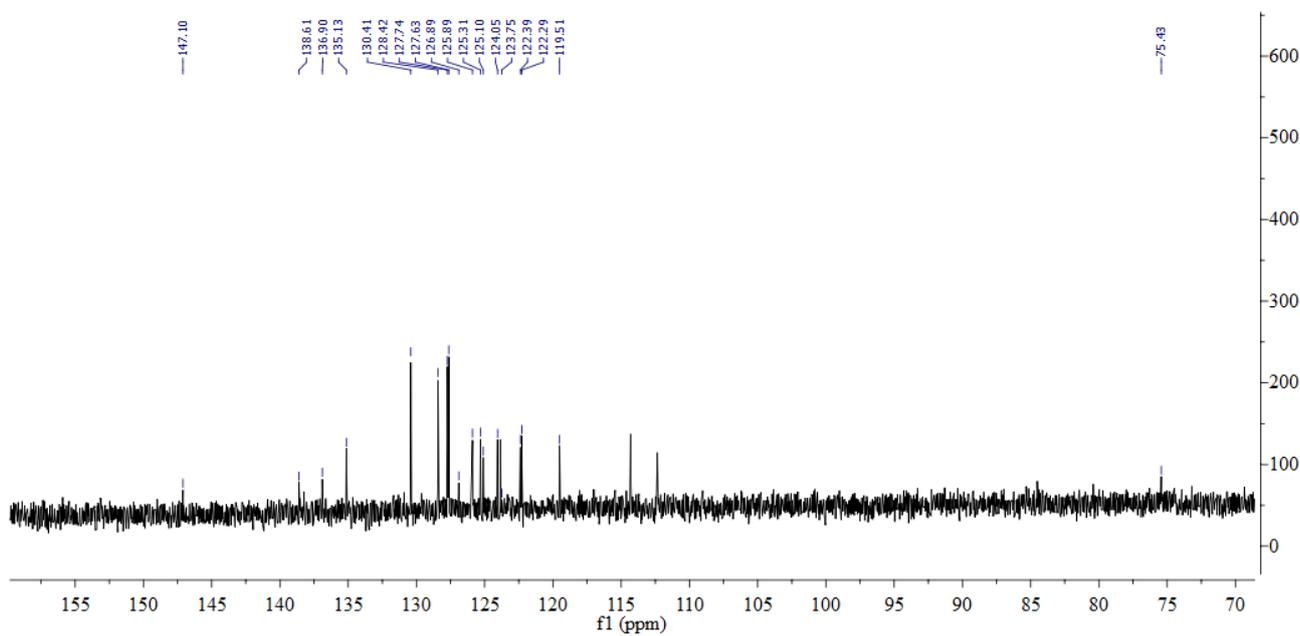


Figure 164 : Spectre RMN ^{13}C (400 Hz, solvant : acétone- d_6) du composé 272. Le signal à 75,43 ppm est caractéristique d'un carbone de type sp^3

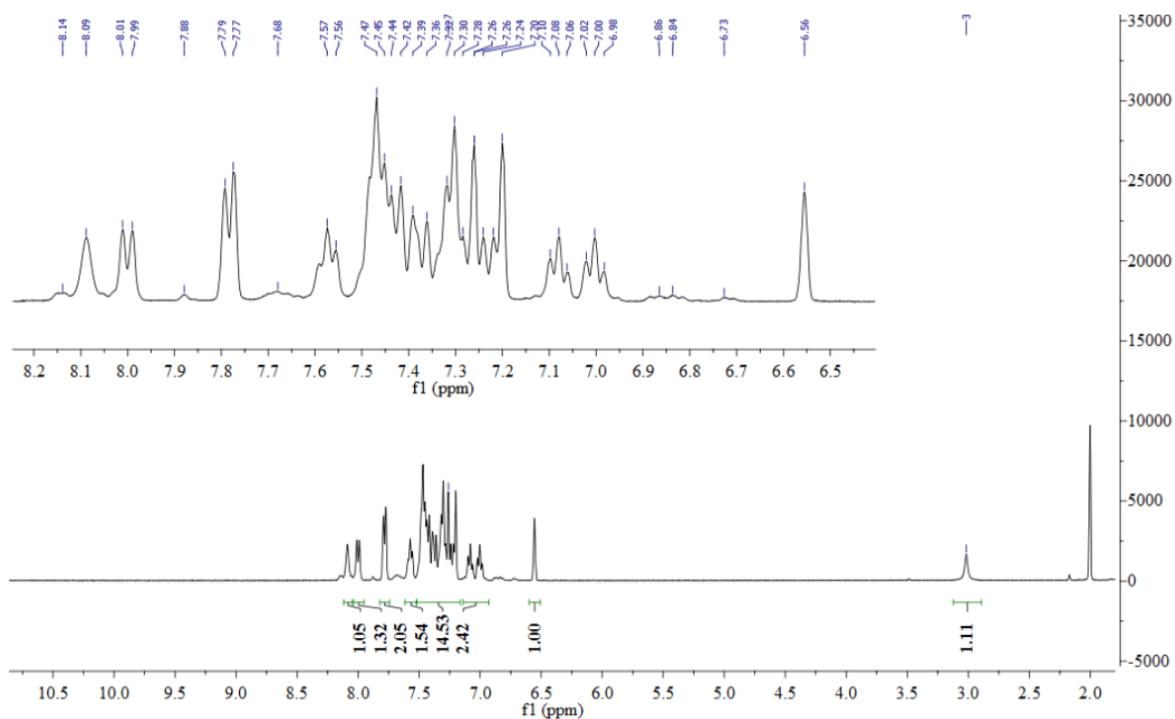


Figure 165 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CDCl_3) du composé 272 avant de TFA dans le tube RMN.

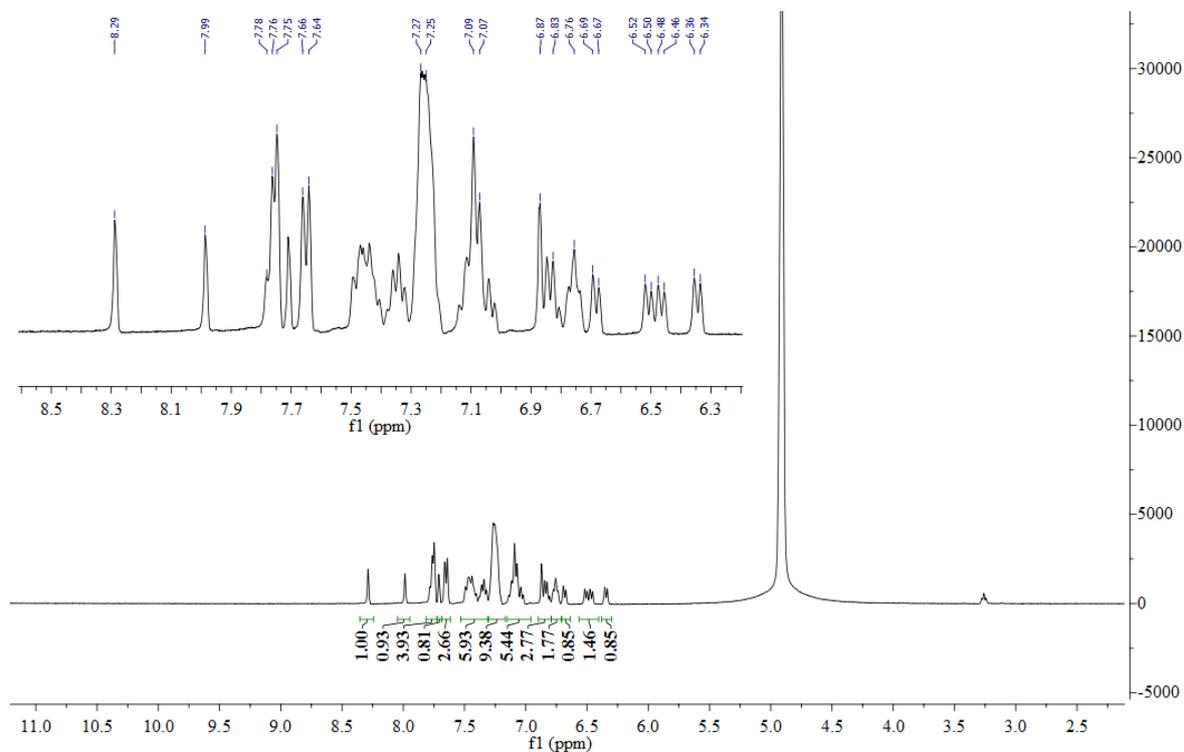


Figure 166 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CDCl_3) du composé 272 après de 0,3 μl TFA dans le tube RMN.

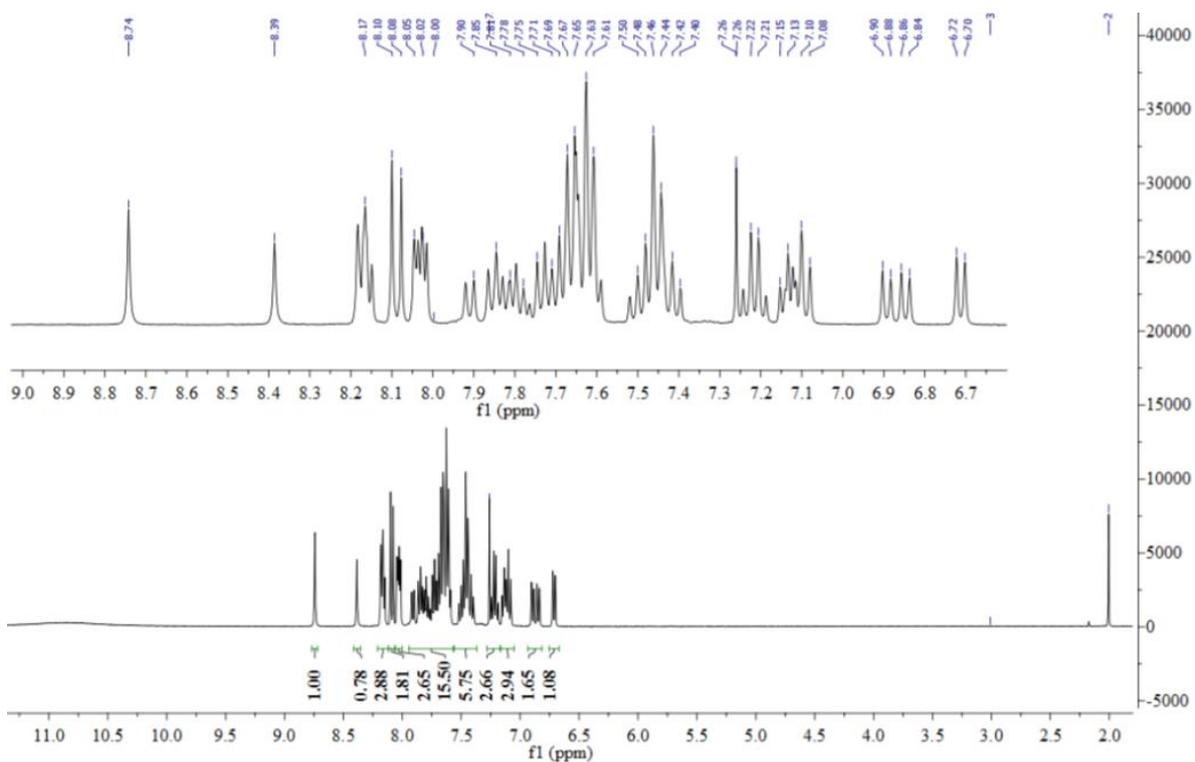


Figure 167 : Spectre RMN 1H (400 Hz, solvant : CDCl₃) du composé 272, après évaporation de la solution du tube RMN contenant du TFA.

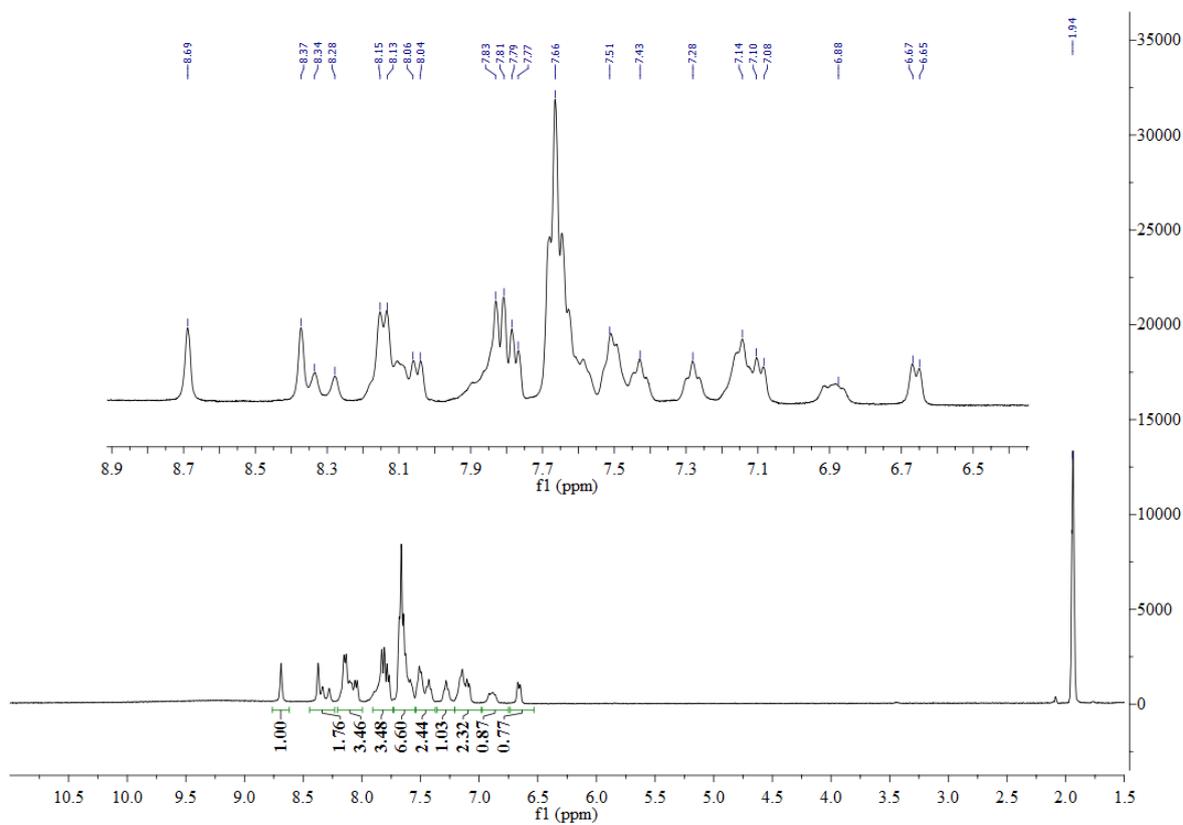


Figure 168 : Spectre RMN 1H (400 Hz, solvant : CD₃CN) du composé 272.

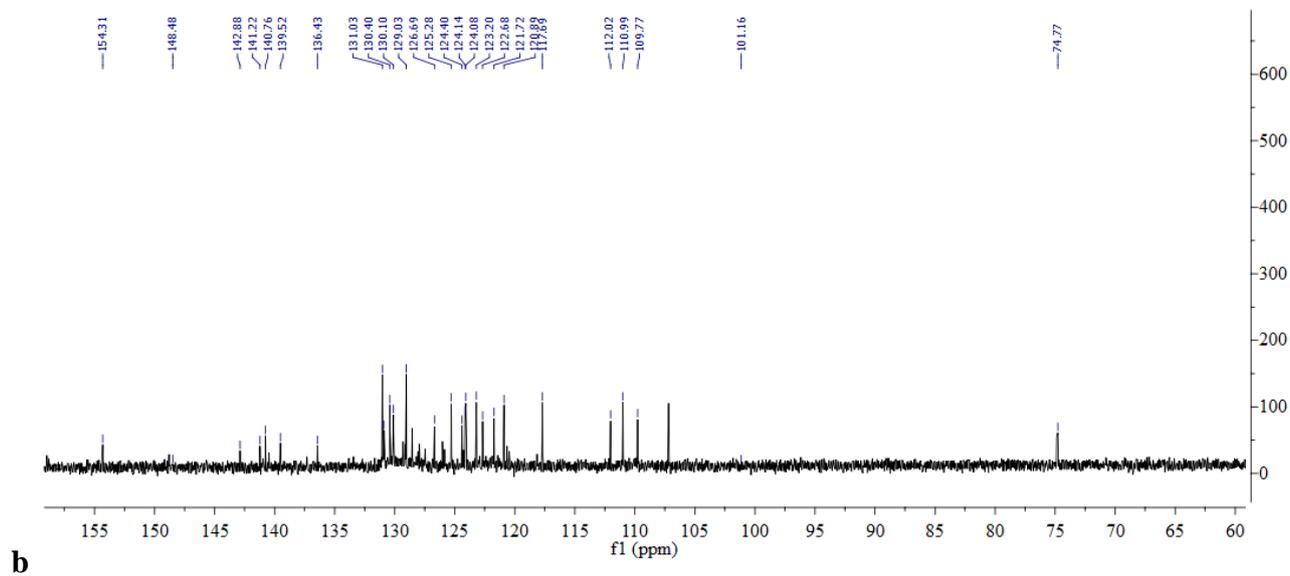
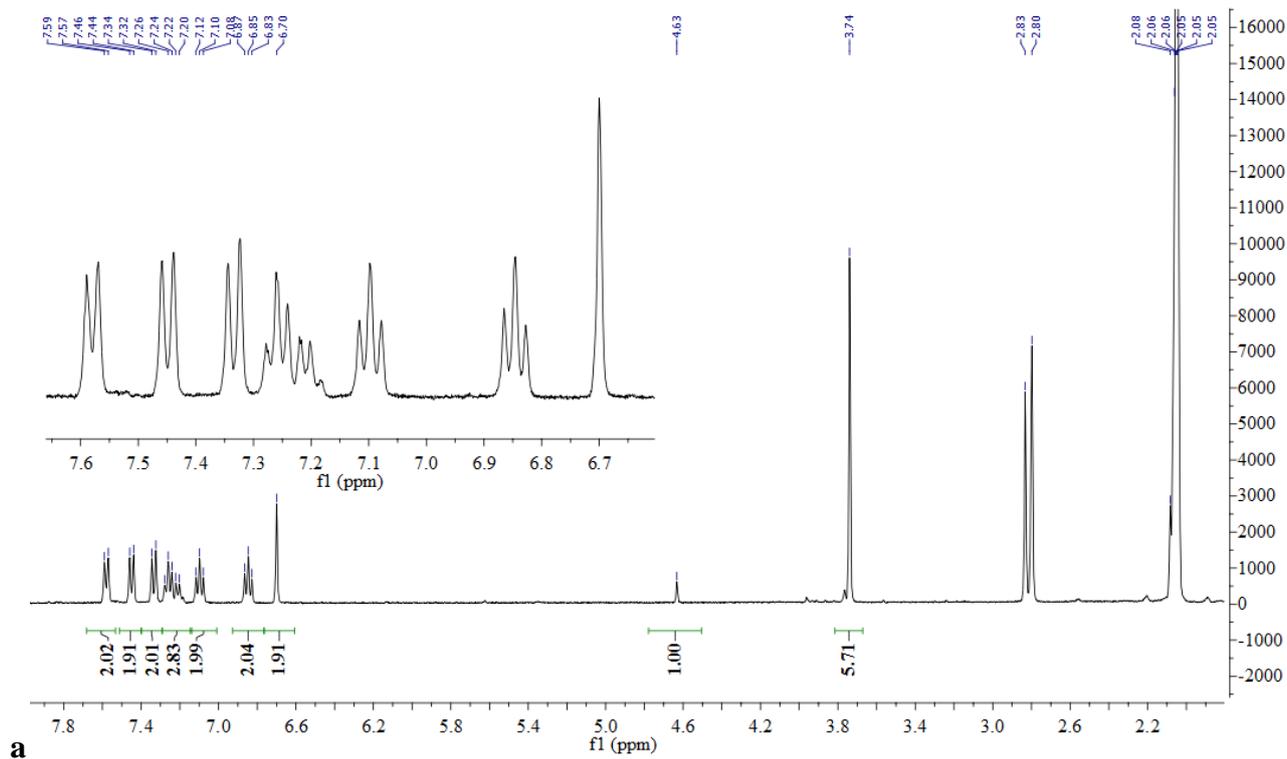


Figure 169 : Spectre RMN ^1H (a) et ^{13}C (b) (400 Hz, solvant : acétone- d_6) du composé 273

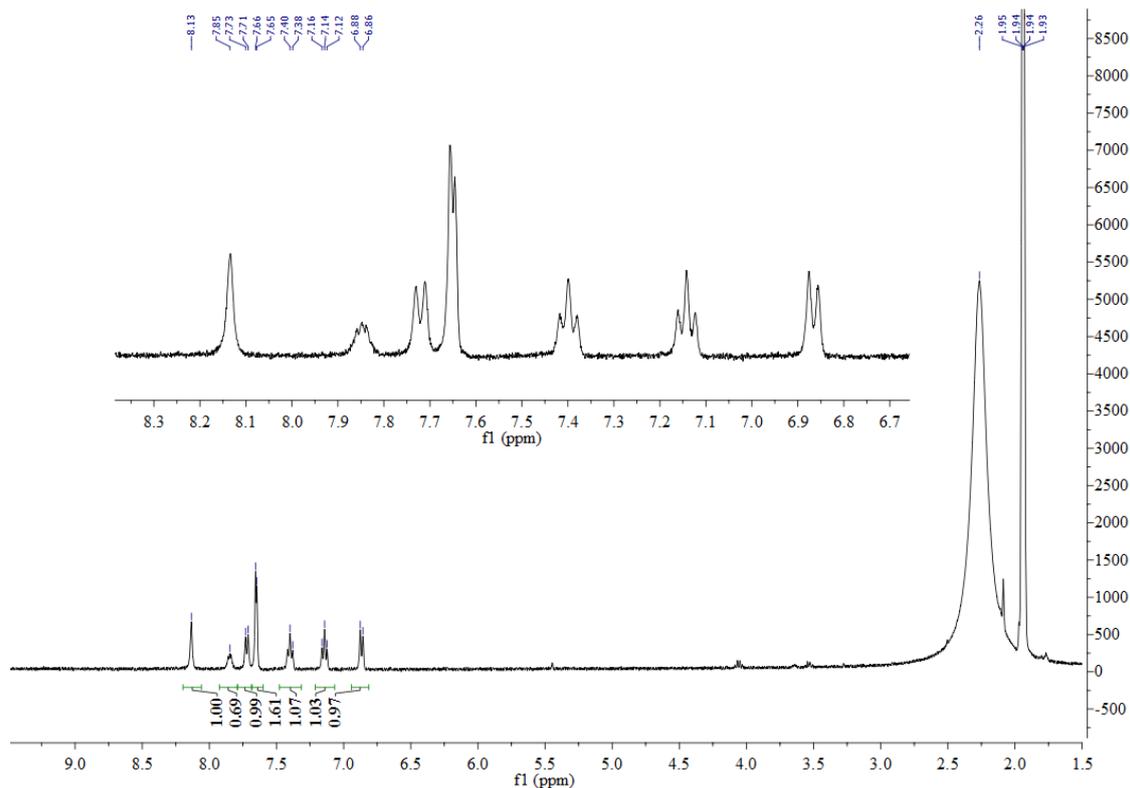


Figure 170 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) du PhéDIMOX 256 utilisé comme référence pour l'oxydation en tube du composé 24

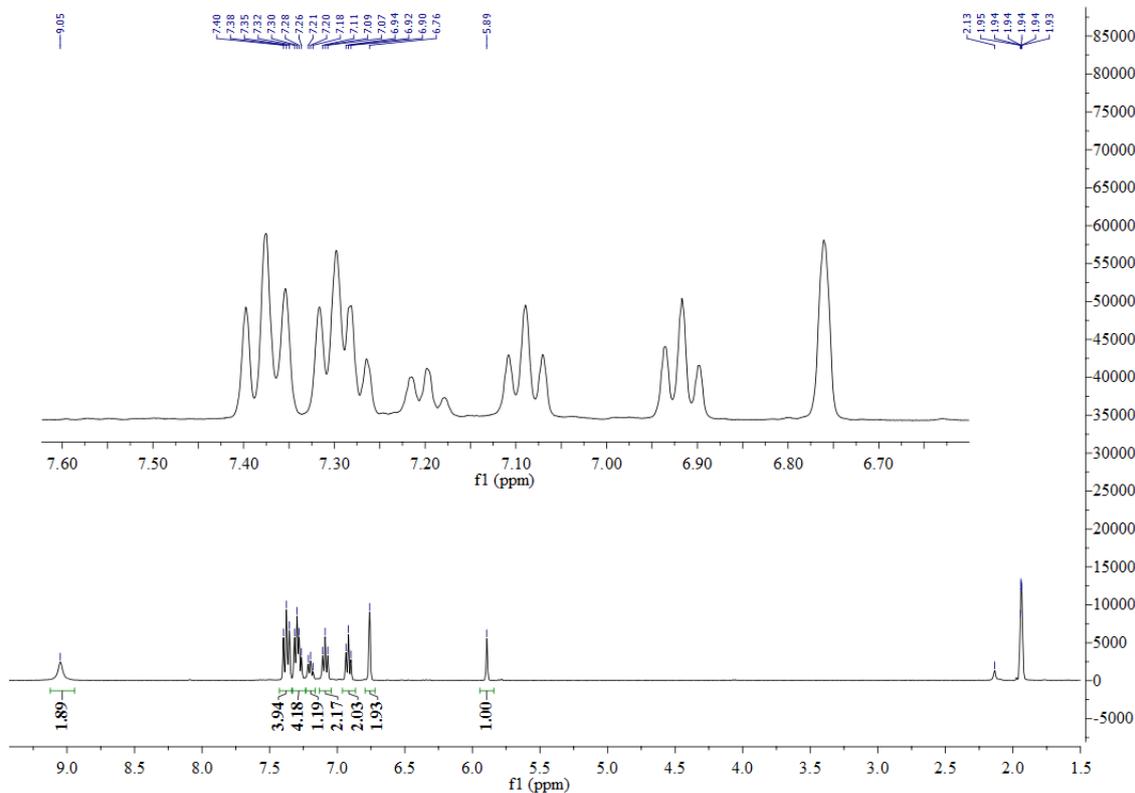


Figure 171 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 24 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ

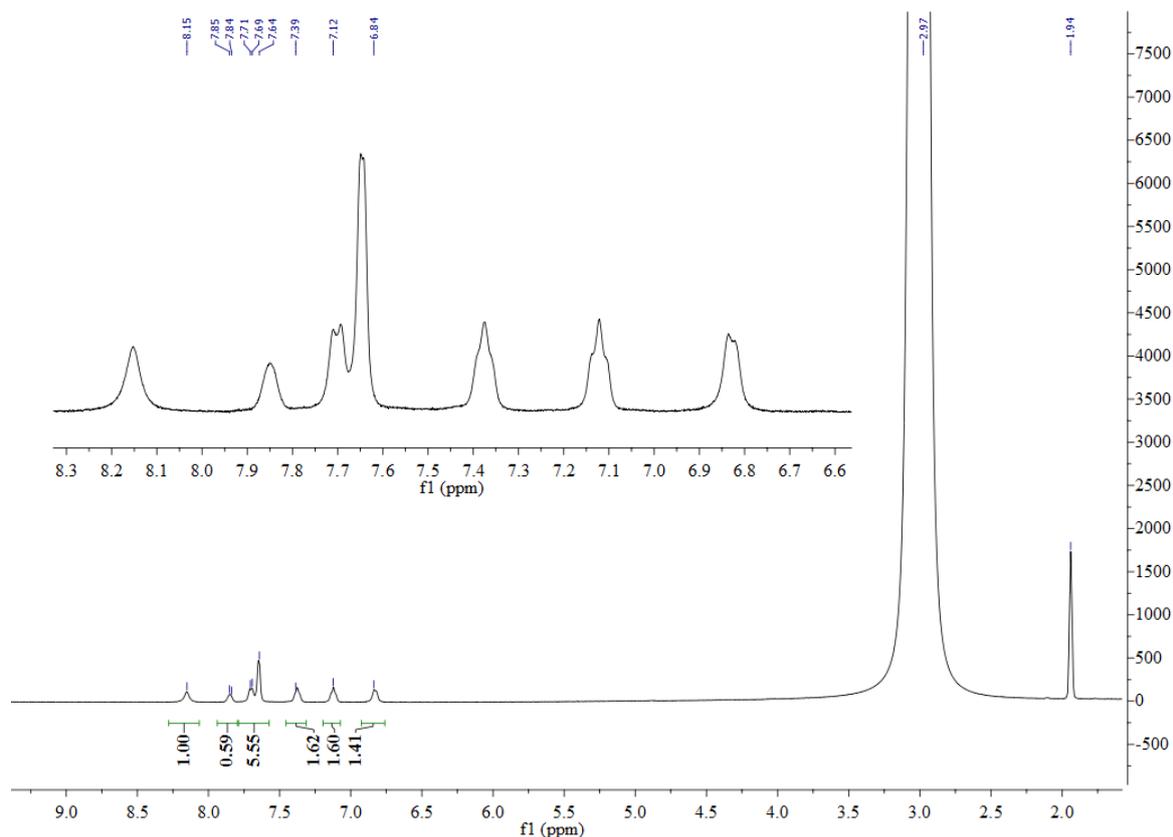


Figure 172 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 24 en présence de 1,2 éq. de DDQ

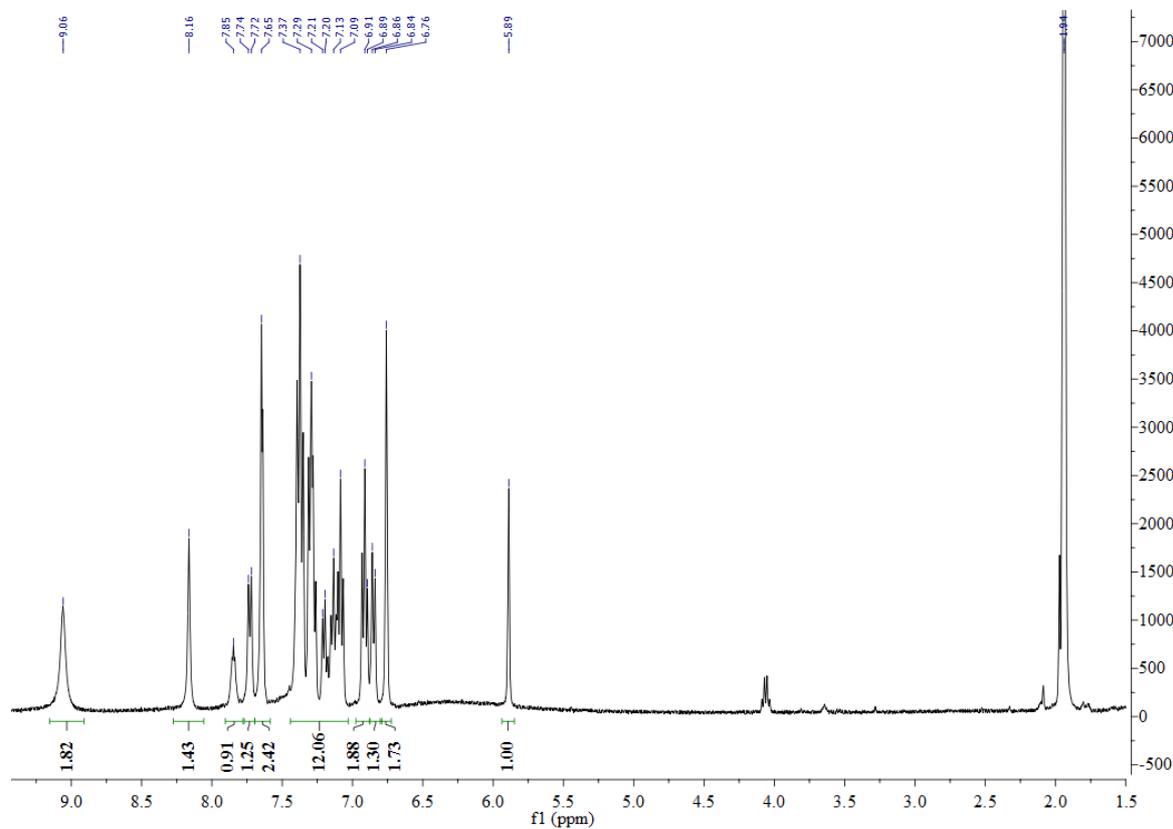


Figure 173 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 24 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres

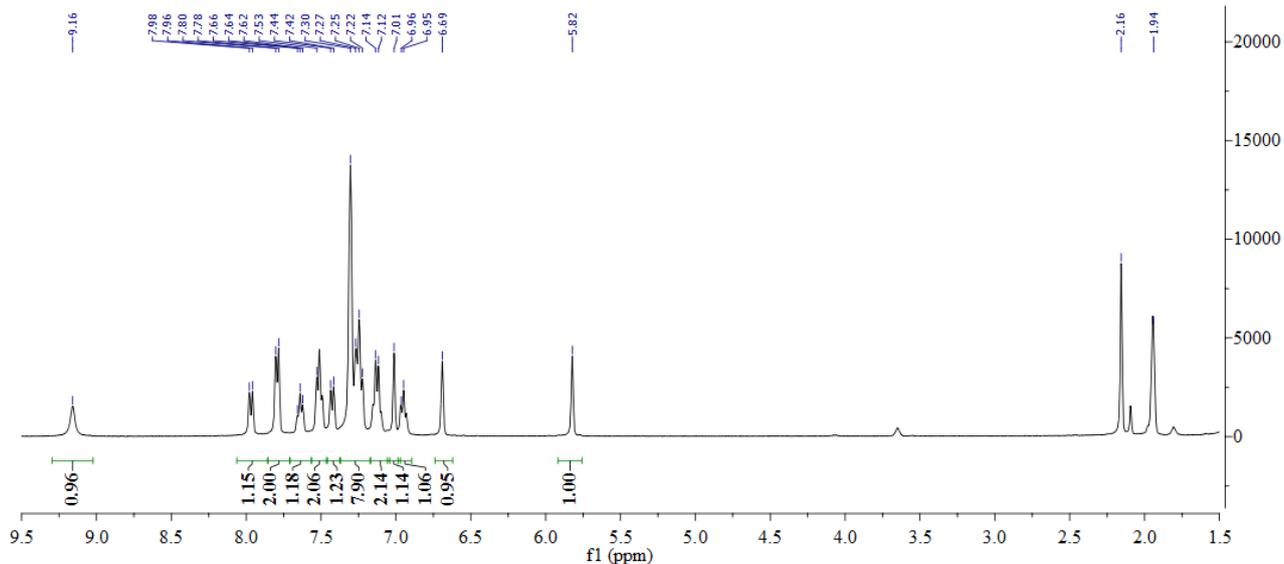


Figure 174 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 241 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ

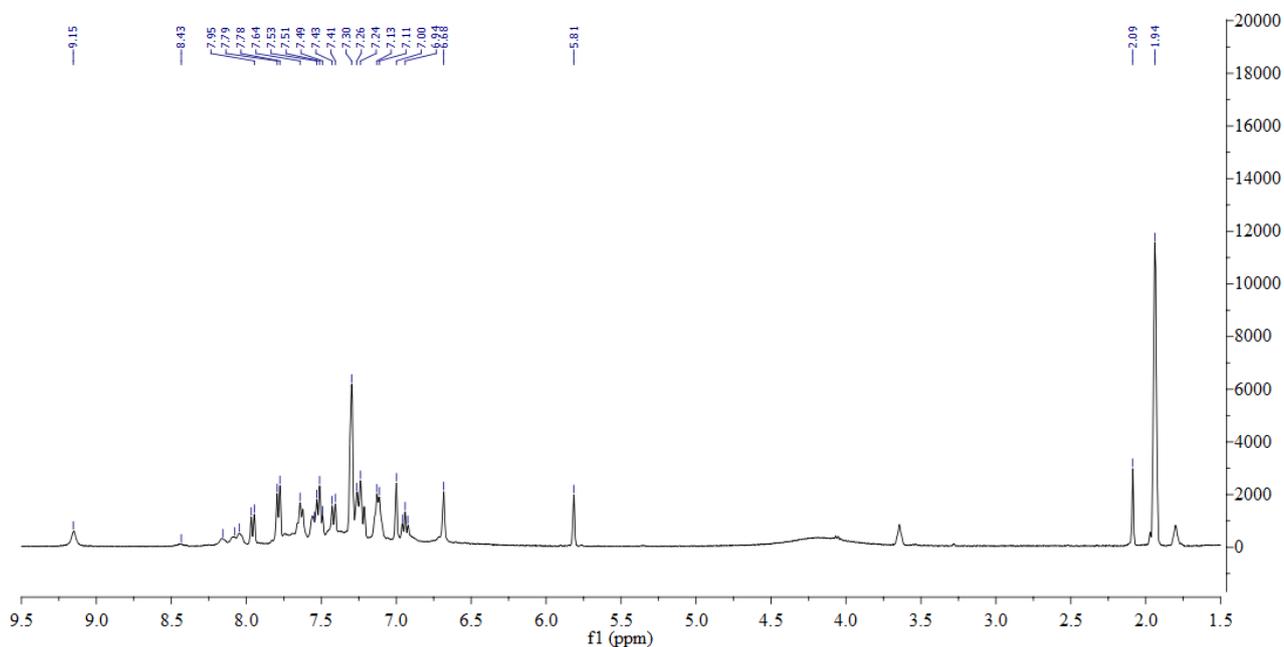


Figure 175 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation en tube RMN du composé 241 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres

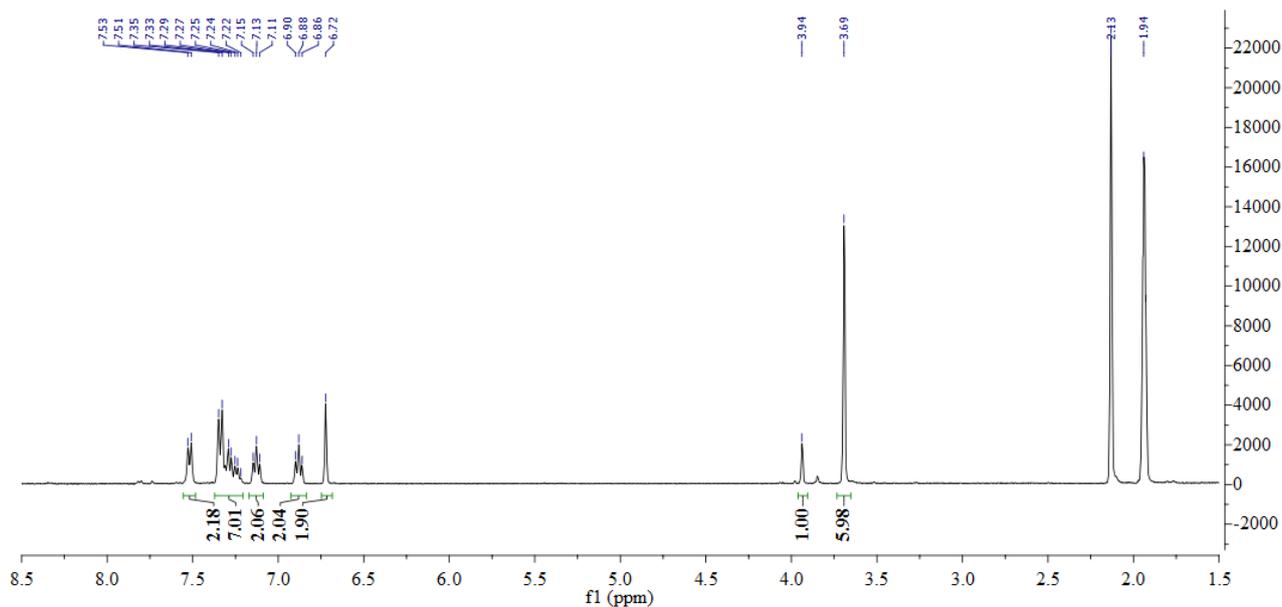


Figure 176 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) du PhédIMOx 273 utilisé comme référence pour l'oxydation en tube RMN du composé 241

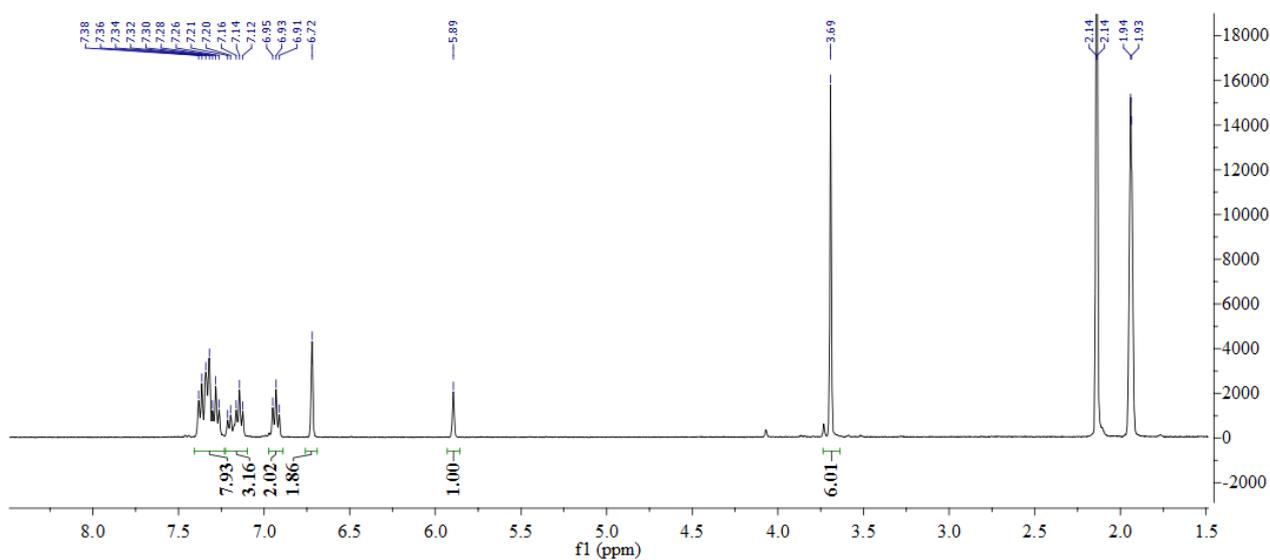


Figure 177 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 30 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ

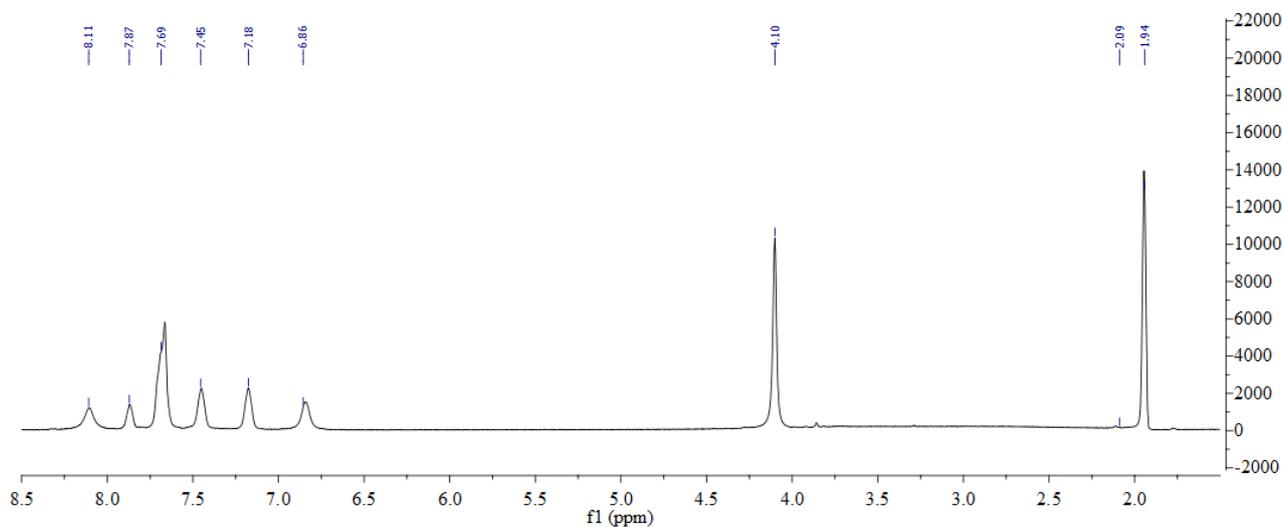


Figure 178 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 30 en présence de 1,2 éq. de DDQ

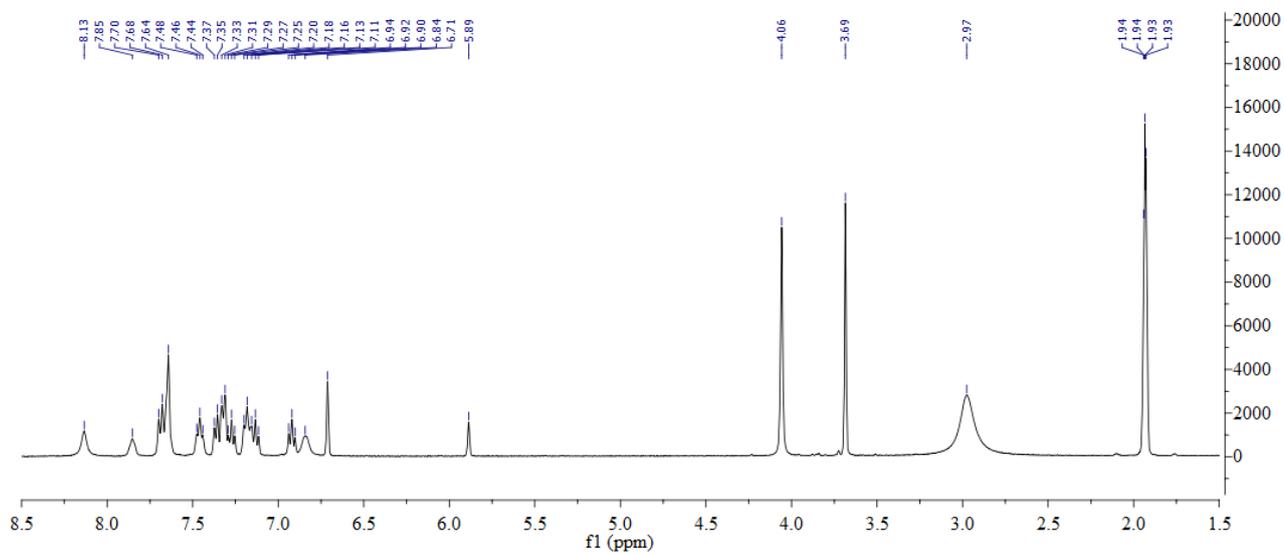
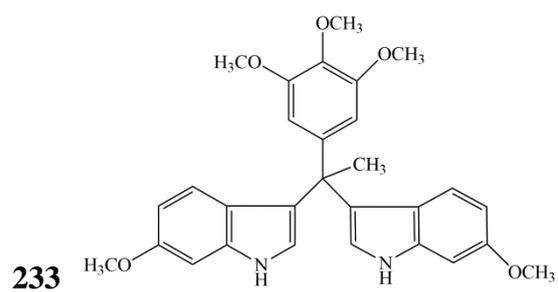
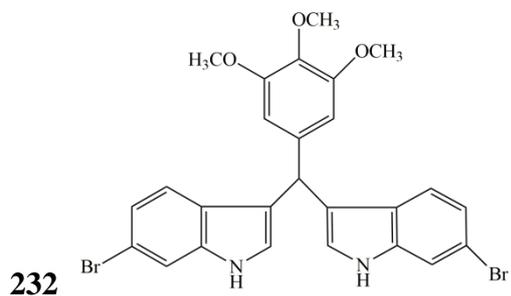
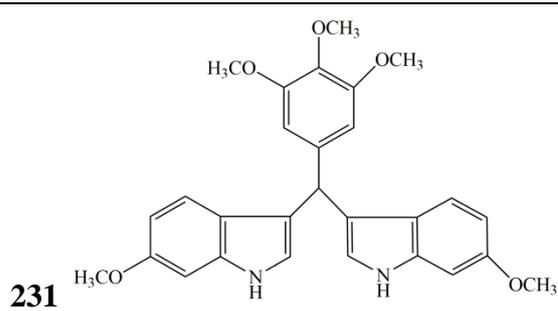
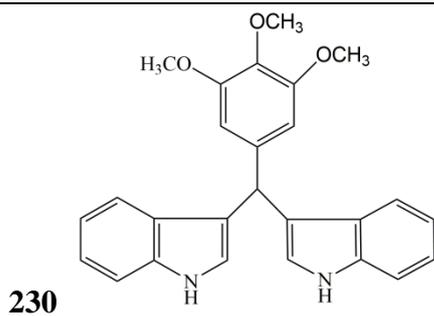
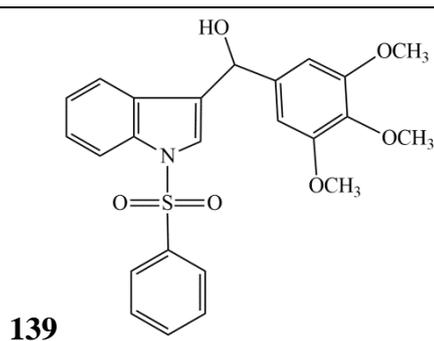
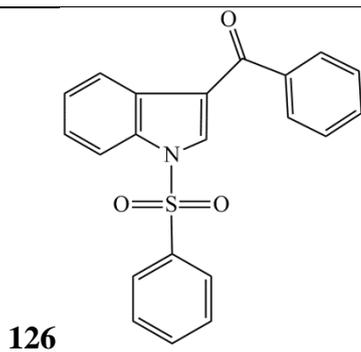
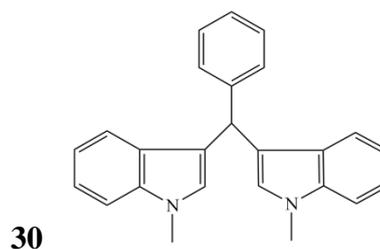
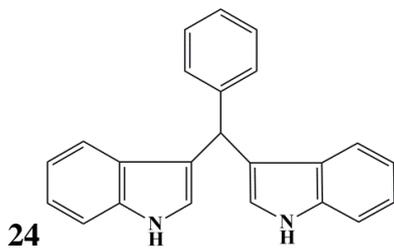
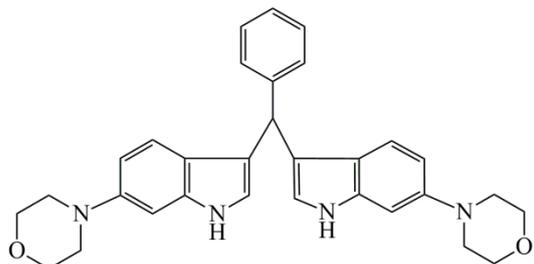


Figure 179 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation en tube RMN du composé 30 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres

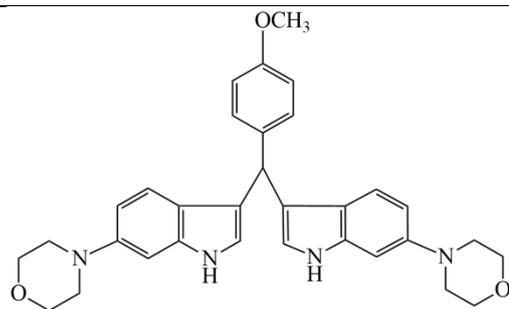
Liste des composés synthétisés



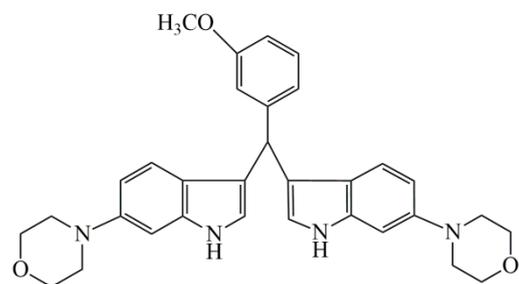
234



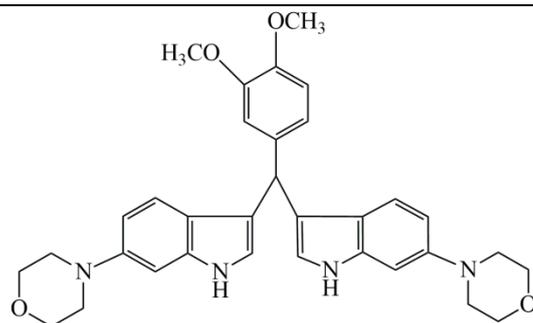
235



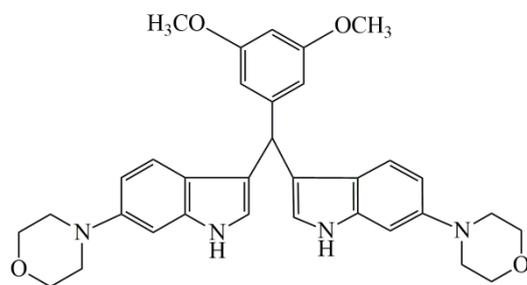
236



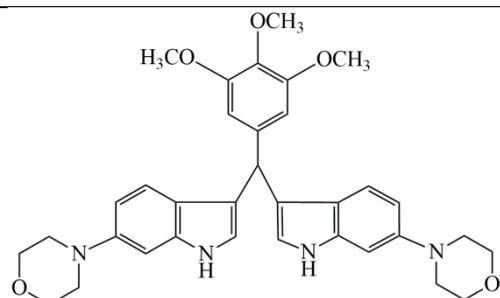
237



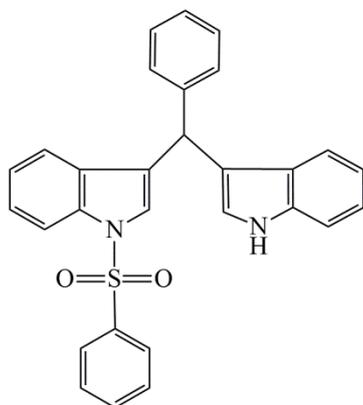
238



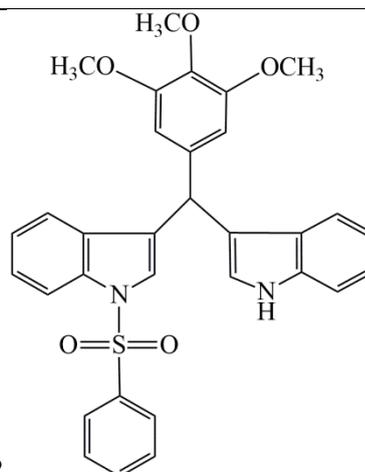
239

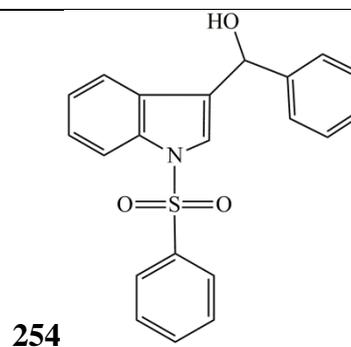
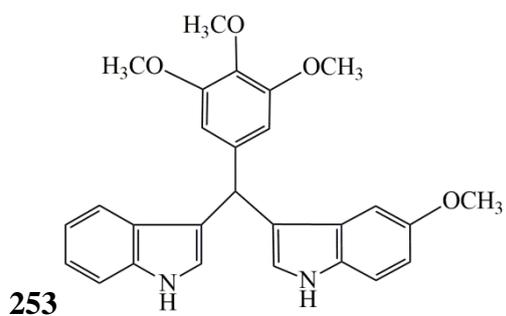
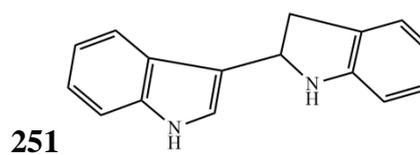
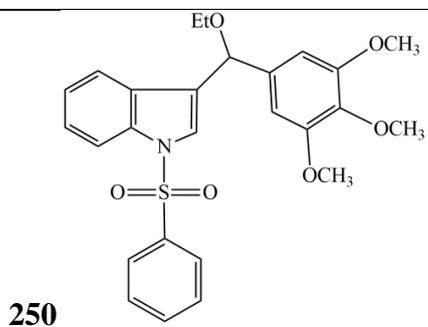
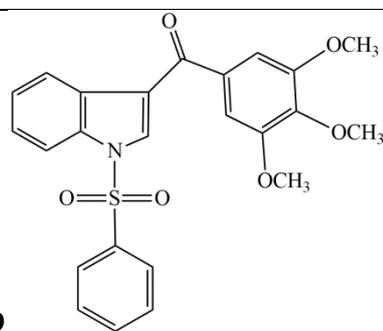
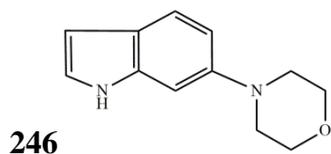
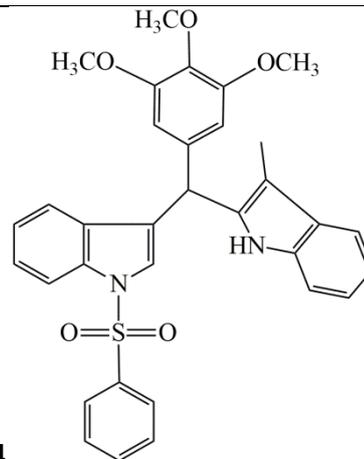
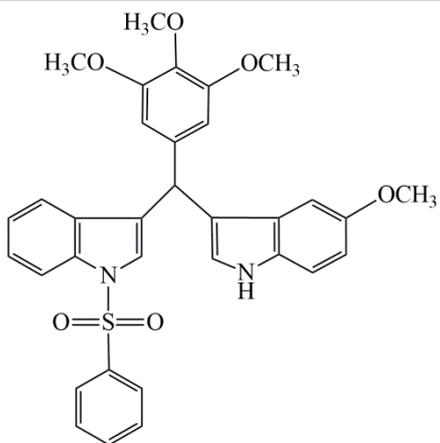


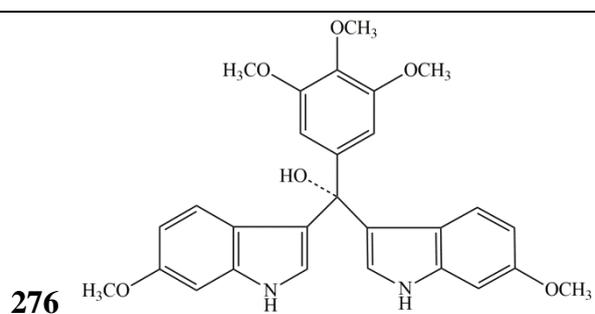
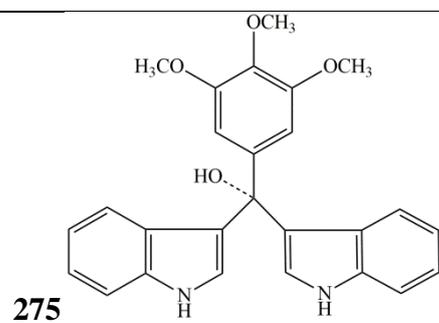
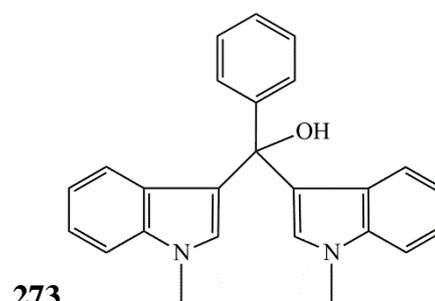
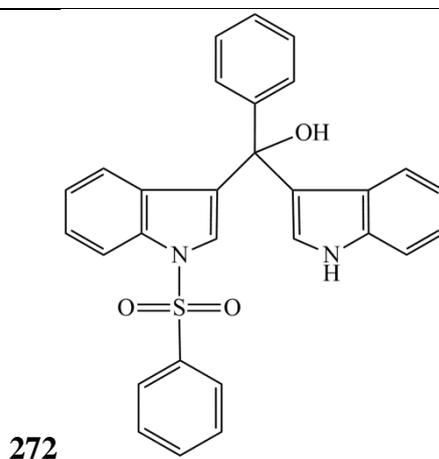
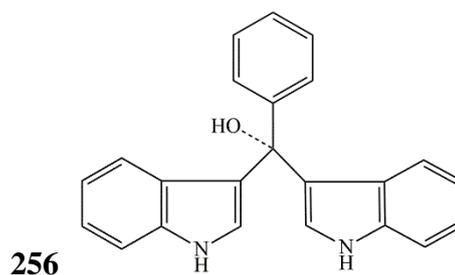
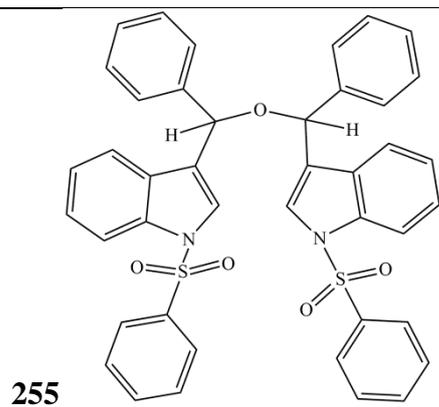
241



242







Partie expérimentale

A- Partie chimie

A-1- Synthèses chimiques, conditions générales

❖ Les réactifs sont pour la plupart commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire. Les solvants utilisés pour les réactions sont de grade « pour analyse ». Le dichlorométhane et le THF anhydres sont préparés sur un purificateur de solvant PS-mino (Innovative Technology). L'acetonitrile deutérié (CD_3CN) a été séché sur tamis moléculaire 3 Å (ALDRICH). Les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de silice Merck Silica gel 60 F₂₅₄ ou d'alumine Merck Alumina gel 60 F₂₅₄. Les composés, sauf exception, sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice ou d'alumine (Merck : 35 – 70 μm ou 20 – 45 μm), sous une pression de 300 mbar.

❖ Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN) et du carbone (^{13}C -RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC300 ou AVANCE 400 à respectivement 300 ou 400 MHz (^1H), et à 75 ou 100 MHz (^{13}C). Les constantes de couplage J , sont mesurées en Hertz (Hz) et pour désigner les multiplets, les abréviations suivantes ont été utilisées : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), t (triplet) q (quadruplet), m (multiplet)... Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et sont déterminés par rapport au pic résiduel du solvant pris comme référence : CDCl_3 : 7,27 ppm (^1H) et 77 ppm (^{13}C) ; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 2,50 ppm (^1H) et 40,6 ppm (^{13}C) ; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: 2,05 ppm (^1H) et 29,8 ppm (^{13}C) ; CD_3CN : 1,94 ppm (^1H) et 1,32 et 11,26 ppm (^{13}C) ; CF_3COOD : 11,5 ppm (^1H) et 116,6 ppm (^{13}C). Les signaux ^1H et ^{13}C sont attribués sans ambiguïté par des expériences de RMN multidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC et JMOD).

❖ Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Nermag R10-10C (DIC/NH_3) ou ZQ 2000 Waters (ESI) ou LCT Premier. Les spectres de masses hautes résolution (HRMS) ont été enregistrés par la plate forme de spectrométrie de masse haute résolution de ICOA UMR7311-CNRS, Université d'Orléans ou de CTAC UMR8638-CNRS, Université Paris Descartes.

❖ Le point de fusion a été mesuré à l'aide du microscope à platine chauffante Leica Galen III.

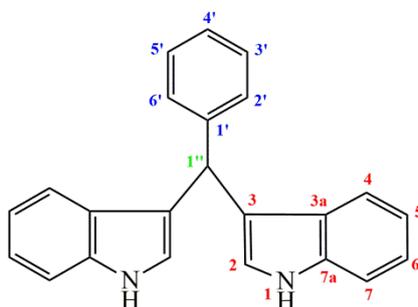
❖ Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectroscope de type Perkin-Elmer Spectrum 65 FT-IR Spectrometer équipé du module ATR "Universal ATR Sampling Accessory".

❖ L'analyse élémentaire a été effectuée au service de micro-analyse de ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette.

❖ L'analyse de pureté a été réalisée par CLHP analytique sur l'appareil Lachrom Merck-HITACHI- muni des modules L7100(pump), L7200 (Autosample), L7400 (UV detector), Four à colonne Merck Jetstream 2plus, logiciel de pilotage E2 Chrom Elite 3.3 ; colonne : Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm 5 µm (Agilent Technologies).

A-2- Conditions particulières de synthèse

24 : 1,1-di(3'-indolyl)-1-phénylméthane ¹³⁶



234,1 mg (2 mmol) de 1*H*- indole, 101 µl (1 mmol) de benzaldéhyde et 4 g de montmorillonite K10 sont mis en solution dans 15 ml de CH₂Cl₂. Le mélange est concentré sous vide à basse pression et est laissé à la température ambiante pour la nuit. Le milieu est remis en suspension dans l'acétate d'éthyle (15 ml), puis filtré et évaporé sous vide. Le composé **24** est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 4 : 1) et est obtenu avec un rendement de 88 %, sous forme de poudre qui rosit à l'air.

Formule brute : C₂₃H₁₈N₂

Masse moléculaire : 322,40 g.mol⁻¹

Point de fusion : 240 °C

IR (ATR) : ν_{max}(cm⁻¹) 3405 ; 3055 ; 3025 ; 2923 ; 2848 ; 2508 ; 1887 ; 1600 ; 1548 ; 1492 ; 1454 ; 1416 ; 1336 ; 1215 ; 1090 ; 1009 ; 850 ; 792 ; 736 ; 699.

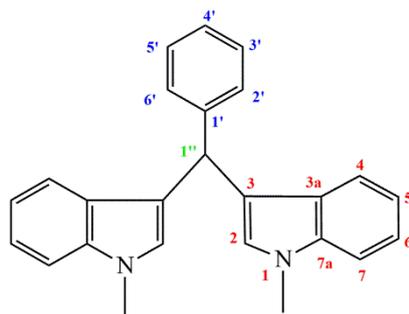
RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **5,82** (s, 1H, **H_{1''}**) ; **6,81** (s, 2H, **H₂**) ; **6,83** (t, *J* = 7,40 Hz, 2H, **H₆**) ; **7,02** (t, *J* = 7,14 Hz, 2H, **H₅**) ; **7,16** (t, *J* = 7,40 Hz, 1H, **H_{4'}**) ; **7,26** (t, *J* = 6,34 Hz, 2H, **H_{3'-5'}**)

- ; **7,27** (d, $J = 7,14$ Hz, 2H, **H₇**); **7,33** (d, $J = 8,02$ Hz, 2H, **H_{2'-6'}**); **7,35** (d, $J = 7,40$ Hz, 2H, **H₄**); **10,8** (s, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O).
- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **39,51** (**C_{1'}**); **111,41** (**C_{2'-6'}**); **118,02** (**C₃**); **118,13** (**C₆**); **119,07** (**C₇**); **120,83** (**C₅**); **123,50** (**C₂**); **125,74** (**C_{4'}**); **126,60** (**C_{3a}**); **128** (**C_{3'-5'}**); **128,27** (**C₄**); **136,55** (**C_{7a}**); **144,96** (**C_{1'}**).

SM : (TOF MS / ESI+) : m/z 345 [C₂₃H₁₈N₂Na]⁺.

30 : 1,1-di(3'((1-méthyl)-indolyl)-1-phenylméthane ¹³⁶



262 mg (2 mmol) de 6-bromo-1*H*-indole, 101 μ l (1 mmol) de benzaldéhyde et 4 g de montmorillonite K10 sont mis en solution dans 15 ml de CH₂Cl₂. Le mélange est concentré sous vide à basse pression et est laissé à la température ambiante pour la nuit. Le milieu est remis en suspension dans l'acétate d'éthyle (15 ml), puis filtré et évaporé sous vide. Le composé **30** est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 9 : 1) et est obtenu avec un rendement de 83 %, sous forme de poudre qui rosit à l'air.

Formule brute : C₂₅H₂₂N₂

Masse moléculaire : 350,46 g.mol⁻¹

Point de fusion : 197,8 °C

IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3053 ; 3021 ; 2928 ; 2850 ; 151 ; 1473 ; 1368 ; 1328 ; 1224 ; 1130 ; 1011 ; 924 ; 740 ; 702.

RMN :

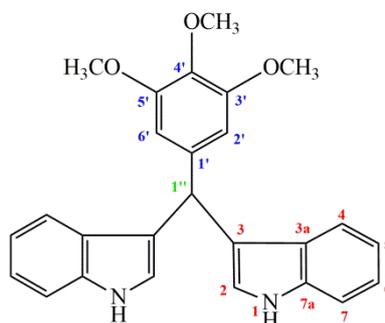
- ❖ ¹H (acétone-*d*₆) δ (ppm) **3,71** (s, 6H, ¹NCH₃); **5,84** (s, 1H, **H_{1'}**); **6,65** (s, 2H, **H₂**); **6,85** (t, $J = 7,34$ Hz, 2H, **H₅**); **7,15** (t, $J = 7,61$ Hz, 2H, **H₆**); **7,19** (t, $J = 7,34$ Hz, 1H, **H_{4'}**); **7,23** (t,

$J = 6,80$ Hz, 2H, $\mathbf{H}_{3'-5'}$) ; $7,26$ (2d, $J = 7,88$ Hz, 4H, $\mathbf{H}_{2'-6'}$, \mathbf{H}_7) ; $7,27$ (d, $J = 7,61$ Hz, 2H, \mathbf{H}_4).

- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) $31,83$ ($^1\text{NCH}_3$) ; $40,01$ ($\mathbf{C}_{1''}$) ; $109,21$ ($\mathbf{C}_{2'-6'}$) ; $118,05$ (\mathbf{C}_3) ; $118,35$ (\mathbf{C}_5) ; $119,52$ (\mathbf{C}_7) ; $121,19$ (\mathbf{C}_6) ; $125,84$ ($\mathbf{C}_{4'}$) ; $127,54$ (\mathbf{C}_{3a}) ; 128 (\mathbf{C}_2 , $\mathbf{C}_{3'-5'}$) ; $128,54$ (\mathbf{C}_4) ; $137,59$ (\mathbf{C}_{7a}) ; $145,01$ ($\mathbf{C}_{1'}$).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 373,1683 ; m/z calculée 373,1681 [$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2+\text{Na}$] $^+$.

230 : 1,1-di(3'-indolyl)-1-(3',4',5'-triméthoxyphenyl)méthane¹³⁶



234,1 mg (2 mmol) de 1*H*-indole, 196 mg (1 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et 4 g de montmorillonite K10 sont mis en solution dans 15 ml de CH_2Cl_2 . Le mélange est concentré sous vide à basse pression et est laissé à la température ambiante pour la nuit. Le milieu est remis en suspension dans l'acétate d'éthyle (15 ml), puis filtré et évaporé sous vide. Le composé **230** est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 7 : 3) et est obtenu avec un rendement de 88 %, sous forme de poudre qui rosit à l'air.

Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$

Masse moléculaire : $412,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : $99,6 \text{ }^\circ\text{C}$

IR (ATR) : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3376 ; 3043 ; 32830 ; 1593 ; 1504 ; 1455 ; 1421 ; 1326 ; 1221 ; 1120 ; 991 ; 792 ; 737 ; 652.

RMN :

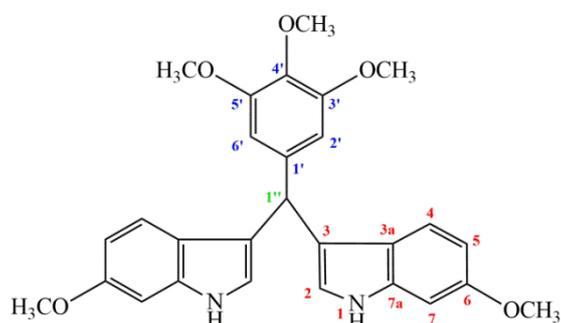
- ❖ ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm) $3,62$ (s, 3H, $^4\text{OCH}_3$) ; $3,65$ (s, 6H, $^{3'-5'}\text{OCH}_3$) ; $5,77$ (s, 1H, $\mathbf{H}_{1''}$) ; $6,70$ (s, 2H, \mathbf{H}_2) ; $6,87$ (st, $J = 6,87$ Hz, 4H, $\mathbf{H}_{2'-6'}$, \mathbf{H}_6) ; $7,02$ (t, $J = 7,01$ Hz, 2H, \mathbf{H}_5) ; $7,32$ –

7,35 (dd, $J_{7,7'} = 7,32$ Hz, $J_{4,4'} = 7,34$ Hz, 4H, **H₇**, **H₄**) ; 10,78 (s, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O).

- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 39,51 (**C_{1''}**) ; 55,86 (^{3'-5'}OCH₃) ; 60,01 (^{4'}OCH₃) ; 105,88 (**C₂**) ; 111,47 (**C₄**) ; 118,12 (**C_{6-6'}**) ; 118,19 (**C_{4'}**) ; 119,13 (**C₇**) ; 120,89 (**C₅**) ; 123,53 (**C_{2'-6'}**) ; 126,70 (**C_{3'-5'}**) ; 128,27 (**C_{3a}**) ; 136,55 (**C_{7a}**) ; 144,96 (**C₃**) ; 152,58 (**C_{1'}**).

SM : (TOF MS / ESI+) : m/z 435 [C₂₆H₂₄N₂O₃Na]⁺.

231 : 1,1-di(3'((6-méthoxy)-indolyl)-1-(3',4',5'-triméthoxyphenyl)méthane ¹³⁶



294 mg (2 mmol) de 6-méthoxy-1*H*-indole, 196 mg (1 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et 4 g de montmorillonite K10 sont mis en solution dans 15 ml de CH₂Cl₂. Le mélange est concentré sous vide à basse pression et est laissé à la température ambiante pour la nuit. Le milieu est remis en suspension dans l'acétate d'éthyle (15 ml), puis filtré et évaporé sous vide. Le composé **231** est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 3 : 2) et est obtenu avec un rendement de 70 %, sous forme de poudre qui rosit à l'air.

Formule brute : C₂₈H₂₈N₂O₅

Masse moléculaire : 472,19 g.mol⁻¹

Point de fusion : 102 °C

IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3396 ; 2928 ; 2833 ; 1627 ; 1590 ; 1500 ; 1453 ; 1418 ; 1324 ; 1157 ; 1121 ; 1026 ; 1002 ; 941 ; 800 ; 692.

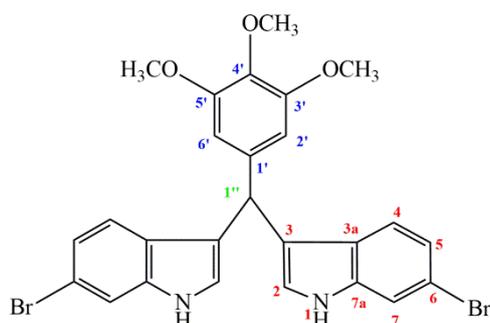
RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 3,61 (s, 3H, ^{4'}OCH₃) ; 3,64 (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃) ; 3,72 (s, 6H, ⁶OCH₃) ; 5,64 (s, 1H, **H_{1''}**) ; 6,53 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H₅**) ; 6,67 (s, 2H, **H₂**) ; 6,71 (s, 2H, **H_{2'-6'}**) ; 6,83 (s, 2H, **H₇**) ; 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H₄**) ; 10,55 (s, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O)

- ❖ ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) 40 ($\text{C}_{1''}$) ; 55,11 ($^6\text{OCH}_3$) ; 55,78 ($^{3'-5'}\text{OCH}_3$) ; 59,95 ($^4'\text{OCH}_3$) ; 94,50 (C_7) ; 105,78 (C_2) ; 108,30 (C_5) ; 118,04 (C_{3a}) ; 119,66 (C_4) ; 121,13 (C_3) ; 122,06 ($\text{C}_{2'-6'}$) ; 135,59 (C_1) ; 137,21 (C_{7a}) ; 140,82 (C_4') ; 152,47 ($\text{C}_{3'-5'}$) ; 155,34 (C_6).

SM : (TOF MS / ESI+) : m/z 495 [$\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$] $^+$.

232 : 1,1-di(3'((6-bromo)-indolyl)-1-(3',4',5'-triméthoxyphenyl)méthane ¹³⁶



388 mg (2 mmol) de 6-bromo-1*H*-indole, 196 mg (1 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et 4 g de montmorillonite K10 sont mis en solution dans 15 ml de CH_2Cl_2 . Le mélange est concentré sous vide à basse pression et est laissé à la température ambiante pour la nuit. Le milieu est remis en suspension dans l'acétate d'éthyle (15 ml), puis filtré et évaporé sous vide. Le composé **232** est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 7 : 3) et est obtenu avec un rendement de 76 %, sous forme de poudre qui rosit à l'air.

Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$

Masse moléculaire : 570,27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : 256 °C

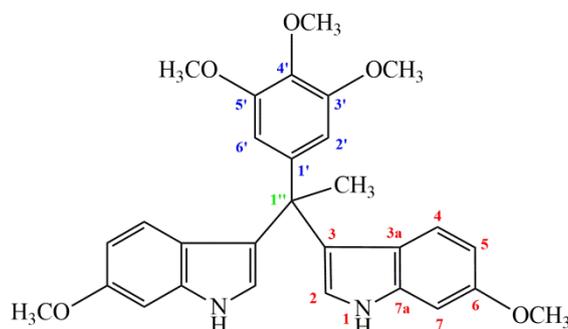
IR (ATR) : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3376 ; 2934 ; 2838 ; 1590 ; 1502 ; 1454 ; 1420 ; 1325 ; 1219 ; 1116 ; 986 ; 892 ; 847 ; 799 ; 706.

RMN :

- ❖ ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm) 3,62 (s, 3H, $^4'\text{OCH}_3$) ; 3,65 (s, 6H, $^{3'-5'}\text{OCH}_3$) ; 5,75 (s, 1H, $\text{H}_{1''}$) ; 6,67 (s, 2H, H_2) ; 6,90 (s, 2H, $\text{H}_{2'-6'}$) ; 7,01 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H_5) ; 7,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H_4) ; 7,53 (s, 2H, H_7) ; 10,96 (s, 2H, NH_1 , échangeable par D_2O).
- ❖ ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) 41,18 ($\text{C}_{1''}$) ; 56,42 ($^{3'-5'}\text{OCH}_3$) ; 60,56 ($^4'\text{OCH}_3$) ; 107,11 (C_7) ; 115,11 (C_2) ; 115,33 (C_5) ; 119,93 (C_{3a}) ; 121,88 (C_4) ; 122,49 (C_3) ; 125,67 ($\text{C}_{2'-6'}$) ; 127,07 (C_1) ; 137,75 (C_{7a}) ; 138,92 (C_4') ; 140,88 ($\text{C}_{3'-5'}$) ; 154,26 (C_6).

❖ **SM** : (HMRS, IPM / ESI+) m/z mesurée 590,9901, m/z calculée 590,9895
[C₂₆H₂₂⁷⁹Br₂N₂O₃Na]⁺.

233 : 1,1-di(3'((6-méthoxy)-indolyl)-1-(3',4',5'-triméthoxyphényl)éthane



a) méthode avec l'acide oxalique dihydraté¹³⁰

Dans 5 ml d'eau sont mis 18,58 mg de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) (0,051 mmol, 5 mole %) suivi de l'ajout de 100 mg (0,68 mmol) de 6-méthoxyindole puis de 70,75 mg (0,34 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde. Le mélange est mis sous agitation et l'on y introduit 64,36 mg (0,51 mmol) d'acide oxalique dihydraté. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane/acétone 5 : 5). La réaction est arrêtée au bout de 36 h. La solution est concentrée sous vide et le brut purifié sur colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 7 : 3). Le produit **233** est obtenu avec un rendement faible de 9 %.

b) méthode avec l'acide phosphomolybdique

100 mg (0,680 mmol) de 6-méthoxyindole et 70,75 mg (0,34 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde sont solubilisés dans 5 ml d'éthanol 96 %. Le mélange réactionnel est mis sous agitation. Puis, 31 mg (0,017 mmol) d'acide phosphomolybdique sont introduits dans la solution. La réaction suivie par CCM (cyclohexane/acétone 5 : 5) et laissée sous agitation durant 48 h. La solution est filtrée sur Büchner. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (cyclohexane/acétone 7 : 3 puis 5 : 5). Le composé **233** est obtenu avec des rendements allant de 4 à 20 %.

c) méthode avec un acide phosphorique chiral dérivé du BINOL

100 mg (0,680 mmol) de 6-méthoxyindole et 70,75 mg (0,34 mmol) de 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde sont solubilisés dans 10 ml d'éthanol 96 %. Le mélange réactionnel est mis sous agitation. Puis, 35,47 mg (0,102 mmol) d'acide (R)-phosphate (-)-1,1'-binapthyl-2,2'-diyle sont introduits dans la solution. La réaction suivie par CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 5 :

5) et laissée sous agitation pendant 36 h. La solution est évaporée sous vide. Le résidu est difficilement purifié sur colonne de gel de silice (cyclohexane/ acétate d'éthyle 7 : 3). Le composé **233** est obtenu avec un rendement de 20 %.

Formule brute : $C_{29}H_{30}N_2O_5$

Masse moléculaire : 486,56 g.mol⁻¹

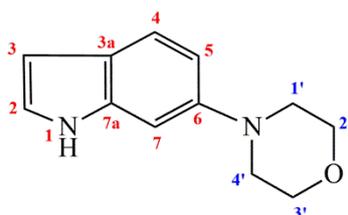
Point de fusion : 115 °C

RMN :

- ❖ ¹H (acétone-*d*₆) δ (ppm) **2,25** (s, 3H, ^{1''}CH₃), **3,58** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃), **3,70** (s, 3H, ^{4'}OCH₃), **3,74** (s, 6H, ⁶OCH₃), **6,48** (dd, *J* = 8,65 Hz, 2H, **H₅**), **6,73** (s, 2H, **H₂**), **6,77** (s, 2H, **H_{2'-6'}**), **6,92** (s, 2H, **H₇**), **7,10** (d ; *J* = 8,65 Hz, 2H, **H₄**), **9,76** (s, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O).
- ❖ ¹³C (acétone-*d*₆) δ (ppm) **15,8** (^{1''}CH₃) ; **51,2** (**C_{1''}**) **55,0** (⁶OCH₃) ; **56,7** (^{3'-5'}OCH₃) ; **60,95** (^{4'}OCH₃) ; **95,50** (**C₇**) ; **106,8** (**C₂**) ; **109,2** (**C₅**) ; **117,0** (**C_{3a}**) ; **119,8** (**C₄**) ; **124,13** (**C₃**) ; **125,06** (**C_{2'-6'}**) ; **135,1** (**C_{1'}**) ; **136,4** (**C_{7a}**) ; **139,6** (**C_{4'}**) ; **152,8** (**C_{3'-5'}**) ; **157,4** (**C₆**).

SM : (TOF MS / ESI+W) : *m/z*. 509 [C₂₉H₃₀N₂O₅Na]⁺.

246 : **6-morpholin-1*H*-indole** ²⁰⁶



Dans un tube de Schlenk, préalablement séché au four avec barreau magnétique, sont mis 196 mg (1 mmol) de 6-bromo-indole, 9,1 mg (1 mole %) de Pd₂dba₃ (tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium (o)) et 9,4 mg (2,4 mole %) de ligand PhDave-Phos®. Fermé hermétiquement avec une vis à téflon, le tube est mis sous vide et rempli d'argon (x3). Puis, sont introduits 1 ml de THF dans le tube, suivi de 2,2 ml de lithium bis(triméthylsilyl)amide (2,2 mmol, LiHMDS) et de 105 ml (1,20 mmol) de morpholine. Le mélange est mis à 65 °C sous agitation durant 24 h. Le mélange réactionnel est laissé refroidi à la température ambiante. 2 ml de HCl (2 M) est sont ajoutés dans le tube et le mélange est agité pendant 5 min et puis versé dans une ampoule à décanter contenant 20 ml d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase organique est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20 ml), lavée avec 40 ml de solution aqueuse saturée NaCl, séchée sur du sulfate de magnésium

et concentrée sous vide à basse pression. Le résidu est purifié sur une colonne de gel de silice avec l'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 2 : 3. Le produit **246** est obtenu sous forme de poudre cristalline blanche avec un rendement de 82 %.

Formule brute : C₁₂H₁₄N₂O

Masse moléculaire : 202,25 g.mol⁻¹

Point de fusion : 196,7 °C

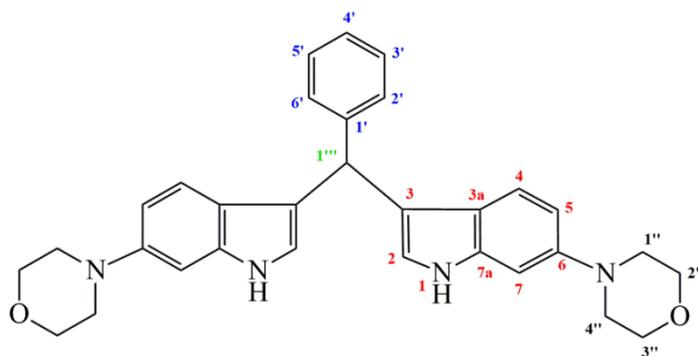
IR (ATR) : $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3115 ; 2961 ; 2166 ; 1625 ; 1449 ; 1253 ; 1175 ; 1115 ; 1063 ; 926 ; 886 ; 843 ; 810 ; 768 ; 731 ; 662.

RMN :

- ❖ ¹H (acétone-*d*₆) δ (ppm) **3,08** (t, *J* = 4,38 Hz, 4H, **H_{1'-4'}**) ; **3,79** (t, *J* = 4,64 Hz, 4H, **H_{2'-3'}**) ; **6,34** (d, *J* = 6,34 Hz, 1H, **H₃**) ; **6,81** (d, *J* = 8,49 Hz, 1H, **H₅**) ; **6,93** (s, 1H, **H₇**) ; 7,15 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, **H₂**) ; **7,42** (d, *J* = 8,49 Hz, 1H, **H₄**) ; **9,93** (s, 1H, **NH₁**).
- ❖ ¹³C (acétone-*d*₆) δ (ppm) **52,16** (**C_{1'-4'}**) ; **67,77** (**C_{2'-3'}**) ; **98,9** (**C₇**) ; **102,1** (**C₃**) ; **112,85** (**C₅**) ; **121,38** (**C₄**) ; **123,49** (**C_{7a}**) ; **124,24** (**C₂**) ; **138,31** (**C_{3a}**) ; 148,96 (**C₆**).

MS : (HMRS, IPM / ESI-W) *m/z* mesurée 201,1024, *m/z* calculée 201,1028 [C₁₂H₁₄N₂O-H]⁻.

234 : 1,1-di(3'((6-morpholin)-indolyl)-1-phenylméthane ¹⁴⁸



La réaction est effectuée sous atmosphère inerte (argon) à 45 °C dans un bain d'huile. 1 équivalent (50 mg, 0,048 ml, 0,471 mmol) de benzaldéhyde pour 2 équivalents (190 mg, 0,942 mmol) de **246** sont introduits dans un ballon qui est ensuite fermé avec un septum. Le ballon est mis sous vide et rempli d'argon (x3). 5 ml de THF sont ajoutés avec une seringue, suivi par l'introduction de 4 équivalents (0,232 ml, 1,885 mmol) de BF₃OEt₂. Après 4 h, le mélange réactionnel est laissé refroidi à la température ambiante sous agitation. Le contenu du ballon est versé dans une ampoule

à décanter contenant une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (10 ml). La phase organique est extraite avec l'acétate d'éthyle (2x20 L), lavée avec 20 ml de solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchée sur du sulfate de magnésium et concentrée sous vide à basse pression. Le produit **234** est purifié sur colonne de gel de silice avec du dichlorométhane/méthanol 5 : 1. Le rendement du produit obtenu est 52 %.

Formule brute : $C_{31}H_{32}N_4O_2$

Masse moléculaire : $492,61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : $152 \text{ }^\circ\text{C}$

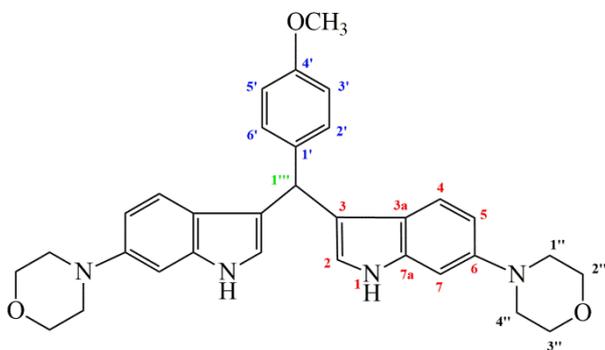
IR (ATR) : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3401 ; 3298 ; 2962 ; 2815 ; 1694 ; 1625 ; 1546 ; 1499 ; 1448 ; 1376 ; 1260 ; 1182 , 1113 ; 1066 ; 962 ; 888 ; 798 ; 751 ; 699.

RMN :

- ❖ ^1H (acétone- d_6) δ (ppm) **3,06** (t, $J = 4,40 \text{ Hz}$, 8H, $\text{H}_{1''-4''}$) ; **3,76** (t, $J = 4,68 \text{ Hz}$, 8H, $\text{H}_{2''-3''}$) ; **5,78** (s, 1H, $\text{H}_{1''''}$) ; **6,65** (s, 2H, H_2) ; **6,69** (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 2H, H_5) ; **6,90** (s, 2H, H_7) ; **7,14-7,20** (m, 4H, $\text{H}_{2'-6'}$, $\text{H}_{3'-5'}$) ; **7,25** (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H, H_4) ; **7,38** (d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 2H, H_4) ; **9,70** (s, 2H, NH_1).
- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) **41,36** ($\text{C}_{1''''}$), **52,04** ($\text{C}_{1''-4''}$), **67,56** ($\text{C}_{2''-3''}$), **99,06** (C_7), **111,99** (C_5), **119,73** ($\text{C}_{3'-5'}$), **120,66** (C_1), **122,73** (C_4), **123,22** (C_{7a}), **126,58** (C_2), **128,96** ($\text{C}_{2'-6'}$), **129,50** (C_3), **138,95** (C_{3a}), **146,18** (C_6), **148,59** (C_4').

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 493,2614 ; m/z calculée 493,2604 [$C_{31}H_{32}N_4O_4+H$] $^+$.

235 : [1,1-di\(3'\(\(6-morpholin\)-indolyl\)-1-\(4'-méthoxyphényl\)méthane](#)¹⁴⁸



La procédure est identique à celle utilisée pour le composé **234**. Le benzaldéhyde est remplacé par le 4-méthoxybenzaldéhyde. Le composé **235** est obtenu avec un rendement de 45 %.

Formule brute : C₃₂H₃₄N₄O₃

Masse moléculaire : 522,26 g.mol⁻¹

Point de fusion : 163,4 °C

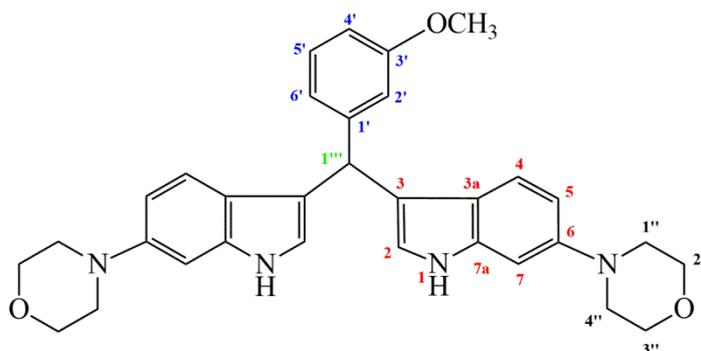
IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3400 ; 2954 ; 2828 ; 1625 ; 1507 ; 1448 ; 1242 ; 1173 ; 1112 ; 1030 ; 963 ; 888 ; 797.

RMN :

- ❖ ¹H (acétone-*d*₆) δ (ppm) **3,05** (t, *J* = 4,13 Hz, 8H, **H**_{1''-4''}), **3,75** (s, 3H, ^{4'}OCH₃), **3,76** (t, *J* = 4,37 Hz, 8H, **H**_{2''-3''}), **5,72** (s, 1H, **H**_{1'''}), **6,64** (s, 2H, **H**₂), **6,69** (d, *J* = 8,53 Hz, 2H, **H**₅), **6,81** (d, *J* = 7,10 Hz, 2H, **H**_{3'-5'}), **6,90** (s, 2H, **H**₇), **7,19** (d, *J* = 8,74 Hz, 2H, **H**₄), **7,27** (d, *J* = 7,77 Hz, 2H, **H**_{2'-6'}), **9,68** (s, 2H, **NH**₁).
- ❖ ¹³C (acétone-*d*₆) δ (ppm) **40,53** (**C**_{1'''}), **52,05** (**C**_{1''-4''}), **55,40** (^{4'}OCH₃), **67,67** (**C**_{2''-3''}), **98,94** (**C**₇), **111,98** (**C**₅), **114,11** (**C**_{3'-5'}), **120,21** (**C**_{1'}), **120,72** (**C**₄), **122,92** (**C**_{7a}), **123,08** (**C**₂), **130,38** (**C**_{2'-6'}), **138,23** (**C**₃), **139,05** (**C**_{3a}), **148,81** (**C**₆), **158,87** (**C**_{4'}).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) *m/z* mesurée 523,2723 *m/z* calculée 523,2709 [C₃₂H₃₄N₄O₃+H]⁺.

236 : 1,1-di(3'((6-morpholin)-indolyl)-1-(3'-méthoxyphenyl)méthane ¹⁴⁸



La procédure est identique à celle utilisée pour le composé **234**. Le benzaldéhyde est remplacé par le 3-méthoxybenzaldéhyde. Le composé **236** est obtenu avec un rendement de 47 %.

Formule brute : C₃₂H₃₄N₄O₃

Masse moléculaire : 522,26 g.mol⁻¹

Point de fusion : 151 °C

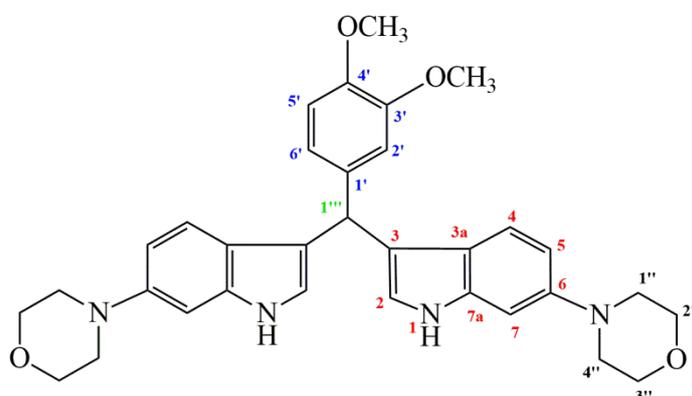
IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3399 ; 2956 ; 2820 ; 1706 ; 1626 ; 1546 ; 1488 ; 1448 ; 1260 ; 1182 ; 1112 ; 1040 ; 962 ; 926 ; 887 ; 797 ; 783 ; 694.

RMN :

- ❖ ¹H (acétone-*d*₆) δ (ppm) **3,06** (t, $J = 4,22$ Hz, 8H, **H_{1''-4''}**), **3,70** (s, 3H, **^{3'}OCH₃**), **3,77** (t, $J = 4,37$ Hz, 8H, **H_{2''-3''}**), **5,76** (s, 1H, **H_{1'''}**), **6,69** (s, 2H, **H₂**), **6,74** (d, $J = 9,90$ Hz, 2H, **H₅**), **6,92** (s, 2H, **H₇**), **6,96** (d, $J = 7,03$ Hz, 2H, **H_{4'-6'}**), **6,97** (s, 1H, **H_{2'}**), 7.17 (t, $J = 8,19$ Hz, 1H, **H_{5'}**), **7,22** (d, $J = 8,64$ Hz, 2H, **H₄**), **9,72** (s, 2H, **NH₁**).
- ❖ ¹³C (acétone-*d*₆) δ (ppm) **40,49** (**C_{1'''}**), **51,16** (**C_{1''-4''}**), **54,38** (**^{3'}OCH₃**), **66,69** (**C_{2''-3''}**), **98,11** (**C_{2'}**), **110,63** (**C_{4'}**), **111,10** (**C₅**), **114,78** (**C_{6'}**), **118,77** (**C₃**), **119,75** (**C₄**), **121,04** (**C_{7a}**), **121,84** (**C_{3a}**), **122,28** (**C₂**), **128,73** (**C_{5'}**), **138,06** (**C₆**), **146,97** (**C₇**), **147,80** (**C_{1'}**), **159,69** (**C_{3'}**).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 523,2709 m/z calculée 523,2709 [C₃₂H₃₄N₄O₃+H]⁺.

237 : **1,1-di(3'((6-morpholin)-indolyl)-1-(3',4'-diméthoxyphenyl)méthane**¹⁴⁸



La procédure est identique à celle utilisée pour le composé **234**. Le benzaldéhyde est remplacé par le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde. Le composé **237** est obtenu avec un rendement de 31 %.

Formule brute : C₃₃H₃₆N₄O₄

Masse moléculaire : 552,27 g.mol⁻¹

Point de fusion : 154,6 °C

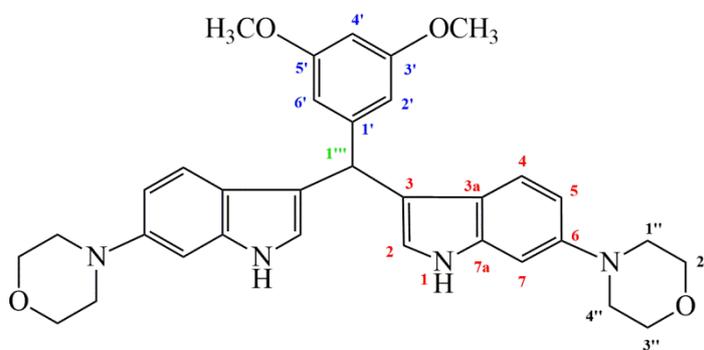
IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3391 ; 2955 ; 2829 ; 1625 ; 1508 ; 1448 ; 1260 ; 1182 ; 1114 ; 1066 ; 1024 ; 963 ; 888 ; 795 ; 758 ; 728 ; 661.

RMN :

- ❖ ^1H (acétone- d_6) δ (ppm) **3,06** (t, $J = 3,95$ Hz, 8H, $\text{H}_{1''-4''}$), **3,69** (s, 6H, $^{3'-4'}$ OCH₃), **3,75** (t, $J = 3,86$ Hz, 8H, $\text{H}_{2''-3''}$), **5,71** (s, 1H, $\text{H}_{1''''}$), **6,67** (s, 2H, H_2), **6,71** (dl, $J = 6,36$ Hz, 2H, H_5), **6,80-6,90** (m, 3H, H , $\text{H}_{2'-6'}$), **7,04** (s, 2H, H_7), **7,21** (d, $J = 6,45$ Hz, 2H, H_4), **9,69** (s, 2H, NH_1).
- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) **41,64** ($\text{C}_{1''''}$), **52,04** ($\text{C}_{1''-4''}$), **55,42** ($^{3'-4'}$ OCH₃), **67,67** ($\text{C}_{2''-3''}$), **98,09** (C_4), **98,96** (C_7), **108,01** ($\text{C}_{2'-6'}$), **112,03** (C_5), **119,57** (C_3), **120,66** (C_4), **122,72** (C_{7a}), **122,96** ($\text{C}_{1'}$), **123,12** (C_2), **139** (C_6), **148,82** (C_{3a}), **161,65** ($\text{C}_{3'-5'}$).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 553,2816 m/z calculée 553,2816 [$\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}$]⁺.

238 : 1,1-di(3'((6-morpholin)-indolyl)-1-(3',5'-diméthoxyphenyl)méthane ¹⁴⁸



La procédure est identique à celle utilisée pour le composé **234**. Le benzaldéhyde est remplacé par le 3,5-diméthoxybenzaldéhyde. Le composé **238** est obtenu avec un rendement de 42 %.

Formule brute : $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4$

Masse moléculaire : 552,27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : 152,3 °C

IR (ATR) : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3400 ; 2956 ; 2833 ; 1731 ; 1626 ; 1593 ; 1449 ; 1245 ; 1185 ; 1151 ; 1113 ; 1063 ; 1041 ; 963 ; 926 ; 889 ; 797 ; 688.

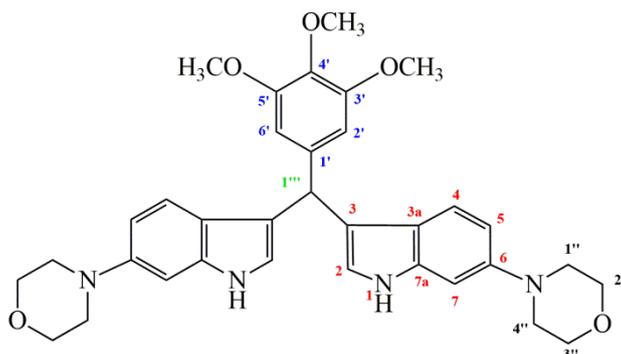
RMN :

- ❖ ^1H (acétone- d_6) δ (ppm) **3,05** (t, $J = 3,97$ Hz, 8H, $\text{H}_{1''-4''}$), **3,69** (s, 6H, $^{3'-5'}$ OCH₃), **3,76** (t, $J = 3,87$ Hz, 8H, $\text{H}_{2''-3''}$), **5,71** (s, 1H, $\text{H}_{1''''}$), **6,32** (s, 1H, H_4), **6,32** (s, 2H, $\text{H}_{2'-6'}$), **6,71** (ds, $J_d = 6,34$ Hz, 4H, H_2 , H_5), **6,90** (s, 2H, H_7), **7,23** (d, $J = 4,04$ Hz, 2H, H_4), **9,70** (s, 2H, NH_1).

- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) 41,64 ($\text{C}_{1''''}$), 52,04 ($\text{C}_{1''-4''}$), 55,42 ($^{3'-5'}\text{OCH}_3$), 67,67 ($\text{C}_{2''-3''}$), 98,09 (C_4), 98,96 (C_7), 108,01 ($\text{C}_{2'-6'}$), 112,03 (C_5), 119,57 (C_3), 120,66 (C_4), 122,72 (C_{7a}), 122,96 ($\text{C}_{1'}$), 123,12 (C_2), 139 (C_6), 148,82 (C_{3a}), 161,65 ($\text{C}_{3'-5'}$).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 553.2823 m/z calculée 553.2815 [$\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}$] $^+$.

239 : 1,1-di(3'((6-morpholin)-indolyl)-1-(3',4',5'-triméthoxyphenyl)méthane ¹⁴⁸



La procédure est identique à celle utilisée pour le composé **234**. Le benzaldéhyde est remplacé par le 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde. Le composé **239** est obtenu avec un rendement de 22 %.

Formule brute : $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5$

Masse moléculaire : 582,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : 140,4 °C

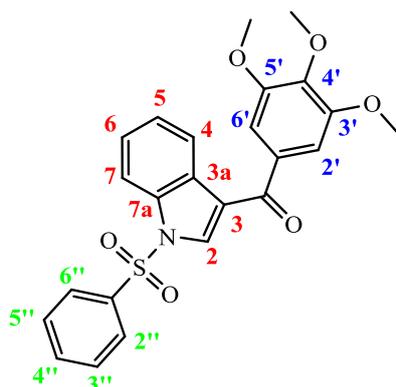
IR (ATR) : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3399 ; 2953 ; 2830 ; 1626 ; 1589 ; 1501 ; 1448 ; 1417 ; 1322 ; 1235 ; 1182 ; 1114 ; 1002 ; 963 ; 888 ; 798 ; 693.

RMN :

- ❖ ^1H (acétone- d_6) δ (ppm) 3,02 (t, $J = 3,98$ Hz, 8H, $\text{H}_{1''-4''}$), 3,65 (s, 9H, $^{3'-4'-5'}\text{OCH}_3$), 3,73 (t, $J = 3,67$ Hz, 8H, $\text{H}_{2''-3''}$), 5,69 (s, 1H, $\text{H}_{1''''}$), 6,67-6,71 (m, $J_d = 8,61$ Hz, 6H, H_2 , H_5 , H_7), 6,88 (s, 2H, $\text{H}_{2'-6'}$), 7,21 (d, $J = 8,77$ Hz, 2H, H_4), 9,66 (s, 2H, NH_1).
- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) 41,71 ($\text{C}_{1''''}$), 52,10 ($\text{C}_{1''-4''}$), 56,40 ($^{3'-5'}\text{OCH}_3$), 60,51 ($^{4'}\text{OCH}_3$), 67,56 ($\text{C}_{2''-3''}$), 99,13 ($\text{C}_{2'-6'}$), 107,27 (C_7), 111,98 (C_5), 119,81 (C_3), 120,69 (C_4), 122,83 ($\text{C}_{1'}$), 123,22 (C_2), 137,54 (C_4), 138,95 (C_6), 141,83 (C_{3a}), 148,51 (C_{7a}), 154,05 ($\text{C}_{3'-5'}$).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 583,2947, m/z calculée 583,2920 [$\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5+\text{H}$] $^+$ ou m/z mesurée 605,2751, m/z calculée 605,2740 [$\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5+\text{Na}$] $^+$.

249 : (1-benzènesulfonyl-1H-indol-3-yl)-(3,4,5-triméthoxyphényl)-méthanone



A une suspension de chlorure d'aluminium (1,034 g, 7,74 mmol, 2 Eq.) dans le dichlorométhane anhydre, est ajouté à 25 °C, le chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle (1,076g, 4,66 mmol). Le mélange réactionnelle est agité pendant 15 minutes et devient jaune foncé. Une solution de 1-(phénylsulfonyl)-1H-indole (1 g, 3,89 mmol) dans le dichlorométhane anhydre est ajoutée goutte à goutte. Au bout de 30 minutes d'agitation à 25 °C, le mélange devient rouge foncé. Le milieu réactionnel est versé dans un bain de glace. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane, puis la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec une solution aqueuse de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit **249** (1,41 g) est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec 80 % de rendement après chromatographie sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/acétate d'éthyle 80/20 V/V).

Formule brute : C₂₄H₂₁NO₆S

Masse moléculaire : 451,49 g.mol⁻¹

Point de fusion : 142-143 °C

IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 2998 ; 2934 ; 2834 ; 1639 ; 1579 ; 1533 ; 1503 ; 1448 ; 1375 ; 1323 ; 1171 ; 1129.

RMN :

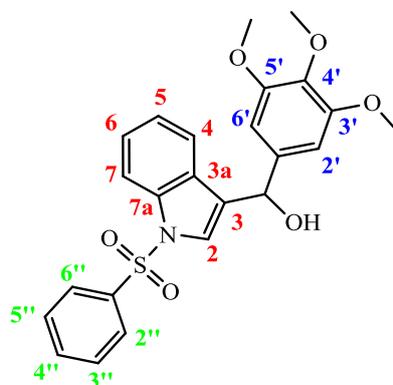
- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **3,93** (s, 6H, ^{3',5'}OCH₃), **3,98** (s, 3H, ^{4'}OCH₃), **7,15** (s, 2H, **H_{2',6'}**), **7,41** (t, $J_{5,4} = 7,2$ Hz, $J_{5,6} = 7,2$ Hz, 1H, **H₅**), **7,45** (t, $J_{6,5} = 7,2$; $J_{6,7} = 7,2$ Hz, 1H, **H₆**), **7,5** (t, $J = 7,8$ Hz, $J = 7,8$ Hz, 2H, **H_{3'',5''}**), **7,62** (t, $J = 7,4$ Hz, $J = 7,4$ Hz, 1H, **H_{4''}**), **7,95** (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, **H_{2'',6''}**), **8,04** (d, $J_{7,6} = 8,2$ Hz, 1H, **H₇**), **8,07** (s, 1H, **H₂**), **8,26** (d, $J_{4,5} = 7,3$ Hz, 1H, **H₄**).

- ❖ ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) **53,3** ($^{3',5'}\text{OCH}_3$), 61,0 ($^{4'}\text{OCH}_3$), **106,7** ($\text{C}_{2',6'}$), **113,2** (C_7), **120,5** (C_3), **122,9** (C_4), **124,8** (C_5), **126,0** (C_6), **127,0** ($\text{C}_{2'',6''}$), **128,5** (C_{3a}), **129,6** ($\text{C}_{3'',5''}$), **132,8** (C_2), **134,1** ($\text{C}_{1''}$), **142,2** ($\text{C}_{4'}$), **153,1** ($\text{C}_{3',5'}$), **189,5** (CO).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z 452 [$\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S} + \text{H}$] $^+$.

Microanalyse :	Composition	C	H	N
	% trouvé	64.42	4.59	2.88
	% calculé	63.85	4.69	3.10

139 : (1-benzènesulfonyl-1H-indol-3-yl)-(3,4,5-triméthoxy-phényl)-méthanol



A une solution de **249** (745,3 mg, 1,652 mmol) dans un mélange méthanol-THF (20/1) à 25° C, est ajouté le borohydrure de sodium (126 mg, 3,304 mmol, 2 éq.) par portions. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle 1/1 V/V) et arrêtée au bout de 30 minutes. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le résidu est mis en solution dans du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, puis avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et enfin concentrée sous pression réduite. Le carbinol **139** (508,7 mg) est obtenue sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 68 % après chromatographie sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/ acétate d'éthyle 70/30 V/V).

Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}$

Masse moléculaire : 453,12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : 140-141 °C

IR (ATR) : ν_{max} (cm^{-1}) 3371 ; 2294 ; 2963 ; 2940 ; 2831 ; 1595 ; 1503 ; 1446 ; 1360 ; 1322 ; 1176 ; 1120.

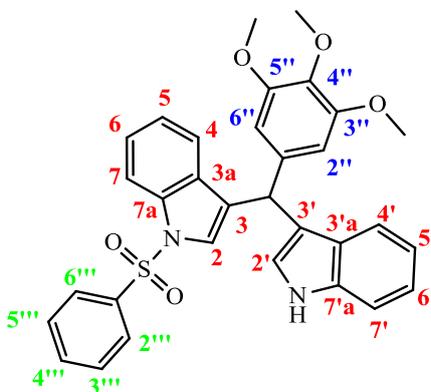
RMN :

- ❖ ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm) **3,58** (s, 3H, $^4\text{OCH}_3$) ; **3,68** (s, 6H, $^{3',5'}\text{OCH}_3$) ; **5,84** (d, $J_{\text{CH,OH}} = 4,0$ Hz, 1H, CH) ; **5,97** (d, $J_{\text{OH,CH}} = 4,0$ Hz, 1H, OH) ; **6,73** (s, 2H, $\text{H}_{2',6'}$) ; **7,17** (t, $J_{5,4} = 7,6$ Hz, $J_{5,6} = 7,6$ Hz, 1H, H_5) ; **7,29** (dd, $J_{6,7} = 8,3$ Hz, $J_{6,5} = 7,6$ Hz, , 1H, H_6) ; **7,53** (d, $J_{4,5} = 7,6$ Hz, 1H, H_4) ; **7,56** (t, 2H, $\text{H}_{3'',5''}$), **7,66** (t, $J_{4'',3''} = 7,3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4''}$) ; **7,68** (s, 1H, H_2) ; **7,91** (d, $J_{7,6} = 8,3$ Hz, 1H, H_7) ; **7,97** (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'',6''}$).
- ❖ ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) **56,9** ($^{3',5'}\text{OCH}_3$) ; **61,0** ($^4\text{OCH}_3$) ; **69,4** (HC-OH) ; **104,7** ($\text{C}_{2',6'}$) ; **114,3** (C_7) ; **122,3** (C_4) ; **124,1** (C_5) ; **125,8** (C_6) ; **127,7** ($\text{C}_{2'',6''}$) ; **128,6** (C_3) ; **129,8** (C_{3a}) ; **130,8** ($\text{C}_{3'',5''}$) ; **135,6** ($\text{C}_{4''}$) ; **135,9** (C_4) ; **138,1** ($\text{C}_{1''}$) ; **140,5** ($\text{C}_{1'}$) ; **153,6** ($\text{C}_{3',5'}$).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z 454 [$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S} + \text{H}$] $^+$.

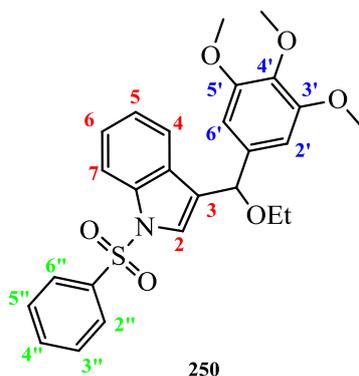
Microanalyse :	Composition	C	H	N
	% trouvé	63.71	5.09	2.96
	% calculé	63.56	5.11	3.09

242 : 3-((1H-indol-3-yl)-(3,4,5-triméthoxyphényl)méthyl)-1-benzènesulfonyl-1H-indole



a) méthode avec le nitrate ammonium cérique

Un mélange de carbinol **139** (30,3 mg, 0,067 mmol), d'indole (7,84 mg, 0,067 mmol), de nitrate ammonium de cérium (3,68 mg, 0,0067 mmol, 0,1 éq.) et de 2 ml d'éthanol à 99 % (V/V), est irradié sous ultra-sons ($\nu = 47$ KHz ± 6 ; P = 120 W) à température ambiante. Au bout de 24 heures, le milieu réactionnel est versé dans de l'eau distillée. La phase aqueuse est extraite par du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée à sec sous pression réduite. Le produit **242** (4,8 mg) est obtenu sous la forme d'une laque avec un rendement de 13 % après purification sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2 V/V). On isole également le composé **250** (28 mg, 87 %).



Formule brute : $C_{26}H_{27}NO_6S$

Masse moléculaire : $481,56 \text{ g.mol}^{-1}$

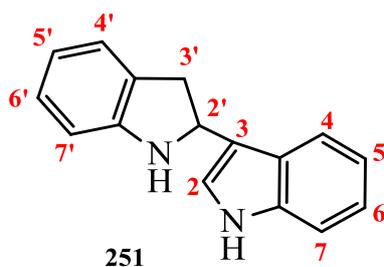
RMN :

- ❖ ^1H (CDCl_3) δ (ppm) **1,12** (m, 3H, $\text{CH}_3(\text{Et})$), **3,56** (m, 2H, $-\text{OCH}_2(\text{Et})$), **3,80** (s, 6H, $^{3',5'}\text{OCH}_3$); **3,87** (s, 3H, $^{4'}\text{OCH}_3$); **5,47** (s, 1H, CH); **6,62** (s, 2H, $\text{H}_{2',6'}$); **7,21** (t, $J_{6,5} = 7,6 \text{ Hz}$, $J_{6,7} = 7,6 \text{ Hz}$, 1H, H_5); **7,28** (s, 1H, H_2); **7,31** (dd, $J_{5,4} = 8,2 \text{ Hz}$, $J_{5,6} = 8,0 \text{ Hz}$, 1H, H_6); **7,42** (dd, 2H, $J_{3'',2''} = 8,0 \text{ Hz}$, $J_{3'',4''} = 7,6 \text{ Hz}$, $\text{H}_{3'',5''}$), **7,54** (m, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_{4''}$); **7,86** (d, $J_{2'',3''} = 8,0 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{2'',6''}$); **7,98** (d, $J_{4,5} = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, H_7)

SM (ESI, ES+): m/z 504 [$C_{26}H_{27}NO_6S + \text{Na}$] $^+$, m/z 520 [$C_{26}H_{27}NO_6S + \text{K}$] $^+$

b) méthode avec SnCl_4

Au carbinol **139** (40 mg, 0,088 mmol) mis en solution dans du dichlorométhane anhydre sous argon à 0°C (bain de glace), est ajouté un équivalent de SnCl_4 (10 μL). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes et devient violet. L'indole (22,6 mg, 0,193 mmol) est alors ajouté, et la solution devient instantanément jaune-orangé. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure et la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane, et les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et enfin, concentrées sous pression réduite. Le produit **242** (7 mg) est obtenue sous la forme d'une laque avec un rendement de 16 % après purification sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3 V/V). On isole également le dimère d'indole **251** (10,3 mg, 23 %).



Formule brute : C₁₆H₁₄N₂

Masse moléculaire : 234,29 g.mol⁻¹

RMN :

- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **3,23** (dd, $J_{3'a-3'b} = 15,6$ Hz, $J_{3'a-2'} = 8,3$ Hz, 1H, **H_{3'a}**), **3,47** (dd, $J_{3'b-3'a} = 15,6$ Hz, $J_{3'b-2'} = 9,1$ Hz, **H_{3'b}**); **5,27** (dd, $J_{2'-3'b} = 9,1$ Hz, $J_{2'-3'a} = 8,3$ Hz, 1H, **H_{2'}**); **6,69** (d, 1H, $J_{7',6'} = 7,7$ Hz, **H_{7'}**); **6,76** (t, $J_{5',4'} = 7,2$ Hz, $J_{5',6'} = 7,2$ Hz, 1H, **H_{5'}**); **7,08** (m, 1H, **H_{6'}**); **7,09** (m, 1H, **H_{5'}**); **7,15** (d, $J_{4',5'} = 7,2$ Hz, 1H, **H_{5'}**); **7,19** (sl, 1H, **H_{2'}**), **7,21** (m, 1H, **H_{6'}**); **7,38** (d, $J_{7,6} = 8,1$ Hz, 1H, **H₇**); **7,60** (d, $J_{4,5} = 8,0$ Hz, 1H, **H₄**), **8,02** (sl, échangeable par D₂O, 1H, **H₁**).
- ❖ ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) **37,7** (**C_{3'}**); **56,4** (**C_{2'}**); **109,2** (**C_{7'}**); **111,3** (**C₇**); **118,7** (**C_{5'}**); **119,5** (**C₃**); **119,5** (**C₄**); **119,6** (**C_{6'}**); **121,1** (**C₂**); **122,3** (**C₅**); **124,7** (**C_{6'}**); **125,8** (**C_{3'a}**); **127,4** (**C_{4'}**); **128,9** (**C_{3a}**); **136,8** (**C_{7a}**); **151,0** (**C₇**).

c) méthode avec l'acide méthane sulfonique

Au carbinol **1** (25,1 mg, 0,055 mmol) mis en solution dans du dichlorométhane anhydre sous argon à température ambiante, est ajouté un équivalent d'acide méthane sulfonique (4 μL). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes et devient violet. L'indole (9 mg, 0,055 mmol) est alors ajouté et la solution devient instantanément rouge claire. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure et 30 minutes. La réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (1 ml). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane, et les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et enfin, concentrées sous pression réduite. Le produit **242** (7,1 mg) est obtenu sous la forme d'une laque avec un rendement de 25 % après purification sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2 V/V).

d) méthode avec le p-toluène sulfonate de pyridinium

Au carbinol **139** (36,2mg, 0,080 mmol) mis en solution à température ambiante dans du dichlorométhane anhydre et sous atmosphère d'argon, sont ajoutés trois équivalents de *p*-toluène sulfonate de pyridinium (60 mg, 0,24 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes, et reste toujours jaune pâle. L'indole (10 mg, 0,080 mmol) est alors ajouté (la coloration de la solution reste inchangée). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 heures et la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, puis concentrées sous pression réduite. Le produit **242** (25,2 mg) est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 56 % après purification sur colonne de silice « flash »(cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3 V/V).

e) méthode avec le chlorure de méthane sulfonyle

Au carbinol **139** (107,3 mg, 0,237 mmol) mis en solution dans du dichlorométhane anhydre sous atmosphère d'argon et à température ambiante, sont ajoutés cinq équivalents de chlorure de mésyle (90 µl). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes, et reste toujours jaune pâle. L'indole (28 mg, 0,237 mmol) est alors ajouté (la coloration de la solution reste inchangée). La réaction est mise sous agitation magnétique et stoppée au bout de 36 heures par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, puis concentrées sous pression réduite. Le produit **242** (91 mg) est obtenue sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 70 % après purification sur colonne de silice « flash » (cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3 V/V). Celui-ci est cristallisé dans un mélange CH₂Cl₂/CH₃OH 8/2 V/V, sous la forme de cristaux incolores.

Formule brute : C₃₂H₂₈N₂O₅S

Masse moléculaire : 552,64 g.mol⁻¹

Point de fusion : 214-215 °C

IR (ATR) : ν_{max} (cm⁻¹) 3412 ; 3358 ; 2993 ; 2938 ; 2837 ; 1592 ; 1505 ; 1448 ; 1421 ; 1376 ; 1235 ; 1175 ; 1130 ; 960 ; 744.

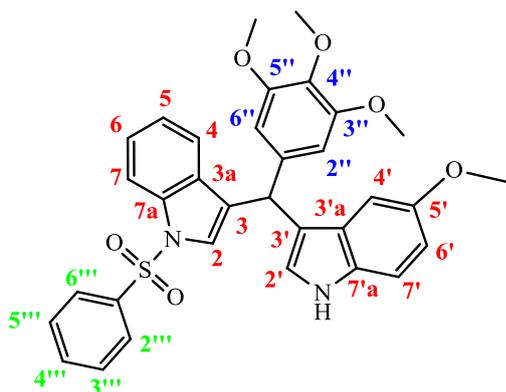
RMN :

- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **3,69** (s, 6H, , ^{3'',5''}OCH₃) ; **3,85** (s, 3H, ^{4''}OCH₃) ; **5,66** (s, 1H, CH) ; **6,49** (s, 2H, **H_{2'',6''}**) ; **6,62** (sl, 1H, **H_{2'}**) ; **7,02** (t, J_{H5'-H4'} = J_{H5'-H6'} = 7,2 Hz, 1H, **H_{5'}**) ; **7,05**

- (s, 1H, **H₂**) ; **7,14** (t, t, $J_{H_5-H_4} = J_{H_5-H_6} = 7,7$ Hz, 1H, **H₅**) ; **7,20** (m, 1H, **H_{6'}**) ; 7,23 (m, 1H, **H_{4'}**) ; **7,27** (m, 1H, **H₄**) ; **7,28** (m, 1H, **H₆**) ; **7,41** (m, 3H, **H_{3''',5'''}**+ **H_{7'}**) ; **7,54** (t, $J_{H_4'''-H_5'''} = 7,5$ Hz = $J_{H_4'''-H_3'''}$ = 7,5 Hz, 1H, **H_{4'''}**) ; **7,76** (d, $J_{H_2'''-H_3'''}$ = 7,4 Hz, 2H, **H_{2''',6'''}**) ; **8,03** (d, $J_{H_7-H_6} = 8,3$ Hz, 1H, **H₇**) ; **8,08** (sl, échangeable par D₂O, 1H, **NH₁**).
- ❖ ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) **40,3** (CH) ; **56,0** (^{3'',5''}OCH₃) ; **60,9** (^{4''}OCH₃) ; **105,6** (**C_{2'',6''}**) **111,3** (**C_{7'}**) ; **113,9** (**C₇**) ; **118,0** (**C_{3'}**) ; **119,4** (**C_{4'}**) ; **119,5** (**C_{5'}**) ; **120,5** (**C₄**) ; **122,3** (**C_{6'}**) ; **123,3** (**C₅**) ; **123,6** (**C_{2'}**) ; **124,8** (**C₆**) ; **125,4** (**C₂**) ; **126,4** (**C₃**) ; **126,6** (**C_{3'a}**) ; **126,8** (**C_{2''',6'''}**) ; **129,1** (**C_{3''',5'''}**) ; **130,5** (**C_{3a}**) ; **133,6** (**C_{4'''}**) ; **135,8** (**C_{7a}**) ; **136,6** (**C_{4''}**) ; **136,7** (**C_{7'a}**) ; **137,7** (**C_{1''}**) ; **138,0** (**C_{1'''}**) ; **153,2** (**C_{3'',5''}**).

SM (ESI, ES+) : m/z 575 [C₃₂H₂₈N₂O₅S +Na]⁺

243 : 3-((5-méthoxy-1H-indol-2-yl)-(3,4,5-triméthoxyphényl)méthyl)-1-benzènesulfonyl-1H-indole



Au carbinol **139** (99,5mg, 0,220 mmol) en solution dans du dichlorométhane anhydre, sous atmosphère d'argon à température ambiante, sont ajoutés cinq équivalents de chlorure de mésyle (85 µl). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 min, et reste toujours jaune pâle. L'indole (28 mg, 0,237 mmol) est alors ajouté et la coloration de la solution reste inchangée. La réaction est mise sous agitation magnétique et stoppée au bout de 36 h par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, puis concentrées sous pression réduite. Le produit **243** (100 mg) est obtenu sous la forme d'une huile rose avec un rendement de 78 % après purification sur colonne de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3 V/V). Le produit est cristallisé dans un mélange dichlorométhane/méthanol 8/2 V/V sous la forme de cristaux blanc.

Formule brute : C₃₃H₃₀N₂O₆S

Masse moléculaire : 582,67 g.mol⁻¹

Point de fusion : 213 °C

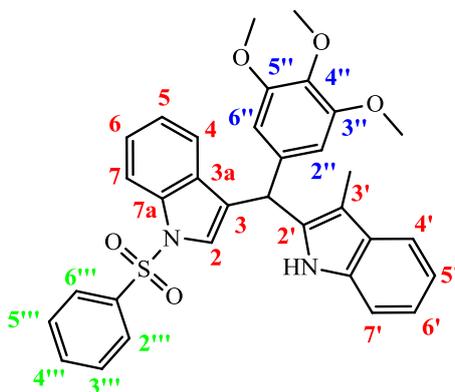
IR (film NaCl) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3412 ; 3358 ; 3058 ; 2992 ; 2928 ; 2837 ; 1585 ; 1504 ; 1448 ; 1362 ; 1235 ; 1174 ; 960 ; 733.

RMN :

- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **3,66** (s, 3H, **5'**OCH₃) ; **3,69** (s, 6H, **3'',5''**OCH₃) ; **3,85** (s, 3H, **4''**OCH₃) ; **5,61** (s, 1H, CH) ; **6,48** (s, 2H, **H_{2'',6''}**) ; **6,60** (sl, 1H, **H_{2'}**) ; **6,69** (d, $J_{H4'-H6'} = 2,4$ Hz, 1H, **H_{4'}**) ; **6,88** (dd, $J_{H6'-H7'} = 8,8$ Hz, $J_{H6'-H4'} = 2,4$ Hz, 1H, **H_{6'}**) ; **7,05** (s, 1H, **H₂**) ; **7,14** (t, $J_{H5-H4} = J_{H5-H6} = 7,1$ Hz, 1H, **H₅**) ; 7,31 (m, 3H, **H_{7',4,6}**) ; 7,41 (m, 2H, **H_{3''',5'''}**) ; 7,53 (t, $J_{H4'''-H5'''} = 7,5$ Hz = $J_{H4'''-H3'''} = 7,5$ Hz, 1H, **H_{4'''}**) ; **7,74** (d, $J_{H2'''-H3'''} = 7,3$ Hz, 2H, **H_{2''',6'''}**) ; **7,92** (sl, échangeable par D₂O, 1H, N **H₁**) ; **8,01** (d, $J_{H7-H6} = 8,3$ Hz, 1H, **H₇**).
- ❖ ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) **40,37** (CH) ; **56,1** (**3'',5''**OCH₃) ; **59,2** (**5'**OCH₃) ; **60,9** (**4''**OCH₃) ; **101,7** (**C_{2'',6''}**) **105,7** (**C_{7'}**) ; **109,5** (**C_{7'}**) ; **112,1** (**C_{3'}**) ; **113,9** (**C_{4'}**) ; **114,4** (**C_{5'}**) ; **117,8** (**C₄**) ; **118,6** (**C_{6'}**) ; **120,6** (**C₅**) ; **123,3** (**C_{2'}**) ; **124,4** (**C₆**) ; **124,9** (**C₂**) ; **125,5** (**C₃**) ; **126,3** (**C_{3'a}**) ; **126,8** (**C_{2''',6'''}**) ; **128,5** (**C_{3''',5'''}**) ; **129,3** (**C_{3a}**) ; **130,6** (**C_{4''''}**) ; **132,3** (**C_{7a}**) ; **133,7** (**C_{4''''}**) ; **135,9** (**C_{7'a}**) ; **137,7** (**C_{1''''}**) ; **138,1** (**C_{1''''}**) ; **154,1** (**C_{3''',5'''}**).

SM (ESI, ES⁺) : m/z 605 [C₃₃H₃₀N₂O₆S +Na]⁺

244: 3-((3-méthyl-1H-indol-2-yl)-(3,4,5-triméthoxyphényl)méthyl)-1-benzènesulfonyl-1H-indole



Au carbinol **139** (74,9mg, 0,165 mmol) en solution dans le dichlorométhane anhydre, sous atmosphère d'argon à température ambiante, sont ajoutés cinq équivalents de chlorure de mésyle (65 μ l). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes. Le scatole (22 mg, 0,165 mmol, 1 éq.) est administré dans le mélange réactionnel, et la coloration de la solution reste inchangée. La réaction est

mise sous agitation magnétique et stoppée au bout de 48 heures par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, puis concentrées sous pression réduite. Le produit **244** (46,9 mg) est obtenu sous la forme d'une huile violette avec un rendement de 49 %, après purification sur colonne de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 1/1 V/V).

Formule brute : $C_{33}H_{30}N_2O_5S$

Masse moléculaire : $566,67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

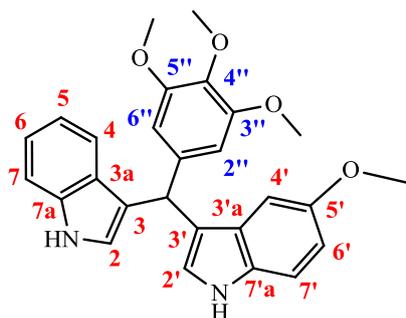
IR (film NaCl) : ν_{max} (cm^{-1}) 3412, 3358, 3058, 2992, 1592, 1505, 1448, 1421, 1370, 1234, 1175, 1127, 960 744.

RMN :

- ❖ ^1H (acétone- d_6) δ (ppm) **2,22** (s, 3H, $3'\text{CH}_3$) ; **3,66** (s, 6H, $3'',5''\text{OCH}_3$) ; **3,69** (s, 3H, $4''\text{OCH}_3$) ; **5,86** (sl, 1H, CH) ; **6,70** (s, 2H, $\text{H}_{2'',6''}$) ; **6,96** (dd, $J_{\text{H}5'-\text{H}6'} = 7,1 \text{ Hz}$ $J_{\text{H}5'-\text{H}4'} = 6,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}5'-\text{H}7'} = 1,25 \text{ Hz}$, 1H, H_5') ; **7,0** (td, $J_{\text{H}6'-\text{H}5'} = J_{\text{H}6'-\text{H}7'} = 7,1 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}4'-\text{H}6'} = 1,44 \text{ Hz}$, 1H, H_6') ; **7,10** (dd, $J_{\text{H}5-\text{H}6} = 8,3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}5-\text{H}4} = 7,9 \text{ Hz}$, 1H, H_5) ; **7,20** (m, 2H, $\text{H}_{7',4}$) ; **7,22** (d, $J_{\text{H}2-\text{CH}} = 1,0 \text{ Hz}$, 1H, H_2) ; **7,31** (tl, $J_{\text{H}6-\text{H}5} = J_{\text{H}6-\text{H}7} = 8,3 \text{ Hz}$, 1H, H_6) ; **7,46** (dd, $J_{\text{H}4'-\text{H}5'} = 6,8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}4'-\text{H}6'} = 1,44 \text{ Hz}$, 1H, H_4') ; **7,57** (m, 2H, $\text{H}_{3''',5''''}$) ; **7,68** (tl, $J_{\text{H}4''''-\text{H}5''''} = J_{\text{H}4''''-\text{H}3''''} = 7,44 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{4''''}$) ; **7,93** (dl, $J_{\text{H}2''''-\text{H}3''''} = 7,30$, 2H, $\text{H}_{2''',6''''}$) ; **7,99** (d, $J_{\text{H}7-\text{H}6} = 8,3 \text{ Hz}$, 1H, H_7) ; **9,86** (Signal échangeable par D_2O , 1H, NH_1).
- ❖ ^{13}C (acétone- d_6) δ (ppm) **7,9** ($3'\text{CH}_3$) ; **40,4** (CH) ; **55,5** ($3'',5''\text{OCH}_3$) ; **59,7** ($4''\text{OCH}_3$) ; **105,9** ($\text{C}_{2'',6''}$) ; **110,9** ($\text{C}_{3'}$) ; **113,6** (C_3) ; **118,05** (C_7) ; **118,6** ($\text{C}_{7'}$) ; **120,4** ($\text{C}_{2'}$) ; **120,9** (C_2) ; **123,4** (C_4) ; **124,9** (C_4) ; **125,2** ($\text{C}_{4''}$) ; **126,7** (C_5) ; **129,6** (C_{7a}) ; **130,4** (C_6) ; **134,3** ($\text{C}_{2''',6''''}$) ; **134,4** ($\text{C}_{3''',5''''}$) ; **135,5** (C_{3a}) ; **135,9** ($\text{C}_{4''''}$) ; **136,4** (C_{7a}) ; **137,8** ($\text{C}_{4''}$) ; **153,6** ($\text{C}_{3'',5''}$)

SM (ESI, ES+) : m/z 589 [$\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}+\text{Na}$] $^+$.

253 : 3-((5-méthoxy-1H-indol-2-yl)-(3,4,5-triméthoxyphenyl)méthyl)-1H-indole



Au produit **243** (36,3mg, 0,062 mmol), mis en solution dans un mélange MeOH/H₂O (4/1) additionné de quelques gouttes de THF, sont ajoutés 3 équivalents de KOH (10,5 mg, 0,187 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux. La réaction est stoppée au bout de 24 heures, par neutralisation à l'aide d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous pression réduite. Le produit **253** (25,5 mg) est obtenu pur, sans autre purification, sous la forme d'une huile rouge avec 98 % de rendement.

Formule brute : C₂₇H₂₆N₂O₄

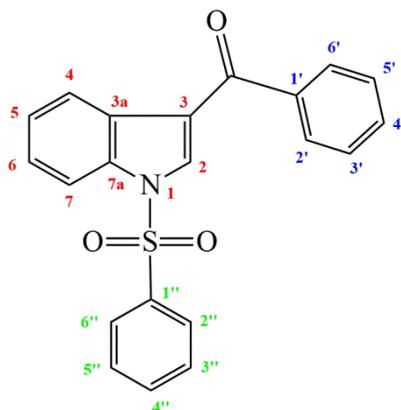
Masse moléculaire : 442,19 g.mol⁻¹

IR (film NaCl) : $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3412, 3358, 2992, 2927, 1591, 1505, 1447, 1420, 1370, 1235, 1124, 960, 739.

RMN :

- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **3,64** (s, 3H, ^{4'}OCH₃) ; **3,69** (s, 9H, ^{3',5'}OCH₃, ^{5'}OCH₃) ; **5,80** (sl, 1H, CH) ; **6,72** (dd, $J_{\text{H6}^{\prime}\text{-H7}^{\prime}} = 8,7$ Hz, $J_{\text{H6}^{\prime}\text{-H4}^{\prime}} = 2,1$ Hz, 1H, **H_{6'}**) ; **6,77** (s, 2H, **H_{2'',6''}**) ; **6,85** (sl, 1H, **H_{2'}**) ; **6,90** (m, 3H, **H_{2,7,4'}**) ; **7,05** (t, $J_{\text{H5}^{\prime}\text{-H6}^{\prime}} = J_{\text{H5}^{\prime}\text{-H4}^{\prime}} = 7,8$ Hz, 1H, **H_{5'}**) ; **7,27** (d, $J_{\text{H7}^{\prime}\text{-H6}^{\prime}} = 8,7$ Hz, 1H, **H_{7'}**) ; **7,37**(m, 2H, **H_{4,6}**) ; **9,0** (Signal échangeable par D₂O, 1H, **NH_{1'}**), **9,84** (Signal échangeable par D₂O, 1H, **NH₁**).
- ❖ ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) **30,2** (CH) ; **40,6** (^{3'',5''}OCH₃) ; **53,4** (^{5'}OCH₃) ; **55,9** (^{4''}OCH₃) ; **60,9** (**C_{2,2'}**) **101,9** (**C_{4'}**) ; **105,8** (**C_{2'',6''}**) ; **111,04** (**C_{6'}**) ; **111,9** (**C_{7,7'}**) ; **119,22** (**C_{3,3'}**) ; **121,9** (**C₄**) ; **123,58** (**C₅**) ; **124,4** (**C₆**) ; **127,5** (**C_{3a}**) ; **131,8** (**C_{3'a}**) ; **136,7** (**C_{7a}**) ; **139,8** (**C_{7'a}**) ; **152,9** (**C_{3'',5''}**) ; **153,7** (**C_{1''}**) ; **207,4** (**C_{5'}**).

SM (ESI, ES+) : m/z 465 [C₂₇H₂₆N₂O₄+Na]⁺.

126 : phényl(1-(phénylsulfonyl)-1*H*-indol-3-yl)méthanone ¹⁶⁷

La réaction est réalisée sous atmosphère inerte (azote ou argon). 258,5 mg (1,94 mmol) de chlorure d'aluminium sont dissouts dans 5 ml de dichlorométhane. Ensuite, 134,2 μ l de chlorure de benzoyle sont ajoutés à la solution. Après 15 min, 1,2 équivalent (250 mg, 0,97 mmol) de 1-(phénylsulfonyl)-1*H*-indole (**248**), préalablement dissout dans du dichlorométhane (3 mL), est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans le milieu réactionnel. La solution passe d'une coloration jaune à une coloration marron foncé. Après 2 h. d'agitation, le mélange est versé doucement sur de la glace pilée et la phase organique est extraite avec du dichlorométhane (3 x 10 ml) et lavée successivement avec des solutions aqueuses saturées d'hydrogencarbonate de sodium et de chlorure de sodium avant d'être séchée sur du sulfate de magnésium. La phase organique est concentrée sous vide et le résidu est purifié sur une colonne de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 4 : 1). Le composé **126** est recueilli avec un rendement de 80 %.

Formule brute : C₂₁H₁₅NO₃S

Masse moléculaire : 361,41 g.mol⁻¹

Point de fusion : 112,2 °C

IR : ν_{\max} (cm⁻¹) 3133 ; 3060 ; 2925 ; 2849 ; 1720 ; 1694 ; 1639 ; 1598 ; 1532 ; 1477 ; 1446 ; 1376 ; 1286 ; 1206 ; 1173 ; 1096 ; 973 ; 873 ; 748 ; 733 ; 710 ; 683 ; 665.

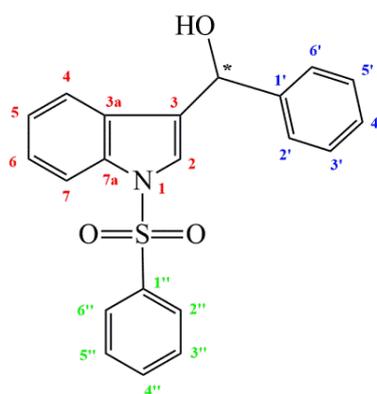
RMN :

- ❖ ¹H (CDCl₃) δ (ppm) **7,37-7,65** (m, 8H, **H**₅₋₆, **H**_{3'-4'-5'}, **H**_{3''-4''-5''}), **7,88** (d, $J = 7,87$, 2H, **H**_{2'-6'}), **7,93** (d, $J = 7,59$ Hz, 2H, **H**_{2''-6''}), **8,01** (d, $J = 7,53$ Hz, 1H, **H**₇), **8,06** (s, 1H, **H**₂), **8,32** (d, $J = 7,39$ Hz, 1H, **H**₄).

- ❖ ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 113,21 (C_7), 120,61 (C_3), 123,05 (C_5), 124,99 (C_4), 126,09 (C_6), 127,08 (C_2), 128,47 (C_{3a}), 128,56 ($\text{C}_{2''-6''}$), 128,72 ($\text{C}_{3'-5'}$), 129,67 ($\text{C}_{2'-6'}$), 132,47 ($\text{C}_{3''-5''}$), 133,52 (C_4'), 134,63 ($\text{C}_{4''}$), 135,06 ($\text{C}_{1'}$), 137,52 (C_{7a}), 139,15 ($\text{C}_{1''}$), 190,86 (CO).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 362,084771, m/z calculée 362,084541 $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}+\text{H}]^+$.

254 : phenyl(1-(phenylsulfonyl)-1H-indol-3-yl)methanol ¹⁶⁷



420 mg (1,16 mmol) de **126** sont solubilisés dans un mélange solvant méthanol/tétrahydrofurane (10 : 0,5). Ensuite, 2 équivalents (87,9 mg, 2,32 mmol) de NaBH_4 sont ajoutés par portions. Le mélange réactionnel est agité durant 45 min et évaporé. Le brut est solubilisé dans 20 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée successivement avec de l'eau (10 ml) et du NaCl aqueux saturée (2 x 10 ml), puis séchée sur du sulfate de magnésium. La phase est concentrée sous vide à basse pression. Le produit **254** est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/ AcOEt 7 : 3) avec un rendement de 68 %.

Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$

Masse moléculaire : $363,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : $93,3 \text{ }^\circ\text{C}$

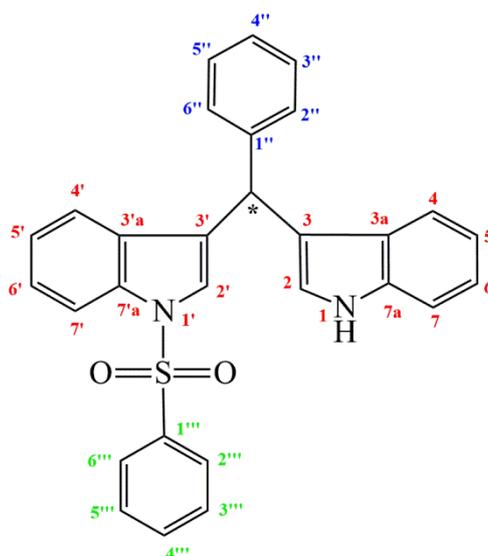
IR : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3030 ; 3063 ; 2925 ; 2849 ; 1732 ; 1604 ; 1585 ; 1563 ; 1446 ; 1366 ; 1275 ; 1173 ; 1117 ; 1096 ; 1020 ; 971 ; 743 ; 723 ; 683.

RMN :

- ❖ ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm) **5,92** (d, $J = 4,5$ Hz, 1H, *CH), **5,97** (d, $J = 4,5$ Hz, HO-C*), **7,14** (t, $J = 7,30$ Hz, 1H, **H₅**), **7,21** (t, $J = 7,30$ Hz, 1H, **H₆**), **7,28** (ts, $J = 12,2$ Hz et 4,5 Hz, 3H, **H_{3'-4'-5'}**), **7,41** (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, **H_{2'-6'}**), **7,44** (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, **H₇**), **7,59** (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, **H_{3''-5''}**), **7,64** (s, 1H, **H₂**), **7,69** (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, **H_{4''}**), **7,89** (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, **H₄**), **7,94** (d, $J = 4,5$ Hz, 2H, **H_{2''-6''}**).
- ❖ ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) **68,28** (C*), **113,44** (C₄), **121,23** (C₇), **123,21** (C₂), **1123,31** (C₅), **124,88** (C_{4'}), **126,51** (C_{2'-6'}), **126,70** (C₆), **127,16** (C_{2''-6''}), **127,66** (C_{3'-5'}), **128,85** (C_{3''-5''}), **134,68** (C_{4''}), **135,02** (C_{3-3a-7a}), **137,08** (C_{1''}), **143,84** (C_{1'}).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 386.082017, m/z calculée 386.082135 [C₂₁H₁₇NO₃S+Na]⁺.

241 : 3-((1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl) 1(phenylsulfonyl)-1H-indole



La réaction a été effectuée sous atmosphère inerte (argon ou azote gazeux). 250 mg (0,69 mmol) de **254** sont solubilisés dans 20 ml de dichlorométhane. 2,5 équivalents (232,2 μl) de triéthylamine (TEA) et 2,5 équivalents (133,2 μl) de chlorure de mésyle (MsCl) y sont ajoutés successivement. La solution de coloration jaune est agitée durant 15 min. 1 équivalent (80,58 mg, 0,69 mmol) d'indole, dissout dans du dichlorométhane (5 ml), est introduit goutte par goutte à l'aide d'une seringue. Le mélange réactionnel prend une coloration jaune foncée et est stoppée au bout de 2 heures par ajout de 15 ml de solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium (NH₄). Ensuite, une extraction est effectuée avec du dichlorométhane (3 x 15 ml). La phase organique est lavée successivement avec du NaHCO₃ aqueux saturé (20 ml) et du NaCl aqueux saturé (20 ml). Puis la phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium avant d'être concentrée sous vide à basse pression. Le brut est

purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 9 : 1) pour donner le produit **241** avec un rendement de 82 %.

Formule brute : C₂₉H₂₂N₂O₂S

Masse moléculaire : 462,56 g.mol⁻¹

Point de fusion : 63 °C

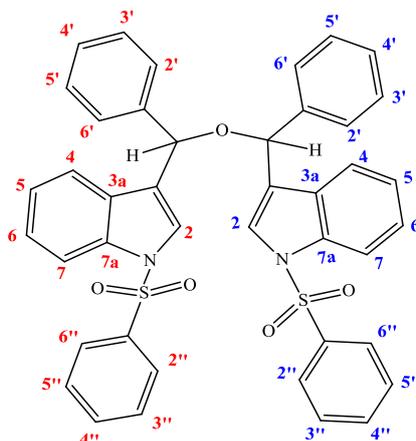
IR : ν_{\max} (cm⁻¹) 3419 ; 3059 ; 3027 ; 2924 ; 2849 ; 1601 ; 1584 ; 1493 ; 1446 ; 1363 ; 1172 ; 1116 ; 1093 ; 972 ; 791 ; 740 ; 723 ; 699 ; 863.

RMN :

- ❖ ¹H (actéone-*d*₆) δ (ppm) **5,87** (s, 1H, *CH), **6,75** (s, 1H, **H₂**), **6,96** (t, *J* = 7,72 Hz, 1H, **H₅**), **7,10-7,14** (m, 3H, **H_{2'}**, **H_{5'}** et **H_{6'}**), **7,21-7,38** (m, 8H, **H₄**, **H_{4'}**, **H_{6'}**, **H_{4''}**, **H_{5''}**, **H_{3''}**, **H_{2''}**, et **H_{6''}**), **7,43** (d, *J* = 8,22 Hz, 1H, **H₇**), **7,57** (t, *J* = 7,56 Hz, 2H, **H_{3'''-5'''}**), **7,65** (t, *J* = 7,23 Hz, 1H, **H_{4'''}**), **7,83** (d, *J* = 7,72 Hz, 2H, **H_{2'''}** et **H_{6'''}**), **8,01** (d, *J* = 8,71 Hz, 1H, **H_{7'}**), **10,12** (s, 1H, N **H₁**).
- ❖ ¹³C (acétone-*d*₆) δ (ppm) **39,78** (C*), **111,44** (C₇), **1113,67** (C_{7'}), **116,90** (C₃), **118,66** (C₅), **119,07** (C₄), **1120,56** (C_{4'}), **121,44** (C₆), **123,18** (C₂), **124,65** (C_{5'}), **125,00** (C_{2'}), **126,39** (C_{6'}), **126,58** (C_{1''}), **126,62** (C_{4''}), **127,23** (C_{3a}), **128,22** (C_{3'''-5'''}), **128,44** (C_{2'''-6'''}), **129,35** (C_{3'''-5'''}), **130,69** (C_{3'a}), **134,02** (C_{2'''}), **134,29** (C_{3'}), **135,79** (C_{7'a}), **136,97** (C_{4'''}), **137,12** (C_{7a}), **137,64** (C_{6'''}), **142,63** (C_{1'''}).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) *m/z* mesurée 485.129130, *m/z* calculée 485.129420 [C₂₉H₂₂N₂O₂S+Na]⁺.

255 : **3,3'-(oxybis(phenylméthylène))bis(1-(phénylsulfonyl)-1H-indole)**



La réaction a été réalisée sous atmosphère inerte (argon). 268 mg (0,739 mmol) de **254** sont solubilisés dans 15 ml de dichlorométhane, puis, 5 équivalents (285, 9 μ l) de chlorure de mésyle (MsCl) y sont ajoutés. La solution de coloration jaune claire devient rose après 12 h d'agitation. La réaction est arrêtée au bout de 24 h, en y ajoutant de NH_4Cl aqueux saturé. Une extraction est effectuée avec du dichlorométhane (3 x 15 ml). La phase organique est lavée avec du NaCl aqueux saturé et séchée sur du sulfate de magnésium avant d'être concentrée sous vide à basse pression. Le brut est purifié sur une colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 8 : 2) pour donner le produit **255** avec un rendement de 40 %.

Formule brute : $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$

Masse moléculaire : 708,84 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Point de fusion : 190 °C

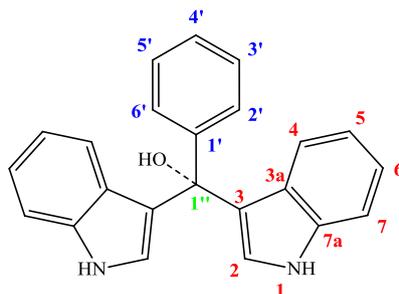
IR : $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3087 ; 3027 ; 2869 ; 1699 ; 1582 ; 1561 ; 1605 ; 1492 ; 1446 ; 1367 ; 1178 ; 1117 ; 1092 ; 1022 ; 968 ; 802 ; 749 ; 723 ; 699 ; 684.

RMN :

- ❖ ^1H (CDCl_3) δ (ppm) **5,53** (s, 2H, 2CH-O), **7,00/7,08** (td, $J = 7,7$ (0,9) / 7,6 (0,9) Hz, 2H, **H₅ / H₅**), **7,12 / 7,18** (d, $J = 7,0$ / 7,7 Hz, 2H, **H₄ / H₄**), **7,21-7,38** (m, 14H, **H₆ / H₆**, **H_{2'-6'} / H_{2'-6'}**), **7,41 / 7,53** (s, 2H, **H₂ / H₂**), **7,44-7,49** (m, 2H, **H_{5''} / H_{5''}**), **7,55-7,58** (t, $J = 2$ et 2,2 Hz, 2H, **H_{2''} / H_{2''}**), **7,82 / 7,87** (dt, $J = 8,6$ (1,7) Hz, 4H, **H_{2''} / H_{6''} // H_{2''} / H_{6''}**), **7,96** (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H₇ / H₇**).
- ❖ ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) **74,0/74,2** (2CH-O), **113,7/113,8** (**C₇ / C₇**), **120,8/120,9** (**C₄ / C₄**), **123,3** (**C₅ / C₅**), **123,7/124** (**C₃ / C₃**), **124,6/124,7** (**C₂ / C₂**), **124,8/124,9** (**C₆ / C₆**), **127,3/127,6** (**C_{2'} / C_{2'} // C_{6'} / C_{6'}**), **127,7/127,8** (**C_{2''} / C_{2''} // C_{6''} / C_{6''}**), **128,0/128,2** (**C_{4'} / C_{4'}**), **128,5/128,6** (**C_{3'} / C_{3'} // C_{5'} / C_{5'}**), **129,0/129,1** (**C_{3a} / C_{3a}**), **129,2/129,3** (**C_{3''} / C_{3''} // C_{5''} / C_{5''}**), **133,8/133,9** (**C_{4''} / C_{4''}**), **135,7/135,8** (**C_{7a} / C_{7a}**), **138,0/138,1** (**C_{1''} / C_{1''}**), **139, / 139,9** (**C_{1'} / C_{1'}**).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) m/z mesurée 731,1645 ; m/z calculée 731,1638 [$\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}+\text{Na}$]⁺.

256 : di(1*H*-indol-3-yl)(phényl)méthanol ²²⁰



100 mg (0,31 mmol) de **24** sont dissouts dans 6 ml d'acetonitrile. La DDQ (1,2 éq., 0,372 mmol, 84,44 mg), préalablement dissoute dans 14 ml d'acetonitrile, est ajoutée goutte à goutte dans la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à disparition du composé **24**, la réaction étant suivie par CCM (phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH 9/1 + AcOH, 1 %). La solution est concentrée sous vide et le résidu est récupéré et recristallisé à chaud (30 °C) dans l'éthanol 96 % (3 ml). La solution éthanolique est filtrée sur Büchner afin d'éliminer un précipité vert mordoré). Le résidu correspondant au composé **256**, est une poudre de coloration rouge (rendement 48 %).

Formule brute : C₂₃H₁₇N₂⁺ OH⁻

Masse moléculaire : 338,40 g.mol⁻¹

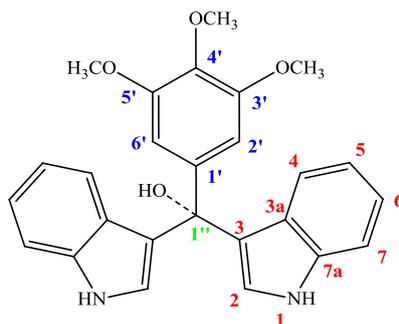
Point de fusion : 153 °C

IR (ATR) : ν_{\max} (cm⁻¹) 3521 ; 3107 ; 3057 ; 2933 ; 2887 ; 2211 ; 1562 ; 1477 ; 1392 ; 1327 ; 1229 ; 1190 ; 1105 ; 1050 ; 874 ; 787 ; 743.

RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **6,66** (d, *J* = 7,08 Hz, 2H, **H₇**), **7,09** (t, *J* = 7,93 Hz, 2H, **H₆**), **7,34** (t, *J* = 7,93 Hz, 2H, **H₅**), **7,62-7,69** (m, 4H, **H_{2'-6'}**, **H_{3'-5'}**, 2H, **H₄**), **7,83** (t, *J* = 7,08 Hz, 1H, **H_{4'}**), **8,53** (s, 2H, **H₂**), **13,95** (s, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O).
- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **114,49** (**C₄**), **121,05** (**C₇**), **121,54** (**C₃**), **124,21** (**C₆**), **125,80** (**C₅**), **126,70** (**C_{3a}**), **129,36** (**C_{2'-6'}**), **132,42** (**C_{3'-5'}**), **133,41** (**C_{4'}**), **137,86** (**C_{1'}**), **140,08** (**C_{7a}**), **147,77** (**C₂**), **170,25** (**C_{1''}**).

SM : (TOF MS / ESI+) : *m/z* 321 [C₂₃H₁₇N₂-OH]⁺, ou **MS (TOF/ESI-)** *m/z* 319 [C₂₃H₁₆N₂-H]⁻.

275 : di(1*H*-indol-3-yl)(3,4,5-triméthoxyphényl)méthanol²²⁰

100 mg (0,243 mmol) de **230** sont dissouts dans 6 ml d'acetonitrile. La DDQ (1,2 éq., 0,291 mmol, 66,11 mg), préalablement dissoute dans 14 ml d'acetonitrile, est ajoutée goutte à goutte dans la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à disparition du composé **230**, la réaction étant suivie par CCM (phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH 9/1 + AcOH, 1 %). La solution est concentrée sous vide et le résidu est récupéré et recristallisé à chaud (30 °C) dans l'éthanol 96 % (3 ml). La solution éthanolique est filtrée sur Büchner afin d'éliminer un précipité vert mordoré). Le résidu correspondant au composé **275**, est une poudre de coloration rouge (rendement 55 %).

Formule brute : C₂₆H₂₃N₂O₃⁺ OH⁻

Masse moléculaire : 428,47 g.mol⁻¹

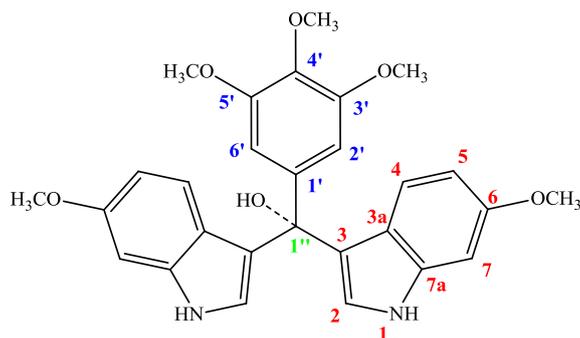
Point de fusion : 179 °C

IR (ATR) : $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3111 ; 2936 ; 2833 ; 2737 ; 2537 ; 2200 ; 1980 ; 1577 ; 1521 ; 1475 ; 1404 ; 1372 ; 1325 ; 1231 ; 1172 ; 1114 ; 996 ; 823 ; 753.

RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **3,69** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃), **3,88** (s, 3H, ^{4'}OCH₃), **6,84** (d, *J* = 7,79 Hz, 2H, **H₇**), **6,91** (s, 2H, **H_{2'-6'}**), **7,11** (t, *J* = 7,03 Hz, 2H, **H₅**), **7,32** (t, *J* = 7,03 Hz, 2H, **H₆**), **7,63** (d, *J* = 8,12 Hz, 2H, **H₄**), **8,37** (s, 2H, **H₂**), **12,8** (sl, 2H, **NH₁**, échangeable par D₂O).
- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **56,27** (^{3'-5'}OCH₃), **60,54** (^{4'}OCH₃), **111,09** (**C_{2'-6'}**), **115,04** (**C₄**), **121,24** (**C₇**), **121,95** (**C₃**), **123,45** (**C₆**), **125,25** (**C₅**), **127,05** (**C_{3a}**), **133,81** (**C_{1'}**), **141,56** (**C_{4'}**), **142,23** (**C_{7a}**), **147,26** (**C₂**), **152,91** (**C_{3'-5'}**), **162,0** (**C_{1''}**).

SM : (TOF MS / ESI+) : *m/z* 411 [C₂₆H₂₃N₂O₃-OH]⁺.

276 : bis(6-méthoxy-1H-indol-3-yl)(3,4,5-triméthoxyphenyl)méthanol ²²⁰

100 mg (0,211 mmol) de **231** sont dissouts dans 6 ml d'acétonitrile. La DDQ (1,2 éq., 0,254 mmol, 57,71 mg), préalablement dissoute dans 14 ml d'acétonitrile, est ajoutée goutte à goutte dans la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à disparition du composé **231**, la réaction étant suivie par CCM (phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH 9/1 + AcOH, 1 %). La solution est concentrée sous vide et le résidu est récupéré et recristallisé à chaud (30 °C) dans l'éthanol 96 % (3 ml). La solution éthanolique est filtrée sur Büchner afin d'éliminer un précipité vert mordoré). Le résidu correspondant au composé **276**, est une poudre de coloration rouge (rendement 45 %).

Formule brute : C₂₈H₂₇N₂O₅⁺ OH⁻

Masse moléculaire : 488,53 g.mol⁻¹

Point de fusion : 214 °C

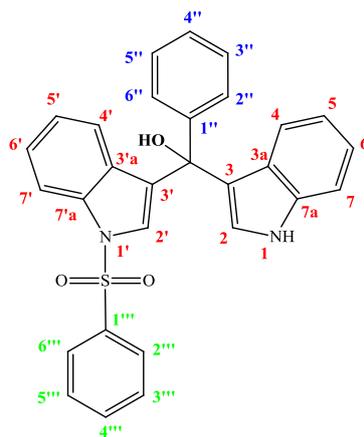
IR (ATR) : $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3093 ; 3000 ; 2940 ; 2835 ; 2214 ; 1629 ; 1556 ; 1524 ; 1492 ; 1479 ; 1436 ; 1396 ; 1238 ; 1197 ; 1150 ; 1123 ; 1094 ; 1049 ; 948 ; 885 ; 840 ; 798.

RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **3,71** (s, 3H, ^{4'}OC_{H3}), **3,85** (s, 6H, ^{3'-5'}OC_{H3}), **3,96** (s, 6H, ^{6'}OC_{H3}), **6,80** (d, *J* = 8,35 Hz, 4H, **H5**, **H4**), **6,98** (s, 2H, **H7**), **7,16** (s, 2H, **H2'-6'**), **8,42** (s, 2H, **H2**), **13,53** (s, 2H, **NH1**, échangeable par D₂O).
- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **55,66** (^{3'-5'}OCH₃), **56,35** (^{4'}OCH₃), **60,60** (^{6-6'}OCH₃), **97,58** (**C2'-6'**), **111,43** (**C7**), **112,96** (**C4**), **120,07** (**C3a**), **121,40** (**C7a**), **122,18** (**C5**), 141,13 (**C6**), **142,31** (**C1'**), 147,25 (**C2**), **152,85** (**C4'**), **158,08** (**C3'-5'**), **165,69** (**C1''**).

SM : (TOF MS / ESI+) : *m/z* 471 [C₂₈H₂₇N₂O₅-OH]⁺.

272 : (1H-indol-3-yl)(phényl)(1-(phénylsulfonyl)-1H-indol-3-yl)méthanol ²²⁰



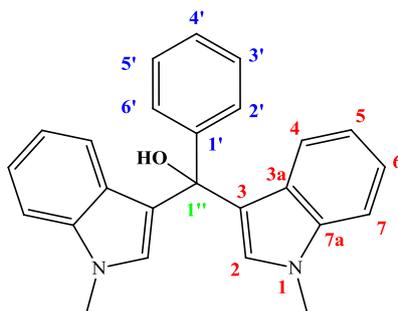
200 mg (0,433 mmol) de **241** sont dissouts dans 6 ml d'acetonitrile. La DDQ (1,2 éq., 0,372 mmol, 117,88 mg), préalablement dissoute dans 14 ml d'acetonitrile, est ajoutée goutte à goutte dans la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à disparation du composé **241**, la réaction étant suivie par CCM (phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH 9/1 + AcOH, 1 %). La solution est concentrée sous vide et le résidu, étant difficile à recristalliser dans l'éthanol 96 %, est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice phase normale (toluène/acétate d'éthyle 9 : 1 ou CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1) ou en phase inverse (en présence ou pas d'acide trifluoroacétique (TFA). Les rendements obtenus sont très faibles (entre 5 et 10 %) et le produit **272** (un mélange) apparaît sous forme de poudre jaune.

Formule brute : C₂₉H₂₂N₂O₃S

Masse moléculaire : 478,56 g.mol⁻¹

Remarque : Ces petites quantités obtenues ont permis de mettre en évidence l'existence en solution des trois formes possibles (carbinol **272a**, indolélium **272b** ou imine **272c**) de produit en fonction du solvant RMN et en présence ou non de TFA.

273 : bis(1-méthyl-1H-indol-3-yl)(phényl)méthanol ²²⁰



100 mg (0,286 mmol) de **30** sont dissouts dans 6 ml d'acetonitrile. La DDQ (1,2 éq., 0,342 mmol, 77,72 mg), préalablement dissoute dans 14 ml d'acetonitrile, est ajoutée goutte à goutte dans la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation jusqu'à disparition du composé **30**, la réaction étant suivie par CCM (phase mobile : CH₂Cl₂/MeOH 9/1 + AcOH, 1 %). La solution est concentrée sous vide et le résidu, étant difficile à recristalliser dans l'éthanol 96 %, repris dans 20 ml de CH₂Cl₂ ; la phase organique est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (3 x 10 ml), séchée sur du sulfate magnésium puis évaporé sous vide. Le brut est purifié sur colonne de gel d'alumine (cyclohexane/acétate d'éthyle 6 : 4) pour donner le produit sous forme de poudre jaune foncé avec un rendement 75 %.

Formule brute : C₂₅H₂₂N₂O

Masse moléculaire : 366,17 g.mol⁻¹

Point de fusion : 177 °C

IR (ATR) : $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3566 ; 3047 ; 2925 ; 2851 ; 2225 ; 2045 ; 1774 ; 1613 ; 1546 ; 1471 ; 1445 ; 1331 ; 1248 ; 1156 ; 1129 ; 1070 ; 1015 ; 965 ; 888 ; 739 ; 714 ; 699.

RMN :

- ❖ ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **3,68** (s, 6H, ¹NCH₃), **5,88** (s, 1H, ¹⁷O^H), **6,70** (s, 2H, **H₂**), 6,82 (t, *J* = 7,41 Hz, 2H, **H₅**), **7,06** (t, *J* = 7,79 Hz, 2H, **H₆**), **7,19** (t, *J* = 6,28 Hz, 1H, **H₄**), **7,25** (t, *J* = 8,29 Hz, 2H, **H₃₋₅**), **7,35** (2d, *J* = 9,79 ; 8,66 Hz, 4H, **H₂₋₆**, **H₇**), **7,46** (d, *J* = 7,91 Hz, 2H, **H₄**).
- ❖ ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) **32,19** (¹NCH₃), **74,11** (**C_{1'}**), **109,35** (**C₇**), **118,09** (**C₅**), **120,70** (**C₆**), **121,67** (**C₂₋₆**), **121,83** (**C₃**), **126,0** (**C₄**), **126,34** (**C_{3a}**), **126,69** (**C₄**), **127,11** (**C₃₋₅**), **128,0** (**C₂**), **137,22** (**C_{7a}**), **148,18** (**C_{1'}**).

SM : (HMRS, IPM / ESI+W) *m/z* mesurée 389,1648, *m/z* calculée 389,1630 [M+Na]⁺.

A-3- Analyse par CLHP des composés **24**, **230**, **231**, **256**, **275** et **276**

- Chaque composé a été solubilisé dans du méthanol pour avoir une concentration massique de 0,05 mg/ml et la longueur d'absorption a été préalablement déterminée par UV-visible ($\lambda = 292$ nm). L'expérience a été réalisée en gradient de volume avec le système CH₃CN (45-70)/H₂O à 20 °C. Les chromatogrammes obtenus (Fig. 180-181) ont permis de

déterminer la proportion en pourcentage de chaque composé et de sa fraction oxydée (Tab. 27).

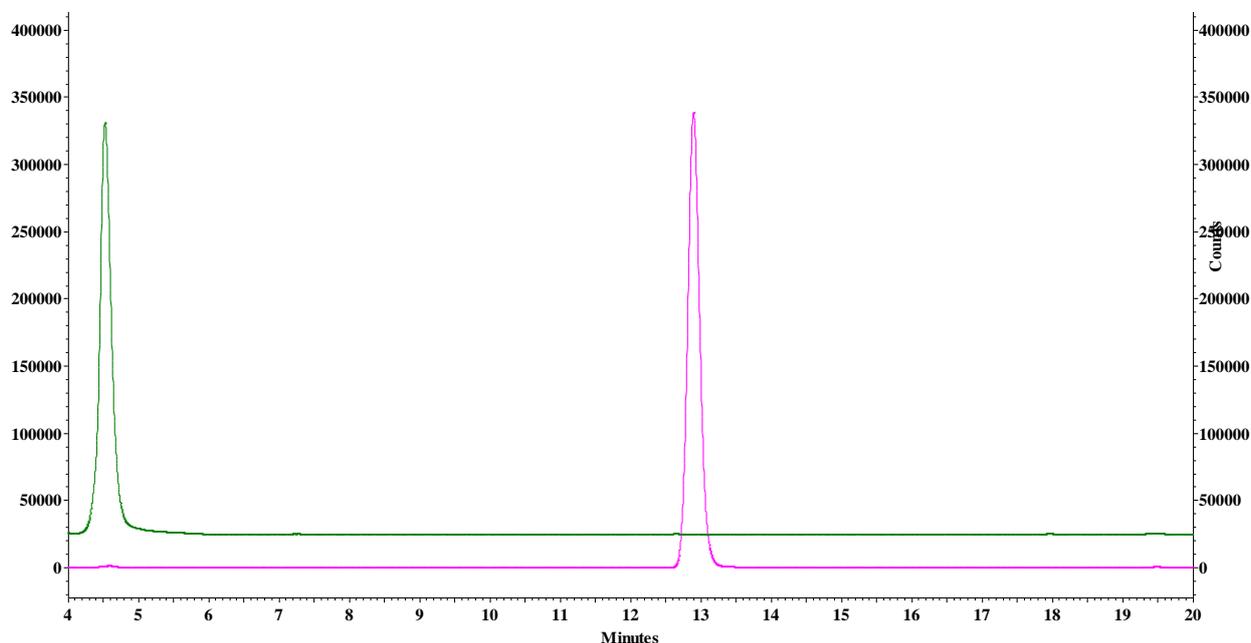


Figure 180 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé rose : PhéDIM 230 ($t_R = 12,9$ min), tracé vert foncé : PhéDIMOX 275 ($t_R = 4,6$ min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient CH₃CN/TFA 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), c = 0,05 mg/mL, $\lambda = 292$ nm, 20° C, 20 μ l).

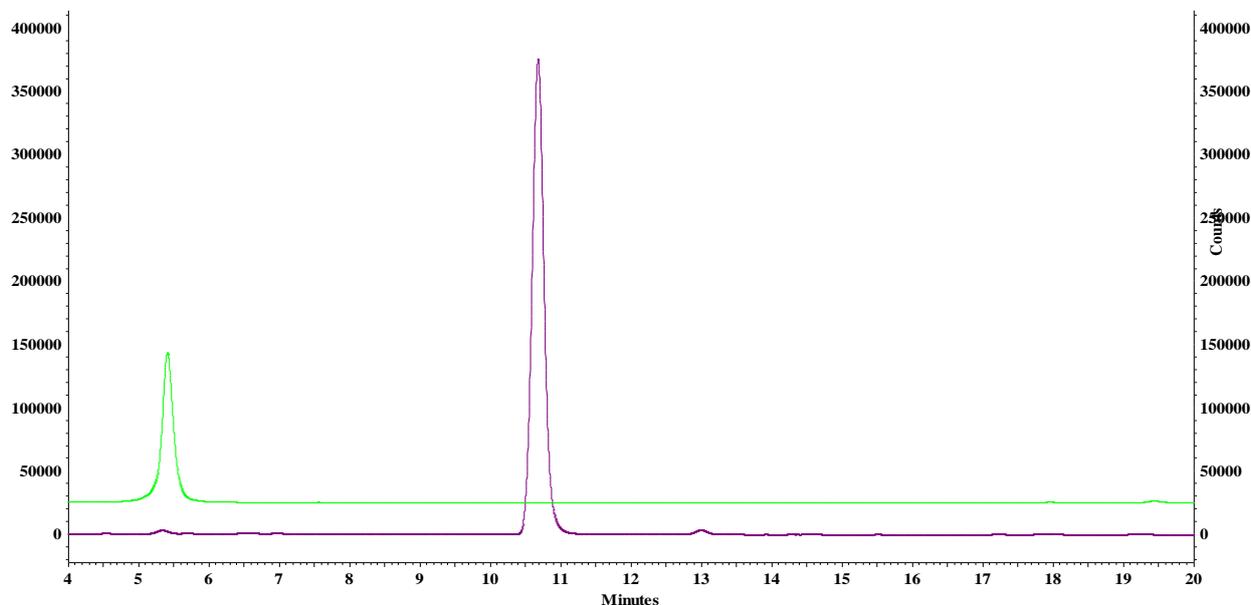


Figure 181 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé violet : PhéDIM 231 ($t_R = 10,6$ min), tracé vert clair : PhéDIMOX 276 ($t_R = 5,3$ min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient CH₃CN/TFA 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), c = 0,05 mg/mL, $\lambda = 292$ nm, 20° C, 20 μ l).

Tableau 27 : Estimation de la de fraction oxydée partiellement des composés 24, 230 et 231

Composé	Temps de rétention (min)	Surface d'intégration (%)	Total (%)
256	5,1	0,82	100
24	17,4	99,18	
275	4,593	0,22	100
230	12,9	99,78	
276	5,3	0,71	100
231	10,6	99,29	

- Nous avons tout de même envisagé de “répurifier” le composé **231** par CLHP préparative afin d’avoir un produit pur pour les tests biologiques. 15 mg du **206** ont été dissouts dans un mélange de solvant MeOH/H₂O et injectés dans la colonne en mode isocratique avec un débit de 30 secondes par tube. Le composé est obtenu à nouveau sous forme de poudre blanche qui prend une coloration rose c'est-à-dire qu’il s’oxyde spontanément à nouveau (95 % de rendement).

B- Partie biochimie

B-1- Matériel

❖ Souches bactériennes

Pour l'expression de la protéine recombinante d'intérêt, les souches bactériennes d'*Escherichia coli* (*E. coli*) utilisées sont :

- la souche Rosetta 2 (DE3) : F⁻, ompT, hsdS_B (r_B⁻m_B⁻), gal, dcm⁺, (DE3), pRARE2 (Cam^R),
- la souche BL21 (DE3) : E. coli B F⁻, ompT, hsdS(r. m-), gal, λ((DE3)).

❖ Plasmides et constructions

pET-21a(+), le plasmide utilisé, est un vecteur d'expression pourvu d'un gène de résistance à l'ampicilline, d'un tag histidine C-terminal facilitant la purification de la protéine d'intérêt, du gène lac 1 et d'un tag T7-terminal (Fig. 182). Ce tag T7 est le promoteur du gène inséré dans le plasmide codant pour une partie de NR4A1 contenant le domaine LBD (la séquence ADN insérée dans le plasmide est présentée, voir figure 1). Le tag T7 permettra d'induire son expression grâce à l'IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside). Ce plasmide a été obtenu par synthèse chimique (Genescript).

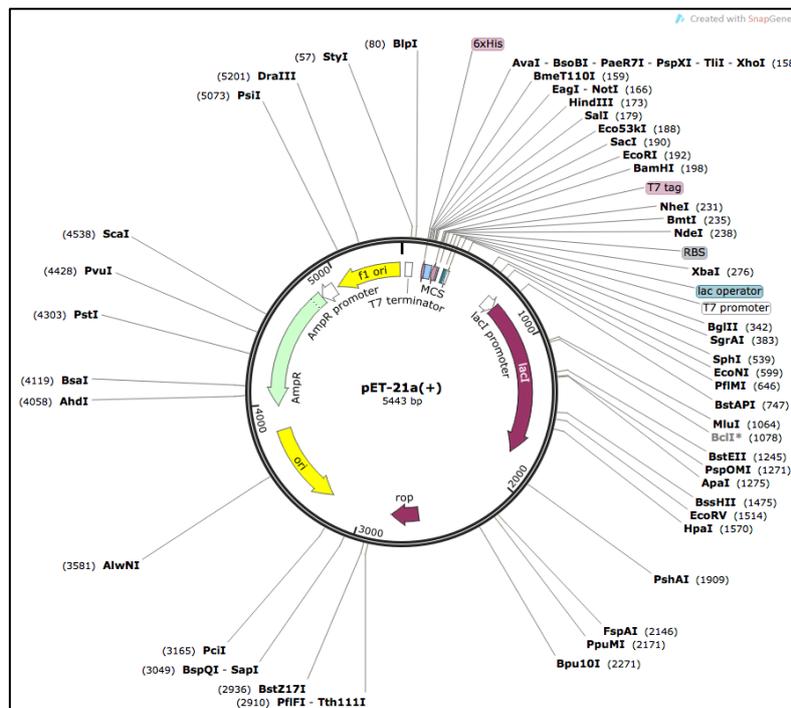


Figure 182 : Vecteur pET-21a(+) dans lequel a été insérée la séquence de NR4A1

B-2- Méthodes de production et de tests d'interaction de NR4A1

❖ Production de la protéine NR4A1

Préparation du milieu de culture

Dans une fiole Erlenmeyer de 3 L sont mis 20 g de LB (10 g de tryptone, 5 g d'extraits de levure, 10 g de NaCl). Puis, y est ajouté 1 L d'eau (15 Ω) pour dissoudre le LB. La solution de LB est ensuite mise à l'autoclave pour y être stérilisée.

Dans une fiole Erlenmeyer de 3 L sont mis 20 g de 2YT (16 g de tryptone, 10 d'extraits de levure, 5 g de NaCl). 1 L d'eau (15 Ω) y est introduit pour dissoudre la poudre de 2YT. La solution est déposée à l'autoclave par la suite.

Transformation bactérienne

Une aliquote de 100 µL de souches bactériennes Rosetta (DE3) chimio-compétentes est décongelé sur glace (4 °C). Puis, 2 µL de plasmide pET21a(+)-NR4a1 y est ajouté. Les souches bactériennes sont incubées avec le plasmide pendant 30 min à 4 °C. Elles sont ensuite soumises à un choc thermique dans un bain-marie à 42 °C durant 45 s, favorisant la fragilisation de la membrane bactérienne et l'intégration du plasmide dans les souches. Les bactéries sont incubées à nouveau pendant 2 mn à 4 °C. 1 ml de LB est ajouté dans le tube et ce dernier est mis à l'étuve à 37 °C durant 45 mn. 500 µl de la préparation sont alors étalés dans une boîte de Pétri LB-Agar contenant les antibiotiques appropriés tels que l'ampicilline (100 µg/ml) pour le plasmide, le chloramphénicol (100µg/ml) et l'ampicilline (100 µg/ml) pour la souche Rosetta (DE3). La boîte est placée à l'étuve à 37 °C. L'apparition de clones est observée et la boîte est placée à 4 °C.

Ce procédé a été utilisé aussi pour la transformation des souches BL21 (DE3) chimio-compétentes avec ajout d'ampicilline (100 µg/ml).

Tests d'expression de la protéine d'intérêt

À partir de bactéries transformées (Rosetta (DE3) et BL21 (DE3)) selon les méthodes décrites ci-dessus et incubées sous agitation à 37 °C, la protéine (NR4A1) est produite. Pour déterminer les meilleures conditions d'expression de cette protéine, un test d'expression est effectué.

Le tube contenant la lignée Rosetta2 (DE3) transformée par le vecteur est reparti dans 12 tubes de 50 ml. Six tubes, contenant 10 ml de LB sont numérotés de 1 à 6, et six tubes contenant 10 ml de 2YT sont numérotés de 1 à 6.

Le contenu du tube de la lignée BL21 (DE3) est aussi reparti dans 12 tubes de 50 ml. Six tubes, contenant 10 ml de LB sont numérotés de 7 à 12, et six tubes contenant 10 ml de 2YT sont numérotés de 1 à 6.

Les 12 tubes sont alors incubés à 37 °C. Toutes les 20 min, les DO (de longueur d'onde 600 nm) des tubes 1 en LB et en 2YT sont mesurées (en supposant qu'elles sont identiques dans les tubes 2, 3, 4, 5 et 6 en LB et 2YT) ; les DO des tubes 7 sont aussi mesurées jusqu'à ce qu'elles soient comprises entre 0,4 et 0,6.

De l'IPTG (0,5 M) est alors ajouté dans chacun des tubes à une concentration de 0,25 mol/L dans les tubes 1, 5, 7, 9 et 11 en LB et en 2YT et à une concentration de 0,5 mol/L dans les tubes 2, 4, 6, 8 et 12 en LB et 2YT. Les tubes sont, ensuite, incubés durant 4 h aux températures indiquées dans le tableau ci-contre (Tab. 28).

Tableau 28 : Différentes conditions d'expression de NR4A1 à différentes températures dans les souches Rosetta (DE3) et BL21 (DE3)

Température d'incubation (°C)	18	18	28	28	37	37
IPTG (M)	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Numéro de tube (Rosetta (DE3))	1	2	3	4	5	6
Numéro de tube (BL21 (DE3))	7	8	9	10	11	12

L'expression de la protéine est analysée par gel SDS-PAGE en comparant le contenu protéique de deux échantillons : l'un prélevé avant l'induction et le second à la fin de l'expression et dont les volumes ont été normalisés en fonction de leurs absorbances.

Expression de la protéine d'intérêt

Pour produire la protéine NR4A1 codée par le gène présent dans le plasmide intégré aux souches bactériennes *E. coli* BL21 (DE3), une préculture est préparée dans un tube de 50 ml contenant 10 ml de milieu de culture LB auxquels sont ajoutés 10 µl d'ampicilline. Ce tube estensemencé avec une lignée *E. coli* BL21 (DE3) déjà transformée. La préculture est ensuite incubée sous agitation à 37 °C dans un appareil Infors toute la nuit. La DO de la préculture est mesurée et doit d'être proche de 2. Le milieu de préculture est versé dans un erlenmeyer de 3 L contenant 1 L de LB pour ensemencer un milieu de culture 100 fois le volume de la préculture. On se place à une DO du milieu d'environ 0,1, (valeur appropriée pour amorcer l'ensemencement) avant d'y ajouter 1 ml d'ampicilline (et 1 ml de chloramphénicol si c'est la souche Rosetta (DE3)). L'erlenmeyer est mise sous agitation à 37 °C dans un appareil Infors. La DO est mesurée jusqu'à ce qu'elle soit comprise entre 0,6 et 0,8. L'expression de la protéine NR4A1 est induite par l'ajout de 1 ml d'IPTG (1M)

dans la culture qui est remise sous agitation à 28 °C. Après 3 h d'expression, la culture est centrifugée à 7000 rpm, à 18 °C durant 30 min. Le surnageant est éliminé et le sédiment bactérien est re-suspendu dans 25 ml de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH8, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazole) puis transféré dans un tube de 50 ml et congelé à - 80 °C.

❖ **Purification de la protéine NR4A1**

Lyse des bactéries

Pour purifier la protéine NR4A1, il faut lyser les bactéries dans lesquelles elle a été surexprimée. Le tube contenant le culot bactérien, préparé selon le protocole décrit ci-dessus ("expression de la protéine d'intérêt"), est décongelé à température ambiante et mis dans de la glace (4 °C). Il est ensuite soniqué 6 fois 1 min avec 1 min de repos entre chaque sonication. Celle-ci est effectuée par sonoplus (bandelin) à 50 Watts avec des pulsations 1s/1s et 50% d'amplitude à 37 °C.

Le lysat est mis dans des tubes JA-20 et centrifugé à 20 000 rpm pendant 30 min à 4°C pour séparer la fraction soluble contenant la protéine de la fraction insoluble contenant les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré dans un tube de 50 ml dans lequel on y prélève 20 µL placés dans un eppendorf pour analyse sur gel (S). La protéine d'intérêt contenue dans le tube, maintenu dans la glace, sera purifiée par la suite.

Chromatographie d'affinité

La protéine NRA4A1 est exprimée en fusion avec une séquence de 6 résidus d'histidine (His-LBD de NR4A1) qui est utilisée comme étiquette de purification. Une colonne de chromatographie d'affinité de type IMAC est constituée en chargeant 6 ml de résine Ni-NTA (Qiagen) sur un support de type Biorad "Econo-lac chromatography column". La résine est rincée avec 3 volumes de colonne d'eau (environ 20 ml) pour diluer le tampon de conservation. Puis, elle est équilibrée avec 12 ml de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, pH8, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazole). La fraction soluble est chargée ensuite sur la colonne. La protéine His-NR4A1 se fixe au nickel, et la partie non fixée sur la colonne est récupérée dans un tube de 50 ml dont 20 µL sont prélevés pour analyse sur gel (NF). La colonne est alors lavée deux fois successives avec 15 ml de tampon de lavage (20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl et 40 mM Imidazole) (L1, L2). Puis, on effectue 4 éluions successives avec 5 ml de tampon d'éluion (20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl et 500 mM Imidazole). La colonne est rincée à l'eau et la résine de Ni-NTA est conservée dans une solution aqueuse d'éthanol 20 %. Toutes les fractions, de lavage et d'éluion, sont collectées et analysées sur gel SDS-PAGE 12,5 % par électrophorèse. Les fractions récupérées sont appelées respectivement S, NF, L1, L2, E1, E2, E3 et E4. Cette électrophorèse permet de vérifier que 90% de la protéine se trouve bien dans les fractions d'éluion qui serviront pour la suite de la purification. Les

échantillons sont préparés par ajout de 10 μL de bleu de protéine (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, β -mercaptoéthanol 14,4 mM, bleu de bromophénol 0,1%, glycérol 25% et SDS 2%) dans 20 μL de fraction, puis chauffés à 95°C pendant 5 min et centrifugés (Himac CT15E, VWR) pour dénaturer la protéine. 10 μL de chaque fraction sont déposés dans les puits du gel. On fait migrer à 220V constant pendant 35 minutes.

Chromatographie d'exclusion

La colonne utilisée est une Superdex 200 16-60 (GE Healthcare HiLoad préparatif grade) connectée à un appareil de chromatographie (Akta purifier, GE Healthcare). Le tampon de gel filtration, GF (Tris-HCl pH 8 20 mM, NaCl 200 mM et DTT 1mM), filtré et dégazé, est utilisé pour équilibrer la colonne (150 ml à 0,8 ml/min). On injecte 5 ml de nos fractions d'élution (concentrées en centripep si nécessaire) contenant la protéine d'intérêt et on collecte des fractions de 1 ml à partir de 30 minutes. Le chromatogramme de l'absorbance à 280 nm étant mesuré à la sortie de la colonne, on analyse sur gel SDS-PAGE 12,5% les fractions correspondant à des pics d'absorbance. Les fractions contenant notre protéine d'intérêt sont concentrées (centripep de seuil d'exclusion 10 kDa) par la suite. Les protéines seront alors conservées à 4 °C pour des études d'interaction et cristallisation.

Concentration de la protéine d'intérêt

L'échantillon est placé dans un centricon Milipore Amicon de 15 ml et de filtre 10kDa et centrifugé à 4°C à une vitesse de rotation de 1455g pendant 5 min. Son absorbance est mesurée à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop et sa concentration est calculée selon la loi de Beer-Lambert : $C = DO/(\epsilon l)$ où ϵ est le coefficient d'absorption molaire ($16960 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et la largeur de la cuve (0.5 ou 1cm). Si la concentration dépasse légèrement celle espérée on peut diluer de nouveau l'échantillon avec le même tampon de GF utilisé pour la chromatographie d'exclusion. Le seuil de concentration 15 mg/ml est respecté éviter d'agréger la protéine. Des échantillons de différentes concentrations peuvent ainsi être obtenus (au cours de ces travaux, on se servira des concentrations de 3 mg/ml, 5 mg/ml, 7mg/ml ou 15 mg/ml).

❖ Tests de quenching de fluorescence

Les tests de quenching de fluorescence ont été réalisés avec la protéine His-LBD et 13 PhéDIMs synthétisés au laboratoire. La méthode utilisée est inspirée de celle décrite par l'équipe Q. Wu⁹⁶⁻⁹⁹ :

Préparation de la solution de PhéDIM

Soit $C = 5 \mu\text{M}$, la concentration de la protéine.

Il s'agit de saturer progressivement la protéine His-LBD par ajout d'un volume donné de PhéDIM. La concentration initiale de PhéDIM est déterminée par $C_1 = 10C = 50.10^{-6}$ M. La masse m_1 de PhéDIM à peser est calculée par $m_1 = C_1 \times M_1$ (en mg) où M_1 est la masse molaire du composé.

Le PhéDIM est dissout dans du DMSO (5 % du volume) puis complété goutte à goutte avec de l'eau 18 Ω pour éviter que le composé précipite. On numérote cette solution S1. Pour prendre en compte l'effet du solvant, une solution aqueuse sans composé est préparée avec 5 % DMSO sera numérotée S2.

Tests de fluorescence

Deux essais de fluorescence ont été réalisés parallèlement dans deux cuves en quartz numérotés de 1 à 2, contenant chacune 500 μ l de l'apoenzyme His-LBD à la concentration $C = 5$ μ M. À l'aide d'un spectrofluoromètre (SAFAS Xenius) thermostaté à 20 °C, les deux cuves sont soumises à une excitation de longueur d'onde 297 nm. La protéine émet dans chaque cas un spectre d'émission dont la bande présente un maximum d'intensité de fluorescence à 335 nm. Les paramètres de l'appareil SAFAS sont au préalable réglés sur :

- Spectre de luminescence,
- Photomultiplicateur, en fonction de l'intensité maximale du spectre de fluorescence, il est fixé entre 440 et 570 volts,
- Excitation 297 nm
- Emission entre 300 et 360 nm
- Bande passante 10 nm

Les cuves 1 et 2 sont incubées respectivement avec une quantité de S1 et S2 et soumises à nouveau à une excitation $\lambda = 297$ nm. Après chaque incubation suivie d'une excitation à 297 nm, une baisse progressive d'intensité de fluorescence est observée mais elle est plus accentuée pour S1 par rapport à S2. Les expériences ont été reproduites trois fois de suite pour tous les PhéDIMs testés et les valeurs des intensités de fluorescence des trois expériences sont moyennées et normalisées à l'intensité. La constante de dissociation K_d est déterminée avec ces dernières valeurs à partir du programme gnuplot.

❖ Expériences de docking

Les composés utilisés pour le docking sont d'une part la Cns-B et ses analogues TMPA, THPN et PDNPA dont la structure cristallographique du complexe avec NR4A1 est déjà connue (excepté Csn-B), et d'autre part les PhéDIMs utilisés lors des expériences de quenching de fluorescence.

Pour mener à bien les expériences de docking, il a été nécessaire de procéder comme suit :

Préparation des fichiers « ligands » en format Mol2

Le fichier de chaque structure des analogues de Csn-B cités ci-dessus a été directement téléchargé en format pdb à partir de leur code PDB depuis le site RCSB (www.rcsb.org/). Il est ré-ouvert dans l'application PyMOL et la séquence de la protéine est supprimée pour ne retenir que celle du ligand. Les atomes d'hydrogènes sont ajoutés au ligand et le fichier est enregistré en format pdb. Il est ré-ouvert avec l'application Chimera pour être enregistré sous format mol2.

Les autres molécules, Csn-B y compris, sont dessinées grâce à application Online SMILES Translator du site web CADD Group Chemoinformatics Tools and User Services (www.cactus.nci.nih.gov) de National Cancer Institute (NCI). Les molécules une fois dessinées sont enregistrées en image 3D sous format pdb. Leur fichier est de nouveau ouvert avec Chimera et sauvegardé en format mol2.

Préparation de la structure LBD de NR4A1

Nous avons choisi de d'effectuer les expériences de docking avec la structure cristallographique connue du domaine LBD dont le code PDB 2QW4 permet de télécharger directement le fichier de la structure depuis l'interface web de SwissDock.

Préparation du docking

Le webser SwissDock dédié au programme EADock a été utilisé pour effectuer nos différents docking. La procédure décrite antérieurement (Chap. 3, § II.B.2) a été appliquée à cet effet. Il est à noter que la structure de LBD présente un tétramère (A, B, C et D). Seule la chaîne B était téléchargeable lors du docking. Les résultats du docking sont téléchargés depuis le site SwissDock puis traités avec Chimera afin de déterminer le mode de fixation et les types d'interaction.

❖ Cristallogenèse

Notons que tous les tests de cristallogenèse on été effectués avec des composés dont la concentration est fixé à 1 : 5 ou 1 : 10 par rapport à celle de la protéine d'intérêt.

Criblage robotisé

Des boîtes de 96 puits de 3 cupules (Greiner) sont préparées selon la méthode de la goutte assise (Fig. 183a) Les puits de ces boîtes sont remplis avec 100 µl de solution de Crystal Screen 1&2 Hampton ou de Index 1&2 Hampton. Ces solutions sont des solutions commercialisées sous forme de kit (Fig. 183b) et contiennent des conditions de cristallisation standard. À l'aide du robot de cristallisation Cybio® (Fig. 184), deux boîtes B1a et B1b respectivement de Crystal Screen (1&2 Hampton) et d'Index (1&2 Hampton) ont été préparées avec trois gouttes dont une dans chaque

cupule : la première goutte avec 0,9 μ l de protéine de concentration $C = 5,7$ mg/ml, la seconde avec 0,9 μ l de protéine de concentration $C/2$ et la troisième avec 0,9 μ l de protéine de concentration C et 0,9 μ l de PhéDIM. Deux autres boîtes B2a et B2b ont été préparées avec le même mode opératoire en substituant le PhéDIM par Csn-B. Les quatre boîtes sont laissées à la température de 18 °C.

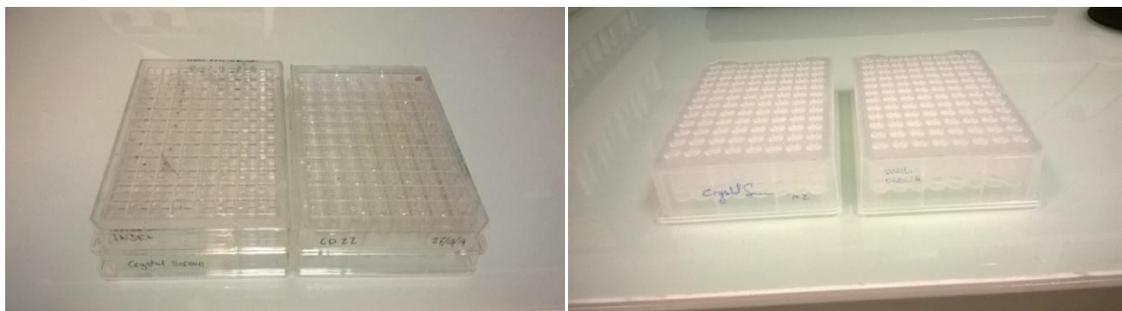


Figure 183 : a) Boîtes utilisées pour le criblage robotisé, b) Kits contenant les solutions Crystal Screen et Index



Figure 184 : Robot Cybi-disk Cybio® destiné au criblage automatisé

Optimisation manuelle des conditions de cristallisation

Les boîtes de cristallogenèse, dans ce cas, sont préparées à la main suivant la méthode de la goutte suspendue afin que les cristaux ne collent pas à la surface de la lamelle. Ces boîtes comportent 24 puits (ou réservoirs). Dans chaque puits est introduit 1 ml de solution pouvant contenir une quantité variable d'agent précipitant, de tampon, d'additifs etc. Le bord du puits est recouvert de graisse de silicone. Sur une lamelle de 22 mm de diamètre sont déposées deux gouttes de 1 μ l de protéine de concentration connue. À l'une des deux gouttes est ajouté 1 μ l de PhéDIM, et chaque goutte reçoit 1 μ l de solution du puits. La lamelle est ensuite retournée et déposée au dessus du puits et scellée par simple pression grâce à la graisse de silicone qui forme alors un joint autour du puits. Cette opération est reproduite pour tous les puits de la boîte qui sera ensuite conservée à 18 °C (Fig. 185).



Figure 185 : Boîtes de cristallogénèse d'optimisation

❖ Suppléments

Préparation de gels SDS-PAGE 12,5 %

Les gels d'épaisseur 0,75 mm ont été obtenus à l'aide d'un système spécifique conçu par Biorad (Miniproteam 3 system) et sont composés de deux parties : un gel de séparation (le résolutif) surmonté par un gel de concentration (le stacking). Les conditions de préparation des deux gels sont présentées ci-dessous (Tab. 29).

Tableau 29 : Composition des gels constituant le gel SDS-PAGE 12,5 %

	Résolutif	Stacking
H ₂ O (15 Ω)	13,2 ml	12 ml
Tris-HCl, pH 8,8 (1,5 M)	8 ml	---
Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)	---	1,54 ml
Acrylamide 19 : 1 (40 %)	10 ml	2 ml
SDS 10 %	320 µl	160 µl
TMED 25 %	80 µl	40 µl
APS 25 %	80 µl	40 µl

Listes des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Brocoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	10
Figure 2 : Mécanisme de régulation de l'apoptose : voie intrinsèque et voie extrinsèque (Fauquenot and Belhassen, 2010)	15
Figure 3 : Classification des différents membres de la famille Bcl-2 (Chao and Korsmeyer, 1998)	16
Figure 4 : Régulation de l'apoptose par clivage de <i>Bcl-2</i>	17
Figure 5 : La structure des protéines de la famille de Bcl-2 et la sélectivité de leurs interactions (Czabotar et al., 2013).....	18
Figure 6 : Schéma de la conversion de <i>Bcl-2</i> par NR4A1. La conformation anti-apoptotique de <i>Bcl-2</i> est maintenue par la formation de liaison de BH3 avec la poche hydrophobique impliquant la région C-terminal. L'interaction de NR4A1 avec la boucle engendre un réarrangement conduisant à l'exposition du domaine BH3.(Zhang, 2007)	19
Figure 7 : a) Les IAPs et leur cibles enzymatiques correspondantes, b) Les IAPs possèdent tous au moins un domaine BIR et certains le domaine RING(Bertrand, 2008).....	20
Figure 8 : <i>Gossypium herbaceum</i> (MALVACEAE) (Document disponible en ligne).....	21
Figure 9 : Structure protéique des récepteurs nucléaires (NRs) : en haut - schématique 1D de séquences d'acides aminés d'un récepteur nucléaire ; en bas – structures 3D des domaines DBD (lié à l'ADN) et LBD (lié au ligand) du récepteur nucléaire des œstrogènes (ER). Le domaines N-terminal (A/B), la région charnière (D) et le domaine C-terminal sont représentés respectivement par les lignes discontinues rouges, violet et orange.....	27
Figure 10 : Image du gène NR4A1/TR3, gène codant pour un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiques	28
Figure 11 : Image de doigt de zinc Cys2His2 : l'ion zinc en vert, complexé à deux histidines (en bas) et deux cystéines (en haut)	29
Figure 12 : Image 3D de la structure cristallographique du domaine LBD de NR4A1 comportant 12 hélices (code PDB 2QW4).....	29
Figure 13 : Différentes voies de régulation de gènes par NR4A1 au sein de cellules cancéreuses du côlon(Safe et al., 2016)	31
Figure 14 : Formule générale des PhédIMs para-substitués.	34
Figure 15 : Induction de l'apoptose par combinaison du docétaxel avec les C-DIM : 25 (= C-DIM 5), 26 (= C-DIM 8) sur cellules A549 (adénocarcinome humain de cellules épithéliales) (Andey et al., 2013)	35

Figure 16 : Panel de PhédIMs, possédant des groupements méthoxyle ou trifluorométhyle sur le groupement phényle et/ou un groupement méthyle sur les indoles, étudié en RSA sur les lignées cellulaires Panc-28	37
Figure 17 : Série de PhédIMs, possédant des groupements bromo ou fluoro sur le groupement phényle et/ou un groupement méthyle sur les indoles, étudiée en RSA sur les lignées cellulaires Panc-1 et Panc-28.....	38
Figure 18 : Série de composés potentiellement anticancéreux, constitués d'une molécule PhédIM et d'une molécule PBD, liées par une chaîne alkyle de n carbones (n = 2 ; 3 ; 4).....	39
Figure 19 : Synthèse du 1,1-di(3'-méthyl-2'-indolyl)-1-phénylméthane(Fischer, 1886).....	42
Figure 20 : Synthèse du 1,1-di(2'-méthyl-3'-indolyl)-1-phénylméthane (Fischer, 1887).....	42
Figure 21 : Formule numérotée de l'indole	42
Figure 22 : Mécanisme de formation du 3,3'-diindolylméthane ou DIM(Dahlbom et al., 1955)	43
Figure 23 : Synthèse du DIM à partir de la 3,3'-diindolylméthanone(Kamal and Ali Qureshi, 1963)	43
Figure 24 : Formule générale des dérivés du 1,1-di(3'-indolyl)-1-phénylméthane (PhédIMs) étudiés	44
Figure 25 : Formule générale des PhédIMs symétriques ou non symétriques, racémiques et asymétriques.....	44
Figure 26 : Bilan général de la réaction de formation des PhédIMs à partir de carbonyles	50
Figure 27 : Mécanisme général de la formation de PhédIMs en présence de proton H ⁺ (Rani et al., 2012)	50
Figure 28 : Mécanisme de formation de PhédIMs à partir de carbonyle et en présence d'un acide de Lewis (Mishra and Ghosh, 2011).....	54
Figure 29 : Synthèse de PhédIMs à partir de benzylamines	60
Figure 30: Mécanisme réactionnel proposé pour le couplage oxydatif de l'indole avec la benzylamine(Gopalaiah et al., 2015)	61
Figure 31 : Réaction d'addition nucléophile sur un dérivé d'acide de Meldrum	62
Figure 32 : Synthèse de PhédIMs en deux étapes à partir de dérivés d'acide de Meldrum(Armstrong et al., 2013)	62
Figure 33 : Mécanisme hypothétique de la formation de PhédIMs par addition d'un nucléophile sur un dérivé indolique d'acide de Meldrum en présence d'un acide de Lewis(Armstrong et al., 2013).....	63
Figure 34 : Synthèse du 7-chloroindole selon la méthode de Bartoli(Bartoli et al., 2014).....	63
Figure 35 : Obtention d'un DIM au cours du traitement de la réaction de Bartoli par HCl ou KHSO ₄ (Abe et al., 2013).....	64

Figure 36 : Développement d'une réaction monotope pour l'accès à des PhéDIMs à partir de la réaction de synthèse des indoles de Bartoli(Abe et al., 2013)	64
Figure 37 : Addition régiodivergente de N-méthylindole sur des alcynes terminaux, en présence de Re(CO)5Br(Xia et al., 2012).....	65
Figure 38 ; Mécanisme proposé pour l'addition régiodivergente de N-méthylindole sur des alcynes terminaux, en présence de Re(CO)5Br (Xia et al., 2012)	66
Figure 39 : Synthèse de 3,3'-diindolyléthanes sulfonylés par double addition de Michael d'indoles sur une sulfone acétylénique, en présence de Cu(OTf)2(Xie et al., 2010)	67
Figure 40 : Mécanisme proposé pour la formation de 3,3'-diindolyléthanes sulfonylés par double addition de Michael d'indoles sur une sulfone acétylénique, catalysée par Cu(OTf)2(Xie et al., 2010)	67
Figure 41 : Formule générale des PhéDIMs non symétriques	68
Figure 42 : Réactions d'acylation d'indoles en position 3, dans les conditions de Friedel et Crafts (Guchhait et al., 2011; Ketcha and Gribble, 1985)	70
Figure 43 : Exemple de réduction de phényl-3-indolylméthanones par NaBH4 (Dupeyre et al., 2006; Le Borgne et al., 1999)	71
Figure 44 : Réaction de l'iodure d'indolylmagnésium sur le chlorure de benzoyle (Dupeyre et al., 2006; Le Borgne et al., 1999)	71
Figure 45 :Couplage d'un dérivé organométallique d'indole avec un halogénure d'acide, en présence d'AlCl3 (Liou et al., 2004; Ty et al., 2008)	72
Figure 46 : Synthèse de la phényl-3-(N-phénylsulfonyl)indolylméthanone à partir du 3-iodo-N-phénylsulfonyl-1H-indole (Saulnier and Gribble, 1982).	72
Figure 47 : Ensemble des phénylméthanones préparées par réaction de couplage décarboxylatif d'indoles avec un acide α -oxocarboxylique, en présence d'acétate de cuivre (II) et d'Ag2CO3(Wang et al., 2014a).....	73
Figure 48 : Mécanisme supposé du couplage décarboxylatif d'indoles avec un acide α -oxocarboxylique en présence d'acétate de cuivre (II) et d'Ag2CO3(Wang et al., 2014a).....	74
Figure 49 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanol à partir d'indole-3-carboxaldéhyde.(Chen et al., 2014; Comins and Stroud, 1986; Gribble et al., 1999; Zhang et al., 2014)	74
Figure 50 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction d'un réactif organomagnésien issu d'un 3-halogénoindole, sur un benzaldéhyde(Tricotet and O'Shea, 2010)...	75
Figure 51 : Synthèse d'(1H-3-indolyl)(phényl)méthanols par réaction d'un réactif organolithien issu d'un 3-halogénoindole, sur un benzaldéhyde(Amat et al., 1994)	76
Figure 52 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols en présence de catalyseur basique (TMG ou tBu-TMG)(Bandini and Sinisi, 2009; Guo et al., 2009)	77

Figure 53 : Synthèse de phénylindolylméthanols diversement fonctionnalisés en présence de Cs ₂ CO ₃ (Elayaraja and Joel Karunakaran, 2012)	77
Figure 54 Synthèse des éthers de triméthylsilyle d'une série de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols (Zhuo et al., 2014).....	78
Figure 55 : Synthèse monotope de carbinols par hydroxyalkylation d'indoles (Downey et al., 2015)	79
Figure 56 : Synthèse de 3-(1-silyloxyalkyl)indoles à partir de benzaldéhydes (Downey et al., 2015)	79
Figure 57 : Synthèse de carbinols tertiaires optiquement actifs par arylation de 2,2,2-trifluoroacétophénones en présence d'un acide phosphorique chiral(Nie et al., 2009)	80
Figure 58 : Structure des ligands chiraux PHNQd (QD-1) et PHNQ (Q-1)(Li et al., 2006)	81
Figure 59 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols tertiaires optiquement actifs par réaction de Friedel-Crafts énantiosélective en présence de dérivés de la quinine comme ligands chiraux(Li et al., 2006)	81
Figure 60 : Synthèse de (1H-3-indolyl)(phényl)méthanols optiquement actifs par réaction de Friedel-Crafts énantiosélective en présence de dérivés de la quinine comme ligands chiraux(Li et al., 2006)	82
Figure 61 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par couplage de carbinols et d'indoles en présence de CAN (Zeng et al., 2005).....	83
Figure 62 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par couplage de carbinols et d'indoles en présence du réactif acide HBF ₄ -SiO ₂ (Bandgar et al., 2008).....	83
Figure 63 : Structure du catalyseur acide de Brønsted chiral utilisé pour la synthèse de PhédIMs asymétriques(Sun et al., 2010).....	84
Figure 64 : Synthèse énantiosélective de PhédIMs par alkylation asymétrique en présence d'un acide phosphorique chiral. (Sun et al., 2010).....	85
Figure 65 : Structure du catalyseur de type acide imidophosphorique chiral (AIPC) (Zhuo et al., 2014)	85
Figure 66 : Synthèse de PhédIMs asymétriques à partir de 3-(1-silyloxyalkyl)indoles et d'indoles, en présence d'un acide imidodiphosphorique chiral(Zhuo et al., 2014).....	86
Figure 67 : Hypothèse de la formation d'une paire d'ions chirale.(Zhuo et al., 2014).....	86
Figure 68 : Formation de PhédIMs non symétriques à partir de dérivés d'acide <i>N,N</i> -diméthylbarbiturique utilisés comme précurseurs(Deb and Bhuyan, 2008, 2007).....	87
Figure 69 : Formation de PhédIMs non symétriques à partir d'intermédiaires dérivés de l'acide de Meldrum(Armstrong et al., 2013)	88

Figure 70 : Synthèse du 3-indolylphthalide 176 à partir de l'indole et de l'acide 2-formylbenzoïque(Lin et al., 2012)	88
Figure 71 : Synthèse de PhédIMs non symétriques par réaction d'addition d'indole sur un 3-indolylphthalide(Lin et al., 2012)	89
Figure 72 : Obtention inattendue des PhédIMs 1230 et 231 par tentative de déprotection de carbinols et purification sur gel de silice (Dupeyre, 2006).....	90
Figure 73 : Liste des PhédIMs préparés en vue de leur évaluation comme ligands potentiels de la protéine NR4A1 et comme composés à potentialité pro-apoptotique.	93
Figure 74 : Les PhédIMs symétriques (24 et 30) et non symétrique (241) utilisés dans l'étude structurale des PhédIMox.....	95
Figure 75 : Liste des PhédIMs non symétriques préparés.....	96
Figure 76 : Formule générale des PhédIMs symétriques synthétisés.	96
Figure 77 : Composé 24 obtenu par couplage d'indole et de benzaldéhyde en présence de MK10..	98
Figure 78 : Liste de composés synthétisés par la méthode de Chakrabarty et coll (Chakrabarty et al., 2002).	98
Figure 79 : Hypothèse d'interaction électronique défavorables pour expliquer la faible réactivité du 6-méthoxy-1H-indole vis-à-vis des SEAr.....	99
Figure 80 : Tentative de couplage du benzaldéhyde avec le N-sulfonyl-1H-indole.....	100
Figure 81 : Structures du complexe (Pd2ba3) (à gauche) et du ligand PhDAVEPHOS (à droite)..	101
Figure 82 : Synthèse du 6-(N-morpholino)-1H-indole par amination de type Buchwald-Hartwig(Charles et al., 2005).....	102
Figure 83 : Tentative de synthèse du composé 234 en présence de l'argile MK10.....	102
Figure 84 : Spectre RMN 1H (acétone-d6) du composé 234.....	106
Figure 85 : Essai de préparation du composé 234 par amination pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig (Charles et al., 2005).	106
Figure 86 : Possibles réactions secondaires inhérentes à la présence du groupement méthyle	108
Figure 87 : Formule développée du (R)-phosphate (-)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyle	110
Figure 88 : Essai de synthèse du carbinol 247 en présence d'acide phosphorique chiral.....	110
Figure 89 : Essai synthèse des composés 90 et 233 en présence d'acide phosphorique chiral dans l'éthanol.	111
Figure 90 : Schéma de rétrosynthèse de PhédIMs non symétriques (241 : R1 = R2 = H).	112
Figure 91 : Synthèse du composé 242	113
Figure 92 : Synthèse du composé 249	114
Figure 93 : Synthèse du carbinol 139.....	114
Figure 94 : Synthèse du N-phénylsulfonyl-1H-indole 248.....	115

Figure 95 : Mécanisme réactionnel supposé de la formation du composé 242	115
Figure 96 : Hypothèse d'activation du carbinol par le chlorure de mésyle.	118
Figure 97 : Synthèse du composé 243.	119
Figure 98 : Synthèse du composé 253.	120
Figure 99 : Synthèse du composé 244.	120
Figure 100 : Synthèse du composé 241.	121
Figure 101 : Synthèse des composés 126 et 254.....	121
Figure 102 : Spectres de RMN (CDCl ₃) 1H (en haut) et 13C (en bas) du composé 255	124
Figure 103 : Attribution des déplacements chimiques des signaux RMN 13C (à gauche) et 1H (à droite) (spectres enregistrés dans CDCl ₃ , à respectivement 100 et 400 MHz).	125
Figure 104 : Principales corrélations en HMBC du composé 255.....	125
Figure 105 : Mécanisme hypothétique de formation du composé 255.	126
Figure 106 : Rôles catalytiques probables de la triéthylamine dans la réaction de couplage carbinol 254 / 1H-indole.	128
Figure 107 : Première synthèse d'un PhédIMOx, le diméthylrosindole par E. Fischer et P. Wagner (Fischer and Wagner, 1887).....	129
Figure 108 : Oxydation des PhédIMs par la DDQ ou la TCQ	131
Figure 109 : Oxydation du PhédIM 1 par CeCl ₃ .7H ₂ O (Silveira et al., 2012)	131
Figure 110 : Synthèse monotope des PhédIMOx 256 et 262-265 à partir des indoles et benzaldéhydes correspondants (Silveira et al., 2012).....	132
Figure 111 : Synthèse monotope séquentielle des PhédIMOx 266-271 (Khorshidi et al., 2014)...	133
Figure 112 : Exemple d'utilisation des PhédIMOx comme indicateur de pH (Khorshidi et al., 2014; Wang et al., 2011a, 2011b)	133
Figure 113 : Spectre RMN proton du composé 256 dans le DMSO-d ₆ (Silveira et al., 2012), (*) signal de NH non observé ; 256a formule décrite dans la littérature et 256b formule suggérée	134
Figure 114 : Structure par diffraction aux RX du PhédIMOx 256 (en réalité le chlorhydrate dihydraté) (Silveira et al., 2012)	135
Figure 115 : Structure de la turbomycine B et synthèse de ce composé à partir de 24 (Gillespie et al., 2002).	135
Figure 116 : Activités antibiotiques de la turbomycine B (isolée vs synthétique) (Gillespie et al., 2002). Abréviations : G+ : E : <i>Erwinia (herbicola)</i> , E : <i>Escherichia (coli)</i> , P : <i>Pseudomonas</i> , S : <i>Salmonella</i> ; G- : B : <i>Bacillus</i> , E : <i>Enterococcus</i> , S : <i>Staphylococcus (aureus)</i> , S : <i>Streptococcus (pyogenes)</i> , <i>Streptomyces (griseus)</i> ; Champignons/levures : C : <i>Candida</i> , P : <i>Pythium</i> , F : <i>Fusarium</i>	136

Figure 117 : Structure des deux PhéDIMOx 272 et 273 apparentés à 256 (*représentation "admise" des structures au début de l'étude).....	137
Figure 118 : Synthèse du PhéDIMOx 256.....	138
Figure 119 : Spectre de RMN du composé 256, enregistré dans DMF- <i>d</i> 7.....	139
Figure 120 : Structures possibles des ions m/z 321 (ESI+) et 319 (ESI-).	141
Figure 121 : Equilibre probable entre les formes carbinol et imine.....	141
Figure 122 : CCM sur silice d'un échantillon de PhéDIM 24, ligne a : PhéDIM 24 seul, ligne b : mélange 24 + 256, ligne c : PhéDIM oxydé 256 seul (Rf 0,5). Éluant CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH : 9/1/0,01 (V/V/V). Observation sans révélation. La tache correspondant au PhéDIM 24 (Rf 0,9) d'abord incolore devient elle aussi rouge après séchage de la plaque.	142
Figure 123 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé bleu : PhéDIM 24 (t _R = 17,4 min), tracé rouge : PhéDIMOx 256 (t _R = 5,1 min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient CH ₃ CN/TFA 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), c = 0,05 mg/mL, λ = 292 nm, 20° C, 20 µl).....	143
Figure 124 : Spectres RMN 1H (400 MHz, solvant : acetone- <i>d</i> 6) ; A) du mélange complexe obtenu après oxydation du 241 : *forme carbinol majoritaire, + formes « indolénium » et « imine » minoritaires. B) Mise en évidence de la forme carbinol 272a par échange par D ₂ O du signal –OH à 5,14 ppm.....	145
Figure 125 : Structures des formes carbinol, « imine » et « indoleninium » du PhéDIMOx 272. .	145
Figure 126 : A) Spectre RMN 1H du composé 241 (400 MHz, solvant : CD ₃ CN) ; B) Réaction d'oxydation du PhéDIM 241 réalisée en tube RMN. Spectre ¹ H (400 MHz, solvant : CD ₃ CN + D ₂ O). * : signaux correspondant aux formes « indoleninium » et « imine ».....	147
Figure 127 : Structure du PhéDIMOx 273.....	149
Figure 128 : Diagramme ORTEP du <i>N,N'</i> -diméthylPhéDIMOx 273 (Dr Pascale Lemoine, UPD)	150
Figure 129 : Structure proposée pour les PhéDIMOx apparentés à 256.....	151
Figure 130 : Rôle supposé de l'eau dans le mécanisme d'oxydation des PhéDIMs par la DDQ.	152
Figure 131 : Analyse thermogravimétrique par thermomicroscopie du composé 256 :.....	153
Figure 132 : Synthèse des composés 275 et 276 à partir respectivement de 230 et 231	155
Figure 134 : Visualisation d'un résultat de docking via l'interface web Swissdock	162
Figure 133 : Constitution du jeu de données de docking via l'interface SwissDock.....	162
Figure 135 : Étapes de la cristallogénèse : sursaturation, nucléation et croissance cristalline	163
Figure 136 : Technique de diffusion en phase vapeur (a) dispositif de goutte suspendue (b) dispositif de goutte assise.....	164

Figure 137 : (A) Structure de LBD-NR4A1; (B) Poche de liaison bloquée du domaine LBD. L'espace disponible est complètement bloqué par des résidus aromatiques et hydrophobique. Ces résidus sont strictement conservés dans la sous-famille NR4 (Flaig et coll. 2005).....	165
Figure 138 : Image représentative issue de la simulation de dynamique moléculaire du bis-indole à l'intérieur de la nouvelle poche de liaison (cyan, après 100 ns; magenta, après 800ns), ajusté à partir de la géométrie du complexe NR4A1/bis-indole docké (vert) (Lanig et al., 2015).....	165
Figure 139 : La cytosporone-B (Csn-B) et ses analogues.....	167
Figure 140 : Résultat de docking de Csn-B avec la structure LBD de NR4A1 (à gauche LBD seul et à droite, le complexe LBD-Csn-B) (adapté de Zhan et coll., 2008) (Zhan et al., 2008).....	168
Figure 141 : Résultat de docking d'EHMOA (en vert) et LBD (représenté par les résidus) avec deux liaisons hydrogène (2,74 Å et 4,66 Å)(Xia et al., 2013).....	170
Figure 142 : Mode de liaison du TMPA (21) au domaine LBD de NR4A1 avec la mise en évidence de deux sites de fixation A et B, (a) localisation sur la structure cristallographique des sites A et B (b) Zoom du mode de fixation sur les deux sites (code PDB 3V3Q) (Zhan et coll., 2015).....	171
Figure 143 : Structures cristallographiques des complexes (a) Site de fixation du THPN avec le domaine LBD de NR4A1 (site occupé : structure I ; site vide : structure II) (b) Mode de fixation du DPDO au niveau du même site de fixation (codes PDB, 4KZI, 4JGV)(Wang et al., 2013).....	171
Figure 144 : Structures cristallographiques du complexe LBD-PDNPA (molécule I et II), chacune avec une conformation distincte (code PDB 3V3E)(Li et al., 2015).....	172
Figure 146 : Illustration du rôle régulateur de Nur77 (NR4A1) dans l'activité de NF-κB, phosphorylation de Nur77 par p38, l'antagonisme de PDNPA de l'interaction Nur77-p38 (Li et coll., 2015).....	173
Figure 145 Modèle proposé pour illustrer la régulation de AMPKα par l'interaction NR4A1-LKB1 et les fonctions possibles de TMPA dans la régulation de la gluconéogenèse (Zhan et coll., 2012).....	172
Figure 147 : Formule générale des <i>p</i> -PhéDIMs.....	175
Figure 148 : Illustration des résultats de docking pour l'étude de l'interaction de <i>p</i> -OH-PhéDIM avec le LBD de NR4A1.....	176
Figure 149 : Gels SDS-PAGE de tests d'expression de His-LBD-NR4A1 dans de différentes conditions (M : marqueur ; pour les autres intitulés se référer au tableau 13).....	179
Figure 150 : Gel SDS-PAGE après chromatographie d'affinité de NR4A1 sur colonne de Ni-NTA (Piste 1 : Surnageant (S), Piste 2 : Culot (C), Piste 3 : non fixé (NF), Piste 4 : Lavage1 (L1), Piste 5 : Lavage2 (L2), Piste 6 : Eluant 1 (E1), Piste 7 : Eluant 2 (E2), Piste 8 : Eluant 3 (E3), Piste 9 : Eluant 4 (E4), Piste 10 : Marqueur (M)).....	180

Figure 151 : (a) Chromatogramme et (b) Gel SDS-PAGE associé de His-LBD-NR4A1 après l'étape de purification par gel filtration	181
Figure 152: Courbes d'intensités de fluorescence : a) Baisses d'intensités dues à l'effet de dilution obtenues par ajouts successifs de 1 μ L (en rouge) à 19 μ L (en bleu clair) de solution aqueuses (5 % DMSO), b) Baisses d'intensités amplifiées dues à l'effet de ligand obtenues par ajouts successifs de 1 μ L (en rouge) à 19 μ L (en bleu clair) de solution de DIM-3 (5 % DMSO)	182
Figure 153 : Images du domaine LBD-NR4A1 présentées : a) sous la forme d'hélices, b) en surface d'hydrophobicité avec la mise en évidence des sites de fixation A et B.	186
Figure 154 : Images de docking : a) mode de fixation de 24 (bleu), 234 (violet) sur le site A, et de 230 et 239 sur les sites B du LBD-NR4A1, b) Orientation de 24 (bleu) et de 234 (violet) dans la cavité du site B.	186
Figure 155: Captures d'image de docking au niveau du site A : a) 20 (vert) ; b) 235 (rose foncé) ; c) 238 (bleu) ; d) 24 (violet) ; e) 234 (rose claire) ; f) 237. Chaque composé interagissant au moins avec les résidus R454, L373 ou G376 par liaison hydrogène.	189
Figure 156 : Images de docking : a) 21 et b) 231, tous deux formant deux liaisons hydrogène avec le résidu R554.	190
Figure 157 : Monocristal de la boîte 2, puits D2	192
Figure 158 : Agrégat de «microcristaux» formés dans la goutte du puits A3 de la boîte 3'	194
Figure 159 : Vue microscopique des cristaux bipyramidaux obtenus en présence de citrate de sodium avec une concentration plus grande de protéine (boîte 002, puits D2)	194
Figure 160 : Vue microscopique de cristaux bipyramidaux de l'apo-enzyme His-LBD-NR4A1 formés après une amélioration des conditions d'optimisation par ajout d'additifs dans les réservoirs. (Boîte 2, b6 ; boîte 6, puits b2 et c3).....	196
Figure 161 : Carte de densité électronique du site A de His-LBD-NR4A1 (bleue) révélant la présence de glycérol en son sein (vert entouré en rouge)	198
Figure 162 : Réduction de sel de tétrazolium en formazan.....	200
Figure 163 : Spectres RMN ^1H (400 Hz, solvant : $\text{DMF-}d_7$) du composé 256 obtenu en baissant la température progressivement de 20 $^\circ\text{C}$ (a) à -41 $^\circ\text{C}$ (g).....	213
Figure 164 : Spectre RMN ^{13}C (400 Hz, solvant : acétone- d_6) du composé 272. Le signal à 75,43 ppm est caractéristique d'un carbone de type sp^3	213
Figure 165 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CDCl_3) du composé 272 avant de TFA dans le tube RMN.....	214
Figure 166 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CDCl_3) du composé 272 après de 0,3 μl TFA dans le tube RMN.....	214

Figure 167 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CDCl_3) du composé 272, après évaporation de la solution du tube RMN contenant du TFA.....	215
Figure 168 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) du composé 272.	215
Figure 169 : Spectre RMN ^1H (a) et ^{13}C (b) (400 Hz, solvant : acétone- d_6) du composé 273	216
Figure 170 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) du PhéDIMOX 256 utilisé comme référence pour l'oxydation en tube du composé 24	217
Figure 171 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 24 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ	217
Figure 172 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 24 en présence de 1,2 éq. de DDQ.....	218
Figure 173 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 24 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres.....	218
Figure 174 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 241 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ	219
Figure 175 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation en tube RMN du composé 241 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres.....	219
Figure 176 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) du PhéDIMOX 273 utilisé comme référence pour l'oxydation en tube RMN du composé 241	220
Figure 177 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) réalisé du composé 30 avant l'oxydation directe en tube RMN avec la DDQ	220
Figure 178 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation directe en tube RMN du composé 30 en présence de 1,2 éq. de DDQ.....	221
Figure 179 : Spectre RMN ^1H (400 Hz, solvant : CD_3CN) obtenu après oxydation en tube RMN du composé 30 en présence de 1,2 éq. de DDQ en conditions anhydres.....	221
Figure 180 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé rose : PhéDIM 230 ($t_R = 12,9$ min), tracé vert foncé: PhéDIMOX 275 ($t_R = 4,6$ min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 μm , débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), $c = 0,05$ mg/mL, $\lambda = 292$ nm, 20° C, 20 μl).....	262
Figure 181 : Figure 182 : Chromatogramme CLHP-C18-UV ; tracé violet : PhéDIM 231 ($t_R = 10,6$ min), tracé vert claire : PhéDIMOX 276 ($t_R = 5,3$ min) (colonne Zorbax® : 150 mm x 4,6 mm x 5 μm , débit : 1 mL/min, phase mobile : gradient $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 0,1 % (45/55 (0') ; 70/30 (20') ; 70/30 (25'), 100/0 (30') ; 45/55 (31'), $c = 0,05$ mg/mL, $\lambda = 292$ nm, 20° C, 20 μl).....	262
Figure 183 : Vecteur pET-21a(+) dans lequel a été inséré la séquence de NR4A1	264
Figure 184 : a) Boîtes utilisées pour le criblage robotisé, b) Kits contenant les solutions Crystal Screen et Index.....	271

Figure 185 : Robot Cybi-disk Cybio® destiné au criblage automatisé	271
Figure 186 : Boîtes de cristallogénèse d'optimisation.....	272

Liste des tableaux

Tableau 1 : Protéines clés impliquées dans la structuration et le fonctionnement cellulaire et constituant des substrats pour des caspases(Bertrand, 2008).....	13
Tableau 2 : Activités biologiques de dérivés gossypol substitués sur les récepteurs Bcl-X _L , Bcl-2 et Mcl-1	23
Tableau 3 : Activités biologiques de PhédIMs ciblant NR4A1 (Chintharlapalli, 2005; Cho et al., 2007, 2008; Dae Cho et al., 2010; Hedrick et al., 2015; Lee et al., 2010, 2014a).....	36
Tableau 4 : Activité biologique (concentration inhibitrice 50 en μM) de composés PhédIM-PBDs au sein d'une sélection de lignées de cellules cancéreuses humaines (Kamal et al., 2012).	40
Tableau 5 : Liste des principaux PhédIMs symétriques de synthèse	45
Tableau 6 : Conditions de synthèse de PhédIMs en présence d'acides protiques	51
Tableau 7 : Conditions de synthèse de PhédIMs en présence d'acides de Lewis.....	55
Tableau 8 : Conditions réactionnelles de synthèse de PhédIMs sans catalyseur acide.....	59
Tableau 9 : Optimisation des conditions de la synthèse de 234 en présence de BF ₃ .OEt ₂	104
Tableau 10 : Conditions spécifiques mises au point pour l'obtention du composé 241	127
Tableau 11 : Les valeurs de K _d obtenus par quenching de fluorescence	169
Tableau 12 : Valeurs des constantes de dissociation LBD-NR4A1/p-PhédIM et résultats de docking associés(Lee et al., 2014b).....	175
Tableau 13 : Différentes conditions d'expression de His-LBD-NR4A1 dans les souches Rosetta (DE3) et BL21 (DE3).....	178
Tableau 14 : Tests d'expression : Mesures de DO avant et après induction à l'IPTG. <i>Pour la préculture issue des souches Rosetta2 (fond jaune), les six tubes, contenant 10 mL de LB sont numérotés de 1a à 6a, et les six tubes contenant 10 mL de 2YT sont numérotés de 1b à 6b. Pour la préculture issue des souches BL21 (DE3) (fond vert), six tubes, contenant 10 mL de LB sont numérotés de 7a à 12a, et six tubes contenant 10 mL de 2YT sont numérotés de 7b à 12b.</i>	178
Tableau 15 : Valeurs des constantes de dissociations K _d de PhédIMs.....	182
Tableau 16 : Energie de liaison de la meilleure orientation proposée par le docking pour chaque PhédIM étudié	185
Tableau 17 : Résultats du docking de PhédIMs (série 1 en vert ; série 2 : en jaune) et d'analogues Csn-B avec LBD de NR4A1	187
Tableau 18 : Conditions ayant donné des pistes cristallines après criblage au robot	191
Tableau 19 : Conditions d'optimisation permettant d'obtenir des cristaux	192
Tableau 20 : Conditions d'optimisation de cristallisation de His-LBD –NR4A1	194
Tableau 21 : Conditions d'optimisation par augmentation de la concentration de His-LBD-NR4A1	195

Tableau 22 : Conditions optimales de cristallisation de His-LBD-NR4A1 en présence d'additifs tels que le glycérol et de ZnSO ₄ dans les réservoirs, ayant favorisé la formation de cristaux de taille plus grande.....	197
Tableau 23 : Les différents paramètres cristallographiques après traitement des jeux de données obtenus par diffraction aux rayons des cristaux de l'apo-enzyme LBD-NR4A1	198
Tableau 24 : Résultats de l'activité cytotoxique de PhédIMs de synthèse sur les cellules cancéreuses humaines	203
Tableau 25 : Valeurs de la CI50 des composés actifs sur les cellules Mia Paca-2.....	204
Tableau 26 : Résultats de l'activité pro-apoptotique des PhédIMs de synthèse sur les cellules cancéreuses Mia Paca-2	205
Tableau 27 : Estimation de la de fraction oxydée partiellement des composés 24, 230 et 231	263
Tableau 28 : Différentes conditions d'expression de NR4A1 à différentes températures dans les souches Rosetta (DE3) et BL21 (DE3)	266
Tableau 29 : Composition des gels constituant le gel SDS-PAGE 12, 5%	272

Références bibliographiques

- (1) Broadbent, T. A.; Broadbent, H. S. 1 - 1. The Chemistry and Pharmacology of Indole-3-Carbinol (Indole-3-Methanol) and 3-(Methoxymethyl)indole. [Part I]. *Curr. Med. Chem.* **1998**, *5* (5), 337–352.
- (2) Preobrazhenskaya, M. N.; Bukhman, V. M.; Korolev, A. M.; Efimov, S. A. Ascorbigen and Other Indole-Derived Compounds from Brassica Vegetables and Their Analogs as Anticarcinogenic and Immunomodulating Agents. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *60* (2), 301–313.
- (3) Aggarwal, B. B.; Ichikawa, H. Molecular Targets and Anticancer Potential of Indole-3-Carbinol and Its Derivatives. *Cell Cycle* **2005**, *4* (9), 1201–1215.
- (4) Bjeldanes, L. F.; Kim, J. Y.; Grose, K. R.; Bartholomew, J. C.; Bradfield, C. A. Aromatic Hydrocarbon Responsiveness-Receptor Agonists Generated from Indole-3-Carbinol in Vitro and in Vivo: Comparisons with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (21), 9543–9547.
- (5) Grose, K. R.; Bjeldanes, L. F. Oligomerization of Indole-3-Carbinol in Aqueous Acid. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5* (2), 188–193.
- (6) Busbee, P. B.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. Natural Indoles, Indole-3-Carbinol (I3C) and 3,3'-Diindolylmethane (DIM), Attenuate Staphylococcal Enterotoxin B-Mediated Liver Injury by Downregulating miR-31 Expression and Promoting Caspase-2-Mediated Apoptosis. *PLOS ONE* **2015**, *10* (2), e0118506.
- (7) Nachshon-Kedmi, M.; Yannai, S.; Haj, A.; Fares, F. A. Indole-3-Carbinol and 3,3'-diindolylmethane Induce Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2003**, *41* (6), 745–752.
- (8) Nachshon-Kedmi, M.; Yannai, S.; Fares, F. A. Induction of Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Line, PC3, by 3,3'-Diindolylmethane through the Mitochondrial Pathway. *Br. J. Cancer* **2004**, *91* (7), 1358–1363.
- (9) Xu, Y. Anticancer Effects of 3,3'-diindolylmethane Are Associated with G1 Arrest and Mitochondria-Dependent Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Oncol. Lett.* **2012**.
- (10) ClinicalTrials.gov. Indole-3-Carbinol in Preventing Breast Cancer in Nonsmoking Women Who Are at High Risk For Breast Cancer. September 30, 2016.
- (11) Chintharlapalli, S. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(P-Substitutedphenyl)methanes Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -Mediated Growth Inhibition, Transactivation, and Differentiation Markers in Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64* (17), 5994–6001.
- (12) Hong, J.; Samudio, I.; Liu, S.; Abdelrahim, M.; Safe, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Activation of p21 in Panc-28 Pancreatic Cancer Cells Involves Sp1 and Sp4 Proteins. *Endocrinology* **2004**, *145* (12), 5774–5785.

- (13) Qin, C.; Morrow, D.; Stewart, J.; Spencer, K.; Porter, W.; Smith, R.; Phillips, T.; Abdelrahim, M.; Samudio, I.; Safe, S. A New Class of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Agonists That Inhibit Growth of Breast Cancer Cells: 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(P-Substituted Phenyl)methanes. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3* (3), 247–260.
- (14) Lockshin, R. A.; Williams, C. M. Programmed Cell death—II. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkworms. *J. Insect Physiol.* **1964**, *10* (4), 643–649.
- (15) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Green, D. R.; Hengartner, M.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M. E.; Tschopp, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhivotovsky, B.; Melino, G. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, *16* (1), 3–11.
- (16) Decaudin, D. Contrôle mitochondrial de l'apoptose : mécanismes d'action de Bcl-2 et perspectives thérapeutiques en oncologie. *La Lettre du Cancérologue*. Edimark,. Puteaux; 1998 Country of publication: France October **1998**, pp 186–189.
- (17) Fisher, D. E. Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold. *Cell* **1994**, *78* (4), 539–542.
- (18) Mo, J.; Marshall, B.; Covar, J.; Zhang, N. Y.; Smith, S. B.; Atherton, S. S.; Zhang, M. Role of Bax in Death of Uninfected Retinal Cells during Murine Cytomegalovirus Retinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55* (11), 7137–7146.
- (19) Steller, H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* **1995**, *267* (5203), 1445–1449.
- (20) Zhang, X. –. Vitamin A and Apoptosis in Prostate Cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2002**, *9* (2), 87–102.
- (21) Dalle, S. Effets du glucose sur la cellule bêta-pancréatique mature : Diabète de type 2 : rôle des nutriments dans le développement du pancréas. *Métabolismes, hormones, diabètes et nutrition*. Edimark. Courbevoix; **2009** Country of publication: France **2009**, pp 29–35.
- (22) Nuñez, G.; Benedict, M. A.; Hu, Y.; Inohara, N. Caspases: The Proteases of the Apoptotic Pathway. *Oncogene* **1998**, *17* (25), 3237–3245.
- (23) Bertrand, N. Le cycle cellulaire et sa régulation. Cours : L'apoptose. **2008**.
- (24) Wong, R. S. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30* (1), 87.
- (25) Berry, D. Molecular Animation of Cell Death Mediated by the Fas Pathway. *Sci. STKE* **2007**, *2007* (380), tr1-tr1.

- (26) Chen, G. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* **2002**, *296* (5573), 1634–1635.
- (27) Wajant, H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* **2002**, *296* (5573), 1635–1636.
- (28) Gonzalez, D.; Bejarano, I.; Barriga, C.; Rodriguez, A. B.; Pariente, J. A. Oxidative Stress-Induced Caspases Are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **2010**, *5* (2), 181–186.
- (29) Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Ninth edition.; Eds.; Elsevier/Saunders: Philadelphia, PA, **2015**.
- (30) Fauquenot, P.; Belhassen, M. *Mécanisme de régulation de l'Apoptose*; **2010**.
- (31) 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.
- (32) Moll, U. M.; Marchenko, N.; Zhang, X. p53 and Nur77/TR3 – Transcription Factors That Directly Target Mitochondria for Cell Death Induction. *Oncogene* **2006**, *25* (34), 4725–4743.
- (33) Zhang, X. Targeting Nur77 Translocation. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11* (1), 69–79.
- (34) Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16* (1), 395–419.
- (35) Ouellet, M. Analyse fonctionnelle d'homologues végétaux de Bax Inhibitor-1 et développement d'un modèle de mort cellulaire programmée induite par Bax chez des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum*, **2004**.
- (36) Lin, B.; Kolluri, S. K.; Lin, F.; Liu, W.; Han, Y.-H.; Cao, X.; Dawson, M. I.; Reed, J. C.; Zhang, X. Conversion of Bcl-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor Nur77/TR3. *Cell* **2004**, *116* (4), 527–540.
- (37) Czabotar, P. E.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J. M. Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *15* (1), 49–63.
- (38) Schimmer, A. D. Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy. *Hematology* **2005**, *2005* (1), 215–219.
- (39) Adams, R.; Geissman, T. A.; Edwards, J. D. Gossypol, a Pigment of Cottonseed. *Chem. Rev.* **1960**, *60*, 555–574.
- (40) Document disponible en ligne. <http://www.rarexoticseeds.com/fr/graines-gossypium-herbaceum-graines-cotonnier.html> <http://www.rarexoticseeds.com/fr/graines-gossypium-herbaceum-graines-cotonnier.html> (accessed Aug 18, **2016**).

- (41) King, T. J.; de Silva, L. B. Optically Active Gossypol from *Thespesia Populnea*. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9 (3), 261–263.
- (42) La Graine de Cotonnier : Une Source Potentielle de Nouveaux Produits Alimentaires Ou Industriels. *Cirad - Agritrop* **1999**, No. 22, 107–113.
- (43) Baggstrom, M. Q.; Qi, Y.; Koczywas, M.; Argiris, A.; Johnson, E. A.; Millward, M. J.; Murphy, S. C.; Erlichman, C.; Rudin, C. M.; Govindan, R. A Phase II Study of AT-101 (Gossypol) in Chemotherapy-Sensitive Recurrent Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, 6 (10), 1757–1760.
- (44) Pellecchia, M.; Bertini, I.; Cowburn, D.; Dalvit, C.; Giralt, E.; Jahnke, W.; James, T. L.; Homans, S. W.; Kessler, H.; Luchinat, C.; Meyer, B.; Oschkinat, H.; Peng, J.; Schwalbe, H.; Siegal, G. Perspectives on NMR in Drug Discovery: A Technique Comes of Age. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (9), 738–745.
- (45) Wei, J.; Kitada, S.; Rega, M. F.; Emdadi, A.; Yuan, H.; Cellitti, J.; Stebbins, J. L.; Zhai, D.; Sun, J.; Yang, L.; Dahl, R.; Zhang, Z.; Wu, B.; Wang, S.; Reed, T. A.; Wang, H.-G.; Lawrence, N.; Sebti, S.; Reed, J. C.; Pellecchia, M. Apogossypol Derivatives as Antagonists of Antiapoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8 (4), 904–913.
- (46) Hedvat, M.; Emdad, L.; K. Das, S.; Kim, K.; Dasgupta, S.; Thomas, S.; Hu, B.; Zhu, S.; Dash, R.; A. Quinn, B.; A. Oyesanya, R.; P. Kegelman, T.; K. Sokhi, U.; Sarkar, S.; Erdogan, E.; E. Menezes, M.; Bhoopathi, P.; Wang, X.-Y.; G. Pomper, M.; Wei, J.; Wu, B.; L. Stebbins, J.; W. Diaz, P.; C. Reed, J.; Pellecchia, M.; Sarkar, D.; B. Fisher, P. Selected Approaches for Rational Drug Design and High Throughput Screening to Identify Anti-Cancer Molecules. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, 12 (9), 1143–1155.
- (47) Gemin X Presents New Data on Obatoclox at the American Society of Hematology Meeting. <http://www.businesswire.com/news/home/20081209005417/en/Gemin-Presents-Data-Obatoclox-American-Society-Hematology>
<http://www.businesswire.com/news/home/20081209005417/en/Gemin-Presents-Data-Obatoclox-American-Society-Hematology> (accessed Aug 18, **2016**).
- (48) Hauck, P.; Chao, B. H.; Litz, J.; Krystal, G. W. Alterations in the Noxa/Mcl-1 Axis Determine Sensitivity of Small Cell Lung Cancer to the BH3 Mimetic ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8 (4), 883–892.
- (49) Obatoclox, ClinicalTrials.gov. Search of: Obatoclox - List Results - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/search/intervention=Obatoclox> (accessed Aug 18, **2016**).
- (50) Parikh, S. A.; Kantarjian, H.; Schimmer, A.; Walsh, W.; Asatiani, E.; El-Shami, K.; Winton, E.; Verstovsek, S. Phase II Study of Obatoclox Mesylate (GX15-070), a Small-Molecule

BCL-2 Family Antagonist, for Patients With Myelofibrosis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2010**, *10* (4), 285–289.

- (51) Chen, J.; Jin, S.; Abraham, V.; Huang, X.; Liu, B.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Lin, X.; Smith, M.; Shen, Y.; Shoemaker, A. R.; Tahir, S. K.; Zhang, H.; Ackler, S. L.; Rosenberg, S. H.; Maecker, H.; Sampath, D.; Levenson, J. D.; Tse, C.; Elmore, S. W. The Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-W Inhibitor, Navitoclax, Enhances the Activity of Chemotherapeutic Agents In Vitro and In Vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10* (12), 2340–2349.
- (52) Konopleva, M.; Watt, J.; Contractor, R.; Tsao, T.; Harris, D.; Estrov, Z.; Bornmann, W.; Kantarjian, H.; Viallet, J.; Samudio, I.; Andreeff, M. Mechanisms of Antileukemic Activity of the Novel Bcl-2 Homology Domain-3 Mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Res.* **2008**, *68* (9), 3413–3420.
- (53) Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H. M.; Ling, Y. Y.; Stout, M. B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K. O.; Giles, C. B.; Wren, J. D.; Niedernhofer, L. J.; Robbins, P. D.; Kirkland, J. L. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors. *Aging Cell* **2016**, *15* (3), 428–435.
- (54) Chinni, S. R.; Li, Y.; Upadhyay, S.; Koppolu, P. K.; Sarkar, F. H. Indole-3-Carbinol (I3C) Induced Cell Growth Inhibition, G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* **2001**, *20* (23), 2927–2936.
- (55) Ge, X.; Fares, F. A.; Yannai, S. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells by Indole-3-Carbinol Is Independent of p53 and Bax. *Anticancer Res.* **1999**, *19* (4B), 3199–3203.
- (56) Howells, L. M.; Gallacher-Horley, B.; Houghton, C. E.; Manson, M. M.; Hudson, E. A. Indole-3-Carbinol Inhibits Protein Kinase B/Akt and Induces Apoptosis in the Human Breast Tumor Cell Line MDA MB468 but Not in the Nontumorigenic HBL100 Line. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1* (13), 1161–1172.
- (57) Rahman, K. M.; Aranha, O.; Glazyrin, A.; Chinni, S. R.; Sarkar, F. H. Translocation of Bax to Mitochondria Induces Apoptotic Cell Death in Indole-3-Carbinol (I3C) Treated Breast Cancer Cells. *Oncogene* **2000**, *19* (50), 5764–5771.
- (58) Rahman, K. M. W.; Aranha, O.; Sarkar, F. H. Indole-3-Carbinol (I3C) Induces Apoptosis in Tumorigenic but Not in Nontumorigenic Breast Epithelial Cells. *Nutr. Cancer* **2003**, *45* (1), 101–112.
- (59) Chen, D. Z.; Qi, M.; Auburn, K. J.; Carter, T. H. Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium. *J. Nutr.* **2001**, *131* (12), 3294–3302.

- (60) Banerjee, S.; Kong, D.; Wang, Z.; Bao, B.; Hillman, G. G.; Sarkar, F. H. Attenuation of Multi-Targeted Proliferation-Linked Signaling by 3,3'-Diindolylmethane (DIM): From Bench to Clinic. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2011**, 728 (1–2), 47–66.
- (61) Safe, S.; Papineni, S.; Chintharlapalli, S. Cancer Chemotherapy with Indole-3-Carbinol, bis(3'-Indolyl)methane and Synthetic Analogs. *Cancer Lett.* **2008**, 269 (2), 326–338.
- (62) Ashrafian, L.; Sukhikh, G.; Kiselev, V.; Paltsev, M.; Druk, V.; Kuznetsov, I.; Muzhnek, E.; Apolikhina, I.; Andrianova, E. Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Multicenter Clinical Trial (Phase IIa) on Diindolylmethane's Efficacy and Safety in the Treatment of CIN: Implications for Cervical Cancer Prevention. *EPMA J.* **2015**, 6 (1).
- (63) Hélène, C.; Saison-Behmoaras, E. La Stratégie Anti-Sens : Nouvelles Approches Thérapeutiques. *médecine/sciences* **1994**, 10 (3), 253.
- (64) Morris, M. J.; Cordon-Cardo, C.; Kelly, W. K.; Slovin, S. F.; Siedlecki, K.; Regan, K. P.; DiPaola, R. S.; Rafi, M.; Rosen, N.; Scher, H. I. Safety and Biologic Activity of Intravenous BCL-2 Antisense Oligonucleotide (G3139) and Taxane Chemotherapy in Patients with Advanced Cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* **2005**, 13 (1), 6–13.
- (65) Tolcher, A. W. A Phase I Pharmacokinetic and Biological Correlative Study of Oblimersen Sodium (Genasense, G3139), an Antisense Oligonucleotide to the Bcl-2 mRNA, and of Docetaxel in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10 (15), 5048–5057.
- (66) Tolcher, A. W. A Phase II, Pharmacokinetic, and Biological Correlative Study of Oblimersen Sodium and Docetaxel in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11 (10), 3854–3861.
- (67) Marshall, J.; Chen, H.; Yang, D.; Figueira, M.; Bouker, K. B.; Ling, Y.; Lippman, M.; Frankel, S. R.; Hayes, D. F. A Phase I Trial of a Bcl-2 Antisense (G3139) and Weekly Docetaxel in Patients with Advanced Breast Cancer and Other Solid Tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **2004**, 15 (8), 1274–1283.
- (68) Rudin, C. M.; Otterson, G. A.; Mauer, A. M.; Villalona-Calero, M. A.; Tomek, R.; Prange, B.; George, C. M.; Szeto, L.; Vokes, E. E. A Pilot Trial of G3139, a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide, and Paclitaxel in Patients with Chemorefractory Small-Cell Lung Cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **2002**, 13 (4), 539–545.
- (69) Hu, Y.; Cherton-Horvat, G.; Dragowska, V.; Baird, S.; Korneluk, R. G.; Durkin, J. P.; Mayer, L. D.; LaCasse, E. C. Antisense Oligonucleotides Targeting XIAP Induce Apoptosis and Enhance Chemotherapeutic Activity against Human Lung Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2003**, 9 (7), 2826–2836.

- (70) Altieri, D. C. Targeted Therapy by Disabling Crossroad Signaling Networks: The Survivin Paradigm. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5* (3), 478–482.
- (71) Nakahara, T.; Takeuchi, M.; Kinoyama, I.; Minematsu, T.; Shirasuna, K.; Matsuhisa, A.; Kita, A.; Tominaga, F.; Yamanaka, K.; Kudoh, M.; Sasamata, M. YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Res.* **2007**, *67* (17), 8014–8021.
- (72) Romagnoli, M.; Séveno, C.; Bataille, R.; Barillé-Nion, S. Survivine En Cancérologie: Aspects Moléculaires et Applications Thérapeutiques. *médecine/sciences* **2008**, *24* (10), 821–827.
- (73) Satoh, T.; Okamoto, I.; Miyazaki, M.; Morinaga, R.; Tsuya, A.; Hasegawa, Y.; Terashima, M.; Ueda, S.; Fukuoka, M.; Ariyoshi, Y.; Saito, T.; Masuda, N.; Watanabe, H.; Taguchi, T.; Kakihara, T.; Aoyama, Y.; Hashimoto, Y.; Nakagawa, K. Phase I Study of YM155, a Novel Survivin Suppressant, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (11), 3872–3880.
- (74) Clemens, M. R.; Gladkov, O. A.; Gartner, E.; Vladimirov, V.; Crown, J.; Steinberg, J.; Jie, F.; Keating, A. Phase II, Multicenter, Open-Label, Randomized Study of YM155 plus Docetaxel as First-Line Treatment in Patients with HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *149* (1), 171–179.
- (75) Papadopoulos, K. P.; Lopez-Jimenez, J.; Smith, S. E.; Steinberg, J.; Keating, A.; Sasse, C.; Jie, F.; Thyss, A. A Multicenter Phase II Study of Sepantronium Bromide (YM155) plus Rituximab in Patients with Relapsed Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **2016**, *57* (8), 1848–1855.
- (76) Tolcher, A. W.; Quinn, D. I.; Ferrari, A.; Ahmann, F.; Giaccone, G.; Drake, T.; Keating, A.; de Bono, J. S. A Phase II Study of YM155, a Novel Small-Molecule Suppressor of Survivin, in Castration-Resistant Taxane-Pretreated Prostate Cancer. *Ann. Oncol.* **2012**, *23* (4), 968–973.
- (77) Chang, C.-C.; Heller, J. D.; Kuo, J.; Huang, R. C. C. Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid Induces Growth Arrest and Cellular Apoptosis by Inhibiting Cdc2 and Survivin Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (36), 13239–13244.
- (78) Sun, Y.; Giacalone, N. J.; Lu, B. Terameprocol (Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid), an Inhibitor of Sp1-Mediated Survivin Transcription, Induces Radiosensitization in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6* (1), 8–14.
- (79) Flaig, R.; Greschik, H.; Peluso-Iltis, C.; Moras, D. Structural Basis for the Cell-Specific Activities of the NGFI-B and the Nurr1 Ligand-Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (19), 19250–19258.

- (80) Safe, S.; Kim, K.; Li, X.; Lee, S.-O. NR4A Orphan Receptors and Cancer. *Nucl. Recept. Signal.* **2011**.
- (81) Maxwell, M. A.; Muscat, G. E. O. The NR4A Subgroup: Immediate Early Response Genes with Pleiotropic Physiological Roles. *Nucl. Recept. Signal.* **2006**, *4*, e002.
- (82) omim.org. NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 4, GROUP A, MEMBER 1; NR4A1. October 1, **2010**.
- (83) Chang, C.; Kokontis, J.; Liao, S. S.; Chang, Y. Isolation and Characterization of Human TR3 Receptor: A Member of Steroid Receptor Superfamily. *J. Steroid Biochem.* **1989**, *34* (1–6), 391–395.
- (84) Chang, C.; Lau, L.; Liao, S.; Kokontis, J. Characterization of New Members of the Steroid Receptor Super-Family. In *The Steroid/Thyroid Hormone Receptor Family and Gene Regulation*; Carlstedt-Duke, J., Eriksson, H., Gustafsson, J.-Å., Eds.; Birkhäuser Basel: Basel, 1989; pp 183–193.
- (85) International CBT Symposium; Carlstedt-Duke, J.; Eriksson, H.; Gustafsson, J.-Å. *The Steroid/Thyroid Hormone Receptor Family and Gene Regulation: Proceedings of the 2nd International CBT Symposium Stockholm, Sweden, November 4-5, 1988*; 1989.
- (86) Lau, L. F.; Nathans, D. Expression of a Set of Growth-Related Immediate Early Genes in BALB/C 3T3 Cells: Coordinate Regulation with c-Fos or c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (5), 1182–1186.
- (87) Saucedo-Cardenas, O.; Kardon, R.; Ediger, T. R.; Lydon, J. P.; Conneely, O. M. Cloning and Structural Organization of the Gene Encoding the Murine Nuclear Receptor Transcription Factor, NURR1. *Gene* **1997**, *187* (1), 135–139.
- (88) Davis, I. J.; Hazel, T. G.; Chen, R. H.; Blenis, J.; Lau, L. F. Functional Domains and Phosphorylation of the Orphan Receptor Nur77. *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7* (8), 953–964.
- (89) Klug, A.; Rhodes, D. Zinc Fingers: A Novel Protein Fold for Nucleic Acid Recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1987**, *52* (0), 473–482.
- (90) Wilson, T. E.; Paulsen, R. E.; Padgett, K. A.; Milbrandt, J. Participation of Non-Zinc Finger Residues in DNA Binding by Two Nuclear Orphan Receptors. *Science* **1992**, *256* (5053), 107–110.
- (91) Baker, K. D.; Shewchuk, L. M.; Kozlova, T.; Makishima, M.; Hassell, A.; Wisely, B.; Caravella, J. A.; Lambert, M. H.; Reinking, J. L.; Krause, H.; Thummel, C. S.; Willson, T. M.; Mangelsdorf, D. J. The Drosophila Orphan Nuclear Receptor DHR38 Mediates an Atypical Ecdysteroid Signaling Pathway. *Cell* **2003**, *113* (6), 731–742.

- (92) Wang, Z.; Benoit, G.; Liu, J.; Prasad, S.; Aarnisalo, P.; Liu, X.; Xu, H.; Walker, N. P. C.; Perlmann, T. Structure and Function of Nurr1 Identifies a Class of Ligand-Independent Nuclear Receptors. *Nature* **2003**, *423* (6939), 555–560.
- (93) Burris, T. P.; Guo, W.; McCabe, E. R. The Gene Responsible for Adrenal Hypoplasia Congenita, DAX-1, Encodes a Nuclear Hormone Receptor That Defines a New Class within the Superfamily. *Recent Prog. Horm. Res.* **1996**, *51*, 241-259-260.
- (94) Seol, W.; Choi, H.-S.; Moore, D. D. An Orphan Nuclear Hormone Receptor That Lacks a DNA Binding Domain and Heterodimerizes with Other Receptors. *Science* **1996**, *272* (5266), 1336–1339.
- (95) Safe, S.; Jin, U.-H.; Morpurgo, B.; Abudayyeh, A.; Singh, M.; Tjalkens, R. B. Nuclear Receptor 4A (NR4A) Family – Orphans No More. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *157*, 48–60.
- (96) Li, L.; Liu, Y.; Chen, H.; Li, F.; Wu, J.; Zhang, H.; He, J.; Xing, Y.; Chen, Y.; Wang, W.; Tian, X.; Li, A.; Zhang, Q.; Huang, P.; Han, J.; Lin, T.; Wu, Q. Impeding the Interaction between Nur77 and p38 Reduces LPS-Induced Inflammation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (5), 339–346.
- (97) Wang, W.; Wang, Y.; Chen, H.; Xing, Y.; Li, F.; Zhang, Q.; Zhou, B.; Zhang, H.; Zhang, J.; Bian, X.; Li, L.; Liu, Y.; Zhao, B.; Chen, Y.; Wu, R.; Li, A.; Yao, L.; Chen, P.; Zhang, Y.; Tian, X.; Beermann, F.; Wu, M.; Han, J.; Huang, P.; Lin, T.; Wu, Q. Orphan Nuclear Receptor TR3 Acts in Autophagic Cell Death via Mitochondrial Signaling Pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *10* (2), 133–140.
- (98) Zhan, Y.; Du, X.; Chen, H.; Liu, J.; Zhao, B.; Huang, D.; Li, G.; Xu, Q.; Zhang, M.; Weimer, B. C.; Chen, D.; Cheng, Z.; Zhang, L.; Li, Q.; Li, S.; Zheng, Z.; Song, S.; Huang, Y.; Ye, Z.; Su, W.; Lin, S.-C.; Shen, Y.; Wu, Q. Cytosporone B Is an Agonist for Nuclear Orphan Receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (9), 548–556.
- (99) Zhan, Y.; Chen, Y.; Zhang, Q.; Zhuang, J.; Tian, M.; Chen, H.; Zhang, L.; Zhang, H.; He, J.; Wang, W.; Wu, R.; Wang, Y.; Shi, C.; Yang, K.; Li, A.; Xin, Y.; Li, T. Y.; Yang, J. Y.; Zheng, Z.; Yu, C.; Lin, S.-C.; Chang, C.; Huang, P.; Lin, T.; Wu, Q. The Orphan Nuclear Receptor Nur77 Regulates LKB1 Localization and Activates AMPK. *Nat. Chem. Biol.* **2012**.
- (100) Anderton, M. J. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Indole-3-Carbinol and Its Acid Condensation Products after Oral Administration to Mice. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (15), 5233–5241.

- (101) Maciejewska, D.; Rasztańska, M.; Wolska, I.; Anuszevska, E.; Gruber, B. Novel 3,3'-Diindolylmethane Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity, Structural Characterization in Solid State. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (10), 4136–4147.
- (102) Fotso Fondja Yao, C. B.; Zereini, W. A.; Fotso, S.; Anke, H.; Laatsch, H. Aqabamycins A–G: Novel Nitro Maleimides from a Marine *Vibrio* Species: II. Structure Elucidation*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63* (6), 303–308.
- (103) Chintharlapalli, S. Activation of Nur77 by Selected 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(P-Substituted Phenyl)methanes Induces Apoptosis through Nuclear Pathways. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (26), 24903–24914.
- (104) Lei, P.; Abdelrahim, M.; Cho, S. D.; Liu, X.; Safe, S. Structure-Dependent Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Pancreatic Cancer by 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(P-Substituted Phenyl)methanes. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (10), 3363–3372.
- (105) Hedrick, E.; Lee, S.-O.; Kim, G.; Abdelrahim, M.; Jin, U.-H.; Safe, S.; Abudayyeh, A. Nuclear Receptor 4A1 (NR4A1) as a Drug Target for Renal Cell Adenocarcinoma. *PLOS ONE* **2015**, *10* (6), e0128308.
- (106) Andey, T.; Patel, A.; Jackson, T.; Safe, S.; Singh, M. 1,1-Bis (3'-Indolyl)-1-(P-Substitutedphenyl)methane Compounds Inhibit Lung Cancer Cell and Tumor Growth in a Metastasis Model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50* (2), 227–241.
- (107) Lee, S.-O.; Andey, T.; Jin, U.-H.; Kim, K.; Sachdeva, M.; Safe, S. The Nuclear Receptor TR3 Regulates mTORC1 Signaling in Lung Cancer Cells Expressing Wild-Type p53. *Oncogene* **2012**, *31* (27), 3265–3276.
- (108) Lee, S.-O.; Jin, U.-H.; Kang, J. H.; Kim, S. B.; Guthrie, A. S.; Sreevalsan, S.; Lee, J.-S.; Safe, S. The Orphan Nuclear Receptor NR4A1 (Nur77) Regulates Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12* (4), 527–538.
- (109) Lee, S.-O.; Chintharlapalli, S.; Liu, S.; Papineni, S.; Cho, S. D.; Yoon, K.; Safe, S. p21 Expression Is Induced by Activation of Nuclear Nerve Growth Factor-Induced B (Nur77) in Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7* (7), 1169–1178.
- (110) Cho, S. D.; Yoon, K.; Chintharlapalli, S.; Abdelrahim, M.; Lei, P.; Hamilton, S.; Khan, S.; Ramaiah, S. K.; Safe, S. Nur77 Agonists Induce Proapoptotic Genes and Responses in Colon Cancer Cells through Nuclear Receptor-Dependent and Nuclear Receptor-Independent Pathways. *Cancer Res.* **2007**, *67* (2), 674–683.
- (111) Cho, S. D.; Lei, P.; Abdelrahim, M.; Yoon, K.; Liu, S.; Guo, J.; Papineni, S.; Chintharlapalli, S.; Safe, S. 1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(P-Methoxyphenyl)methane Activates

- Nur77-Independent Proapoptotic Responses in Colon Cancer Cells. *Mol. Carcinog.* **2008**, *47* (4), 252–263.
- (112) Dae Cho, S.; Lee, S.-O.; Chintharlapalli, S.; Abdelrahim, M.; Khan, S.; Yoon, K.; Kamat, A. M.; Safe, S. Activation of Nerve Growth Factor-Induced B by Methylene-Substituted Diindolylmethanes in Bladder Cancer Cells Induces Apoptosis and Inhibits Tumor Growth. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77* (3), 396–404.
- (113) Lee, S.-O.; Abdelrahim, M.; Yoon, K.; Chintharlapalli, S.; Papineni, S.; Kim, K.; Wang, H.; Safe, S. Inactivation of the Orphan Nuclear Receptor TR3/Nur77 Inhibits Pancreatic Cancer Cell and Tumor Growth. *Cancer Res.* **2010**, *70* (17), 6824–6836.
- (114) Lei, P.; Abdelrahim, M.; Cho, S. D.; Liu, S.; Chintharlapalli, S.; Safe, S. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(P-Substituted Phenyl)methanes Inhibit Colon Cancer Cell and Tumor Growth through Activation of c-Jun N-Terminal Kinase. *Carcinogenesis* **2008**, *29* (6), 1139–1147.
- (115) Hartley, J. A. SJG-136 (NSC 694501), a Novel Rationally Designed DNA Minor Groove Interstrand Cross-Linking Agent with Potent and Broad Spectrum Antitumor Activity: Part 1: Cellular Pharmacology, In Vitro and Initial In Vivo Antitumor Activity. *Cancer Res.* **2004**, *64* (18), 6693–6699.
- (116) Hochhauser, D.; Meyer, T.; Spanswick, V. J.; Wu, J.; Clingen, P. H.; Loadman, P.; Cobb, M.; Gumbrell, L.; Begent, R. H.; Hartley, J. A.; Jodrell, D. Phase I Study of Sequence-Selective Minor Groove DNA Binding Agent SJG-136 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (6), 2140–2147.
- (117) Kamal, A.; Srikanth, Y. V. V.; Ramaiah, M. J.; Khan, M. N. A.; Kashi Reddy, M.; Ashraf, M.; Lavanya, A.; Pushpavalli, S. N. C. V. L.; Pal-Bhadra, M. Synthesis, Anticancer Activity and Apoptosis Inducing Ability of Bisindole Linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine Conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 571–578.
- (118) Antonow, D.; Thurston, D. E. Synthesis of DNA-Interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs). *Chem. Rev.* **2011**, *111* (4), 2815–2864.
- (119) Cipolla, L.; Araújo, A. C.; Airoidi, C.; Bini, D. Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine as a Scaffold for the Design and Synthesis of Anti-Tumour Drugs. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9* (1), 1–31.
- (120) Gerratana, B. Biosynthesis, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrolobenzodiazepines. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32* (2), 254–293.
- (121) Fischer, E. Ueber Einige Reactionen Der Indole. *Berichte der.* November 1886, pp 2988–2291.
- (122) Noland, W. E.; Robinson, D. N. Electrophilic Substitution in Skatole and its Derivatives. *ScienceDirect. Elsevier.* **1958**, pp 68–72.

- (123) Fischer, E. 3) Ueber das Methylketol. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, 242 (3), 372–383.
- (124) Sundberg, R. J. *Indoles*; Best synthetic methods series; Academic Press: San Diego, Calif., **1996**.
- (125) Gribble, G. W., *Heterocyclic Scaffolds. 2: Reactions and Applications of Indoles*; Ed.; Topics in heterocyclic chemistry; Springer: Heidelberg, **2010**.
- (126) Dahlbom, R.; Misiorny, A.; Haraldsen, H.; Prydz, H. Some 3-Dialkylaminomethylindoles and 3,3'-Diindolylmethanes. *Acta Chem. Scand.* **1955**, 9, 1074–1078.
- (127) Bergman, J.; Carlsson, R.; Sjöberg, B. The Reaction of Indole and the Indole Grignard Reagent with Phosgene. A Facile Synthesis of Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1977**, 14 (7), 1123–1134.
- (128) Kamal, A.; Ali Qureshi, A. Syntheses of Some Substituted Di-Indolylmethanes in Aqueous Medium at Room Temperature. *Tetrahedron* **1963**, 19 (4), 513–520.
- (129) Rani, V. J.; Vani, K. V.; Rao, C. V. PEG-SO₃H as a Catalyst for the Preparation of Bis-Indolyl and Tris-Indolyl Methanes in Aqueous Media. *Synth. Commun.* **2012**, 42 (14), 2048–2057.
- (130) Ghorbani-Vaghei, R.; Veisi, H.; Keypour, H.; Dehghani-Firouzabadi, A. A. A Practical and Efficient Synthesis of Bis(indolyl)methanes in Water, and Synthesis of Di-, Tri-, and Tetra(bis-Indolyl)methanes under Thermal Conditions Catalyzed by Oxalic Acid Dihydrate. *Mol. Divers.* **2010**, 14 (1), 87–96.
- (131) Rafiee, E.; Zolfagharifar, Z.; Joshaghani, M.; Eavani, S. 12-Tungstosilicic Acid Supported on Different Carriers: Pronounced Catalytic Activity in the Synthesis of Bis(indolyl)methanes Under Solvent-Free Conditions. *Synth. Commun.* **2011**, 41 (3), 459–467.
- (132) Wang, Y.; Yuan, Y.; Xing, C.-H.; Lu, L. Trifluoromethanesulfonic Acid-Catalyzed Solvent-Free Bisindolylolation of Trifluoromethyl Ketones. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (5), 1045–1048.
- (133) Singh, P. R.; Singh, D. U.; Samant, S. D. Sulphamic Acid—A Mild, Efficient, and Cost-Effective Solid Acid Catalyst for the Synthesis of Bis(1H-indol-3-yl)methanes. *Synth. Commun.* **2005**, 35 (16), 2133–2138.
- (134) Ke, B.; Qin, Y.; Wang, Y.; Wang, F. Amberlyst-Catalyzed Reaction of Indole: Synthesis of Bisindolylalkane. *Synth. Commun.* **2005**, 35 (9), 1209–1212.
- (135) Magesh, C. J.; Nagarajan, R.; Karthik, M.; Perumal, P. T. Synthesis and Characterization of Bis(indolyl)methanes, Tris(indolyl)methanes and New Diindolylcarbazolylmethanes Mediated by Zeokarb-225, a Novel, Recyclable, Eco-Benign Heterogenous Catalyst. *Appl. Catal. Gen.* **2004**, 266 (1), 1–10.

- (136) Chakrabarty, M.; Ghosh, N.; Basak, R.; Harigaya, Y. Dry Reaction of Indoles with Carbonyl Compounds on Montmorillonite K10 Clay: A Mild, Expedient Synthesis of Diindolylalkanes and Vibrindole A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (22), 4075–4078.
- (137) Laszlo, P. Chemical Reactions on Clays. *Science* **1987**, *235* (4795), 1473–1477.
- (138) Mishra, S.; Ghosh, R. Ecofriendly and sustainable efficient synthesis of bis(indolyl)methanes based on recyclable Brønsted (CSA) or Lewis (ZrOCl₂·8H₂O) acid catalysts. *Indian Journal of Chemistry*. November **2011**, pp 1630–1636.
- (139) Chen, D.; Yu, L.; Wang, P. G. Lewis Acid-Catalyzed Reactions in Protic Media. Lanthanide-Catalyzed Reactions of Indoles with Aldehydes or Ketones. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (26), 4467–4470.
- (140) Nagarajan, R.; Perumal, P. T. InCl₃ and In(OTf)₃ Catalyzed Reactions: Synthesis of 3-Acetyl Indoles, Bis-Indolylmethane and Indolylquinoline Derivatives. *Tetrahedron* **2002**, *58* (6), 1229–1232.
- (141) Mo, L.; Ma, Z.; Zhang, Z. CuBr₂-Catalyzed Synthesis of Bis(indolyl)methanes. *Synth. Commun.* **2005**, *35* (15), 1997–2004.
- (142) Xia, M.; Wang, S.; Yuan, W. Lewis Acid Catalyzed Electrophilic Substitution of Indole with Aldehydes and Schiff's Bases Under Microwave Solvent-Free Irradiation. *Synth. Commun.* **2004**, *34* (17), 3175–3182.
- (143) Shirini, F.; Langroodi, M. S.; Abedini, M. Efficient Synthesis of Bis (Indolyl) Methanes Catalyzed by (PhCH₂PPh₃)+Br₃⁻ under Solvent-Free Conditions. *Chin. Chem. Lett.* **2010**, *21* (11), 1342–1345.
- (144) Boroujeni, K. P.; Parvanak, K. Efficient and Solvent-Free Synthesis of Bis-Indolylmethanes Using Silica Gel Supported Aluminium Chloride as a Reusable Catalyst. *Chin. Chem. Lett.* **2011**, *22* (8), 939–942.
- (145) Yang, Q.; Yin, Z. L.; Ouyang, B. L.; Peng, Y. Y. Pyridinium Tribromide Catalyzed Condensation of Indoles and Aldehydes to Form Bisindolylalkanes. *Chin. Chem. Lett.* **2011**, *22* (5), 515–518.
- (146) Ganguly, N. C.; Mondal, P.; Barik, S. K. Iodine in Aqueous Micellar Environment: A Mild Effective Ecofriendly Catalytic System for Expedient Synthesis of Bis(indolyl)methanes and 3-Substituted Indolyl Ketones. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5* (1), 73–81.
- (147) Beltrá, J.; Gimeno, M. C.; Herrera, R. P. A New Approach for the Synthesis of Bisindoles through AgOTf as Catalyst. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2206–2214.
- (148) Swetha, A.; Babu, B. M.; Meshram, H. M. An Efficient and Rapid Protocol for the Synthesis of Diversely Functionalized Bisindolylmethanes. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (14), 1775–1779.

- (149) Kobayashi, S.; Hachiya, I. Lanthanide Triflates as Water-Tolerant Lewis Acids. Activation of Commercial Formaldehyde Solution and Use in the Aldol Reaction of Silyl Enol Ethers with Aldehydes in Aqueous Media. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (13), 3590–3596.
- (150) King, L. C.; Ostrum, G. K. Selective Bromination with Copper(II) Bromide¹. *J. Org. Chem.* **1964**, *29* (12), 3459–3461.
- (151) Bandgar, B. P.; Shaikh, K. A. Molecular Iodine-Catalyzed Efficient and Highly Rapid Synthesis of Bis(indolyl)methanes under Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (9), 1959–1961.
- (152) Bakthadoss, M.; Devaraj, A.; Srinivasan, J. First Synthesis of Bis(di(indolyl)aryl)methanes From Bis(salicylaldehydes): First Synthesis of Bis(di(indolyl)aryl)methanes from Bis(salicylaldehydes). *J. Heterocycl. Chem.* **2015**, *52* (2), 418–424.
- (153) Ji, S.-J.; Wang, S.-Y.; Zhang, Y.; Loh, T.-P. Facile Synthesis of Bis(indolyl)methanes Using Catalytic Amount of Iodine at Room Temperature under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron* **2004**, *60* (9), 2051–2055.
- (154) Deb, M. L.; Bhuyan, P. J. An Efficient and Clean Synthesis of Bis(indolyl)methanes in a Protic Solvent at Room Temperature. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (9), 1441–1443.
- (155) Patil, V. D.; Dere, G. B.; Rege, P. A.; Patil, J. J. Synthesis of Bis(indolyl) Methanes in Catalyst- and Solvent-Free Reaction. *Synth. Commun.* **2011**, *41* (5), 736–747.
- (156) Gopalaiah, K.; Chandrudu, S.; Devi, A. Iron-Catalyzed Oxidative Coupling of Benzylamines and Indoles: Novel Approach for Synthesis of Bis(indolyl)methanes. *Synthesis* **2015**, *47* (12), 1766–1774.
- (157) Armstrong, E. L.; Grover, H. K.; Kerr, M. A. Scandium Triflate-Catalyzed Nucleophilic Additions to Indolylmethyl Meldrum's Acid Derivatives via a Gramine-Type Fragmentation: Synthesis of Substituted Indolemethanes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (20), 10534–10540.
- (158) Dumas, A. M.; Fillion, E. Sc(OTf)₃-Catalyzed Conjugate Allylation of Alkylidene Meldrum's Acids. *Org. Lett.* **2009**, *11* (9), 1919–1922.
- (159) Mahoney, S. J.; Lou, T.; Bondarenko, G.; Fillion, E. Carbon-Based Leaving Group in Substitution Reactions: Functionalization of Sp³-Hybridized Quaternary and Tertiary Benzylic Carbon Centers. *Org. Lett.* **2012**, *14* (13), 3474–3477.
- (160) Oikawa, Y.; Hirasawa, H.; Yonemitsu, O. Meldrum's Acid in Organic Synthesis. 1. A Convenient One-Pot Synthesis of Ethyl Indolepropionates. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (20), 1759–1762.
- (161) Bartoli, G.; Dalpozzo, R.; Nardi, M. Applications of Bartoli Indole Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (13), 4728.

- (162) Abe, T.; Nakamura, S.; Yanada, R.; Choshi, T.; Hibino, S.; Ishikura, M. One-Pot Construction of 3,3'-Bisindolylmethanes through Bartoli Indole Synthesis. *Org. Lett.* **2013**, *15* (14), 3622–3625.
- (163) Xia, D.; Wang, Y.; Du, Z.; Zheng, Q.-Y.; Wang, C. Rhenium-Catalyzed Regiodivergent Addition of Indoles to Terminal Alkynes. *Org. Lett.* **2012**, *14* (2), 588–591.
- (164) Xie, M.-H.; Xie, F.-D.; Lin, G.-F.; Zhang, J.-H. Convenient Synthesis of Bis(indolyl)alkanes and Bis(pyrrolyl)alkanes by Cu(OTf)₂-Catalyzed Addition of Indole and Pyrrole to Acetylenic Sulfone. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (8), 1213–1215.
- (165) Guchhait, S. K.; Kashyap, M.; Kamble, H. ZrCl₄-Mediated Regio- and Chemoselective Friedel–Crafts Acylation of Indole. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (11), 4753–4758.
- (166) Ketcha, D. M.; Gribble, G. W. A Convenient Synthesis of 3-Acylindoles via Friedel Crafts Acylation of 1-(Phenylsulfonyl)indole. A New Route to Pyridocarbazole-5,11-Quinones and Ellipticine. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (26), 5451–5457.
- (167) Dupeyre, G.; Chabot, G. G.; Thoret, S.; Cachet, X.; Seguin, J.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Scherman, D.; Koch, M.; Michel, S. Synthesis and Biological Evaluation of (3,4,5-Trimethoxyphenyl)indol-3-ylmethane Derivatives as Potential Antivascular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (13), 4410–4426.
- (168) Ty, N.; Dupeyre, G.; Chabot, G. G.; Seguin, J.; Tillequin, F.; Scherman, D.; Michel, S.; Cachet, X. Synthesis and Biological Evaluation of New Disubstituted Analogues of 6-Methoxy-3-(3',4',5'-Trimethoxybenzoyl)-1H-Indole (BPROL075), as Potential Antivascular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (15), 7494–7503.
- (169) Le Borgne, M.; Marchand, P.; Delevoye-Seiller, B.; Robert, J.-M.; Le Baut, G.; Hartmann, R. W.; Palzer, M. New Selective Nonsteroidal Aromatase Inhibitors: Synthesis and Inhibitory Activity of 2,3 or 5-(α -Azolylbenzyl)-1H-Indoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (3), 333–336.
- (170) Dhiman, S.; Ramasastry, S. S. V. Di- and Triheteroarylalkanes via Self-Condensation and Intramolecular Friedel–Crafts Type Reaction of Heteroaryl Alcohols. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (46), 8030.
- (171) Dupeyre, G. Synthèse et évaluation biologique d'analogues indoliques de la combrétastatine A-4 à potentialité antivasculaire, Université Paris Descartes. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques: Paris, **2006**.
- (172) Fusco, R.; Sannicolo, F. Rearrangement of Arylhydrazones of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds in Polyphosphoric Acid. 6. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (23), 4374–4378.
- (173) Liou, J.-P.; Chang, Y.-L.; Kuo, F.-M.; Chang, C.-W.; Tseng, H.-Y.; Wang, C.-C.; Yang, Y.-N.; Chang, J.-Y.; Lee, S.-J.; Hsieh, H.-P. Concise Synthesis and Structure–Activity

- Relationships of Combretastatin A-4 Analogues, 1-Aroylindoles and 3-Aroylindoles, as Novel Classes of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (17), 4247–4257.
- (174) Yang, C.; Patel, H. H.; Ku, Y.-Y.; Shah, R.; Sawick, D. The Use of Lewis Acid in the Reaction of Zinc Salts of Indoles and Acyl Chloride. *Synth. Commun.* **1997**, *27* (12), 2125–2132.
- (175) Saulnier, M. G.; Gribble, G. W. Generation and Reactions of 3-Lithio-1-(Phenylsulfonyl)indole. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (5), 757–761.
- (176) Wang, C.; Wang, S.; Li, H.; Yan, J.; Chi, H.; Chen, X.; Zhang, Z. Copper-Catalyzed Decarboxylative C3-Acylation of Free (N–H) Indoles with α -Oxocarboxylic Acids. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (11), 1721.
- (177) Gribble, G. W.; Silva, R. A.; Saulnier, M. G. Intramolecular Diels-Alder Reactions of 4H-Furo[3,4-B]indoles. New Syntheses of Benzo[a]carbazoles and Benzo[c]carbazoles. *Synth. Commun.* **1999**, *29* (4), 729–747.
- (178) Zhang, F.-L.; Wang, Y.-F.; Lonca, G. H.; Zhu, X.; Chiba, S. Amide Synthesis by Nucleophilic Attack of Vinyl Azides. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (17), 4479–4483.
- (179) Comins, D. L.; Stroud, E. D. Synthesis of 3-Substituted Indoles via N-Acyliindolium Ions. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (17), 1869–1872.
- (180) Chen, C.; Feng, H.-X.; Li, Z.-L.; Cai, P.-W.; Liu, Y.-K.; Shan, L.-H.; Zhou, X.-L. A Highly Efficient Route to C-3 Alkyl-Substituted Indoles via a Metal-Free Transfer Hydrogenation. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (28), 3774–3776.
- (181) Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Yoshida, A.; Sato, S. Halogen-Magnesium Exchange Reaction of Iodoindole Derivatives. *HETEROCYCLES* **1996**, *42* (1), 105.
- (182) Kondo, Y.; Takazawa, N.; Yoshida, A.; Sakamoto, T. Preparation and Reactions of Lithium Indolyl(dimethyl)zincates. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1995**, No. 10, 1207.
- (183) Tricotet, T.; O'Shea, D. F. Automated Generation and Reactions of 3-Hydroxymethylindoles in Continuous-Flow Microreactors. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16* (22), 6678–6686.
- (184) Krasovskiy, A.; Knochel, P. Eine LiCl-vermittelte Br/Mg-Austauschreaktion zur Herstellung funktionalisierter Aryl- und Heteroarylmagnesium-Verbindungen ausgehend von organischen Bromiden. *Angew. Chem.* **2004**, *116* (25), 3396–3399.
- (185) Amat, M.; Hadida, S.; Sathyanarayana, S.; Bosch, J. Preparation and Reactions of 1-(Tert-Butyldimethylsilyl)-3-Lithioindole. Regioselective Synthesis of 3-Substituted Indoles. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (1), 10–11.

- (186) Guo, Q.-X.; Peng, Y.-G.; Zhang, J.-W.; Song, L.; Feng, Z.; Gong, L.-Z. Highly Enantioselective Alkylation Reaction of Enamides by Brønsted-Acid Catalysis. *Org. Lett.* **2009**, *11* (20), 4620–4623.
- (187) Bandini, M.; Sinisi, R. Efficient Guanidine-Catalyzed Alkylation of Indoles with Fluoromethyl Ketones in the Presence of Water. *Org. Lett.* **2009**, *11* (10), 2093–2096.
- (188) Elayaraja, R.; Joel Karunakaran, R. Cesium Carbonate Mediated Synthesis of 3-(α -Hydroxyaryl)indoles. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (51), 6901–6904.
- (189) Zhuo, M.-H.; Jiang, Y.-J.; Fan, Y.-S.; Gao, Y.; Liu, S.; Zhang, S. Enantioselective Synthesis of Triarylmethanes by Chiral Imidodiphosphoric Acids Catalyzed Friedel–Crafts Reactions. *Org. Lett.* **2014**, *16* (4), 1096–1099.
- (190) Downey, C. W.; Poff, C. D.; Nizinski, A. N. Friedel–Crafts Hydroxyalkylation of Indoles Mediated by Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (20), 10364–10369.
- (191) Han, X.; Li, H.; Hughes, R. P.; Wu, J. Gallium(III)-Catalyzed Three-Component (4+3) Cycloaddition Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (41), 10390–10393.
- (192) Nie, J.; Zhang, G.-W.; Wang, L.; Fu, A.; Zheng, Y.; Ma, J.-A. A Perfect Double Role of CF₃ Groups in Activating Substrates and Stabilizing Adducts: The Chiral Brønsted Acid-Catalyzed Direct Arylation of Trifluoromethyl Ketones. *Chem. Commun.* **2009**, No. 17, 2356.
- (193) Li, H.; Wang, Y.-Q.; Deng, L. Enantioselective Friedel–Crafts Reaction of Indoles with Carbonyl Compounds Catalyzed by Bifunctional Cinchona Alkaloids. *Org. Lett.* **2006**, *8* (18), 4063–4065.
- (194) Zeng, X.-F.; Ji, S.-J.; Wang, S.-Y. Novel Method for Synthesis of Unsymmetrical Bis(indolyl)alkanes Catalyzed by Ceric Ammonium Nitrate (CAN) under Ultrasonic Irradiation. *Tetrahedron* **2005**, *61* (43), 10235–10241.
- (195) Bandgar, B. P.; Patil, A. V.; Kamble, V. T. Fluoroboric acid adsorbed on silica gel catalyzed synthesis of bisindolyl alkanes under mild and solvent-free conditions. *ARKIVOC*. January 12, **2008**, pp 252–259.
- (196) Sun, F.-L.; Zheng, X.-J.; Gu, Q.; He, Q.-L.; You, S.-L. Enantioselective Synthesis of Unsymmetrical Triarylmethanes by Chiral Brønsted Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (1), 47–50.
- (197) Deb, M.; Bhuyan, P. A Novel and Efficient Method for the Synthesis of Unsymmetrical Diindolylmethanes and Heterocyclic(indolyl)alkanes. *Synthesis* **2008**, *2008* (18), 2891–2898.

- (198) Deb, M. L.; Bhuyan, P. J. Uncatalyzed Michael Addition of Indoles: Synthesis of Some Novel 3-Alkylated Indoles via a Three-Component Reaction in Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (12), 2159–2163.
- (199) Lin, H.; Zang, Y.; Sun, X.; Lin, G. Highly Efficient Synthesis of Unsymmetrical 3,3'-Bis(1-*H*-Indol-3-yl)methanes in Water. *Chin. J. Chem.* **2012**, 30 (10), 2309–2314.
- (200) Noland, W. E.; Johnson, J. E. 3-(Indolyl)-Phthalides and (2-Carboxybenzyl)-Indoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82 (19), 5143–5147.
- (201) Marrelli, M. Progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di nuovi carbazoli. Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université Paris Descartes: Paris, **2011**.
- (202) Ty, N. Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux analogues contraints de la combretastatine A4 à potentialité antivasculaire. Thèse de doctorat : Chimie thérapeutique, Université Paris Descartes. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques: Paris, **2009**.
- (203) Ty, N.; Dupeyre, G.; Chabot, G. G.; Seguin, J.; Quentin, L.; Chiaroni, A.; Tillequin, F.; Scherman, D.; Michel, S.; Cachet, X. Structure–activity Relationships of Indole Compounds Derived from Combretastatin A4: Synthesis and Biological Screening of 5-phenylpyrrolo[3,4-*A*]carbazole-1,3-Diones as Potential Antivascular Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (9), 3726–3739.
- (204) Bardiot, D.; Carlens, G.; Dallmeier, K.; Kaptein, S.; McNaughton, M.; Marchand, A.; Neyts, J.; Smets, W. Synthesis Route for 885275-10-5. WO2013/45516 A1, **2013**.
- (205) Liu, C.; Lin, J.; Delucca, G. V.; Batt, D. G.; Liu, Q. Carboline Carboxamide Compounds Useful as Kinase Inhibitors. WO2011159857 A1, déc **2011**.
- (206) Charles, M. D.; Schultz, P.; Buchwald, S. L. Efficient Pd-Catalyzed Amination of Heteroaryl Halides. *Org. Lett.* **2005**, 7 (18), 3965–3968.
- (207) Marrelli, M.; Cachet, X.; Conforti, F.; Sirianni, R.; Chimento, A.; Pezzi, V.; Michel, S.; Statti, G. A.; Menichini, F. Synthesis of a New Bis(indolyl)methane That Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Nat. Prod. Res.* **2013**, 27 (21), 2039–2045.
- (208) Dupeyre, G.; Lemoine, P.; Ainseba, N.; Michel, S.; Cachet, X. A One-Pot Synthesis of 7-phenylindolo[3,2-*A*]carbazoles from Indoles and β -Nitrostyrenes, via an Unprecedented Reaction Sequence. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (22), 7780.
- (209) Zolfigol, M. A.; Salehi, P.; Shiri, M. An Efficient Procedure for the Preparation of Mono, and Di-bis-indolylmethanes Catalyzed by Molibdatophosphoric Acid. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2004**, 179 (11), 2273–2277.

- (210) Furst, L.; Narayanam, J. M. R.; Stephenson, C. R. J. Total Synthesis of (+)-Gliocladin C Enabled by Visible-Light Photoredox Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (41), 9655–9659.
- (211) Pratihari, S. Triggering the Approach of an Arene or Heteroarene towards an Aldehyde via Lewis Acid–aldehyde Communication. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (10), 2854–2865.
- (212) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J., 2007.
- (213) Shiri, M.; Zolfigol, M. A.; Kruger, H. G.; Tanbakouchian, Z. Bis- and Trisindolylmethanes (BIMs and TIMs) [†]. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (4), 2250–2293.
- (214) Crossland, R. K.; Servis, K. L. Facile Synthesis of Methanesulfonate Esters. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (9), 3195–3196.
- (215) Hubbard, P.; Brittain, W. J. Mechanism of Amine-Catalyzed Ester Formation from an Acid Chloride and Alcohol. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (3), 677–683.
- (216) Fischer, E.; Wagner, P. Ueber Rosindole. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20* (1), 815–818.
- (217) König, W. Beiträge Zur Kenntnis Der Reaktionsfähigkeit Des in β -Stellung Nicht Substituierten Pyrrolrings. *J. Für Prakt. Chem.* **1911**, *84* (1), 194–219.
- (218) König, W. Über „vinylhomologe“ Indol- und Pyrrol-Farbstoffe. *Z. Für Angew. Chem.* **1925**, *38* (35), 743–748.
- (219) Kiang, A. K.; Mann, F. G. 121. The Action of Acyl Cyanides on 2- and 1 : 2-Substituted Indoles. Part I. *J. Chem. Soc. Resumed* **1953**, 594.
- (220) He, X.; Hu, S.; Liu, K.; Guo, Y.; Xu, J.; Shao, S. Oxidized Bis(indolyl)methane: A Simple and Efficient Chromogenic-Sensing Molecule Based on the Proton Transfer Signaling Mode. *Org. Lett.* **2006**, *8* (2), 333–336.
- (221) Lee, J. W.; Park, S. Y.; Cho, B.-K.; Kim, J. S. Dual Colorimetric Sensing bis(indolyl)calix[4]crown-6. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (14), 2541–2546.
- (222) Martínez, R.; Espinosa, A.; Tárraga, A.; Molina, P. Bis(indolyl)methane Derivatives as Highly Selective Colourimetric and Ratiometric Fluorescent Molecular Chemosensors for Cu²⁺ Cations. *Tetrahedron* **2008**, *64* (9), 2184–2191.
- (223) Wang, L.; He, X.; Guo, Y.; Xu, J.; Shao, S. Anion Binding and Sensing Properties of Bis(3-Indolyl)methane Derivatives Based on Proton Transfer Process. *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8* (1), 60–65.
- (224) Wang, L.; He, X.; Guo, Y.; Xu, J.; Shao, S. pH-Responsive Chromogenic-Sensing Molecule Based on Bis(indolyl)methane for the Highly Selective Recognition of Aspartate and Glutamate. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 218–221.

- (225) Fu, P. P.; Harvey, R. G. Dehydrogenation of Polycyclic Hydroaromatic Compounds. *Chem. Rev.* **1978**, *78* (4), 317–361.
- (226) Cheng, D.; Bao, W. ChemInform Abstract: Highly Efficient Metal-Free Cross-Coupling by C-H Activation Between Allylic and Active Methylenic Compounds Promoted by DDQ. *ChemInform* **2008**, *39* (44).
- (227) Silveira, C. C.; Mendes, S. R.; Villetti, M. A.; Back, D. F.; Kaufman, T. S. CeIII-Promoted Oxidation. Efficient Aerobic One-Pot Eco-Friendly Synthesis of Oxidized Bis(indol-3-Yl)methanes and Cyclic Tetra(indolyl)dimethanes. *Green Chem.* **2012**, *14* (10), 2912.
- (228) Silveira, C. C.; Mendes, S. R. Catalytic Oxidation of Thiols to Disulfides Using Iodine and CeCl₃·7H₂O in Graphite. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (42), 7469–7471.
- (229) Khorshidi, A.; Mardazad, N.; Shaabanzadeh, Z. Zirconium(IV)-Catalyzed One-Pot Synthesis and Oxidation of Bis- and Tris(indolyl)methanes into Conjugated Chromophores as New pH Indicators or Calorimetric Chemosensors for Transition Metals. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (29), 3873–3877.
- (230) Gillespie, D. E.; Brady, S. F.; Bettermann, A. D.; Cianciotto, N. P.; Liles, M. R.; Rondon, M. R.; Clardy, J.; Goodman, R. M.; Handelsman, J. Isolation of Antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (9), 4301–4306.
- (231) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Murthy, C. V. S. R.; Kumar, G. M.; Madan, C. ChemInform Abstract: Lithium Perchlorate Catalyzed Reactions of Indoles: An Expedient Synthesis of Bis(indolyl)methanes. *ChemInform* **2010**, *32* (33), no-no.
- (232) Lavrenov, S. N.; Luzikov, Y. N.; Bykov, E. E.; Reznikova, M. I.; Stepanova, E. V.; Glazunova, V. A.; Volodina, Y. L.; Tatarsky, V. V.; Shtil, A. A.; Preobrazhenskaya, M. N. Synthesis and Cytotoxic Potency of Novel tris(1-Alkylindol-3-Yl)methylum Salts: Role of N-Alkyl Substituents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (18), 6905–6913.
- (233) Stepanova, E. V.; Shtil', A. A.; Lavrenov, S. N.; Bukhman, V. M.; Inshakov, A. N.; Mirchink, E. P.; Trenin, A. S.; Galatenko, O. A.; Isakova, E. B.; Glazunova, V. A.; Dezhenkova, L. G.; Solomko, E. S.; Bykov, E. E.; Preobrazhenskaya, M. N. Tris(1-Alkylindol-3-Yl)methylum Salts as a Novel Class of Antitumor Agents. *Russ. Chem. Bull.* **2010**, *59* (12), 2259–2267.
- (234) Inamoto, T.; Papineni, S.; Chintharlapalli, S.; Cho, S.-D.; Safe, S.; Kamat, A. M. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-Chlorophenyl)methane Activates the Orphan Nuclear Receptor Nurr1 and Inhibits Bladder Cancer Growth. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7* (12), 3825–3833.

- (235) Lee, S.-O.; Li, X.; Hedrick, E.; Jin, U.-H.; Tjalkens, R. B.; Backos, D. S.; Li, L.; Zhang, Y.; Wu, Q.; Safe, S. Diindolylmethane Analogs Bind NR4A1 and Are NR4A1 Antagonists in Colon Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28* (10), 1729–1739.
- (236) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. ed., 4. print.; Springer: New York, NY, **2010**.
- (237) McCammon, J. A. Target Flexibility in Molecular Recognition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1754* (1–2), 221–224.
- (238) Schames, J. R.; Henchman, R. H.; Siegel, J. S.; Sottriffer, C. A.; Ni, H.; McCammon, J. A. Discovery of a Novel Binding Trench in HIV Integrase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (8), 1879–1881.
- (239) Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. EADock: Docking of Small Molecules into Protein Active Sites with a Multiobjective Evolutionary Optimization. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2007**, *67* (4), 1010–1025.
- (240) Sirockin, F.; Sich, C.; Improta, S.; Schaefer, M.; Saudek, V.; Froloff, N.; Karplus, M.; Dejaegere, A. Structure Activity Relationship by NMR and by Computer: A Comparative Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (37), 11073–11084.
- (241) Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (suppl), W270–W277.
- (242) Cavarelli, J. Cristallographie des macromolécules biologiques. *Techniques de l'Ingénieur*. March 10, **2000**, p 1090 pp 1-20.
- (243) McPherson, A. Increasing the Size of Microcrystals by Fine Sampling of pH Limits. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28* (3), 362–365.
- (244) Lanig, H.; Reisen, F.; Whitley, D.; Schneider, G.; Banting, L.; Clark, T. In Silico Adoption of an Orphan Nuclear Receptor NR4A1. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0135246.
- (245) Brady, S. F.; Wagenaar, M. M.; Singh, M. P.; Janso, J. E.; Clardy, J. The Cytosporones, New Octaketide Antibiotics Isolated from an Endophytic Fungus. *Org. Lett.* **2000**, *2* (25), 4043–4046.
- (246) Huang, H.; Zhang, L.; Zhang, X.; Ji, X.; Ding, X.; Shen, X.; Jiang, H.; Liu, H. Total Synthesis of Cytosporone B. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28* (6), 1041–1043.
- (247) Liu, J. j.; Zeng, H. n.; Zhang, L. r.; Zhan, Y. y.; Chen, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Xiang, S. h.; Liu, W. j.; Wang, W. j.; Chen, H. z.; Shen, Y. m.; Su, W. j.; Huang, P. q.; Zhang, H. k.; Wu, Q. A Unique Pharmacophore for Activation of the Nuclear Orphan Receptor Nur77 In Vivo and In Vitro. *Cancer Res.* **2010**, *70* (9), 3628–3637.

- (248) Xia, Z.; Cao, X.; Rico-Bautista, E.; Yu, J.; Chen, L.; Chen, J.; Bobkov, A.; Wolf, D. A.; Zhang, X.-K.; Dawson, M. I. Relative Impact of 3- and 5-Hydroxyl Groups of Cytosporone B on Cancer Cell Viability. *Med Chem Commun* **2013**, *4* (2), 332–339.
- (249) Gallastegui, N.; Mackinnon, J. A. G.; Fletterick, R. J.; Estébanez-Perpiñá, E. Advances in Our Structural Understanding of Orphan Nuclear Receptors. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40* (1), 25–35.
- (250) Kabsch, W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 133–144.
- (251) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 125–132.
- (252) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP 4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–242.
- (253) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (4), 486–501.

Résumé :

Le diindolylméthane (DIM) est un composé non naturel issu de l'autocondensation de l'indole-3-carbinol, lui-même issu de l'hydrolyse de la glucobrassicine, un glucosinolate présent dans de nombreuses Brassicaceae alimentaires tels que les choux de Bruxelles, choux-fleurs etc. Des études épidémiologiques américaines ont montré que la consommation hebdomadaire d'au moins trois portions de ce type de légumes diminuait le risque de cancer de la prostate de 41 %. *In vitro*, le diindolylméthane inhibe la croissance des cellules de prostate hormono-dépendantes LnCaP en agissant comme inhibiteur compétitif de la dihydrotestotérone. L'introduction d'un groupement phényle au niveau du carbone central (PhéDIM) élimine tout effet hormonal, bien que des effets antiprolifératifs soient observés. Les composés synthétisés à ce jour sont pour l'essentiel des agonistes du récepteur PPAR γ , d'autres étant des agonistes du récepteur nucléaire orphelin NR4A1, récepteur souvent surexprimé dans les cellules cancéreuses du poumon, de la prostate et du colon. Le sujet de cette thèse a porté sur la synthèse de nouveaux PhéDIMs symétriques et non symétriques en série racémique et à leur évaluation biologique comme agents pro-apoptotiques potentiels. Une partie du travail a également porté sur l'étude de l'interaction avec le domaine LBD du récepteur NR4A1, cible protéique potentielle de ces molécules. Pour cela nous avons procédé à une étude de constante de dissociation (*Kd*) par quenching de fluorescence, des études de docking *in silico*, ainsi qu'à des essais de co-cristallisation, dans le but d'obtenir une structure par diffraction aux rayons X satisfaisante permettant une étude prédictive des relations structure-activité dans cette série. Un des nouveaux PhéDIMs symétriques préparés (**234**) inhibe la croissance des cellules humaines du cancer du pancréas Mia-Paca-2 et les cellules humaines du cancer du côlon HT-29 à des concentrations submicromolaires. (CI50 respectives de 0,6 μ M et 0,9 μ M) et son activité pro-apoptotique a été évaluée sur les caspases-3 et -7. Le *Kd* est de l'ordre du micromolaire, mais les essais de co-cristallisation avec NR4A1 ne sont pas encore concluants. Par ailleurs, une partie des travaux a aussi porté sur la mise au point de nouvelles conditions de synthèse de PhéDIMs non symétriques. La méthode de synthèse développée s'avère efficace et a été appliquée à la synthèse de nouveaux dérivés. Enfin, une autre partie de nos travaux a porté sur l'étude de l'oxydation des PhéDIMs (PhéDIMOx). En effet, cette oxydation se produit spontanément et partiellement à l'air mais les informations bibliographiques disponibles dans la littérature à ce sujet sont peu abondantes voire incomplètes. Or, ces phénomènes d'oxydation pourraient avoir un impact sur leurs propriétés biologiques. À ce jour, nous avons réalisé l'oxydation de plusieurs PhéDIMs (symétriques et non symétriques), et élucidé, par RMN, spectrométrie de masse et diffraction aux RX, la structure des PhéDIMs oxydés qui se présenteraient sous forme de carbinol. Certains PhéDIMOx ont montré une activité inhibitrice sur les cellules Mia Paca-2 à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Discipline :

Pharmacognosie

Mots-clés :

Phényldiindolylméthanes, carbinol, cytotoxicité, apoptose, NR4A1

Adresse de l'auteur :

1 rue Thomas Édison 94000 Créteil